



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

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

Tese de Doutorado

Síntese e caracterização de nanopartículas de vidro bioativo contendo Ca e Mn e incorporação em hidrogéis injetáveis de Pluronic® F127

Autora: Priscilla Mol Queiroz

Orientadora: Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira

Belo Horizonte - MG

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

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

Priscilla Mol Queiroz

“Síntese e caracterização de nanopartículas de vidro bioativo contendo Ca e Mn e incorporação em hidrogéis injetáveis de Pluronic® F127”

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

Área de Concentração: Ciência dos Materiais

Orientadora: Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira

Belo Horizonte – MG

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Engenharia

2021

Q3s	Queiroz, Priscilla Mol. Síntese e caracterização de nanopartículas de vidro bioativo contendo Ca e Mn e incorporação em hidrogéis injetáveis de Pluronic® F-127 [recurso eletrônico] / Priscilla Mol Queiroz. -- 2021. 1 recurso online (119 f. : il., color.) : pdf. Orientadora: Marivalda de Magalhães Pereira. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia. Bibliografia: f. 106-119. Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader. 1. Materiais - Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses. 3. Hidrogéis - Teses. 4. Manganês - Teses. 5. Nanocompósitos (Materiais) - Teses. 6. Vidros bioativos - Teses. I. Pereira, Marivalda de Magalhães, 1960-. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título. CDU: 620(043)
-----	---

Ficha catalográfica elaborada pelo bibliotecário Reginaldo César Vital dos Santos CRB/6 2165

Biblioteca Prof. Mário Werneck, Escola de Engenharia da UFMG



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



Tese intitulada "Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Vidro Bioativo Contendo Ca e Mn e Incorporação em Hidrogéis Injetáveis de Pluronic F-127", área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais, apresentada pela candidata Priscilla Mol Queiroz, para obtenção do grau de Doutora em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, aprovada pela comissão examinadora constituída pelos seguintes membros:

Profª Marivalda de Magalhães Pereira
Orientadora - PhD (UFMG)

Prof. Rodrigo Lambert Oréfice
PhD (UFMG)

Prof. Eduardo Henrique Martins Nunes
Dr. (UFMG)

Profª Eliane Ayres
Drª (UEMG)

Talita Martins
Drª (Faculdade Pitágoras)

Breno Barrioni
Dr. (Pós-Doc UFMG)

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

Belo Horizonte, 15 de setembro de 2021

AGRADECIMENTOS

Finalizando essa etapa de tanto aprendizado e crescimento, só consigo pensar em como sou grata por todos esses anos, por cada pessoa que reencontrei e que conheci, tantas pessoas que construíram comigo esse caminho e que sem as quais, com certeza, não teria chegado até aqui!

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu marido Thiago e a minha princesa Bia, meus amores, por todo apoio e incentivo e também pela compreensão nos momentos em que precisei me dedicar totalmente aos estudos. Mas principalmente, queria agradecer por serem minha alegria e minha força!

Um agradecimento especial aos meus pais Ernesto e Fátima e minhas irmãs Vivi e Carol meus maiores incentivadores desde sempre. Vocês são meus exemplos e inspiração! Às minhas princesinhas Luiza e Isabela, que está chegando, por encherem a vida da titia de amor.

À minha querida orientadora Marivalda de Magalhães Pereira por me aceitar no melhor grupo de pesquisa! Por sempre confiar no meu trabalho e apoiar todos os meus projetos. Além da admiração pela pesquisadora incrível e reconhecida que você é, esses 4 anos fizeram nascer uma amizade e uma grande admiração pela pessoa humana e de enorme coração!

Ao professor Eduardo e sua esposa Patrícia, pela amizade verdadeira que nasceu durante esses anos e pela ajuda na construção desse trabalho. Aos professores Rodrigo Orefice e Herman Mansur, pela disponibilidade e apoio nas análises. À Alexandra Mansur pela análise de XPS.

Aos professores e profissionais do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais que contribuíram para conclusão desse trabalho. Em especial à Cida pelo apoio, à Patrícia do MEV pela amizade e dedicação para realizar as análises. Ao Samuel pela disponibilidade nas análises de DRX.

À Cláudia, Felipe e Hellen pelas análises de ICP-OES realizadas no Laboratório de Análises Químicas (LAQ – DEMET - UFMG) e pela disponibilidade de infraestrutura.

Aos professores Alfredo e Dawidson do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG), e à Thalita Marcolan no desenvolvimento das análises biológicas.

À professora Glaura e Jésus Nuncira do CTNano pelo apoio nas análises reológicas.

Aos queridos amigos do LabBio, por serem uma verdadeira equipe, cada um deixou uma contribuição nesse trabalho, mas especialmente pela amizade, por cada momento, cada risada! Vocês têm para sempre um lugar especial no meu coração: Andreia, Ingrid, Diogo, Layla, Sandhra. À Talita e Cheisy que sempre estiveram disponíveis para ajudar em todos os momentos. À Amanda por caminharmos juntas nesses tempos difíceis de pandemia, ao Iuri e à Michelle pelas contribuições nas sínteses e ensaios. Um agradecimento especial ao Breno pela dedicação a esse trabalho, por todos os ensinamentos e conselhos e à Agda por ter aberto essa porta maravilhosa que mudou a minha vida.

Ao Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e ao PPGEM agradeço pela oportunidade e suporte ao desenvolvimento do trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Acima de tudo agradeço à Deus por tantas bênçãos na minha vida!

RESUMO

Vidros bioativos mesoporosos têm demonstrado grande potencial para regeneração tecidual devido à sua capacidade de se ligar ao osso em ambiente fisiológico e estimular o reparo ósseo. A incorporação de diferentes íons com propriedades terapêuticas específicas na estrutura de vidros bioativos é uma estratégia para aprimorar o seu desempenho para aplicações específicas. Dentre os diferentes íons com atividades fisiológicas, a incorporação de íon manganês tem mostrado respostas biológicas favoráveis a diferenciação osteogênica. Ainda com propósito de obtenção de um biomaterial com propriedades aprimoradas do ponto de vista de aplicação e desempenho, a incorporação de partículas de vidro bioativo a matrizes poliméricas injetáveis permite uma alternativa de aplicação minimamente invasiva diretamente no local onde o material é necessário. Nesse trabalho, diferentes composições de nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo contendo manganês foram produzidas para avaliação da influência da incorporação desse íon sobre a estrutura e propriedades do material. Análise morfológicas e estruturais confirmaram a obtenção de nanopartículas mesoporosas esféricas de vidro bioativo. Foi verificada a presença de Mn na estrutura o vidro bioativo, bem como a formação de óxidos de manganês de acordo com a concentração de Mn utilizada. Os resultados *in vitro* mostraram capacidade de liberação controlada de íons e bioatividade em meio fisiológico. Ensaios celulares mostraram efeito dose dependente de manganês sobre viabilidade celular e atividade de fosfatase alcalina. Finalmente as nanopartículas de vidro bioativo foram incorporadas em hidrogéis poliméricos termossensíveis para obtenção de novos nanocompósitos injetáveis. Diferentes formulações de um novo nanocompósito obtidas a partir da incorporação de vidro bioativo em um hidrogel sintético de *Pluronic*® F-127 foram avaliadas. Foram obtidos hidrogéis com até 89 % de porosidade e ensaios reológicos e de injetabilidade comprovaram a viabilidade para aplicação dos nanocompósitos de forma minimamente invasivas através de seringas. A adição de nanopartículas de vidro bioativo aprimorou as propriedades elásticas e estabilidade dos hidrogéis à temperatura corporal, com aumento do módulo do módulo de elasticidade G' e tempo de residência, avaliado em ensaio de perda de massa. Além disso, a incorporação de vidro bioativo não comprometeu a viscosidade a baixas temperaturas, permitindo injeção suave e gelificação dentro de faixas de temperatura e tempo adequados a aplicações biomédicas. Diante dos resultados obtidos, os nanocompósitos produzidos apresentam potencial para utilização como materiais injetáveis para aplicação em regeneração óssea.

Palavras-chave: vidro bioativo; manganês; nanocompósito injetável; hidrogel termossensível; *Pluronic*[®] F-127.

ABSTRACT

Mesoporous bioactive glasses have shown great potential for tissue regeneration due to their ability to bind to the bone in physiological environment and to stimulate bone repair. The incorporation of different ions with specific therapeutic properties in the bioactive glass network is a strategy to improve the material performance for specific applications. Among the different ions with physiological activities, the manganese ions incorporation has shown to enhance biological responses by favoring osteogenic differentiation. In addition, aiming to obtain a biomaterial with improved properties in terms of application and performance, the incorporation of bioactive glass particles into injectable polymeric matrices allows for a minimally invasive application alternative directly to the place where the material is needed. In this work, different compositions of bioactive glass mesoporous nanoparticles containing manganese were produced to evaluate the Mn influence on the bioactive glass structure and properties. Morphological and structural analysis confirmed that spherical bioactive glass mesoporous nanoparticles were obtained. The Mn presence in the bioactive glass structure was verified, as well as the manganese oxides formation according to the Mn concentration used. In vitro results showed controlled ion release capacity and bioactivity in physiological medium. Cellular assays showed a manganese dose-dependent effect on cell viability and alkaline phosphatase activity. Finally, the bioactive glass nanoparticles were incorporated into a Pluronic® F-127 hydrogel to obtain a new nanocomposite. The material was evaluated for structural characterization, thermosensitive behavior and injection capacity. Hydrogels of up to 89 % porosity were obtained and rheological and injectability tests proved the material feasibility for a minimally invasive administration through syringes. Moreover, the bioactive glass nanoparticles addition improved the hydrogels elastic properties and stability at body temperature, showing an increase in the elasticity modulus (G') and residence time, evaluated by a mass loss assay. Furthermore, the viscosity at low temperatures was not compromised by the bioactive glass incorporation, allowing a smooth injection and suitable gelation temperature and time for biomedical applications. Considering the obtained results, the produced nanocomposites have great potential for use as injectable devices for bone regeneration.

Keywords: bioactive glass; manganese; injectable nanocomposite; thermosensitive hydrogel; Pluronic® F-127.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura esquemática da rede do vidro bioativo (adaptado de BARRIONI; OLIVEIRA; PEREIRA, 2016).....	27
Figura 3.2. Esquema das reações para formação da rede de vidro bioativo a partir de TEOS (adaptado de JONES, 2013).	28
Figura 3.3. Representação esquemática da resposta biológica dos produtos de dissolução iônica do vidro bioativo (adaptado de BAINO, 2018).	30
Figura 3.4. Diagrama de equilíbrio de fases para sistemas poliméricos LCST e UCST. (adaptado de GIBSON; O'REILLY, 2013).	34
Figura 3.5. Estrutura química do copolímero PLU.....	36
Figura 3.6. Ilustração esquemática da formação de micelas com aquecimento de uma hidrogel PLU (adaptado JUNG et al., 2017).	37
Figura 3.7. Estrutura molecular de um copolímero tribloco Pluronic® (à esquerda) e a grade Pluronic® (direita; código de cores do estado físico dos copolímeros em condições ambiente: verde = líquido; vermelho = pasta; laranja = floco) (adaptado de PITTO-BARRY; BARRY, 2014).	39
Figura 4.1. Esquema de síntese das nanopartículas de vidro bioativo: a) Síntese de NP-SiO ₂ por metodologia sol-gel modificada e b) Síntese de BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn por impregnação.	48
Figura 4.2. Imagens da superfície das nanopartículas de vidro bioativo obtidas por MEV para a) NP-SiO ₂ , b) BG1Ca, c) BG1Mn, d) BG0.5CaMn e e) BG1CaMn.	57
Figura 4.3. Imagens das nanopartículas de vidro bioativo obtidas por MET para a) NP-SiO ₂ , b) BG1Ca, c) BG1Mn, d) BG0.5CaMn e e) BG1CaMn.	58
Figura 4.4. Espectros de FTIR das amostras NP-SiO ₂ , BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn.	60
Figura 4.5. Padrões de Difração de Raios-X (DRX) das amostras NP-SiO ₂ , BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn.	62
Figura 4.6. Espectros de varredura de XPS para as amostras NP-SiO ₂ , BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn.	63
Figura 4.7. Espectros de XPS de alta resolução para a) Si 2p, b) O 1s, c) Ca 2p e d) Mn 2p.	65
Figura 4.8. Isotermas de adsorção de N ₂ e distribuição de tamanho de poros (método BJH) das amostras de vidro bioativo.	68
Figura 4.9. Perfil de liberação de íons Si, Ca, P e Mn para amostras BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn em imersão de SBF.	71
Figura 4.10. Imagens de MEV e respectivos EDS antes (0 h) e após 14 de imersão em SBF para a) BG1Ca, b) BG1Mn, c) BG0.5CaMn e d) BG1CaMn.	75
Figura 4.11. Imagens de MEV e respectivos EDS de estrutura em formato de flor identificadas para as amostras a) BG1Mn e b) BG1CaMn.	76
Figura 4.12. Espectro de FTIR antes (0 h) e após (7 e 14 dias) para a) BG1Ca, b) BG1Mn, c) BG0.5CaMn e d) BG1CaMn.	77
Figura 4.13. Padrões de DRX antes (0 h) e após (7 e 14 dias) para a) BG1Ca, b) BG1Mn, c) BG0.5CaMn e d) BG1CaMn.	78
Figura 4.14. Gráficos de viabilidade celular avaliada por ensaio de MTT em três tempos (24, 48 e 72 h) e três concentrações (1000, 1500 e 2000 µg.mL ⁻¹) para a) NP-SiO ₂ , b) BG1Ca, c) BG1Mn, d) BG0.5CaMn e e) BG1CaMn. *p<0,05 vs Controle de	

viabilidade; #p<0,05 vs Controle de Citotoxicidade; Δ p<0,05 vs 1000 µg.mL ⁻¹ ; ⊕ p<0,05 vs 1500 µg.mL ⁻¹	81
Figura 4.15. a) Imagens das placas do ensaio de ALP em cultura de MC3T3-E1 expostas a meio osteogênico (Grupo controle – CTL) e ao produto iônico de BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn. Gráficos de ALP em cultura de MC3T3-E1 expostas a meio osteogênico (Controle) e ao produto iônico de BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn em b) 3 dias, c) 7 dias, d) 14 dias e e) 21 dias. *p<0,05 vs Controle; #p<0,05 vs BG1Ca; Δp<0,05 vs BG1Mn.	83
Figura 5.2. Imagens dos nanocompósitos a) 20P; b) 20PBG5; c) 20PBG10; d) 25P; e) 25PBG5; f) 25PBG10 à 15 °C e 37 °C.	90
Figura 5.3. Gráfico das temperaturas de gelificação medidas no ensaio de inversão de tubo para os nanocompósitos produzidos.	91
Figura 5.4. Desenho esquemático dos processos de micelização e gelificação.	92
Figura 5.5. Curvas de G' e G'' em função da deformação para determinação da Região de Viscoelasticidade Linear dos nanocompósitos para a) 20P e b) 25PBG10.	93
Figura 5.6. Curvas médias de G' e G'' em função da temperatura para a-b) 20P, 20PBG5 e 20PBG10; e c-d) 25P, 25PBG5 e 25PBG10, em escala liner e logarítmica.	94
Figura 5.7. a) Espectro de FTIR dos Nanocompósitos. Ampliação dos espectros de b) 1600 a 400 cm ⁻¹	98
Figura 5.8. Imagens de MEV das amostras liofilizadas de a) 20P, b) 20PBG5, c) 20PBG10, d) 25P, e) 25PBG5, f) 25PBG10.	100
Figura 5.9. Imagens 3D reconstruídas e corte transversal das amostras liofilizadas de a) 20P, b) 20PBG5, c) 20PBG10, d) 25P, e) 25PBG5, f) 25PBG10 obtidas por microtomografia.	101
Figura 5.10. Perfil de dissolução dos Nanocompósitos em imersão em SBF.	102
Figura 5.11. Gráfico representativo das curvas de força x volume extrudado dos nanocompósitos.	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Propriedades de alguns copolímeros Pluronic [®] (adaptado de HE; KIM; LEE, 2008).....	40
Tabela 4.1. Amostras de nanopartículas de vidro bioativo e respectivas razões molares utilizadas nas sínteses.....	47
Tabela 4.2. Dados de composição final em % molar das amostras de vidro bioativo..	54
Tabela 4.3. Diâmetro médio das nanopartículas de vidro bioativo conforme análises de MET e DLS, índice de polidispersão das análises de DLS e potencial zeta.	59
Tabela 4.4.4. Bandas de vibração presentes nos espectros de FTIR das amostras de vidro bioativo.	61
Tabela 4.5. Valores de energia de ligação obtidos pelos espectros de alta resolução de Si 2p, O 1s, Ca 2p e Mn 2p para as nanopartículas de vidro bioativo.	65
Tabela 4.6. Propriedades texturais obtidas pela análise de adsorção de N ₂ para as amostras de vidro bioativo.	69
Tabela 5.1. Identificação e composição das amostras de nanocompósitos.	87
Tabela 5.2. Principais parâmetros reológicos medidos para os nanocompósitos.....	95
Tabela 5.3. Principais bandas de absorbância identificadas nos espectros de FTIR dos nanocompósitos.....	98
Tabela 5.4. Dados de Porosidade fechada, porosidade aberta e porosidade total dos nanocompósitos calculados por análise de μ -CT.	101
Tabela 5.5. Força máxima medida em ensaio de injetabilidade para nanocompósitos.	105

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BFGF – fator de crescimento básico de fibroblastos
BMP-2 – proteína morfogenética óssea tipo 2
CaP – fosfato de cálcio
CMC – Concentração Crítica de Micelas
CMT - Temperatura de Micelização Crítica
DMEM – meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO – Dimetilsulfóxido
DRX – Difração de raios - X
ECM – Matriz extracelular
EDS – espectrômetro/espectrometria de energia dispersiva
FBS- soro fetal bovino
FDA – *Food and Drug Administration*
FGF – fatores de crescimento de fibroblastos
FTIR – Espectrometria do Infravermelho com Transformada de Fourier
HA – hidroxiapatita
HAC – hidroxiapatita carbonatada
hMSC – células tronco mesenquimais de medula óssea
ICP-OES – espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
LCST – temperatura de solução crítica inferior
MET – microscopia eletrônica de transmissão
MEV – microscopia eletrônica de varredura
MTT – brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
NC – nanocompósito
NP - nanopartícula
PBS – tampão fosfato-salino
PDGF – fatores de crescimento derivados de plaquetas
PDI - polidispersão
PEG – Polietileno glicol
PEO – Poli(óxido de etileno)
PLU - *Pluronic*[®]
PPO – Poli(óxido de propileno)
PNIPAM – Poli-N-isopropilacrilamida
RMN – ressonância magnética nuclear
SANS – espalhamento de nêutrons de pequeno ângulo
SAOS – células de osteosarcoma humano

SBF – Fluido corporal simulado

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SUS – sistema único de saúde

TCP – fosfato tricálcico

SUMÁRIO

SUMÁRIO	15
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	13
RESUMO	7
ABSTRACT	9
CAPÍTULO 1. Introdução	16
CAPÍTULO 2. Objetivos	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
CAPÍTULO 3. Revisão Bibliográfica	21
3.1 Uso de Biomateriais na Engenharia de Tecidos	21
3.2 Regeneração de Tecido Ósseo	22
3.3 Vidro Bioativo	25
3.4 Íons terapêuticos	30
3.5 Hidrogéis sensíveis a estímulos	32
3.6 Copolímero de Polióxido de etileno-Políoxido de propileno e Polióxido de etileno (PEO-PPO-PEO)	35
3.7 Nanocompósitos	41
CAPÍTULO 4. Estudo de nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo contendo manganês	45
4.1 Introdução	45
4.2 Materiais	46
4.3 Síntese das nanopartículas de vidro bioativo	46
4.4 Caracterização das nanopartículas de vidro bioativo	48
4.4.1 Estudo da Composição Química	48
4.4.2 Análise morfológica	49
4.4.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta	49
4.4.4 Análise Estrutural	49
4.4.5 Características texturais	50
4.4.6 Ensaio de liberação iônica e bioatividade <i>in vitro</i>	50
4.5 Ensaios de citotoxicidade e biocompatibilidade <i>in vitro</i>	51
4.6 Resultados e Discussão	53
4.7 Conclusão	84

CAPÍTULO 5.	Estudo de Nanocompósito injetável de Pluronic® F-127 e Vidro Bioativo	85
5.1	Introdução	85
5.2	Preparação do hidrogel de Pluronic® F-127	86
5.3	Obtenção do Nanocompósito de Pluronic® F-127 e Vidro Bioativo	86
5.4	Caracterização dos Nanocompósitos de Pluronic® F-127 e Vidro Bioativo	87
5.5	Resultados e Discussão	90
5.7.1	Caracterização dos Nanocompósitos de F-127 e Vidro bioativo	90
5.7.1.1	Avaliação do comportamento termossensível qualitativo	90
5.7.1.2	Avaliação do comportamento reológico dos nanocompósitos	92
5.7.1.3	Espectrometria do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	97
5.7.1.4	Análise morfológica	99
5.7.1.5	Estudo do comportamento dos Nanocompósitos em ensaio de imersão em SBF	102
5.7.1.6	Injetabilidade dos nanocompósitos	104
5.6	Conclusão	105
CAPÍTULO 6.	Considerações Finais	107
CAPÍTULO 7.	Referências bibliográficas	109

CAPÍTULO 1. Introdução

Nos últimos anos, o aumento da expectativa de vida tem provocado envelhecimento da população, com consequente aumento da necessidade de reparo de vários tecidos do organismo, como por exemplo dos tecidos ósseos, que podem sofrer degeneração devido ao desgaste, perda óssea e outras questões clínicas. Dentre os materiais que podem ser utilizados para reparo de tecidos ósseos encontram-se os vidros bioativos (VB), que apresentam grande destaque na área de implantes devido a sua ação na regeneração óssea ⁽¹⁾. Esses materiais formam uma ligação com o osso mais rapidamente do que outras cerâmicas bioativas, devido a formação de uma camada de apatita carbonatada em sua superfície quando imersos em um fluido fisiológico, que é muito semelhante à apatita no osso ⁽²⁾. Diferentes morfologias de VBs vem sendo estudadas sendo que as nanopartículas (NP) de vidro bioativo são biomateriais atraentes para um grande número de aplicações biomédicas, devido ao seu pequeno tamanho, grande área superficial específica e sua grande razão superfície-volume que lhes conferem propriedades especiais. Em particular, nanopartículas de vidro bioativos são promissores para produção de materiais compósitos, pois suas características morfológicas são propícias à incorporação homogênea em matrizes poliméricas ^(2,3).

O vidro bioativo pode ser obtido por processamento sol-gel que permite, além da produção de materiais em escala nanométrica, a obtenção de VB com composições flexíveis e a incorporação de diferentes íons metálicos com benefícios terapêuticos na rede de vidro, de tal forma que possa ser liberado de maneira controlada diretamente no local desejado através da dissolução do VB em contato com fluido corporal. Essa liberação *in situ* minimiza possíveis efeitos colaterais e é uma grande vantagem em relação a medicamentos de entrega sistêmica. O manganês é um dos vários íons terapêuticos estudados devido a seu auxílio no processo de diferenciação osteogênica, além de desempenhar um papel importante na adesão celular ⁽⁴⁾. Portanto, a incorporação de íons manganês na estrutura de vidro bioativo é uma estratégia importante na obtenção de biomateriais com propriedades aprimoradas.

Vidro bioativo tem sido muito utilizado como preenchimento de defeitos ósseos causados por trauma, defeitos congênitos, doenças como osteoporose ou remoção de tumor com objetivo principal de estimular o reparo local ⁽⁵⁾. Em geral, a aplicação é feita através de cirurgias acarretando traumas de tecidos adjacentes e dor pós-operatória. Uma alternativa muito promissora é utilização de hidrogéis injetáveis como carreador de

vidro bioativo, permitindo preenchimento de defeitos irregulares através de procedimentos minimamente invasivos ^(6,7).

Além da possibilidade administração minimamente invasiva, hidrogéis injetáveis estão em evidência em inúmeras pesquisas devido a sua capacidade de se adaptarem ao formato da cavidade onde são inseridos. Essas propriedades podem ser obtidas com utilização de materiais que respondem a estímulos ambientais, como a temperatura. Dessa forma, esses materiais se apresentam em estado de fluido a temperaturas inferiores, antes da administração e, uma vez injetados no organismo, eles rapidamente se tornam gel sob condições fisiológicas. Além disso, moléculas bioativas ou células podem ser incorporadas ao material por simples mistura antes da injeção ^(8,9). Os copolímeros triblocos termossensíveis conhecidos como *Pluronics*[®] ou *Poloxamers*, compostos por segmento hidrofóbico de Poli(óxido de propileno) e segmentos hidrofílicos de Poli(óxido de etileno), são objetos de inúmeros estudos na área biomédica como sistema hidrogel injetável. Esses materiais são relativamente fáceis de se obter e apresentam custo inferior quando comparados a materiais com características semelhantes, apresentando potencial para tratamento mais acessível para aplicações em medicina regenerativa. Dentre os vários copolímeros *Pluronics* disponíveis no mercado, o copolímero conhecido por *Pluronic*[®] F-127 (F-127) se destaca por apresentar maior massa molar e conseqüentemente maior estabilidade relativa, sendo, portanto, um dos mais estudados. Dessa forma, o desenvolvimento de um nanocompósito sintético formado por uma matriz de hidrogel injetável de F-127 com adição de nanopartículas de vidro bioativo para utilização como implante com possibilidade de injeção minimamente invasiva e que tenha capacidade de estimular o reparo ósseo de forma recuperar a funcionalidade, será um importante passo nessa área.

Não é relatado na literatura, até onde se pode verificar, um estudo sistemático sobre influência da incorporação de íons Ca e Mn sobre propriedades físico-químicas de nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo. Além disso, apesar de muitos estudos avaliarem individualmente vidro bioativo e *Pluronic*[®] F-127, não foi encontrado na literatura, até o momento, relato do desenvolvimento e caracterização desse nanocompósito (NC), o que destaca o caráter inovador do trabalho proposto.

Essa tese de doutorado está dividida em capítulos. No Capítulo 2 são apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho. Uma revisão da literatura quanto à propriedades, estrutura e produção de vidros bioativos, hidrogel *Pluronic* F-127 e de

nanocompósitos é apresentada no Capítulo 3. No Capítulo 4, é apresentado o estudo dos efeitos da incorporação de diferentes concentrações de íons manganês em nanopartículas de vidros bioativos sobre as propriedades, estrutura e efeitos biológicos *in vitro*. No Capítulo 5, foram obtidas diferentes formulações de nanocompósitos de F-127 e vidro bioativo para avaliação da influência da incorporação desse material sobre propriedades reológicas e estabilidade do hidrogel. Por fim, as considerações finais e sugestões para trabalhos futuros são apresentadas no Capítulo 6 e referências bibliográficas no Capítulo 7.

CAPÍTULO 2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo com incorporação de íons manganês e avaliar dos efeitos da adição desse íon sobre propriedades físico-químicas e bioatividade do material. Em uma segunda etapa, o trabalho tem o objetivo de produção, caracterização físico-química e avaliação de comportamento reológico e estabilidade de nanocompósitos termossensíveis de *Pluronic* F-127 e vidro bioativo para potencial aplicação como sistema injetável.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo com incorporação de íon terapêutico Mn e caracterizá-las quanto à composição química por Espectroscopia de emissão com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), quanto à morfologia e tamanho de partículas por Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e Espalhamento dinâmico de luz (DLS), e quanto à estrutura por Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Difração de raios-X (DRX) e Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) e quanto à propriedades texturais por ensaios de adsorção de nitrogênio;
- Avaliar a capacidade de liberação de íons terapêuticos dos vidros bioativos e bioatividade em ensaios de imersão em fluido corporal simulado;
- Avaliar a viabilidade celular e atividade de fosfatase alcalina de células pré-osteoblásticas expostas ao produto iônico dos vidros bioativos;
- Obter nanocompósitos a partir da incorporação de nanopartículas de vidros bioativos em hidrogéis *Pluronic* F-127 e caracterizá-los morfologicamente por Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Microtomografia computadorizada de raios-X (Micro-CT) e estruturalmente por Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);

- Avaliar a influência da incorporação do vidro bioativo sobre comportamentos termossensível e reológico dos nanocompósitos;
- Avaliar a dissolução *in vitro* dos nanocompósitos em fluido corporal simulado;
- Avaliar a injetabilidade dos nanocompósitos por ensaio de extrusão do material através de seringas descartáveis.

CAPÍTULO 3. Revisão Bibliográfica

3.1 Uso de Biomateriais na Engenharia de Tecidos

Os avanços da medicina na última década vêm ampliando a expectativa de vida da população mundial. Entretanto, associado a esse envelhecimento da população, ocorre também uma redução do desempenho e funções dos tecidos e órgãos que constituem o corpo humano ⁽¹⁰⁾. A necessidade de recuperar a funcionalidade desses tecidos e órgãos danificados vem, portanto, norteando inúmeras pesquisas na área de materiais para uso médico, visto as possibilidades quase ilimitadas de manipulação das estruturas e propriedades dos materiais, buscando sucesso na restauração da função desses tecidos afetados.

Há alguns anos, o conceito de materiais biocompatíveis referia-se àqueles materiais “inertes”, ou “quase-inertes”, que provocavam baixa ou quase nenhuma reação adversa no organismo e desencadeavam formação de cápsula fibrosa delgada após implantação. No entanto, esse conceito tem sido alterado tendo em vista que o material ideal para várias aplicações deveria de alguma forma interagir com o tecido. Sendo assim, para determinados casos, uma integração tecido-material seria mais importante para maximizar a atuação do material ⁽¹⁰⁾.

O termo “engenharia de tecidos” foi oficialmente cunhado em um workshop da National Science Foundation em 1988 para significar “a aplicação de princípios e métodos de engenharia e ciências para a compreensão fundamental das relações estrutura-função em tecidos mamíferos normais e patológicos, e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido” ⁽¹¹⁾. Atualmente, na engenharia de tecidos, os biomateriais tem sido definidos como “material destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo”⁽¹²⁾. Dessa forma, muitos biomateriais tem sido desenvolvidos com objetivo de fornecer estrutura física e mecânica para o crescimento celular, podendo incorporar moléculas bioativas e mimetizar a matriz extracelular nativa (ECM), além de muitas vezes atuar como estímulo para a regeneração natural do organismo ⁽¹³⁾. A demanda por biomateriais no mercado brasileiro foi avaliada em mais de US \$ 1,89 bilhão em 2016 e deverá atingir US \$ 5,18 bilhões em 2022 ⁽¹⁴⁾, demonstrando o enorme potencial de desenvolvimento dessa área. O desafio da engenharia de tecidos é mimetizar o que acontece na natureza. Tentativas estão sendo feitas para projetar praticamente todos os tecidos e órgãos do corpo *in vitro*. Na área

dos tecidos conjuntivos, muito trabalhos têm sido desenvolvidos em todo o mundo na engenharia de ossos, tendões, ligamentos e cartilagens ⁽³⁾.

3.2 Regeneração de Tecido Ósseo

O osso é um material sólido compósito que representa o constituinte principal do esqueleto vertebral. Este tecido dinâmico desempenha muitos papéis importantes no corpo humano – em primeiro lugar, por uma ação conjunta com os sistemas digestivo e renal, contribui para a regulação da concentração de eletrólitos, como Ca e P. Em segundo lugar, sua natureza dura e moderadamente elástica permite fornecer uma estrutura para o apoio e fixação de tecidos mais macios, como os músculos, e para a proteção dos órgãos vitais e da medula óssea. Finalmente, fornece todo o suporte corporal necessário para locomoção e contração muscular ^(15,16). A nível microscópico, o osso pode ser dividido em três componentes principais: matriz, células e fatores bioativos. A matriz óssea calcificada é formada por uma matriz orgânica rica em proteínas (20% do peso seco), uma substância mineral (65%) e água (aproximadamente 10%). A fase orgânica tem um papel na determinação da forma do osso e oferece resistência à tensão. O principal componente da matriz orgânica é o colágeno tipo I (90%); os 10% restantes são constituídos de proteínas não-colagenosas, proteoglicanos e fosfolipídios. Além disso, a matriz contém fatores de crescimento e enzimas, como fosfatase e metaloproteinase. Fibrilas de colágeno são formadas por três cadeias polipeptídicas filamentosas em uma configuração helicoidal, que são estabilizadas através de ligações cruzadas intra e intermoleculares que aumentam a resistência à tração das fibrilas. A fase inorgânica serve como um reservatório iônico (predominantemente Ca, Mg, Na e P) e aumenta a resistência do osso devido à presença de apatita, carbonato, fosfato ácido e brushita. O principal componente inorgânico do osso é a hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ ^(16–18).

O tecido ósseo apresenta capacidade intrínseca para reparar, remodelar e regenerar, embora esta capacidade seja considerada limitada, já que algumas lesões não se regeneram com facilidade, seja devido à localização anatômica, à idade do paciente ou podem ser simplesmente grandes demais para o organismo reparar o defeito sozinho. A grande incidência destas condições faz com que o osso seja o tecido mais comumente transplantado depois do sangue, com mais de 500.000 procedimentos de enxerto realizados nos EUA anualmente ⁽¹⁸⁾. Para atender às necessidades desses pacientes, cirurgiões desenvolveram diferentes métodos e usaram uma variedade de materiais para restaurar o tecido ósseo, ou pelo menos restaurar a integridade mecânica do local.

A fixação mecânica é geralmente uma medida temporária (que pode durar décadas, em casos como articulações artificiais), proporcionando estabilidade e mantendo os ossos no lugar por tempo suficiente para a reintegração dos fragmentos ósseos. No entanto, esta estratégia somente é eficaz se houver fragmentos ósseos saudáveis suficientes para efetivamente serem fixados. Muitas vezes, mesmo após a fixação dos fragmentos disponíveis, ainda existem lacunas que devem ser preenchidas com osso ou materiais que levam à regeneração óssea. Assim, nos últimos anos, as pesquisas científicas tem buscado não apenas restaurar a integridade mecânica do tecido, mas também regenerar o osso como originalmente existia, restaurando um tecido natural saudável⁽¹⁸⁾. Auto enxertos ósseos, ou seja, enxerto ósseo retirado de um sítio diferente no próprio paciente, são o padrão-ouro do tratamento, com taxas de sucesso 90% na maioria dos casos⁽¹⁸⁾. Porém sua utilização é limitada pela disponibilidade de osso que seja transplantado com segurança, além disso há a necessidade de uma segunda cirurgia para extração do enxerto, com todos os riscos e complicações, podendo incluir dor a longo prazo e dormência no local da extração. Uma solução alternativa não limitada pelo tamanho do enxerto ou condição do paciente seria a utilização de aloenxertos, tecido de doador humano. No entanto, essa opção apresenta uma grande dificuldade de disponibilidade de doador associada a questões de potencial transmissão de doenças e a rejeição, sendo estes grandes limitantes para real utilização^(11,19).

Essa situação cria uma grande demanda por substitutos sintéticos especialmente projetados para agir como matrizes que seriam implantadas em um defeito ósseo com objetivo de guiar e estimular o crescimento do tecido *in situ*. O conhecimento do processo de regeneração do tecido ósseo é importante para ajudar os pesquisadores a desenvolver novas estratégias para tratar fraturas de cicatrização lenta ou não-cicatrização. O tecido ósseo possui uma capacidade intrínseca de se regenerar, sendo que esse processo é uma interação de fatores biomecânicos, celulares e moleculares. Se bem-sucedido, o osso se regenera em osso recém-formado em crianças, e em uma estrutura lamelar mecanicamente estável em adultos. Estes são formados após a remodelação do tecido ósseo recém-formado. Em primeiro lugar, quando ocorre uma fratura, observa-se o seguinte dano tecidual local: interrupção da integridade esquelética, ruptura das estruturas vasculares e do fluxo de nutrientes no local da fratura, levando a uma redução da pressão de oxigênio e ruptura da arquitetura medular. Esse é o início do processo real de regeneração óssea. O processo de consolidação óssea é dividido em três fases: fase de inflamação, fase de reparação e fase de remodelação. Durante a fase de inflamação, a ruptura dos vasos sanguíneos causa a formação de um coágulo sanguíneo, chamado hematoma. Posteriormente, as

plaquetas, neutrófilos e macrófagos imigrantes liberam moléculas sinalizadoras, como fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), fatores de necrose tumoral α (TNF- α), fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), fatores de crescimento básico de fibroblastos (BFGF), fatores de crescimento transformador (TGF- β) e citocinas, como IL-1 e IL-6. Então, IL-1 e IL-6 quimiotaticamente atraem precursores de células mesenquimais. Finalmente, os precursores mesenquimais proliferam e se diferenciam nas linhagens condrogênica e osteogênica. Durante a segunda fase, ou fase reparativa, os condroblastos formam cartilagem hialina, enquanto os osteoblastos formam tecido ósseo que une e estabiliza a ferida óssea. A cartilagem hialina assim formada é então substituída por tecido lamelar seguindo um processo de mineralização de tecido. O tecido calcificado é penetrado pelos vasos sanguíneos e o septo cartilaginoso é removido. A última fase é a fase de remodelação durante a qual o calo da fratura é convertido em osso novo. Nesta fase, os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção do osso trabecular, criando um poço de reabsorção superficial, chamado de lacuna de Howship. Então, uma destruição enzimática da matriz óssea, promovida pelas células presentes localmente, leva à liberação de fatores de crescimento e citocinas. Estas últimas induzem a conversão de células osteoprogenitoras em osteoblastos que preenchem as cavidades de reabsorção criadas pelos osteoclastos para criar uma nova matriz óssea. Finalmente, as células aprisionadas dentro da matriz óssea geram osteócitos ⁽¹⁶⁾.

Alguns dos biomateriais mais promissores para aplicação em engenharia de tecidos ósseos são as biocerâmicas, como hidroxiapatita (HA), fosfatos de cálcio, vidros bioativos devido a capacidade de estimular biológicas como osteocondução, que é a capacidade de estimular crescimento do osso na interface do implante ⁽²⁾. Os vidros bioativos apresentam algumas características que os tornam especialmente interessantes como a capacidade de reagir com os fluidos fisiológicos formando ligações fortes com o osso através da formação de camadas de hidroxiapatita, levando a uma interação biológica efetiva e fixação do tecido ósseo com a superfície do material ⁽²⁰⁾. Além disso, no caso de vidros bioativos de silicato, as reações na superfície do material induzem a liberação e troca de concentrações críticas de íons solúveis, o que pode levar a resultados intracelulares favoráveis e respostas extracelulares que promovem a rápida formação óssea ^(7,21).

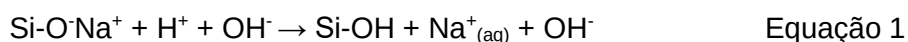
3.3 Vidro Bioativo

O primeiro vidro bioativo (VB) foi obtido e relatado por Larry Hench, na Universidade da Flórida, em 1969. O professor Hench e colaboradores investigaram vários materiais que pudessem se ligar ao osso e selecionaram um vidro degradável no sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$, de alto teor de cálcio, e de fácil fusão por apresentar uma composição próxima a um eutético ternário no diagrama $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$. A principal descoberta foi que um VB da composição 46,1% molar de SiO_2 , 24,4% molar de Na_2O , 26,9% molar de CaO e 2,6% molar de P_2O_5 , mais tarde denominado 45S5 ou Bioglass®, formava uma ligação com o osso tão forte que o material não poderia ser removido sem quebrar o osso. Isto lançou o campo das cerâmicas bioativas, com muitos novos materiais e produtos sendo formados a partir de variações de vidros bioativos e também de vidro-cerâmicas, como a hidroxiapatita sintética (HA) e outros fosfatos de cálcio ^(5,22).

Um material bioativo é definido como um material que estimula uma resposta benéfica do corpo, particularmente a ligação ao tecido do hospedeiro, geralmente osso ⁽⁵⁾. O Bioglass® 45S5 liga-se rapidamente ao osso e também estimula o crescimento ósseo longe da interface osso-implante. O mecanismo de ligação óssea é atribuído à formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) na superfície do vidro, após sua dissolução inicial. A HCA é semelhante ao mineral ósseo e pensa-se que interaja com fibrilas de colágeno para se integrar, ligando-se ao osso hospedeiro. Acredita-se que as propriedades osteogênicas do vidro, frequentemente denominadas osteoindução, sejam devidas aos produtos de dissolução do vidro, isto é, íons solúveis de sílica e cálcio, que estimulam as células osteogênicas a produzir matriz óssea. Além disso, a camada de HCA também fornece uma superfície adequada para fixação e proliferação de células osteogênicas ⁽⁵⁾.

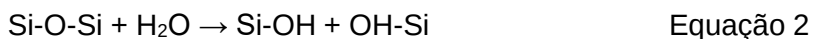
São propostos cinco estágios para a formação de HCA quando o VB é imerso em fluido corporal simulado (SBF) *in vitro* ou em fluido corporal *in vivo* ^(5,23):

1. Rápida troca de cátions Na^+ e/ou Ca^{2+} do VB com H^+ da solução, criando ligações silanol ($\text{Si}-\text{OH}$) na superfície do vidro:



O pH da solução aumenta e uma região rica em sílica (pobre em cátions) se forma perto da superfície do vidro. O fosfato, se presente na composição, também é liberado do VB.

2. O pH local alto leva ao ataque da rede de sílica do vidro por OH⁻, quebrando as ligações Si-O-Si. A sílica solúvel é liberada na forma de Si(OH)₄ para a solução, deixando mais Si-OH (silanóis) na interface vidro-solução:



3. Condensação de grupos Si-OH próximos à superfície do vidro: repolimerização da camada rica em sílica;
4. Migração dos grupos Ca²⁺ e PO₄³⁻ para a superfície através da camada rica em sílica e da solução, formando um filme rico em CaO-P₂O₅ amorfo na camada rica em sílica;
5. Incorporação de grupos hidroxilas e carbonatos da solução e cristalização do filme CaO-P₂O₅ ao HCA.

Resumidamente, o conceito de regeneração óssea é utilizar um *scaffold* que possa atuar como um modelo temporário tridimensional (3-D) para guiar o reparo ósseo. Idealmente, o *scaffold* deverá estimular os mecanismos regenerativos naturais do organismo e deverá, portanto, recrutar células, como as células-tronco da medula óssea, e estimulá-las a formar novo tecido ósseo. Vasos sanguíneos também devem penetrar para que o novo osso possa sobreviver. Com o tempo, o *scaffold* deve se degradar, deixando o osso remodelar naturalmente ⁽²⁴⁾.

O VB pode ser produzido utilizando-se dois métodos de processamento: a rota tradicional de fusão e a rota sol-gel. Bioglass® 45S5 e outros vidros bioativos comerciais são produzidos por fusão, onde óxidos são fundidos juntos em altas temperaturas (acima de 1300 °C) em um cadinho de platina e temperados em um molde de grafite, para produção de bastões ou monolitos, ou em água. A rota sol-gel permite produzir nanopartículas de sílica à temperatura ambiente com maior controle de composição e morfologia. É uma rota de síntese baseada em química onde uma solução contendo os precursores composicionais sofre reações do tipo polimerização à temperatura ambiente para formar um gel ⁽²⁵⁾. O gel formado é uma rede inorgânica úmida de sílica ligada covalentemente que deve ser seca e tratada termicamente, à aproximadamente 600 °C, para formação do vidro. Controlando a composição, bem como a morfologia, especificamente quanto ao tamanho das partículas, porosidade e forma geométrica, pode-se controlar as propriedades físico-químicas e biológicas do VB ^(3,26).

VB tem natureza amorfa e sua estrutura é composta de formadores de rede, modificadores de rede e óxidos intermediários. Os formadores de rede podem formar

vidro sem componentes adicionais, sendo que os formadores de rede mais investigados são sílica (SiO_2), pentóxido de fósforo (P_2O_5) e trióxido de boro (B_2O_3). Sódio e cálcio são exemplos típicos de modificadores de rede em estruturas de vidro. Eles interrompem a rede convertendo átomos de oxigênio ligantes (ligações químicas covalentes) em átomos de oxigênio não-ligantes (ligações Si-O-M^+ , predominantemente de caráter iônico, onde M^+ é um cátion modificador), alterando a estrutura do vidro (Figura 3.1). Os óxidos intermediários podem atuar como modificadores de rede ou entrar na estrutura de vidros como os formadores de redes ^(3,4).

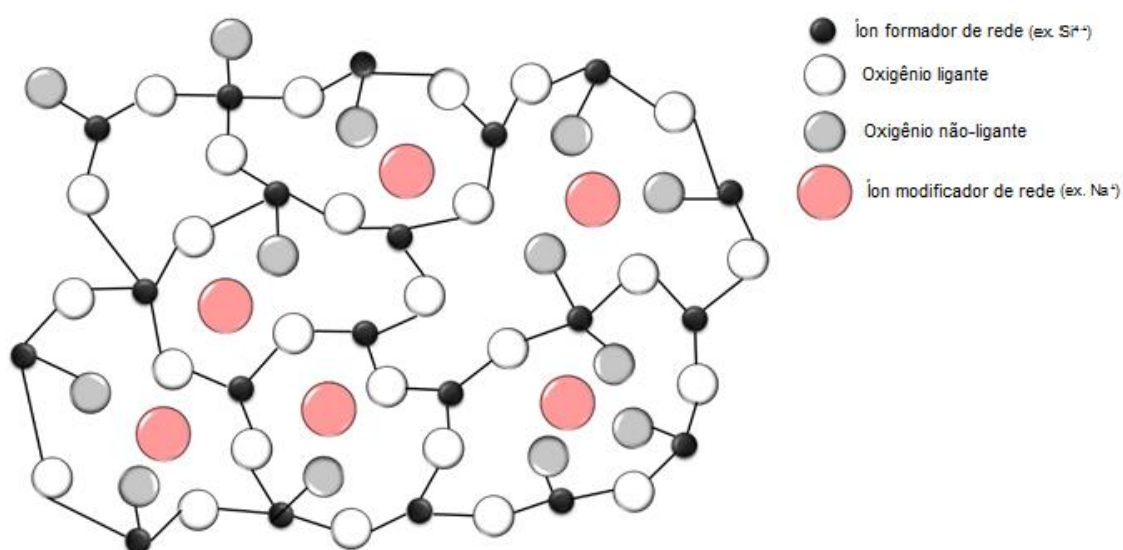


Figura 3.1. Estrutura esquemática da rede do vidro bioativo (adaptado de BARRIONI; OLIVEIRA; PEREIRA, 2016).

O processo sol-gel envolve principalmente hidrólise e condensação de precursores, secagem e estabilização. Ao controlar os parâmetros de processamento, as propriedades dos materiais, como morfologia e composição, podem ser controladas. Para a síntese de nanopartículas de VB pela rota sol-gel, o ortossilicato de tetraetila (TEOS) é o precursor de silicato mais utilizado, enquanto a água e/ou álcool (metanol ou etanol) são usados como solventes. O processo sol-gel pode ocorrer sob condições ácidas ou básicas, e tais condições afetam as propriedades dos materiais resultantes. Nas etapas que envolvem a produção de VB no processo sol-gel, o TEOS primeiramente sofre hidrólise e condensação na presença de catalisadores para formar nanopartículas (NP) de SiO_2 . As reações que ocorrem nessa etapa são apresentadas na Figura 3.2. A reação de hidrólise substitui um grupo alcóxido por hidroxila. Duas moléculas hidrolisadas parcialmente podem se ligar em uma reação de condensação envolvendo grupos silanol (Si-OH) para produzir ligações siloxanas (Si-O-Si) mais água

ou álcool como subproduto. Os precursores de íons metálicos podem ser adicionados durante a hidrólise e condensação de TEOS ou após a formação de NPs de SiO₂. Os precursores comuns para a introdução de cálcio e fosfato são o nitrato de cálcio tetra-hidratado e o trietilfosfato (TEP), respectivamente. Em seguida, as NPs resultantes são secas e calcinadas para formar o VB. O processo térmico também remove os subprodutos dos precursores não-alcóxidos, como os nitratos de cálcio ⁽⁵⁾.

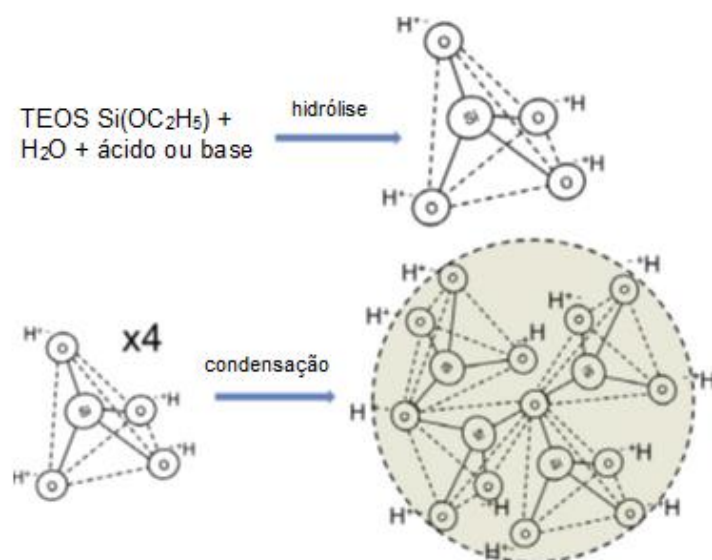
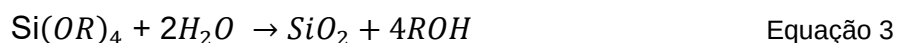
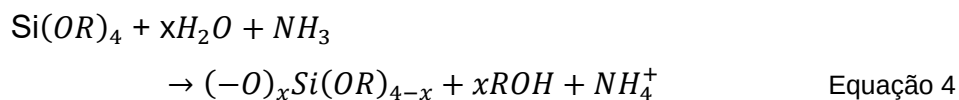


Figura 3.2. Esquema das reações para formação da rede de vidro bioativo a partir de TEOS (adaptado de JONES, 2013).

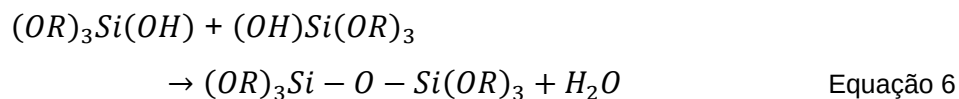
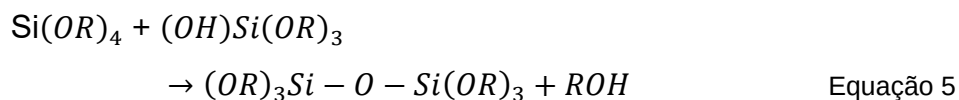
Em geral, as reações de hidrólise do TEOS (o mesmo mecanismo que ocorre para o TEP) pode ser expressa pela Equação 3 ⁽²⁶⁾:



A Equação 4 do processo de hidrólise controlada produz o monômero hidrolisado [(OR)₃Si(OH)]:



Estes produtos intermediários participam nas reações de condensação (Equações 5 e 6), por sua vez formando rede de sílica:



Os alcóxidos de silício, como TEOS, tendem a formar uma estrutura 3D gelificada sob condições ácidas, ou partículas individuais sob condições básicas ⁽⁵⁾. Com base neste fato, podem ser produzidos NPs esféricas monodispersas de SiO₂ (de 0,05 a 2 µm) através de uma rota de sol-gel catalisada por base, conhecido como método de Stöber, pesquisador que desenvolveu esse processo para obtenção de sílica esférica em 1968 ⁽²⁷⁾. Neste método, o precursor de silicato, TEOS, e precursores de íons metálicos são geralmente adicionados a uma solução composta de água, álcool e hidróxido de amônio sob agitação contínua. Ao ajustar os parâmetros de processamento (por exemplo, relação TEOS/H₂O, pH de síntese, tipos de precursores), o tamanho e morfologia da partícula podem ser ajustados. A presença de grupos OH⁻ resulta em forças repulsivas entre as partículas, o que facilita a formação de partículas esféricas monodispersas. Estudos mostram que baixas concentrações de TEOS e água podem produzir nanopartículas de tamanho uniforme monodispersas. O tamanho das nanopartículas aumenta com concentrações mais elevadas de reagentes, TEOS, água e amônia. Partículas preparadas em soluções de metanol são menores e seu tamanho aumenta com o aumento do comprimento da cadeia de álcool. A distribuição do tamanho de partícula também se torna mais ampla quando álcoois de cadeia mais longa são usados como solventes ⁽²⁶⁾. Oliveira e colaboradores modificaram o método de Stöber para produzir VB com composição nominal mássica de 60% SiO₂, 36% CaO e 4% P₂O₅ pela mistura de diferentes alcóxidos e solubilização de sais precursores durante o processo de síntese, em meio aquoso, utilizando metanol como solvente e produzindo nanopartículas de VB dispersas. Sendo assim, é possível obter nanopartículas de VB apresentando alta área superficial, propriedade que melhora a resposta biológica e é especialmente interessante para sua utilização como agente de reforço de materiais compósitos ⁽²⁸⁾.

Outros íons metálicos também podem ser adicionados durante a síntese para formação da rede. Esses íons posteriormente podem ser dissolvidos e liberados no organismo proporcionando alguma ação terapêutica auxiliar.

3.4 Íons terapêuticos

Os VB promovem seus efeitos biológicos através da liberação de íons terapêuticos no ambiente fisiológico. Até agora, alguns elementos (por exemplo, Sr, Cu, Mg, Mn e Zn, entre outros) foram adicionados à estrutura VB para melhorar a osteogênese, angiogênese, atividade bactericida e propriedades anti-inflamatórias. A Figura 3.3 mostra alguns efeitos da dissolução de íons terapêuticos. No entanto, deve-se notar que essas respostas biológicas devem ser alcançáveis através da liberação de íons de forma controlada em uma concentração ideal, permitindo uma condição adequada para as células humanas, idealmente, não apresentando toxicidade. Alguns dos traços de elementos metálicos são potencialmente prejudiciais para as células e tecidos humanos em altas concentrações, resultando em um desafio nesta área ⁽²²⁾.

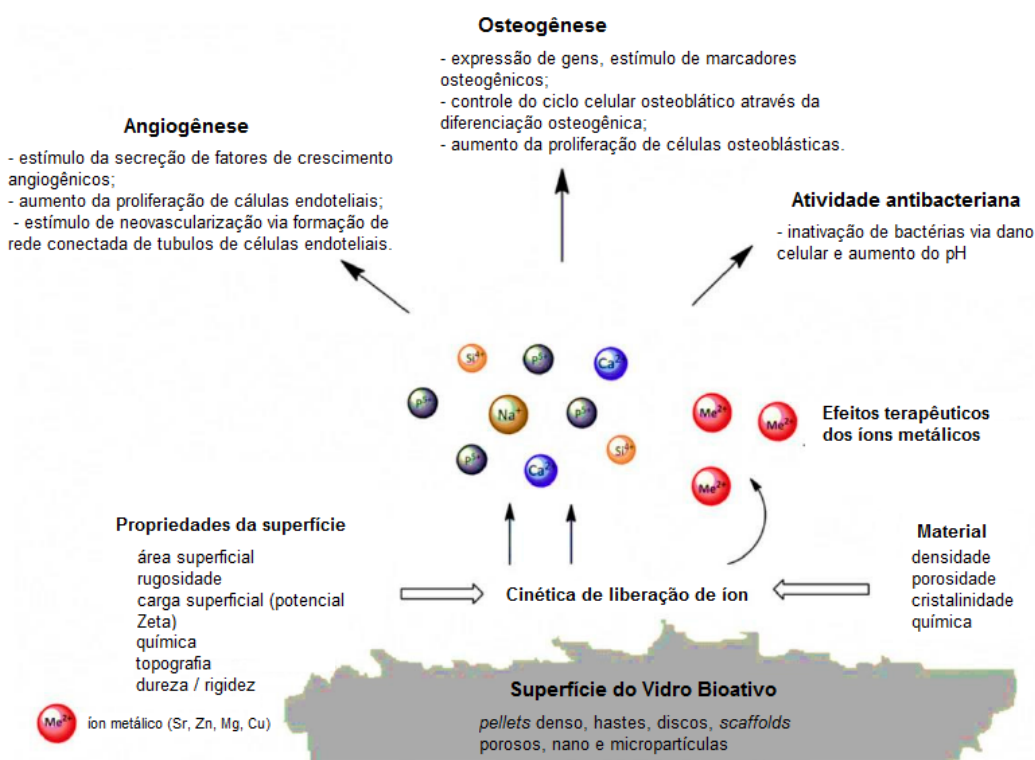


Figura 3.3. Representação esquemática da resposta biológica dos produtos de dissolução iônica do vidro bioativo (adaptado de BAINO, 2018).

Uma outra vantagem do processamento sol-gel é sua versatilidade, permitindo a preparação de VB com composições variadas e permitindo a incorporação de várias concentrações de íons com atividades fisiológicas e propriedades terapêuticas na rede. Íons que atuam como modificadores de rede (ligados ionicamente a átomos de oxigênio não-ligantes) podem ser liberados durante o processo de dissolução por troca iônica

com o fluido corporal. Dessa forma, os íons são disponibilizados no local onde são necessários, melhorando o efeito terapêutico e reduzindo os efeitos colaterais, proporcionando uma vantagem significativa em relação aos medicamentos administrados sistemicamente. Além disso, os vidros bioativos podem permitir a liberação contínua de íons, com um efeito terapêutico sustentado através da degradação do vidro, e a taxa de liberação pode ser otimizada através de variações na conectividade da rede do vidro e o tipo de modificador ou íon intermediário ^(4,29).

O manganês é um oligoelemento que desempenha importantes papéis no metabolismo dos ossos e músculos. Está presente em pequenas quantidades em vários tecidos e órgãos, como ossos, pâncreas, fígado e mucosa intestinal ⁽³⁰⁾. Este elemento é um co-fator para metaloenzimas (oxidases e desidrogenases), DNA polimerases e quinases e enzimas, como glicosiltransferases (ou mucopolissacarídeos), que estão envolvidas no remodelamento da ECM necessário para a produção de proteoglicanos, que são importantes constituintes das estruturas esqueléticas e cartilaginosas. A proteína mais importante da ECM é o colágeno, que dá propriedades estruturais particulares aos tecidos conectivos. Essa proteína é degradada no processo de remodelação do tecido ósseo, liberando constituintes essenciais, como a prolidase, uma metaloprotease que tem um requisito específico para o manganês ⁽³⁰⁾. O Mn^{2+} influencia fortemente a ativação de integrinas, uma família de receptores que mediam as interações celulares com a ECM e os ligantes da superfície celular, influenciando consequentemente a adesão celular ⁽³¹⁾. Culturas de células osteoblásticas humanas com adição direta de Mn^{2+} mostraram uma disseminação e proliferação celular reduzida dependente da concentração; portanto, a liberação de íons de manganês em um biomaterial deve ser completamente ajustada de acordo com os níveis de tolerância ⁽³⁰⁾.

Barrioni e colaboradores investigaram o efeito da dopagem com Mn em vidro bioativo com até 5% de MnO , o qual foi sintetizado utilizando $MnCl_2$ como precursor em rota sol-gel. A presença de Mn não afetou o caráter amorfo do vidro e amostras apresentaram alta área superficial e mesoporos. A formação da camada de HCA foi identificada após imersão das amostras em fluido corporal simulado (SBF), confirmando a bioatividade *in vitro*. Um perfil sustentado de liberação de Mn foi observado e a composição química do vidro pode ser ajustada para liberar uma quantidade apropriada de íons ⁽²⁹⁾. Ainda mais recentemente, Nawaz e colaboradores sintetizaram pela primeira vez nanopartículas esféricas mesoporosas de VB dopado com Mn pelo método de Stöber modificado. Estudos preliminares de bioatividade *in vitro* indicaram que VB dopado com 5% de Mn formaram cristais de hidroxiapatita após imersão em SBF, confirmando sua adequação

para aplicações de regeneração óssea. Além disso, a liberação controlada de íons Mn induziu um efeito antibacteriano sem afetar a bioatividade inerente associada às nanopartículas de VB ⁽³²⁾. Esses estudos reforçam o pressuposto de que o manganês é um promissor dopante para produção de vidros bioativos com propriedades superiores, especialmente para potenciais aplicações em regeneração de tecidos ósseos.

Devido a sua capacidade de estímulo a regeneração óssea, uma das aplicações mais importantes para vidro bioativo, é como preenchimento de defeitos ósseos com objetivo principal de estimular o reparo local ⁽⁵⁾. Geralmente, os materiais de preenchimento são aplicados através de cirurgias que resultam em traumas de tecidos adjacentes e dor pós-operatória. Uma alternativa muito promissora é utilização de hidrogéis injetáveis como carreador de vidro bioativo, permitindo preenchimento de defeitos irregulares através de procedimentos minimamente invasivos ^(6,7).

Recentemente, sistemas injetáveis de formação *in situ* tem sido amplamente relatados para aplicações ortopédicas com muitas vantagens em relação a outros métodos tradicionalmente utilizados, como *scaffolds* pré-fabricados. Ao contrário desses sistemas tradicionais, os materiais injetáveis têm atraído grande interesse como um método terapêutico para áreas de mais difícil acesso do organismo por permitir uso de procedimentos minimamente invasivos e por apresentarem capacidade de se adaptar a qualquer formato independentemente da geometria do defeito. Além disso, sistemas injetáveis podem ser usados como preenchimentos para reforçar as propriedades mecânicas do osso doente ou lesionado e como um transportador de células e agentes terapêuticos, como drogas e fatores de crescimento e regeneração ^(13,33).

3.5 Hidrogéis sensíveis a estímulos

Desde o século passado, hidrogéis tem sido objeto de estudos para uma imensa variedade de aplicações. Os hidrogéis podem ser definidos como estruturas poliméricas hidrofílicas que absorvem grande quantidade água, sem se dissolver. Sua estrutura de rede sólida tridimensional fabricada a partir de cadeias de polímero hidrofílico de ligação cruzada permite níveis elevados de hidrofiliidade e biocompatibilidade ^(34,35). Mas, talvez, a característica mais interessante dessas redes 3D seja a sua elevada semelhança, em termos de estrutura e propriedades físicas, com a matriz extracelular nativa (ECM), destacando seu potencial para fins biomédicos ^(7,36). Devido à sua capacidade de absorção de água e sua natureza viscoelástica, esses materiais proporcionam um microambiente favorável para as células e, portanto, têm sido

utilizados para inúmeras aplicações biomédicas. Pesquisas de novas aplicações utilizando diferentes tipos de hidrogéis tiveram um crescimento significativo nas últimas décadas, como regeneração de tecidos cardiovascular, oftalmológico ^(33,37), engenharia de tecidos ósseos, cartilaginosos ^(38–41), liberação controlada de agentes terapêuticos e terapias com células ^(42–45).

Sua estrutura tridimensional (3D) é composta por cadeias poliméricas reticuladas por ligações covalentes ou não-covalentes (forças de interação intermoleculares) produzindo hidrogéis químicos ou físicos, respectivamente. As ligações cruzadas covalentes são tipicamente formadas em uma reação de co-monômero de reticulação, dando origem a classificação desses materiais como hidrogéis químicos. Essas ligações controlam o grau de absorção de água do hidrogel de acordo com as interações polímero-água e o grau de reticulação que ocorre na matriz. Por outro lado, quando as ligações cruzadas se devem a interações físicas que se formam devido às interações de hidrogênio, de Van Der Waals e ao entrelaçamento das cadeias poliméricas, esses hidrogéis são chamados de hidrogéis físicos ^(8,46).

Quitosana, colágeno e ácido hialurônico são hidrogéis baseados em polímeros de origem natural, semelhantes à ECM nativa, que têm sido amplamente utilizados em aplicações biomédicas ^(36,39,43). Esses materiais naturais apresentam muitas vantagens, como excelente biocompatibilidade e baixa toxicidade, exatamente devido a sua origem natural. No entanto, a utilização de polímeros naturais é, algumas vezes, questionada devido a potenciais reações imunogênicas, possibilidade de transmissão de doenças e grande dificuldade de controle de propriedades das matérias-primas. Diante dessa condição, polímeros sintéticos apresentam propriedades mais previsíveis, incluindo a cinética de degradação, que pode ser controlada pela composição química e estrutura configuracional, peso molecular, polidispersividade, cristalinidade, morfologia do material (afetando, por exemplo, a porosidade e área superficial), orientação da cadeia e hidrofiliabilidade global. Essa versatilidade de propriedades aliada à possibilidade de melhor controle sobre essas características torna muito interessante a utilização de materiais sintéticos como Poli-N-isopropilacrilamida (PNIPAM), Polietileno glicol (PEG), Poli-ε-caprolactona, Poli(óxido de etileno) (PEO) e Poli(óxido de propileno) (PPO) ^(8,47–49).

Hidrogéis fisicamente reticulados ou géis reversíveis ganharam importância devido à sua relativa facilidade de produção e a vantagem de não usar agentes de reticulação, muitas vezes componentes tóxicos, durante sua síntese. Essas interações físicas

podem ser formadas devido a um estímulo específico como mudança de temperatura, pH, presença de íons, estímulos elétricos, entre outros. Os hidrogéis termossensíveis são particularmente interessantes, dentre esses “materiais inteligentes”, porque sua gelificação e as alterações na capacidade de absorção podem ser provocadas pela mudança de temperatura, que é um parâmetro fácil de se manipular. Em aplicações biomédicas, isso pode ser conseguido através do aumento da temperatura da temperatura ambiente para fisiológica ⁽⁸⁾.

Hidrogéis sensíveis à temperatura exibem uma transição de fase de volume a uma certa temperatura, denominada transição sol-gel. Os hidrogéis podem apresentar temperatura de solução crítica inferior (LCST - Lower Critical Solution Temperature) ou temperatura de solução crítica superior (UCST - Upper Critical Solution Temperature), dependendo da estrutura da rede polimérica e dos mecanismos de transição de fase ⁽⁵⁰⁾. LCST e UCST correspondem às respectivas temperaturas críticas abaixo e acima da qual o polímero e o solvente são completamente miscíveis. Os hidrogéis que apresentam LCST, se tornam insolúveis, gelificam liberando água absorvida após o aquecimento, enquanto os sistemas UCST se tornam solúveis, formam solução absorvendo grande quantidade de água, por aquecimento. Diagrama de fase de uma mistura de polímero/solventes em função temperatura mostra as regiões de uma fase de duas fases e pode-se identificar a temperatura crítica da solução conforme Figura 3.4 ⁽⁵¹⁾.

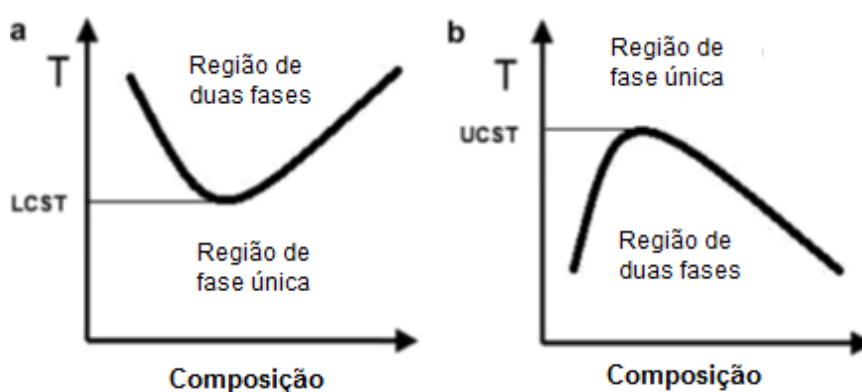


Figura 3.4. Diagrama de equilíbrio de fases para sistemas poliméricos LCST e UCST. (adaptado de GIBSON; O'REILLY, 2013).

Em geral há uma concentração crítica (concentração crítica de gel, CGC) de um polímero acima da qual a transição de fase sol-gel começa a aparecer. A CGC é na maioria das vezes inversamente proporcional ao peso molecular do polímero empregado ⁽⁵²⁾. A maioria dos polímeros termossensíveis utilizados em aplicações

biomédicas exibem uma temperatura de solução crítica inferior (LCST) e formam um gel após o aumento da temperatura ⁽⁸⁾. Estes sistemas termossensíveis permitem a formação de hidrogéis *in situ*, uma vez que são fluidos na temperatura ambiente, podem ser injetados diretamente no órgão, tecido ou cavidade do corpo e gelificar no local. Portanto, os hidrogéis injetáveis, que oferecem uma entrega minimamente invasiva e baixos custos de injeção, são estruturas promissoras para aplicações médicas à medida que permitem minimizar procedimentos cirúrgicos para introdução do biomaterial no organismo. Como são fluidos na temperatura ambiente, esses sistemas permitem facilidade para incorporação de componentes biológicos, como células, fármacos e moléculas bioativas, por simples mistura, e sua natureza fluida garante a adaptação adequada da forma, resultando em um bom ajuste com o ambiente circundante ⁽³⁴⁾.

O Poli-N-isopropilacrilamida (PNIPAM) é um dos polímeros termossensíveis mais estudados por apresentar LCST muito próxima a temperatura corporal. Além desse, um copolímero tribloco formado por Poli(óxido de etileno) (PEO) – Poli(óxido de propileno) (PPO) – Poli(óxido de etileno) (PEO), (PEO-PPO-PEO) também apresenta LCST que pode ser ajustada em função da massa molecular e balanço entre monômeros hidrofílicos e hidrofóbicos. Esses últimos são comercializados em custos inferiores em relação a maioria dos materiais com características semelhantes, possibilitando a produção de biomaterial para uso em aplicações médicas de custo mais acessível.

3.6 Copolímero de Polióxido de etileno-Poli(óxido de propileno) e Poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO)

Pluronic[®] (PLU) ou *Poloxamer*[®] são nomes comerciais dos copolímeros de tribloco ABA formados por Poli(óxido de etileno) (PEO) – Poli(óxido de propileno) (PPO) – Poli(óxido de polietileno) (PEO), (PEO-PPO-PEO), cuja estrutura química pode ser vista na Figura 3.5. Nessa molécula, A representa o segmento PEO, mais hidrofílico, enquanto B representa o segmento PPO, mais hidrofóbico. Uma variedade de *Pluronics* está disponível no mercado, diferindo pelo peso molecular dos blocos de construção e pela relação entre unidades hidrofóbicas (PPO) e hidrofílicas (PEO). Esses materiais são aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), agência dos Estados Unidos responsável por aprovação de medicamentos e alimentos, como materiais inativos em formulações farmacêuticas. Nos últimos anos, os sistemas baseados em PLU têm sido extensivamente relatados na literatura para liberação controlada de medicamentos e de genes, bem como em engenharia de tecidos devido à sua baixa toxicidade, alta

capacidade de carga de fármaco e capacidade de gelificar em condições fisiológicas em concentrações relativamente baixas ^(8,53).

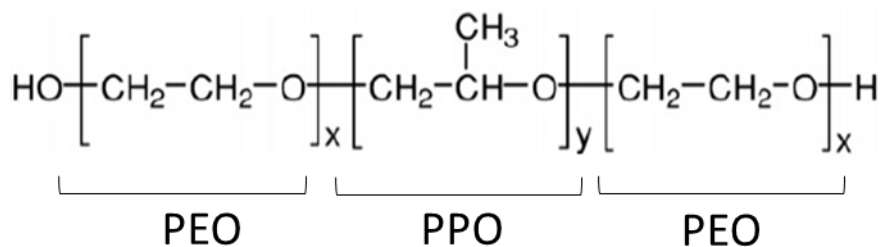


Figura 3.5. Estrutura química do copolímero PLU.

Diferentemente dos homopolímeros, que são polímeros produzidos a partir de unidades monoméricas idênticas, os copolímeros incluem dois tipos de unidades monoméricas de solubilidade diferente. Assim, em solução e em baixa concentração, essas moléculas anfifílicas existem como unímeros, enquanto em concentrações maiores, ocorre agregação. Os agregados finais, chamados de micelas, que geralmente incluem várias dúzias desse tipo de unidade e são caracterizados pela forma esférica com um núcleo hidrofóbico e um invólucro hidrofílico, que estabiliza estericamente as micelas. Assim, é possível definir a Concentração Crítica de Micelas (CMC) como a concentração de um monômero anfifílico a partir da qual as micelas são formadas, bem como o número de agregação como o número de moléculas individuais que formam uma micela. Enquanto que para os copolímeros em bloco a solvatação anfifílica é fortemente dependente da temperatura, outro parâmetro importante a ser levado em conta é a Temperatura de Micelização Crítica (CMT), abaixo da qual o anfifílico existe como unímero, e acima do qual unímeros e agregados coexistem ⁽⁵⁴⁾.

Dessa forma, soluções aquosas de PLU exibem uma transição de fase sol-gel com aumento de temperatura, apresentando temperatura de solução crítica inferior (LCST), quando a concentração está acima da concentração crítica de micelas (CMC). O hidrogel pode se auto montar, em uma certa faixa de concentração, formando micelas e associação micelar à medida que a temperatura é aumentada, resultando em uma transição sol-gel sensível à temperatura. Devido ao alto teor de PEO, mais hidrofílico, a água é um bom solvente para esses sistemas em temperatura ambiente, porém à medida que a temperatura aumenta, a água torna-se progressivamente um solvente pior para o segmento PPO, de forma que o segmento PPO interagem entre si levando à formação de micelas (Fusco, 2006). Essa transição pode ser visualizada na Figura 3.6. Portanto, em sistemas PLU, a micela apresenta forma esférica, sendo um núcleo

hidrofóbico PPO e um invólucro hidrofílico PEO ⁽⁵⁵⁾. À temperatura ambiente, as soluções aquosas de PLU estão no estado sol, o que facilita a incorporação de moléculas bioativas. Quando injetados no organismo, os hidrogéis formam gel semi-sólido à temperatura corporal, o que, portanto, possibilita sua utilização como material injetável. Tanto a temperatura de transição de fase quanto a CMC são fortemente influenciados pela massa molecular e relação entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que compõem o copolímero.

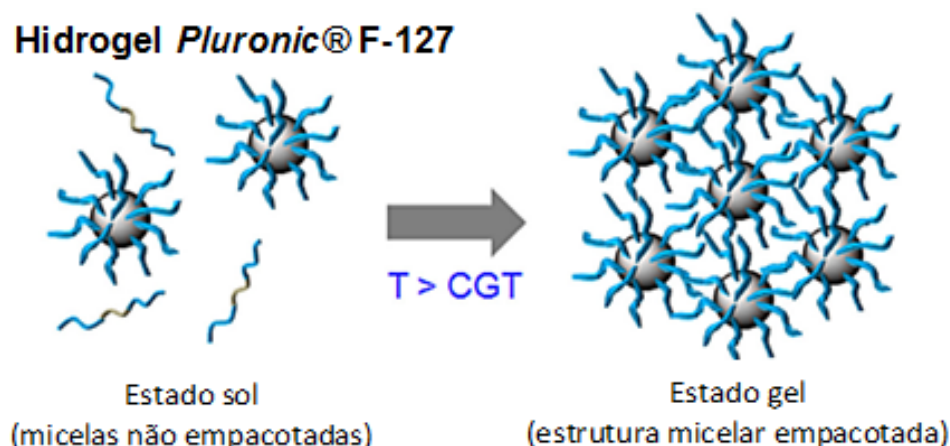


Figura 3.6. Ilustração esquemática da formação de micelas com aquecimento de uma hidrogel PLU (adaptado JUNG et al., 2017).

O mecanismo de gelificação das soluções aquosas de PLU na literatura ainda é uma questão um pouco controversa. No início dos anos 80, pensava-se que uma alteração intrínseca nas propriedades micelares, como o número de agregação e a simetria micelar, fazia com que as soluções aquosas de PLU formassem um gel. Essa suposição era baseada na observação de uma diminuição na concentração crítica de micelas com o aumento da temperatura. Mais tarde, a desidratação do PPO foi proposta como causa da gelificação de soluções aquosas de PLU com base em um estudo de ^{13}C -RMN ⁽⁵⁶⁾. O deslocamento e alargamento do pico do grupo metil do PPO na temperatura de transição foi interpretada como a desidratação do PPO das micelas existentes. Isto resultou no aumento do atrito entre as cadeias poliméricas, seguido pela viscosidade da solução, resultando na fase gel. Vadnere e colaboradores alegaram que a mudança de entropia causada pela água localmente ordenada ao redor do núcleo PPO levou a transição sol-gel ⁽⁵⁷⁾. Esta é uma visão tradicional das interações hidrofóbicas. Eles sugeriram um modelo de dois estados para grupos (O – C – C – O), assumindo estados polar e não polar. Com o aumento da temperatura, a população de estados não polar aumenta, gerando a formação de gel. Attwood e colaboradores observaram que os raios

hidrodinâmicos das micelas de PLU eram constantes, enquanto o número de agregação e a fração volumétrica das micelas aumentavam com o aumento da temperatura ⁽⁵⁸⁾. Recentemente, estudos mecanísticos sobre a transição de fase e caracterização dos estados de solução e gel de PLU foram relatados usando várias técnicas instrumentais, tais como velocidade de ultrassom, espalhamento de luz estático e dinâmico, espalhamento de nêutrons de pequeno ângulo (SANS), reometria, medição de constante dielétrica, e microcalorimetria ⁽⁵⁹⁾.

Avaliando em conjunto, os copolímeros tribloco formam micelas que se equilibram com os unímeros de PLU a baixa temperatura e acima da concentração micelar crítica (CMC), cerca de 1mg/ml ⁽⁶⁰⁾. À medida que a temperatura aumenta, o equilíbrio muda de unímeros para micelas esféricas, reduzindo o número de unímeros não associados em solução, levando a um aumento na fração volumétrica da micelas (ϕ_m). Quando $\phi_m > 0,53$, o sistema se torna um gel por empacotamento micelar (cristalização de esfera dura). O raio de interação da esfera dura aumenta constantemente com a temperatura, enquanto a fração de volumétrica da micela aumenta abruptamente em uma certa faixa de temperatura, que depende da concentração. Quando a fração de volume das micelas é $> 0,53$, o sistema se torna um gel ⁽⁶¹⁾.

A classe de copolímeros PLU oferece uma variedade de mais de 50 materiais anfifílicos, solúveis em água e polimórficos (A = bloco hidrofílico Poli(óxido de etileno) (PEO) e B = bloco hidrofóbico Poli(óxido de propileno) (PPO)) conforme mostrado na Figura 3.7. O fabricante original desses materiais, BASF, introduziu uma nomenclatura específica para os copolímeros que consiste em uma letra indicando o morfismo de cada copolímero - líquido (L), pasta (P) e pó (*flake*, F) - seguido por um ou dois números referentes à grade Pluronic[®] mostrada na Figura 3.7, e fornecendo 1/300 da massa molar do bloco PPO por unímero. O último dígito mostra um décimo do percentual de massa molar do conteúdo de PEO por mero. Como exemplo, os copolímeros P123 e P103 são ambos no estado pastoso, tendo o mesmo percentual de massa molar de PEO por unímero (30%) com unidades PO mais longas para P123 ⁽⁶²⁾.

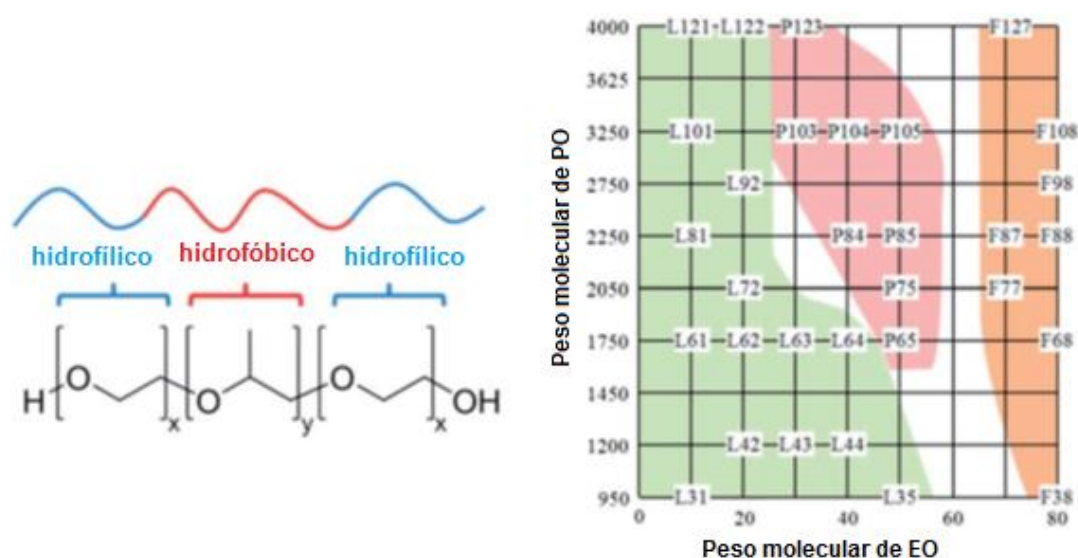


Figura 3.7. Estrutura molecular de um copolímero tribloco Pluronic® (à esquerda) e a grade Pluronic® (direita; código de cores do estado físico dos copolímeros em condições ambiente: verde = líquido; vermelho = pasta; laranja = floco) (adaptado de PITTO-BARRY; BARRY, 2014).

Entre os vários tipos de PLU, o Pluronic F-127 (F-127) ganhou considerável atenção devido a sua ampla gama de aplicações biomédicas. O segmento PPO de F-127 compreende um núcleo hidrofóbico como um microambiente para incorporação de drogas lipofílicas, enquanto o segmento PEO de F-127 previne a adsorção e agregação de proteína incorporada. O sistema termossensível de gelificação *in situ* F-127 tem sido amplamente estudado na área biomédica devido à facilidade de preparação e/ou comercialização a baixo custo, não utilização de solventes orgânicos e possibilidade de injeção minimamente invasiva diretamente no local de tratamento. Essas características do F-127 permitiram muitos estudos de aplicação em diferentes campos de liberação de vários agentes bioativos como medicamentos, células e partículas bioativas, entre outros ⁽⁶³⁾. A Tabela 3.1 apresenta algumas propriedades dos copolímeros PLU mais utilizados em pesquisas na área biomédica. O F-127 é, dentre os PLU, o que apresenta maior massa molar, o que lhe confere uma estabilidade relativamente maior em comparação com os outros copolímeros, e essa característica é determinante para sua maior atenção em pesquisas na área biomédica, em que é importante que o gel formado *in situ* tenha tempo de residência mínimo que permita a liberação do agente terapêutico ou regeneração tecidual, dependendo da aplicação proposta.

Tabela 3.1. Propriedades de alguns copolímeros Pluronic[®] (adaptado de HE; KIM; LEE, 2008).

Polímero	MM	PEO(%p)	Ponto fusão (°C)
P-65	3400	50	27
P-85	4600	50	34
P-105	6500	50	35
F-87	7700	70	49
F-127	12600	70	56

Os hidrogéis PLU são considerados não-biodegradáveis por natureza, seguros e bem tolerados pelo organismo ⁽⁶³⁾. Vários estudos foram realizados para determinar a segurança, imunogenicidade e eliminação desses materiais, que são inclusive aprovados para utilização em formulações farmacêuticas pelo FDA. Alguns estudos também demonstraram que os hidrogéis PLU podem ser eliminados dos rins na forma de unímeros. Os estudos mostraram também que F-127 não influencia as funções fisiológicas normais do corpo e não tem impacto nocivo nos órgãos vitais ^(55,64).

Os requisitos básicos para a seleção de material para aplicações de engenharia de tecidos são desafiadores e multifacetados. Para sistemas injetáveis especificamente, a solução precursora do polímero deve ser facilmente injetável através do sistema de liberação requerido, a fim de facilitar o procedimento cirúrgico minimamente invasivo. A viscosidade do hidrogel antes da gelificação desempenha um papel crítico na determinação da capacidade de injeção do sistema. Para assegurar a injetabilidade do sistema, muitos polímeros reticuláveis *in situ* são dissolvidos em solventes biocompatíveis, tais como água. Além da solubilidade do solvente, o tempo necessário para a gelificação deve estar dentro de uma janela de tempo apropriada para evitar dificuldades cirúrgicas e falha do implante. Por exemplo, tempos de gelificação mais lentos podem permitir a migração indesejada do material da área do defeito, ao passo que tempos de gelificação demasiadamente rápidos podem dificultar a implantação. Muitos fatores, como a intensidade dos estímulos de interligação, concentração polímero precursor, tipo de solvente e forma de reticulação precisam ser definidos e otimizados para determinação de um sistema injetável ^(65,66).

Propriedades como injetabilidade e seringabilidade devem, portanto, ser avaliadas para avaliação do desempenho de um material para aplicação como sistema injetável. Há

algumas divergências na literatura em relação a esses termos e em alguns casos eles são usados como sinônimos. Nesse trabalho, consideraremos o termo injetabilidade relacionado à medida da força necessária para aplicação de determinada quantidade de material por meio de uma seringa. Já o termo seringabilidade estará relacionado à facilidade de liberação do material por meio de uma agulha, e será quantificada como a quantidade de material que será liberada em tempo e sob pressão aplicada determinados baseados nas condições de injeção manual conforme literatura ^(13,67,68).

Todas essas características descritas colocaram os hidrogéis PLU em posição de destaque para aplicações biomédicas. No entanto, esses hidrogéis são caracterizados por uma taxa de dissolução relativamente rápida e baixa resistência mecânica. Embora existam aplicações para as quais estas características possam ser vantajosas, como por exemplo na administração de drogas nasais, em geral essas propriedades podem limitar a utilização desses materiais em outras áreas no campo biomédico ^(8,63). Dessa forma, melhorar a estabilidade e as propriedades mecânicas desses hidrogéis tem sido um importante objetivo de muitas pesquisas ^(9,38,69,70). Uma alternativa muito utilizada para melhorar essas propriedades é o reforço de materiais poliméricos utilizando agentes de reforço (partículas, fibras) de materiais mais resistentes, como por exemplo materiais cerâmicos, formando os chamados materiais compósitos ^(9,52,71). Associada a essa questão, a incorporação de materiais bioativos, como o vidro bioativo, é uma estratégia para desenvolver materiais com propriedades superiores do ponto de vista mecânico e biológico ^(66,72). Diante de todos os requisitos necessários para um material ser utilizado com sucesso em medicina regenerativa, em especial, em regeneração de tecidos ósseos, uma classe de material isoladamente não é capaz de satisfazê-los. Dessa forma, novos materiais têm sido largamente estudados para unir características interessantes de cada tipo de material, são os chamados materiais compósitos ^(7,73).

3.7 Nanocompósitos

A diversidade e complexidade das aplicações potenciais tornam o projeto de materiais para *scaffolds* extremamente desafiador. Existem alguns requisitos fundamentais que todos os materiais para *scaffolds* precisam atender: 1. Todos os materiais que o compõe e as técnicas de processamento aplicadas precisam ser biocompatíveis. 2. O *scaffold* deve ser capaz de resistir às tensões mecânicas aplicadas ao sistema e manter sua integridade mecânica ao longo de sua vida útil. 3. A microestrutura do material deve permitir a ligação celular e, no caso ideal, a integração ao microambiente biológico vizinho. 4. Sistemas altamente porosos são mandatórios para permitir a migração e

proliferação celular, bem como o potencial crescimento do tecido vizinho e dos vasos sanguíneos (angiogênese). Um último fator, se não essencial pode ser considerado como diferencial para escolha de um material, é a possibilidade de estimulação controlada da resposta celular antecipada, ou seja proliferação, migração, organização e diferenciação celular ⁽⁷⁾.

Muitos materiais têm sido aplicados em pesquisas de biomateriais para aplicação como *scaffolds*, incluindo numerosos polímeros sintéticos e naturais, bem como materiais inorgânicos, cerâmicos e vidros, e suas combinações. Combinando as vantagens dos hidrogéis e cargas inorgânicas são gerados efeitos sinérgicos que, no caso ideal, são capazes de neutralizar as desvantagens dos materiais individuais. Mais especificamente, a combinação de hidrogéis com cargas inorgânicas deve resultar em materiais altamente biocompatíveis que possam atender aos requisitos mecânicos do local implantado, estimular o comportamento celular desejado e exibir perfis de degradação bem definidos. ⁽⁷⁾. Essa condição abre um outro cenário de busca de novos biomateriais através da produção de materiais compósitos.

Materiais compósitos podem ser definidos como materiais formados por dois ou mais componentes com distintas composições, estrutura e propriedades, e que estão separadas por uma interface ⁽¹⁰⁾. É muito comum um material compósito que associa uma matriz polimérica com agentes de reforço, que podem ser compostos por diferentes classes de materiais metálicos, cerâmicos ou mesmo poliméricos. O aumento da demanda por hidrogéis com propriedades mecânicas aprimoradas, bem como materiais que apresentem respostas bioativas, cresceu fortemente com o rápido desenvolvimento da biomedicina ⁽⁹⁾. As propriedades mecânicas inferiores e a funcionalidade limitada, características de hidrogéis, têm restringido uma mais ampla aplicação desses materiais, por exemplo, como materiais de suporte de carga ou para regeneração tecidual. Várias estratégias têm sido exploradas para melhorar o desempenho de hidrogéis sendo que a incorporação de nanopartículas na matriz polimérica para produzir hidrogéis nanocompósitos (NC) tem se mostrado extremamente promissora. Nanopartículas, incluindo nanopartículas inorgânicas (como argila, hidroxiapatita, vidro bioativo, grafeno e nanopartículas metálicas) e nanopartículas orgânicas / poliméricas, podem ser usadas como cargas para reforçar a matriz de hidrogel e trazer também novas funcionalidades ⁽⁷⁴⁾. Através da adição de cargas inorgânicas, as propriedades do hidrogel podem muitas vezes ser melhoradas e adaptadas a uma variedade de aplicações. Propriedades mecânicas, comportamento de degradação e interações

célula-material estão entre as características mais predominantemente afetadas resultantes da adição de materiais inorgânicos a redes de hidrogel polimérico ⁽⁷⁾.

Como uma nova geração de materiais, os géis NC combinam as vantagens do hidrogel e das partículas de reforço nanométricas. A geração de efeitos sinérgicos nesses sistemas permite o projeto de materiais com propriedades superiores, incluindo desempenho biológico, rigidez e comportamento de degradação *in vitro* e *in vivo* ⁽⁷⁾. As propriedades mecânicas, elétricas, magnéticas, ópticas e biológicas superiores dos agentes de reforço nanométricos, além da excelente biocompatibilidade dos hidrogéis, possibilitam extraordinárias funcionalidades ao gel NC, ampliando seu potencial e desempenho para aplicações biomédicas. Os géis NC podem ser um veículo adequado para carregar e transportar Fatores Bioquímicos. As propriedades físicas dos géis NC, tais como grau de intumescimento, tamanho de malha e coeficiente de difusão, que podem afetar o comportamento de liberação desses fatores bioquímicos da matriz de hidrogel, podem ser refinadas pelo controle da estrutura química da rede de hidrogel com incorporação dos agentes de reforço. Na distribuição local de agentes terapêuticos, os géis NC podem servir como reservatório de moléculas, partículas ou células com base na interação entre estas e o NC. Os géis NC responsivos aos estímulos externos possuem grande potencial na liberação de fatores bioquímicos, de forma que estes podem ser inteligentemente liberados sob estímulos externos, como campo elétrico, campo magnético, temperatura e pH, etc.

Por exemplo, a adição de nanopartículas de hidroxiapatita (HA) de 20 a 70 nm a hidrogéis de PEG resultou em um módulo de Young e de tensão aumentado ⁽⁷⁵⁾. Os compósitos resultantes foram relatados como extremamente resistentes e extensíveis. A adição de nanopartículas de HA aumentou significativamente o módulo de Young, a tensão de fratura, a deformação final e a tenacidade do compósito polimérico. Essas propriedades físicas aumentadas foram atribuídas a interações físicas entre as cadeias poliméricas e as nanopartículas de HA. As partículas agiram como pontos de reticulação físicos que reforçam o hidrogel reticulado. Song e colaboradores compararam a influência de agregados porosos de nanocristais de HA com partículas compactas de HA calcinadas de tamanho micrométrico sobre as propriedades mecânicas de um hidrogel injetável de Poli(2-hidroxietilmetacrilato) (pHEMA). Eles observaram um aumento das propriedades mecânicas para ambos os sistemas. No entanto, os compósitos contendo agregados de nanocristais de HA foram significativamente mais rígidos e mostraram uma maior resistência à formação de trinca em comparação com compósitos contendo partículas de HA de tamanho micrométrico. Uma possível

explicação para esse reforço dependente do tamanho seria que uma maior área superficial resultaria em maior interação da matriz com partículas menores ⁽⁷⁴⁾.

Hawkins e colaboradores utilizaram o F-127 como matriz para incorporar nanopartículas de óxido de ferro e moléculas de fármaco ⁽⁴⁴⁾. O NC, na temperatura ambiente, apresenta estado de solução e pode ser facilmente injetado por via percutânea em um paciente onde o sistema gelificará ao atingir as temperaturas fisiológicas. Sob ação de campo magnético, as nanopartículas aquecem o sistema até uma temperatura próxima ou acima temperatura de transição de fase superior, causando assim a dissolução do gel novamente e, conseqüentemente, a liberação rápida (explosão) do medicamento carregado. Quando o campo magnético é removido, o sistema retornará à temperatura fisiológica, e o estado de gel será retomado. A droga restante poderia ser liberada pela nova aplicação do campo magnético. Dessa forma, um controle remoto de liberação de fármaco de forma pulsada pode ser alcançado através da atuação do sistema nanocompósito sol-gel em um campo magnético alternado. Won e colaboradores também relataram que a adição simples de uma pequena quantidade de óxido de grafeno (GO) a sistemas de F-127 foi muito eficiente para aumentar a estabilidade do gel físico em um ambiente aberto. O efeito da adição de GO carboxilado foi ainda mais pronunciado do que o GO simples para aumentar a estabilidade dos hidrogéis. Eles demonstraram que a taxa de dissolução *in vitro* de hidrogéis FP127 e FP127 modificado pode ser sistematicamente reduzida pelo aumento da quantidade de GO incorporada ⁽⁹⁾. Zhou e colaboradores combinaram materiais comerciais de hidroxiapatita (HA) e fosfato de cálcio com hidrogel F-127 para melhorar moldabilidade dos materiais bioativos e manipulação para implantação cirúrgica e mostraram que a introdução do hidrogel não atrapalhou a indução de regeneração óssea *in vivo* estimulada pela HA ⁽⁷⁶⁾. Outros estudos similares também utilizaram F-127 para melhorar propriedades das cerâmicas de HA, como Mirhosseini que explorou a modificação superficial das partículas de HA usando F-127, o que melhorou a dispersão das partículas adicionadas em uma matriz polimérica, bem como resultados de adesão e proliferação celular ⁽⁷⁷⁾.

Tendo em vista essas questões envolvendo regeneração de tecidos ósseos, acredita-se que o desenvolvimento de um biomaterial sintético para utilização como implante, a preços razoáveis, com possibilidade de injeção minimamente invasiva e que tenha capacidade de estimular o reparo ósseo de forma recuperar a funcionalidade, será um importante passo nessa área.

CAPÍTULO 4. Estudo de nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo contendo manganês

4.1 Introdução

Vidros bioativos são amplamente reconhecidos por sua capacidade de formar uma ligação química forte e rápida com osso e estimular regeneração do tecido ósseo ⁽⁵⁾. Entre várias morfologias de VBs, as nanopartículas de vidro bioativas (NP) mesoporosas têm sido muito estudadas devido a sua elevada área superficial específica e razão superfície-volume, que lhes conferem propriedades muito atrativas como maior capacidade de incorporação de íons e outros agentes terapêuticos ⁽⁷²⁾, além de rápida dissolução e liberação de íons em ambiente fisiológico ⁽⁷⁸⁾. Em particular, esses materiais são promissores para produção de compósitos, uma vez que suas características morfológicas facilitam sua incorporação homogênea em matrizes poliméricas ^(2,3). Uma estrutura mesoporosa com poros ordenados pode ser obtida pela utilização de brometo de cetilamônio (CTAB) como *template* durante a síntese das NP de sílica ⁽⁷⁹⁾. No entanto, a incorporação de íons modificadores de rede de sílica durante processo sol-gel pode alterar significativamente a morfologia das partículas e prejudicar estrutura porosa ^(80,81), de forma que a produção de vidro bioativo em duas etapas tem se mostrado uma solução promissora. Primeiramente são produzidas nanopartículas de sílica com utilização de CTAB e, em uma segunda etapa, é realizado processo de impregnação utilizando solução de precursores dos íons de interesse.

Uma grande vantagem da produção de vidro bioativo via processamento sol-gel é a obtenção de VB com composições flexíveis e a incorporação de diferentes íons metálicos com benefícios terapêuticos na rede de vidro, de tal forma que possa ser liberado de maneira controlada diretamente no local desejado através da dissolução do VB em contato com fluido corporal ⁽⁸²⁾. Essa liberação *in situ* minimiza possíveis efeitos colaterais e é uma grande vantagem em relação a medicamentos de entrega sistêmica. Os benefícios da incorporação de cálcio em vidros bioativos sobre proliferação de células osteogênicas e formação óssea estão bem estabelecidos na literatura ^(82,83). Além disso, sabe-se que a presença de íons Ca atuando como modificadores da rede aumenta a taxa de dissolução do sistema e, conseqüentemente, sua bioatividade ⁽⁸⁴⁾. Já o manganês é um dos vários íons terapêuticos estudados devido a sua ação no remodelamento da matriz extracelular ⁽³¹⁾ e processo de mineralização ⁽⁸⁵⁾. Trabalhos relatam ação de íons Mn^{2+} sobre ativação de integrinas ⁽⁸⁶⁾ e metabolismo ósseo ⁽⁸⁷⁾. Um estudo recente mostrou que a incorporação de manganês em fosfato de tricálcio

aumentou a adesão celular e a resposta osteogênica ⁽⁸⁸⁾. Melhoria na proliferação de osteoblastos foi também relatada em estudo de hidroxiapatita contendo manganês ⁽⁸⁹⁾. Outros trabalhos mostraram bioatividade *in vitro* ⁽⁹⁰⁾ e potencial osteogênico ⁽³⁰⁾ de vidro bioativo contendo Mn. Mais recentemente, Nawaz e colaboradores relataram a adição de Mn em nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo, que demonstraram capacidade de formação de camada de hidroxiapatita carbonatada e efeito antibacteriano ⁽⁹¹⁾, enquanto Westhauser e colaboradores, usando mesmo sistema, demonstraram estímulo à diferenciação osteogênica, porém com uma ação dose-dependente relacionando efeitos citotóxicos quando altas doses Mn foram utilizada⁽⁹²⁾. Esses trabalhos demonstram potencial de biomateriais contendo Mn em aplicações de regeneração óssea, porém avaliação criteriosa da capacidade de liberação desse íon em solução fisiológica é importante.

Nesse contexto, a proposta deste estudo foi produzir, pela primeira vez, amostras mesoporosas de vidros bioativos com estrutura porosa ordenada e em sistemas binários e ternários contendo Ca e Mn, a fim de avaliar a influência de cada íon nas propriedades do material. Para isso, nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo contendo Mn e Ca foram obtidas através do processo de impregnação a partir de nanopartículas de sílica previamente produzidas. Foi avaliada a influência da incorporação do Mn na morfologia e estrutura das NPBG, bem como sua capacidade de liberação controlada de íons, bioatividade e potencial osteogênico.

4.2 Materiais

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico (P.A.) e incluem: Tetraetil ortosilicato 98% (TEOS, Sigma Aldrich), Brometo de cetilamônio 99% (CTAB, Vetec), Acetato de etila (Synth Brazil), Nitrato de cálcio tetraidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Synth Brazil), solução 2 M de Hidróxido de sódio (NaOH, Neon), Cloreto de manganês ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Synth Brazil), Álcool etílico absoluto (ETOH, Synth), Ácido nítrico 2 M e Água deionizada.

4.3 Síntese das nanopartículas de vidro bioativo

As NP de vidro bioativo foram obtidas de acordo com procedimento baseado em metodologia sol-gel modificada descrito previamente Chang e colaboradores ^(80,93). Resumidamente, em um erlenmeyer de vidro de 1 L, foram adicionados 500 mL de água deionizada, 1 g de CTAB e 3 mL de NaOH (2 M), sob agitação mecânica de 600 rpm e

controle de temperatura em 70 °C. Após estabilização da temperatura, foram adicionados 5 mL de TEOS e, após 1 min, 5 mL de Acetato de etila. Após 1 h, a agitação mecânica foi desligada e a solução mantida a 70 °C por mais 3 h. As partículas obtidas após esse período foram transferidas para tubos Falcon, centrifugadas, lavadas três vezes com etanol absoluto (ETOH) e posteriormente secas a 60 °C por 24 h. As amostras de sílica (NP-SiO₂) foram obtidas após tratamento térmico a 550 °C por 6 h, usando taxa de aquecimento de 3 °C.min⁻¹, para completa remoção de CTAB.

As amostras de vidro bioativo em sistema binário (SiO₂ – CaO e SiO₂ – MnO) e ternário (SiO₂ – CaO – MnO) foram obtidas em uma segunda etapa de impregnação, usando nitrato de cálcio como precursor de Ca e cloreto de manganês como precursor de Mn. A identificação das amostras e razões molares Si:Ca:Mn utilizadas são apresentadas na Tabela 4.1. Nesse processo, primeiramente as partículas de sílica obtidas foram dispersas em água deionizada e então misturadas à solução de nitrato de cálcio e/ou cloreto de manganês, sob agitação ultrassônica, por 30 min. As soluções obtidas foram centrifugadas e as partículas coletadas secas a 60 °C por 24 h e submetidas a tratamento térmico a 680 °C por 3 h, usando taxa de aquecimento de 2 °C.min⁻¹. Em seguida, as nanopartículas contendo apenas Ca (BG1Ca) foram lavadas três vezes com ETOH para remoção do excesso de íons que não foram efetivamente incorporados à rede do vidro bioativo. As amostras contendo manganês (BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn) foram lavadas primeiramente com solução 2 M de Ácido nítrico seguida por lavagem duas vezes com ETOH para remoção de excesso de íons e principalmente óxido de manganês (insolúvel em ETOH), possivelmente formado durante tratamento térmico. A Figura 4.1 apresenta um esquema com as etapas das sínteses realizadas.

Tabela 4.1. Amostras de nanopartículas de vidro bioativo e respectivas razões molares utilizadas nas sínteses.

Amostras	Razão molar Si:Ca:Mn
NP-SiO ₂	1:0:0
BG1Ca	1:1:0
BG1Mn	1:0:1
BG0.5CaMn	1:0,5:0,5
BG1CaMn	1:1:1

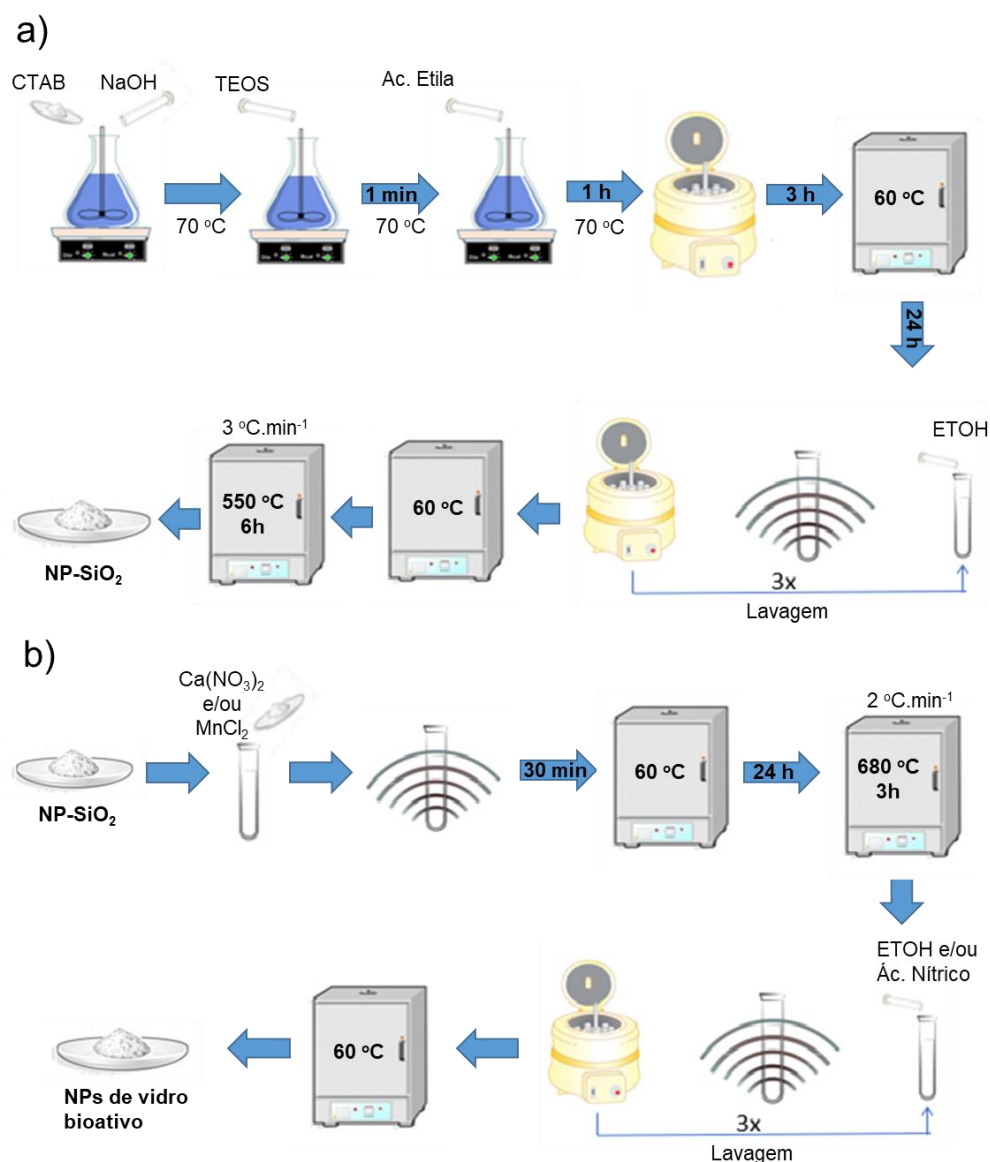


Figura 4.1. Esquema de síntese das nanopartículas de vidro bioativo: a) Síntese de NP-SiO₂ por metodologia sol-gel modificada e b) Síntese de BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn por impregnação.

4.4 Caracterização das nanopartículas de vidro bioativo

4.4.1 Estudo da Composição Química

As composições químicas das NPs de vidro bioativo foram analisadas através do método de digestão ácida seguido de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), utilizando o equipamento Perkin-Elmer Optima 7300 DV. Nesse processo, 0,1 g de cada amostra obtida foi misturado a 0,7 g de metaborato de lítio anidro em um cadinho de grafita. Em seguida, mais 0,7 g de

metaborato de lítio anidro foi adicionado e a mistura fundida a 950 °C por 10 min. Então, a mistura foi homogeneizada e novamente levada ao forno para fundir a 950 °C por mais 10min. Após resfriamento, a amostra foi transferida para um béquer contendo 100 mL de solução de 10 %vol de HNO₃ e mantida sobre agitação até dissolução completa. As concentrações de Si, Ca, e Mn foram analisadas através do ICP-OES e as proporções de SiO₂, CaO, e MnO calculadas.

4.4.2 Análise morfológica

A morfologia das NPs foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando equipamento FEI-INSPECT S50, operando a 20kV, equipado com um espectrômetro de energia dispersiva (EDS), para avaliar qualitativamente a composição química das amostras. Para realização da análise, as amostras foram recobertas com uma camada de carbono por pulverização catódica. A morfologia e tamanho das nanopartículas de VB foram estudados com auxílio de um microscópio eletrônico (MET) de transmissão Tecnai G2-20 - FEI SuperTwin operando a 200 kV. Para análise de MET, as amostras de vidro bioativo foram dispersas em etanol absoluto em banho ultrassônico por 30 min e então coletadas em grades de 400 mesh de carbono recobertas por cobre. Os diâmetros das nanopartículas foram avaliados a partir das micrografias de MET, sendo em média medidas 100 partículas para cada amostra com a utilização do programa ImageJ (Freeware National Institutes of Health) para cálculo do diâmetro médio e desvio padrão.

4.4.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta

A distribuição do tamanho de partícula foi verificada através de ensaio de Espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizando o instrumento Zetasizer 3000 HS 1256 com um comprimento de onda de luz laser de 633 nm (laser de hélio/neon de 4 mW) usando um mínimo de dez repetições. As nanopartículas de VB foram dispersas em etanol absoluto para análise de DLS e em água deionizada para análise de Potencial Zeta sob agitação ultrassônica por 20 min. Os diâmetros médios e índices de polidispersão (PDI) foram calculados como valor médio das medições $\pm$ desvio-padrão.

4.4.4 Análise Estrutural

Os grupos funcionais presentes nas nanopartículas de VB foram analisados por meio de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em

equipamento Brucker Alpha utilizando técnica de ATR (Attenuated Total Reflectance) equipado com cristal de diamante. Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda entre 4000 – 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e 128 varreduras. As amostras foram submetidas a ensaios de Difração de Raios-X (DRX) para análise das fases presentes e organização estrutural do material. Os difratogramas foram obtidos no equipamento Phillips PW1700 utilizando radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) a 40 kV/40 mA. Os dados foram coletados entre 4 e 90 ° com passo de 0,06 ° e tempo de aquisição de 1,5 s. A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) foi utilizada para investigar a configuração das ligações químicas no material. A análise de XPS foi realizada no Espectrômetro Amicus, Kratos, utilizando radiação Mg-K α e 120 W. Os espectros foram obtidos entre 0 e 1100 eV, com passo de 1 eV e tempo de aquisição de 100 ms. Os espectros de varredura foram realizados para verificar a composição elementar na superfície das amostras e as varreduras em alta resolução foram realizadas para Si 2p, O 1s, Ca 2p e Mn 2p para investigar a configuração das ligações químicas. A energia de ligação (BE) devido ao carregamento da amostra foi corrigida usando como referência a linha central C 1s, deslocada para 284,8 eV ^(94,95). Os espectros de alta resolução foram submetidos à deconvolução com ajuste Gaussiano.

4.4.5 Características texturais

Isotermas de adsorção e dessorção de N₂ foram coletadas em equipamento Quantachrome NOVA 2200e. As amostras foram desgaseificadas por 24 h a 110 °C antes da medição. A área superficial específica (SA) foi determinada pelo método Brunauer–Emmett–Teller (BET) usando pontos de adsorção na faixa de pressão relativa (P/P₀) de 0,01 a 0,30. O diâmetro e a distribuição do tamanho dos poros foram avaliados pelo método de Barrett – Joyner–Halenda (BJH) aplicado às curvas de dessorção.

4.4.6 Ensaio de liberação iônica e bioatividade in vitro

A solução de fluido corporal simulado (SBF) utilizada neste estudo foi preparada de acordo com o método descrito anteriormente por Kokubo ⁽⁹⁶⁾. Amostras de vidro bioativo foram imersas em 50 mL de SBF (1,5 mg.mL^{-1}) e mantidas a 37 °C. Alíquotas de 1 mL foram retiradas da solução após 4 h, 8 h, 24 h, 72 h, 7 dias e 14 dias e substituídas por 1 mL de SBF, mantendo o volume total. Cada amostra coletada foi diluída em 9 mL de ácido nítrico (2 M), filtrada (0,22 μm) e analisada por ICP-OES quanto à concentração dos íons Si, Ca, P e Mn ⁽⁹⁷⁾. Os ensaios foram realizados em triplicata. Para avaliação da bioatividade in vitro, ao final de 7 dias e 14 dias, as nanopartículas imersas foram

filtradas, lavadas com acetona para finalizar a reação e secas a 60 °C por 24 h. Alterações estruturais nas NPs de vidro bioativo após imersão em SBF foram avaliadas por FTIR e DRX e a morfologia foi avaliada por MEV.

4.5 Ensaios de citotoxicidade e biocompatibilidade *in vitro*

4.5.1 Cultura de células MC3T3-E1

Células da linhagem MC3T3-E1 subclone 14, pré-osteoblastos imortalizados da calvária de camundongos neonatos foram utilizadas neste estudo. Essas células foram gentilmente cedidas pelo Prof. Paulo Tambasco de Oliveira - USP, comercializadas pela empresa ATCC (Manassas, Virginia; www.atcc.org). Após o descongelamento, a suspensão celular foi transferida para um frasco plástico estéril contendo meio basal de cultivo composto por α -MEM (Alpha Minimum Essential Medium, Gibco™) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco™) e antibióticos estreptomicina ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) / penicilina ($500 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, Invitrogen™). Em seguida, o frasco contendo a suspensão celular foi centrifugado por 7 minutos a 1400 rpm. Posteriormente, o pellet contendo as células foi ressuspensionado em 10 mL de meio basal fresco, a suspensão celular foi adicionada à garrafa estéril de cultura de células e incubada em estufa a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂. Após 24 h, o meio foi removido e renovado com meio fresco com a finalidade de desprezar células não viáveis e que não aderiram à superfície do frasco. Para a manutenção das células, ao atingirem 80-90 % de confluência nos dias subsequentes foi realizada a passagem para outro frasco estéril. Para o repique celular, o meio de cultura foi desprezado do frasco e a monocamada celular foi lavada 2x com 5 mL de PBS 1x (Phosphate Buffered Saline, Gibco™). Em seguida, foram adicionados 1 mL de solução de Tripsina (0,25%) Ethylenediamine Tetraacetic Acid (EDTA, Gibco™) por frasco e a solução resultante foi incubada a 37 °C por 6 minutos. Posteriormente, as células foram ressuspensas em meio completo fresco e transferidas para novos frascos na razão desejada (1:5). Os experimentos foram realizados até a passagem 20, uma vez que osteoblastos em contínuas passagens apresentam diminuição na formação de matriz mineralizada ⁽⁹⁸⁾.

4.5.2 Preparo do produto iônico

As nanopartículas de VB foram ressuspensas em PBS 1x (20 mg.mL^{-1}), homogeneizadas durante 1 min e refrigeradas a 5°C por 24h. Posteriormente, o produto iônico foi filtrado em filtro estéril de $0,22 \mu\text{m}$ e adicionado nas proporções pré-definidas ao meio de cultura para realização dos ensaios *in vitro*.

4.5.3 Ensaio de citotoxicidade

A biocompatibilidade das NPs de vidro bioativo foi avaliada por meio do ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Invitrogen), como descrito por Mosmann ⁽⁹⁹⁾. O ensaio de MTT quantifica a atividade mitocondrial com base na redução do sal de tetrazólio em cristais de formazan por células vivas. Foram semeadas 1×10^4 MC3T3-E1 (por poço) em placas de 48 poços por 24h. Posteriormente, as células foram tratadas com 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de produto iônico das amostras de NP-SiO₂, BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn, BG1CaMn, além do controle de viabilidade que recebeu apenas PBS 1x e o controle de toxicidade que foi exposto a Triton™X-100 2% (Sigma-Aldrich) por 2 h. Após o tratamento, os grupos de células foram avaliados ao final de três tempos (24, 48 e 72 h). O meio de tratamento foi então removido e adicionado uma solução contendo 130 μL de meio basal composto por α -MEM e 100 μL de MTT (5 mg.mL^{-1}) / poço. Após 2 h, os cristais de formazan foram visualizados em microscópio de luz e, em seguida, dissolvidos em 130 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10 % em HCl 0,01 M (Sigma-Aldrich). Em todos os passos da descrição acima as placas de cultura foram incubadas a 37°C em atmosfera umidificada de 5 % CO₂. Posteriormente, foram transferidos 100 μL da solução centrifugada para uma placa de 96 poços e realizada a leitura de densidade ótica a 595 nm. O ensaio foi realizado em triplicata biológica e experimental e a absorbância média para cada grupo de NPs foi normalizada pelo resultado médio do grupo de controle de viabilidade.

4.5.4 Atividade de Fosfatase Alcalina

A atividade de fosfatase alcalina foi avaliada por meio do kit de bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP), sal de nitro-blue tetrazólio (NBT), conforme descrição do fabricante (Life Technologies). Foram semeadas 500 células (por poço) em placas de 24 poços por 24 h. Posteriormente, as células foram tratadas com 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de produto iônico das

amostras BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn preparados em meio de cultura α -MEM suplementado com solução osteogênica ($2,165 \text{ mg.mL}^{-1}$ de β -glicerofosfato + ácido ascórbico) (Sigma-Aldrich), além do controle negativo que recebeu apenas PBS 1x. Após o tratamento, os grupos de células foram avaliados ao final de quatro tempos (3, 7, 14 e 21 dias). Para isso, o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x, foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de solução BCIP-NBT por poço e incubadas a 37°C em atmosfera umidificada de $5\% \text{ CO}_2$ por 2 h. Após a incubação, os precipitados insolúveis de cor arroxeada presentes no fundo dos poços foram solubilizados com $210 \mu\text{L}$ de SDS – $10\% \text{ HCl}$. Após 18 h, o conteúdo do poço foi centrifugado a 2000 rpm por 2 min. Posteriormente, foram transferidos $100 \mu\text{L}$ da solução centrifugada para uma placa de 96 poços e realizada a leitura de densidade óptica a 595 nm. O ensaio foi realizado em triplicata biológica e experimental e a absorbância média para cada grupo de NPs foi normalizada pelo resultado médio do grupo de controle.

4.5.5 Análise estatística

A análise estatística para a viabilidade celular foi realizada utilizando análise de variância ANOVA unidirecional seguida de pós-teste de Tukey. O ensaio ALP utilizou ANOVA bidirecional seguida de pós-teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism 6 e os valores relatados foram expressos como média $\pm$ S.E.M. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.6 Resultados e Discussão

4.6.1 Composição Química

Para confirmar a composição final das nanopartículas de vidro bioativo obtidas foi utilizado o método de fusão do metaborato de lítio e análise por ICP-OES. As composições calculadas são apresentadas na Tabela 4.2. A concentração de SiO_2 ficou entre 85 e 89 %mol para todas as formulações estudadas. Estudos mostram que vidro bioativo produzidos por rota sol-gel apresentam bioatividade em concentrações de SiO_2 de até 90 %mol ⁽¹⁰⁰⁾, portanto os vidros obtidos estão dentro da faixa considerada bioativa. Nesse estudo, a proposta foi produzir vidro bioativo com menos componentes

(apenas Si, Ca e Mn), de forma a avaliar a influência de cada íon nas propriedades do material formado.

Tabela 4.2. Cálculos de composição final, em % molar, das amostras de vidro bioativo obtidos a partir dos resultados de ICP-OES.

Amostras	Composição ICP-OES (%mol)		
	NP-SiO ₂	CaO	MnO
NP-SiO ₂	100	0	0
BG1Ca	86,7±0,1	13,3±0,1	0
BG1Mn	87,0±3,2	0	13,1±3,2
BG0.5CaMn	85,6±0,2	6,59±0,2	7,81±0,1
BG1CaMn	89,4±0,1	1,7±0,1	9,0±0,1

BG1Ca apresentou $13,3 \pm 0,1$ mol% CaO, enquanto o teor total de MnO medido para BG1Mn foi de $13,1 \pm 3,2$ mol%, ambas as amostras nos sistemas binários com razão molar Si:Ca ou Si:Mn de 1:1. Para incorporar Ca²⁺ e Mn²⁺ na rede de sílica, foi aplicado um método de impregnação, no qual precursores de Ca e Mn foram adicionados após a formação da partícula de sílica mesoporosa, depositando-se na superfície da partícula durante o processo de secagem, seguido por difusão na rede de sílica durante o tratamento térmico. Os íons não incorporados foram removidos por uma etapa de lavagem, para evitar a formação de fases ricas em Ca ou Mn ao redor das partículas. Um método de impregnação semelhante foi relatado por Chen e colaboradores para incorporar íons zinco na rede de sílica, e a quantidade total incorporada nos sistemas binários SiO₂-ZnO foi similar a obtida neste trabalho, confirmando que este método pode ser útil para obter partículas de sílica mesoporosa contendo diferentes íons incorporados⁽⁸⁰⁾. Outros estudos utilizando nanopartículas mesoporosas também obtiveram incorporações da ordem de 12 a 14 %mol^(101,102). Greasley e colaboradores obtiveram nanopartículas densas no sistema SiO₂-CaO a partir da incorporação de CaO após a formação da sílica. Usando a mesma razão Si:Ca 1:1 molar, as partículas densas sintetizadas apresentaram menos de 7 %mol de CaO⁽⁸⁴⁾. Maiores valores de incorporação de íons podem ter sido obtidos durante processo de impregnação para partículas mesoporosas devido a maior área superficial para deposição de íons em solução e consequentemente maior difusão durante tratamento térmico.

Para os sistemas ternários, BG0,5CaMn e BG1CaMn, o conteúdo total de MnO foi $7,8 \pm 0,1$ e $9,0 \pm 0,1$ mol% e de CaO foram $6,6 \pm 0,2$ e $1,7 \pm 0,1$ %mol, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 4.2. Um aumento no teor de MnO foi observado para

BG1CaMn, porém com redução da concentração de CaO, apesar da utilização de razão nominal de 2:1 (Ca:Si e Mn:Si). Neste trabalho, diferente da maior parte dos vidros bioativos em sistemas com 3 ou mais componentes avaliados na literatura, Ca e Mn foram incorporados às NP de sílica já produzidas previamente. O objetivo de incorporação em uma segunda etapa é evitar alterações na morfologia das NP que pode ocorrer quando íons modificadores são adicionados na solução durante formação das partículas ⁽¹⁰³⁾. Além disso, estudos relatam que Ca só é incorporado efetivamente na rede de sílica em temperaturas acima de 400 °C durante tratamento térmico ⁽²⁰⁾ e espera-se comportamento semelhante para Mn. Nesse caso, a diferença de tamanho de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} pode ter papel importante em uma etapa de competição entre íons durante processo de difusão uma vez que íons Mn^{2+} possuem raio iônico menor que Ca^{2+} ⁽¹⁰⁴⁾, o que pode ter favorecido a difusão de Mn, permitindo maior incorporação especialmente quando as concentrações dos íons foram mais elevadas. A análise química confirmou a presença dos componentes das amostras de vidro bioativo em diferentes composições de acordo com quantidades nominais utilizadas na síntese. Vale ressaltar que o aumento da relação Ca:Si e Mn:Si, nos sistemas ternários, não resultou em aumento de incorporação de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} , de forma que a utilização de menores concentrações mostrou-se mais efetiva. No processo de incorporação a partir de partículas de sílicas previamente produzidas, os íons dispersos em solução na etapa de impregnação depositam-se na superfície e poros abertos das partículas para posterior incorporação por difusão durante tratamento térmico ⁽⁸⁰⁾. Nesse sentido, pode-se supor que haja uma relação entre a quantidade de íons depositados/área superficial. Assim, é possível que tenha-se atingido um limite, acima do qual o aumento da concentração de íons não provoca mais aumento na incorporação final.

4.6.2 Análise Morfológica

A morfologia das nanopartículas foi avaliada por MEV (Figura 4.2) e MET (Figura 4.3), e a formação de nanopartículas esféricas foi observada em todas as amostras. A presença dos componentes do vidro bioativo (Si, e Ca e Mn) foi confirmada através da análise de EDS (Figura 4.2). A presença de uma estrutura contendo poros ordenados em arranjo hexagonal tipicamente obtidos com utilização de CTAB como surfactante ^(80,105) foi observada em todas as partículas, conforme apresentado nos resultados da MET. O tamanho de partículas individuais para cada amostra foi obtido a partir de medições de diâmetro em imagens de MET e valores médios são apresentadas na Tabela 4.3. Todas as amostras apresentam tamanho de partículas em escala

nanométrica variando de 50 a 67 nm. A metodologia de síntese utilizada foi efetiva na obtenção de partículas esféricas em escala nanométrica em todas as formulações utilizadas, sendo que a estrutura mesoporosa foi mantida mesmo com a incorporação de íons Ca^{2+} e Mn^{2+} . Partículas mesoporosas em escala nanométrica e morfologia esférica, como as obtidas, apresentam desempenho superior tanto em relação a propriedades biológicas do vidro bioativo quanto para obtenção de nanocompósito injetável. Partículas com essas características apresentam maior bioatividade ^(79,106) especialmente devido a maior área superficial e, portanto, maior liberação de íons em meio fisiológico e formação de camada de hidroxiapatita carbonatada. Essas características também permitem maior interação com a fase polimérica em nanocompósitos utilizados como materiais injetáveis, permitindo uma injeção suave utilizando seringas e agulhas ^(66,105,107).

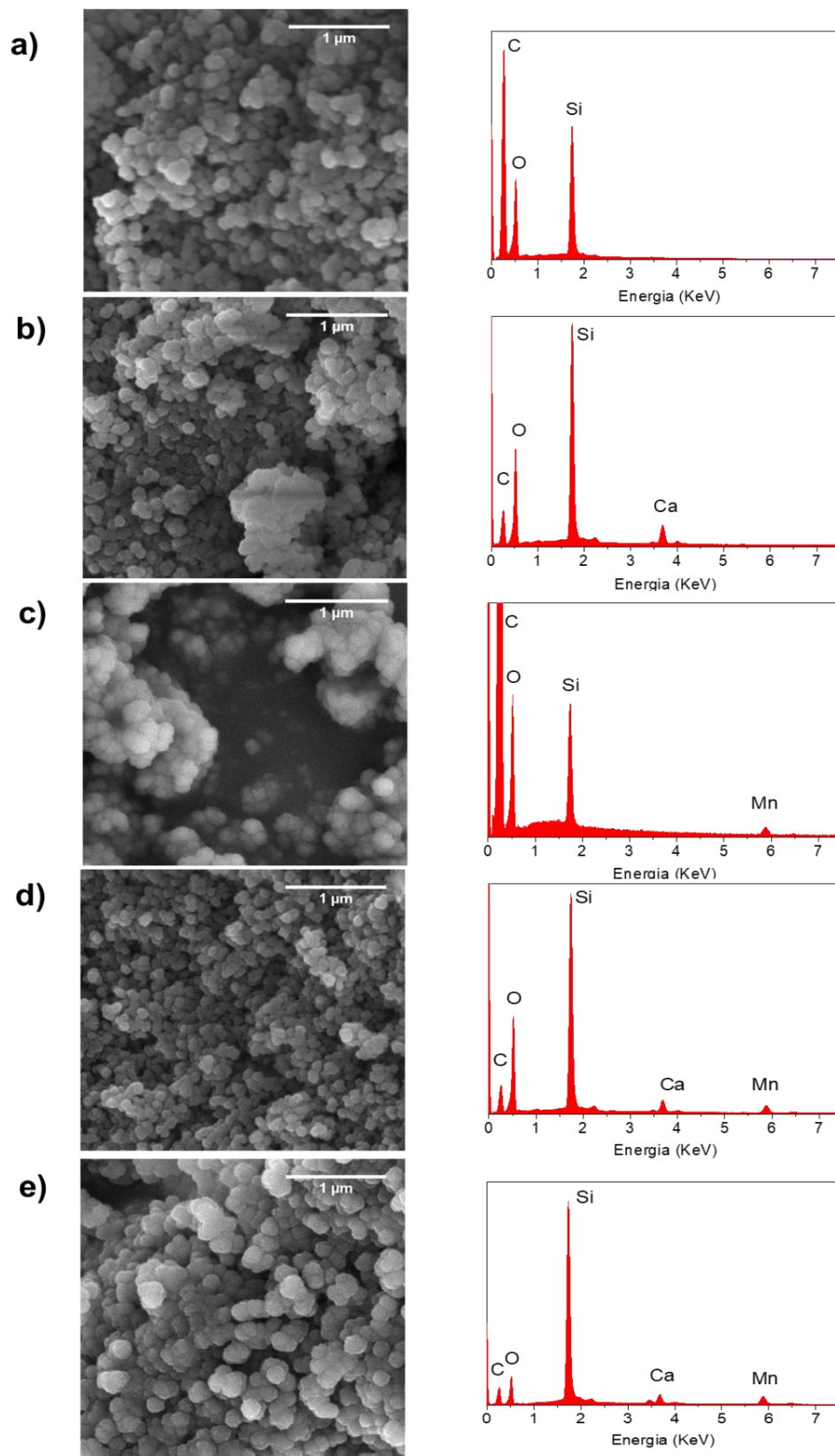


Figura 4.2. Imagens da superfície das nanopartículas de vidro bioativo obtidas por MEV para a) NP-SiO₂, b) BG1Ca, c) BG1Mn, d) BG0.5CaMn e e) BG1CaMn.

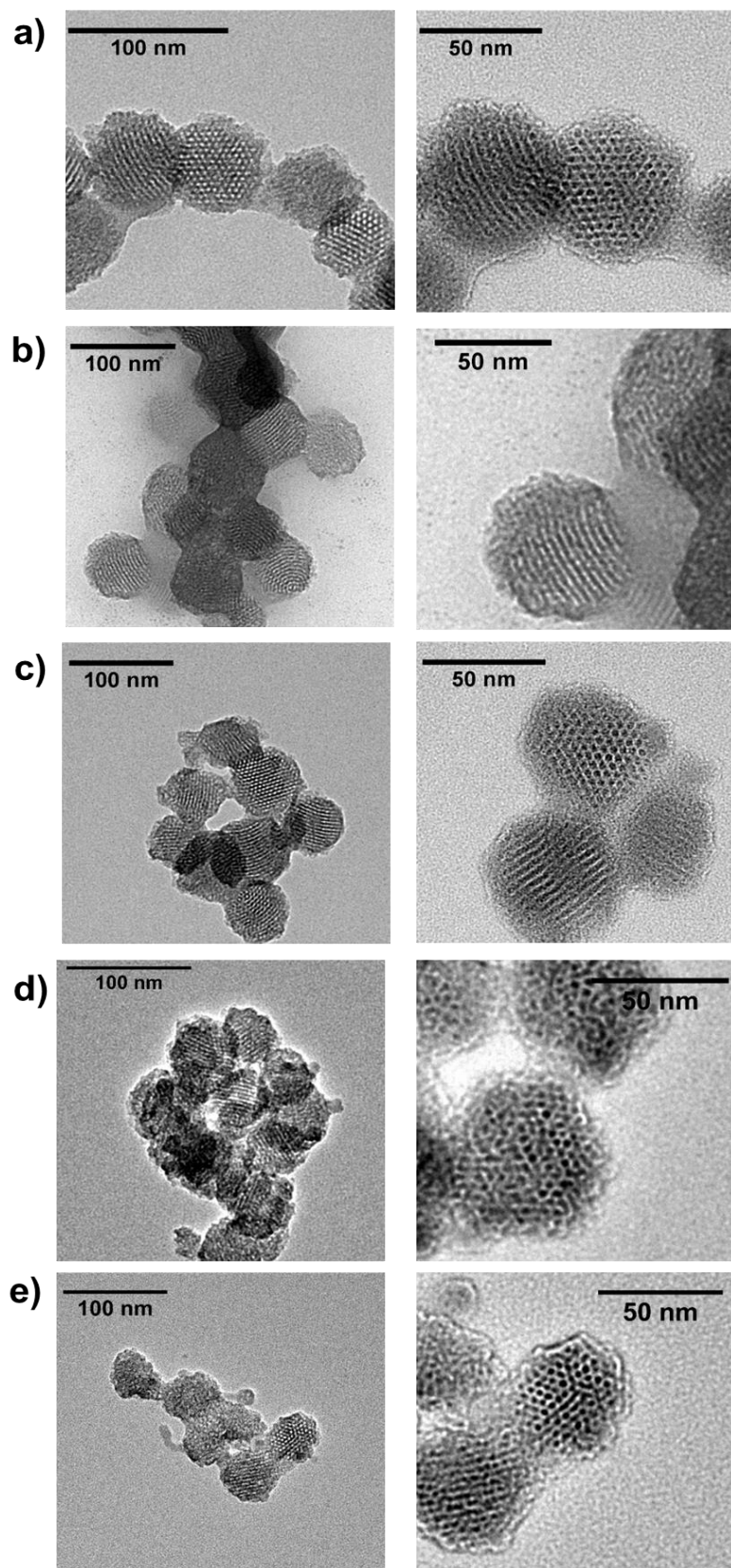


Figura 4.3. Imagens das nanopartículas de vidro bioativo obtidas por MET para a) NP-SiO₂, b) BG1Ca, c) BG1Mn, d) BG0.5CaMn e e) BG1CaMn.

O tamanho médio das partículas também foi avaliado através da técnica de DLS, conforme apresentado na Tabela 4.3. Os diâmetros médios das partículas medidos por DLS foram de 3 a 4 vezes maiores do que os observados através da medição direta por MET. É esperado que medições por DLS sejam maiores que o diâmetro real, uma vez que a técnica mede o diâmetro hidrodinâmico. No entanto, o aumento observado em comparação ao observado por MET pode ser um indicador da formação de aglomerados de nanopartículas de vidro bioativo. De fato, partículas de tamanho nanométrico apresentam maior tendência à formação de aglomerados reduzindo a área superficial o que poderia ser prejudicial à bioatividade do material. No entanto, espera-se que esses maiores tamanhos não representem um grande impacto sobre essas propriedades uma vez que muitos estudos mostram bioatividade de partículas mesoporosas em escala nano e micrométrica ^(108–110). Na Tabela 4.3 resultados da avaliação do Potencial Zeta das nanopartículas também são apresentados. Valores negativos de Potencial Zeta foram observados para todas as amostras, conforme esperado para partículas de vidro bioativos, devido a presença de hidroxilas na sua superfície ⁽¹¹¹⁾. Valores de carga superficial mais negativos (maiores em módulo) favorecem a dispersão das partículas devido a repulsão eletrostática entre partículas ⁽¹⁰⁷⁾. No entanto, a incorporação de Ca^{2+} e Mn^{2+} , tendo como consequência uma diminuição em valor absoluto do Potencial Zeta, favoreceu a aglomeração das nanopartículas.

Tabela 4.3. Diâmetro médio das nanopartículas de vidro bioativo conforme análises de MET e DLS, índice de polidispersão das análises de DLS e Potencial Zeta.

Amostra	Diâmetro médio MET (nm)	Diâmetro médio DLS (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV) em solução aquosa (pH = 7,0)
NP-SiO ₂	67 ± 24	214 ± 14	0,31 ± 0,04	-30,2 ± 3,4
BG1Ca	63 ± 12	178 ± 25	0,24 ± 0,05	-21,3 ± 5,1
BG1Mn	59 ± 10	321 ± 31	0,26 ± 0,07	-24,2 ± 1,3
BG0.5CaMn	50 ± 10	243 ± 20	0,23 ± 0,09	-20,6 ± 3,0
BG1CaMn	52 ± 13	201 ± 12	0,21 ± 0,07	-25,3 ± 4,3

As medições obtidas por MET podem apresentar uma redução de 5% no diâmetro devido à intensa radiação a que as partículas são submetidas ⁽¹¹²⁾. Ainda assim, esses resultados obtidos por MET são mais próximos dos tamanhos reais das partículas individuais obtidas, embora deva ser considerada a presença de aglomerados atingindo tamanhos de 178 a 243 nm.

4.6.3 Análise estrutural

A análise estrutural das nanopartículas foi realizada através das técnicas de FTIR, DRX e XPS. A Figura 4.4 apresenta os espectros de FTIR das amostras de nanopartículas de vidro bioativo, e bandas de absorção típicas de vidros bioativos podem ser observadas. As principais bandas presentes nos espectros são apresentadas na Tabela 4.4. A presença da banda na região entre $450 - 470 \text{ cm}^{-1}$ pode ser relacionada à deformação angular de ligações Si-O-Si de estruturas amorfas ^(108,113). A absorbância em 800 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento simétrico Si-O ^(111,112), enquanto que o estiramento assimétrico dessas ligações pode ser atribuído à absorbância observada na faixa entre $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ ^(26,108). Em 965 cm^{-1} é possível observar uma banda relacionada às ligações Si-O contendo um oxigênio não ligante (Si-O-NBO) por tetraedro de SiO_4 ^(90,91), indicando ruptura da ligação Si-O-Si e formação de rede de sílica menos conectada. As absorbâncias observadas em 666, 572 e 526 cm^{-1} , observadas nas amostras BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn, podem ser relacionadas ao estiramento da ligação Mn-O-Mn presente em óxido de Mn_2O_3 ⁽¹¹⁴⁾, e a formação dessa estrutura pode ser relacionada ao excesso de precursores utilizados na metodologia empregada nesse trabalho.

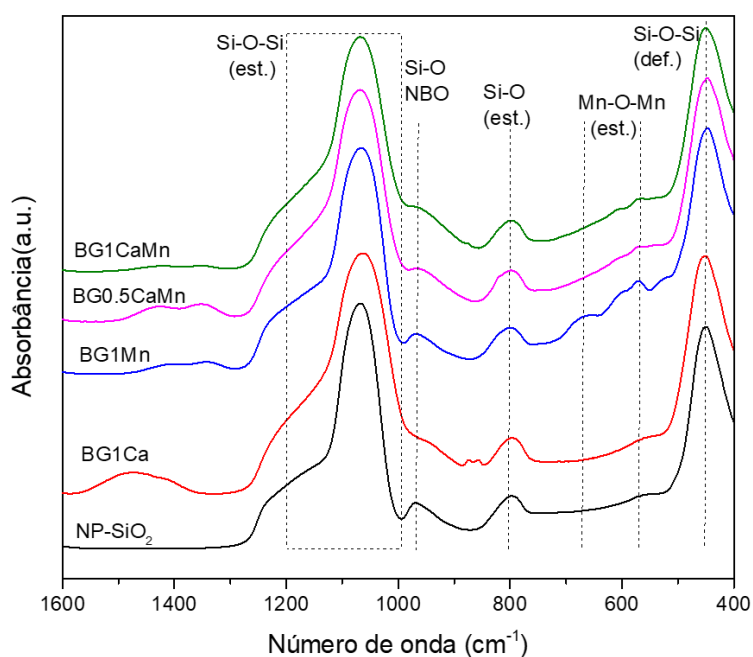


Figura 4.4. Espectros de FTIR das amostras NP-SiO₂, BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn.

Tabela 4.4.4. Bandas de vibração presentes nos espectros de FTIR das amostras de vidro bioativo.

Número de onda (cm ⁻¹)	Correlação	Referências
1070	Si-O-Si (Estiramento assimétrico)	(26,108)
965	Si-O-NBO	(90,91)
800	Si-O-Si (Estiramento simétrico)	(111,112)
450	Si-O (deformação angular)	(108,113)
666, 572, 526	α-Mn ₂ O ₃	(114)

Os difratogramas das amostras de NP de vidro bioativo são apresentados na Figura 4.5. Todas as amostras apresentaram um halo difuso entre 15 e 35° (2θ), característico de estruturas amorfas ⁽¹¹⁵⁾. A amostra BG1Ca apresentou a estrutura amorfa típica de vidro bioativo com um pico cristalino associado à formação de uma fase de silicato de cálcio (Ca₂SiO₄, COD 96-153-5816), reportado na literatura por apresentar boa bioatividade ⁽¹¹⁶⁾. A presença desta fase pode ser relacionada ao processo de estabilização do vidro bioativo a 680 °C, que pode causar cristalização parcial na matriz amorfa, principalmente em partículas menores ^(112,117). As amostras contendo Mn apresentaram estrutura de vidro predominantemente amorfa, mesmo para a amostra BG1Mn, na qual o halo difuso pode ser identificado apesar da presença de picos cristalinos que atenuam sua visualização. Estudos anteriores mostraram que as estruturas amorfas apresentam uma rede mais aberta, aumentando a dissolução do vidro e a taxa de liberação de íons, consequentemente melhorando a bioatividade e o efeito terapêutico do material ⁽¹¹⁸⁾. BG0.5CaMn e BG1CaMn apresentaram picos cristalinos correspondentes aos óxidos de manganês II (MnO, COD 96-900-6667) e III (Mn₂O₃, COD 96-151-4114), enquanto BG1Mn, que possui maior teor de Mn, apresentou apenas a fase de Mn₂O₃, o que pode estar relacionado à oxidação de Mn²⁺ a Mn³⁺, favorecida quando concentrações maiores de Mn estão presentes em temperaturas acima de 450 °C e ar ambiente ⁽¹¹⁹⁾. A formação dos óxidos de manganês relatados pode ter sido favorecida pelo excesso de íons manganês na superfície das partículas de vidro bioativo durante tratamento térmico devido ao método de síntese e incorporação de íons utilizado. Trabalhos anteriores

também relataram a identificação de picos cristalinos de Mn_2O_3 em sistemas $\text{Mn}_2\text{O}_3/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ produzidos por rota sol-gel, devido ao aumento da concentração de Mn, o que está de acordo com o observado para as partículas de vidro bioativo ⁽¹²⁰⁾. Óxidos de manganês são muito estudados na área biomédica como agentes de contraste em exames de imagem por apresentarem toxicidade mais baixa que outros agentes a base de gadolínio ⁽¹²¹⁾, no entanto o efeito da presença desses óxidos sobre potencial osteogênico não tem sido reportado na literatura, até onde podemos verificar. É importante ressaltar que, apesar da confirmação da formação dos óxidos de manganês pelo ensaio de DRX, é possível que parte dos íons adicionados tenham sido também incorporados à rede de vidro bioativo, conforme pode ser verificado adiante na análise de XPS. Nesse caso muitos estudos reportam efeitos positivos sobre proliferação de osteoblastos e potencial osteogênico de vidro bioativo com incorporação de íons Mn ^(30,92,122).

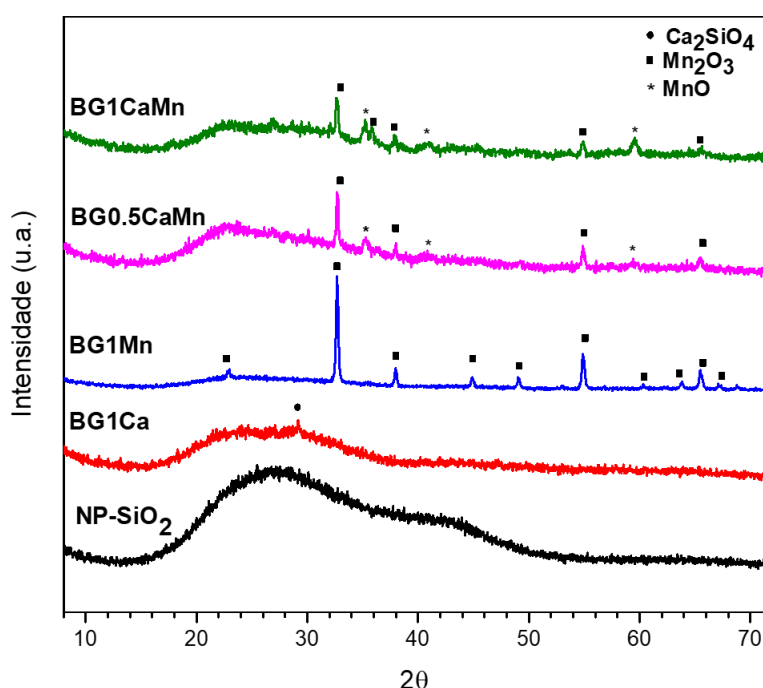


Figura 4.5. Padrões de Difração de Raios-X (DRX) das amostras NP-SiO₂, BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn.

A estrutura das nanopartículas de vidro bioativo foi ainda avaliada por XPS, e os espectros de varredura obtidos são apresentados na Figura 4.6. Linhas Auger e de fotoemissão características de Si 2p, O 1s, Ca 2p e Mn 2p, constituintes dos vidros bioativos, foram identificadas nas amostras. A banda correspondente a C 1s, observada em todas as amostras, pode ser relacionada à absorção de impurezas de hidrocarbonetos na superfície do vidro bioativo, e foi utilizado como referência para

calibração das energias de ligação (BE), devido ao carregamento das amostras, ajustando seu valor para 284,8 eV^(94,123).

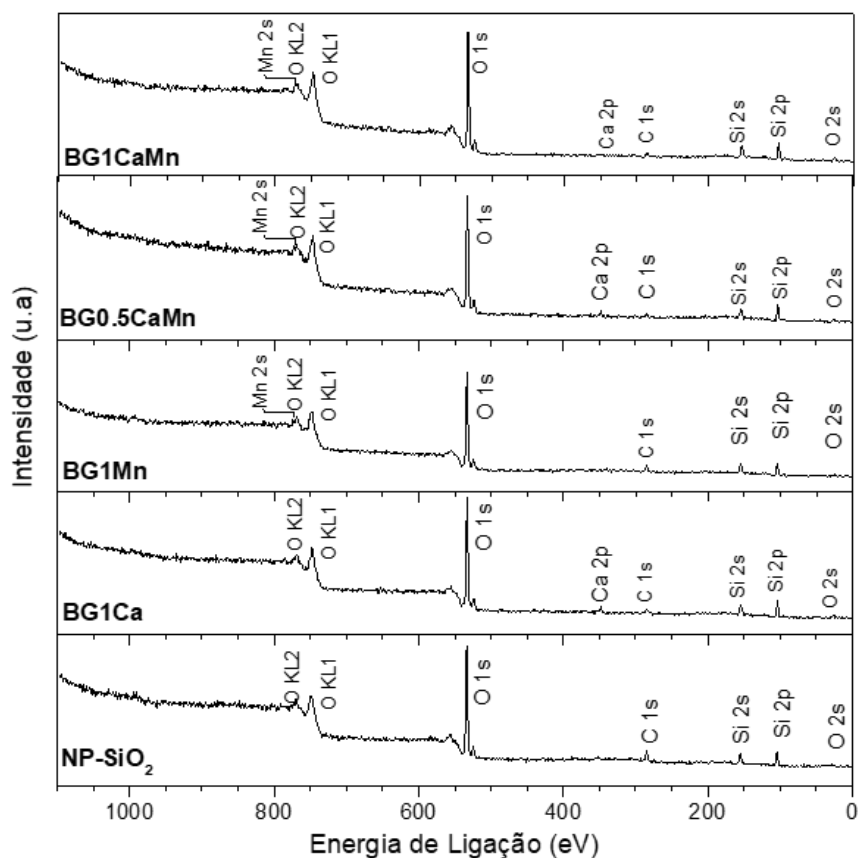


Figura 4.6. Espectros de varredura de XPS para as amostras NP-SiO₂, BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn.

A Figura 4.7(a) apresenta o espectro de alta resolução Si 2p para as NP de vidro bioativo, a fim de investigar a influência da incorporação de íons modificadores na rede de sílica. Os resultados de energias de ligação para cada amostra e componentes analisados estão apresentados na Tabela 4.5. Uma banda bem resolvida entre 103,2 e 104,3 eV foi observada para todas as amostras, encontrando-se na faixa relatada para vidros silicatos^(124–126). Um valor mais elevado de energia de ligação (BE) foi encontrado para NP-SiO₂ (104,3 eV) quando comparado à BE reportada para sílica fundida na literatura (103,9 eV)⁽¹²⁷⁾, o que pode estar relacionado a um maior número de grupos hidroxila (Si-OH) na superfície do vidro bioativo mesoporoso, deslocando os valores de BE. De fato, trabalhos anteriores mostraram que os grupos silanóis são mais eletronegativos, deslocando BE para valores mais altos, conforme observado neste trabalho^(128,129).

Os valores máximos da banda de Si 2p foram deslocados para valores mais baixos após a incorporação de íons de cálcio e manganês para todas as amostras, conforme observado na Figura 4.7(a). Vários estudos relataram comportamento semelhante usando diferentes íons modificadores de rede, como Pb, Na e K ^(127,130,131). Soulé e colaboradores também relataram valores mais baixos de BE para Si 2p devido a presença de grupos menos eletronegativos, nesse caso pela modificação da superfície de sílica por enxertos orgânicos ⁽¹³²⁾. Portanto, esse deslocamento indica que os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} atuam como modificadores de rede, rompendo uma ligação Si-O-Si (oxigênio ligante – *bridging oxygen*, BO) e formando uma ligação iônica Si-O-M⁺ (oxigênio não-ligante – *non-bridging oxygen*, NBO), onde M⁺ pode ser Ca^{2+} ou Mn^{2+} ^(81,118). Esses íons, especialmente Ca^{2+} , mas também Mn^{2+} , são menos eletronegativos do que Si^{4+} , fazendo ligação iônica com oxigênio não-ligante (NBO) e efetivamente cedendo elétrons para a ligação. Portanto, a densidade eletrônica na ligação Si-NBO é aumentada, reduzindo sua energia de ligação em relação ao Si-O-Si. A incorporação de íons modificadores de rede altera a estrutura do vidro bioativo, formando uma rede menos conectada, o que favorece a resposta biológica do material quando exposto a fluidos corporais, uma vez que permite que moléculas de água penetrem na rede, resultando em liberação mais rápida de íons ^(103,133). A importante presença de NBO foi também identificada na análise de FTIR.

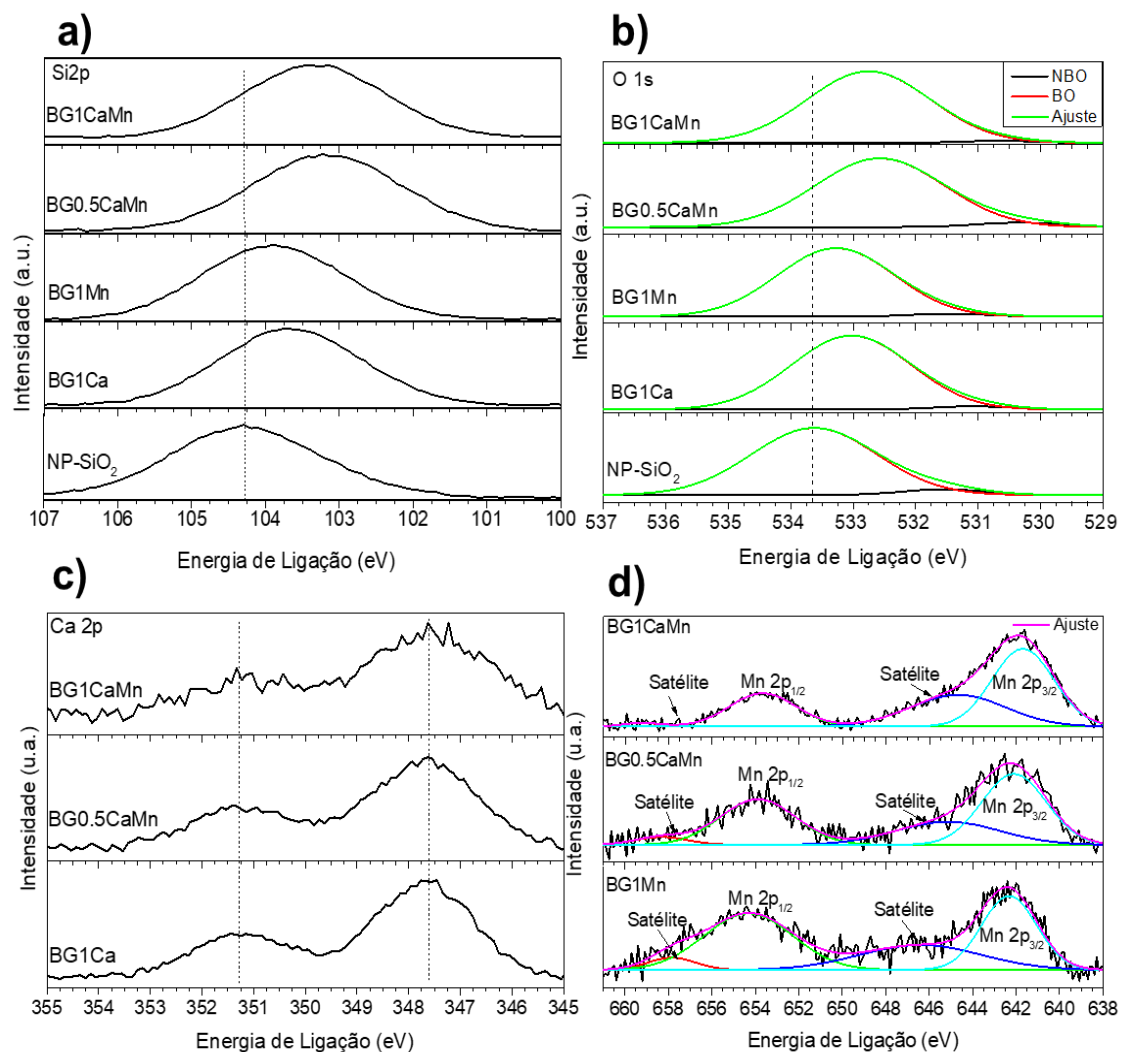


Figura 4.7. Espectros de XPS de alta resolução para a) Si 2p, b) O 1s, c) Ca 2p e d) Mn 2p.

Tabela 4.5. Valores de energia de ligação obtidos pelos espectros de alta resolução de Si 2p, O 1s, Ca 2p e Mn 2p para as nanopartículas de vidro bioativo.

Amostras	Energia de Ligação (eV)				
	Si2p	O1s	Ca2p	Mn2p	
				Multipletos	Satélites
NP-SiO ₂	104,3	531,6/533,6	-	-	-
BG1Ca	103,7	531,1/533,0	347,7/351,2	-	-
BG1Mn	103,9	531,5/533,3	-	642,3/654,3	646,4/657,9
BG0.5CaMn	103,2	530,3/532,6	347,7/351,2	642,1/653,9	645,1/658,3
BG1CaMn	103,4	530,7/532,8	347,6/351,2	641,7/653,7	644,7/659,2

O espectro de alta resolução O 1s fornece importantes informações sobre os tipos de ligações de óxidos em silicatos através da sua deconvolução. Os espectros de alta resolução O 1s obtidos para as NP de vidro bioativo são apresentados na Figura 4.7(b), e um comportamento semelhante ao dos espectros Si 2p pode ser observado. Todas as amostras apresentaram uma banda principal bem resolvida com máximo entre 533,6 e 532,6 eV, associada a contribuições de oxigênio ligantes (BO), e uma banda menor em energia de ligações mais baixas (530,3 – 531,6 eV), associada à contribuições de oxigênios não-ligantes, NBO ⁽¹²²⁾. Pode-se observar também nos espectros, que a banda O 1s foi ligeiramente deslocada para valores baixos de BE após a incorporação de Ca e Mn quando comparado ao NP-SiO₂. Trabalhos anteriores mostraram que as contribuições de NBO são geralmente observadas em valores de BE mais baixos do que contribuições de BO em vidros silicatos ^(123,131,133), indicando que os íons Ca e Mn estariam agindo como modificadores de rede nas nanopartículas mesoporosas de sílica.

Os espectros de alta resolução Ca 2p para as diferentes amostras contendo esse elemento são apresentados na Figura 4.7(c), sendo formado por duas bandas características do desdobramento dos multipletos Ca 2p_{3/2} e Ca 2p_{1/2}, identificados em aproximadamente 347,7 e 351,2 eV, compatíveis com valores de compostos de cálcio relatados na literatura ^(94,134). Não foram observadas diferenças significativas nos espectros das diferentes formulações. Além disso, o valor típico da diferença de BE entre os multipletos de 3,5 eV para compostos de cálcio ^(135,136) foi também verificado para todas as amostras.

O estado de oxidação do Mn foi investigado através espectro de alta resolução para Mn 2p para as amostras de vidro bioativo contendo esse elemento (BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn), conforme apresentado na figura 4.7(d). A deconvolução permite identificação dos principais aspectos discutidos na literatura. Duas bandas principais referentes ao desdobramento dos multipletos Mn 2p_{3/2} e Mn 2p_{1/2} ⁽¹²²⁾ podem ser identificadas em todas as amostras em aproximadamente 642,0 eV e 654,0 eV, respectivamente. Estudos mostram que essas bandas se encontram na faixa característica de compostos de manganês com valência II e III (Mn²⁺ e Mn³⁺) ^(137,138), embora a identificação exata de diferentes compostos de manganês nos espectros de XPS seja desafiadora, uma vez que o manganês pode ser encontrado em seis diferentes estados de oxidação com energias de ligação semelhantes e sobreposição de multipletos ⁽¹³⁹⁾. No entanto, a presença de bandas satélites nos multipletos, identificados em aproximadamente 645,1 a 646,4 eV e em 657,9 a 659,2 eV fortemente sugerem a presença de Mn²⁺ ^(122,137,138). Estudos prévios relatam que o Mn está

geralmente presente em vidros silicatos no estado de oxidação Mn^{2+} , embora também seja possível para Mn^{3+} ⁽¹⁴⁰⁾, sugerindo presença de Mn^{2+} na estrutura do vidro bioativo.

A confirmação pela análise de XPS do principal estado de oxidação Mn^{2+} , bem como a importante presença de grupos oxigênio não-ligantes, resultantes da incorporação de íons modificadores de rede, são fortes indicativos de que, ao menos parte dos íons Mn adicionados, podem de fato ter sido incorporados à rede de vidro bioativo. Conforme já mencionado, a presença de Mn na estrutura do vidro bioativo foi relacionada a melhoria na adesão celular e na proliferação e diferenciação de osteoblastos ^(30,92,122). A presença de óxidos de manganês como uma segunda fase foi identificada nas amostras com maior teor de manganês (BG1Mn e BG1CaMn), no entanto as análises estruturais avaliadas em conjunto sugerem que os íons cálcio e manganês foram, ao menos em parte, incorporados a rede do vidro atuando como íons modificadores de rede, aumentando a presença de NBO e obtendo uma rede de sílica menos conectada.

4.6.4 Características texturais

As propriedades texturais das amostras de vidro bioativo foram avaliadas por análise de adsorção de N_2 . As isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e o perfil de distribuição de tamanho de poros derivado das curvas de dessorção, pelo método BJH, são apresentadas na Figura 4.8. Os valores de área superficial, obtidos pelo método BET, e volume e tamanho de poros obtidos utilizando método BJH são listados na Tabela 4.6. Em todas as amostras foram identificadas isotermas do tipo IV, segundo classificação IUPAC ⁽¹⁴¹⁾, associadas a materiais contendo mesoporos (poros entre 2 e 50 nm). Resultado similar foi reportado por Chang e colaboradores para nanopartículas mesoporosas de sílica obtidas utilizando CTAB como surfactante ⁽⁹³⁾. Histerese discreta pode ser observada em todas as amostras na região de pressão relativa de 0,8 a 0,9, sendo classificada como H1, típica de poros cilíndricos abertos ^(101,141). De fato, a ocorrência mais significativa do fenômeno de histerese, para materiais com poros cilíndricos se dá para mesoporos acima de 4 nm ⁽¹⁴¹⁾, no entanto todas as amostras deste trabalho apresentam tamanho de poros da ordem de 3 nm, conforme observado na tabela 4.6, justificando a histerese menor observada.

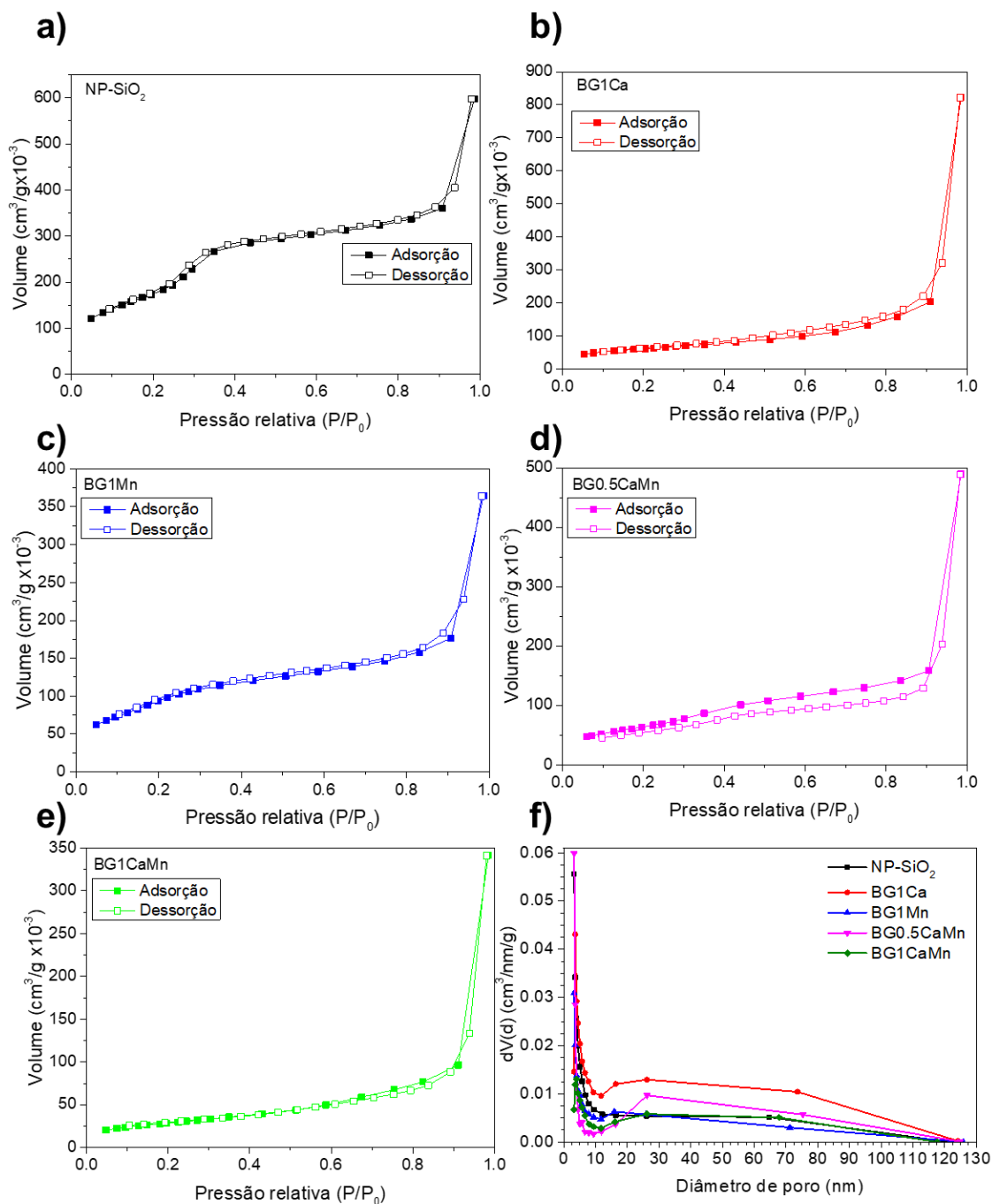


Figura 4.8. Isotermas de adsorção de N₂ e distribuição de tamanho de poros (método BJH) das amostras de vidro bioativo.

O tamanho de poros das amostras (Tabela 4.6) não sofreu influência significativa devido às diferentes formulações utilizadas. A área superficial (SSA), volume e tamanho de poros calculados para as amostras estão de acordo com dados previamente reportados para nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo^(79,101,142). NP-SiO₂ apresentou elevada área superficial específica (705,1 m².g⁻¹), sendo que a adição de íons, tanto Ca quanto Mn, resultaram em redução da SSA para as outras amostras. Martinez e

colaboradores verificaram redução da área superficial com o aumento da concentração de CaO em partículas de vidro no sistema binário SiO₂-CaO, porém não foi realizada uma discussão sobre o resultado ⁽¹⁰⁰⁾. Alguns estudos atribuem a redução da área superficial associada à incorporação de íons modificadores de rede devido à quebra da estrutura conectada e porosa de SiO₂ ^(143–145). A modificação de rede pode de fato alterar a estrutura porosa, como reportado por Arcos e colaboradores na comparação com estrutura de sílica de poros ordenados, em que a adição de 10 %mol CaO produziu uma estrutura amorfa com significativa redução de área superficial ⁽¹⁴⁶⁾.

Tabela 4.6. Propriedades texturais obtidas pela análise de adsorção de N₂ para as amostras de vidro bioativo.

Amostras	Área superficial específica (m ² .g ⁻¹)	Volume de poros (cm ³ .g ⁻¹)	Diâmetro médio de poros (nm)
NP-SiO ₂	705,1	0,555	3,3
BG1Ca	223,9	1,249	3,6
BG1Mn	376,6	0,425	3,2
BG0.5CaMn	262,7	0,693	3,3
BG1CaMn	105,1	0,512	4,0

Neste trabalho, a amostra BG1Mn, na qual apenas Mn²⁺ foi adicionado, apresentou SSA maior (376,6 m².g⁻¹) do que BG1Ca (223,9 m².g⁻¹), na qual apenas Ca²⁺ foi adicionado. Nesse contexto, considerando que ambos íons (Ca²⁺ e Mn²⁺) são incorporados como modificadores de rede, espera-se que Ca²⁺ resulte em maior redução da área superficial como resultado de maior expansão da rede de sílica devido ao seu maior raio iônico (1,00 Å) em relação ao Mn²⁺ (0,83 Å) ⁽¹⁴⁷⁾. Resultados similares foram obtidos em estudos que utilizaram íons Sr²⁺ em substituição de Ca²⁺, uma vez que Sr²⁺ possui raio iônico maior, provocando maior alteração na rede de vidro bioativo ^(109,145). Estudos de nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo contendo Mn relataram aumento da SSA com aumento da concentração MnO na composição do material ^(32,92). No entanto, nesses estudos MnO foi adicionado ao sistema em substituição parcial de CaO. Portanto o efeito de redução da concentração de CaO prevaleceu, provocando uma alteração menor na rede, e resultando em área superficial maior. Neste estudo, MnO, sendo incorporado como modificador de rede, provoca distorção da rede e redução da SSA, porém em menor intensidade que a incorporação de CaO. A amostra BG0.5CaMn, com incorporação de Mn e Ca, apresentou valor de área superficial intermediário (262,7 m².g⁻¹).

¹⁾ e está de acordo com a justificativa proposta. No entanto, BG1CaMn apresentou valor de área superficial muito inferior ($105,1 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$). O volume de poros calculado foi maior para as amostras com maior incorporação de Ca, $1,249 \text{ (cm}^3.\text{g}^{-1})$ e $0,693 \text{ (cm}^3.\text{g}^{-1})$ para BG1Ca e BG0.5CaMn respectivamente, possivelmente como efeito de distorções na rede provocadas pela incorporação de íons, especialmente Ca^{2+} , que possui maior raio iônico, como discutido para a área superficial. Já o volume de poros para a amostra BG1Mn foi reduzido significativamente para $0,425 \text{ (cm}^3.\text{g}^{-1})$. Nesse caso, possivelmente a presença de óxidos de manganês como segunda fase, conforme identificado na análise de DRX, pode ter sido depositada na superfície dos poros, reduzindo o volume medido.

De forma geral, as amostras apresentaram características texturais atrativas para aplicações como biomateriais, como a sua estrutura mesoporosa com elevadas áreas superficiais, acima de $200 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ para a maioria das formulações, o que favorece a liberação iônica da superfície do biomaterial e, conseqüentemente, aumentam a bioatividade do vidro bioativo ⁽¹¹⁸⁾. Além disso, presença de mesoporos favorece a nucleação de hidroxiapatita carbonatada, uma vez que os poros podem exercer a função de sítios de nucleação ⁽²¹⁾.

4.6.5 Ensaio de bioatividade in vitro e liberação iônica por imersão em SBF

O entendimento do processo de liberação de íons por exposição das partículas de vidro bioativo em fluido corporal simulado (SBF) pode ser utilizado para prever o comportamento de degradação de materiais bioativos e de formação de camada de hidroxiapatita carbonatada, um indicativo da bioatividade de vidros ^(96,97). A Figura 4.9 apresenta a concentração de Si, Ca e Mn em solução SBF após imersão das nanopartículas de vidro bioativo por diferentes períodos de tempo (BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn), além da concentração de P em solução, essencial para a avaliação da formação da camada de HAC em vidros bioativos.

Observa-se uma rápida liberação de Si nas primeiras 24 horas de imersão para todas as amostras, atingindo valor máximo de 91 ppm para BG1Mn, com posterior redução e estabilização. A redução da concentração de Si após as 24 horas iniciais pode estar relacionada à saturação da solução, seguida pela deposição de um composto de silicato na superfície das partículas, conforme relatado anteriormente ⁽¹⁴⁸⁾, o que também

poderia reduzir a taxa de degradação do vidro nos períodos seguintes. Comportamento semelhante de liberação de Si também foi relatado para diferentes sistemas de nanopartículas mesoporosas de sílica ^(78,145), e pode ser atribuído ao mecanismo de degradação desses materiais, em que diversos fatores, tais como pH e tipo de fluido de imersão ⁽⁷⁸⁾, presença de outros íons ^(110,149), rede de SiO₂ mais conectada e porosidade ⁽¹⁴⁸⁾, entre outros, podem afetar o processo de degradação. É esperado que as taxas de liberação das amostras sejam elevadas por se tratarem de nanopartículas mesoporosas com altos valores de área de superficial, conforme resultados de BET. Não foi observada diferença significativa para os perfis de liberação de Si entre as diferentes amostras avaliadas neste trabalho. Após 7 dias de imersão em SBF, a concentração de Si atingiu aproximadamente 60 ppm para todas as amostras. Estudos anteriores mostraram efeitos benéficos da liberação de Si na faixa de 0,1 a 100 ppm na diferenciação, proliferação e atividade dos osteoblastos ^(150,151).

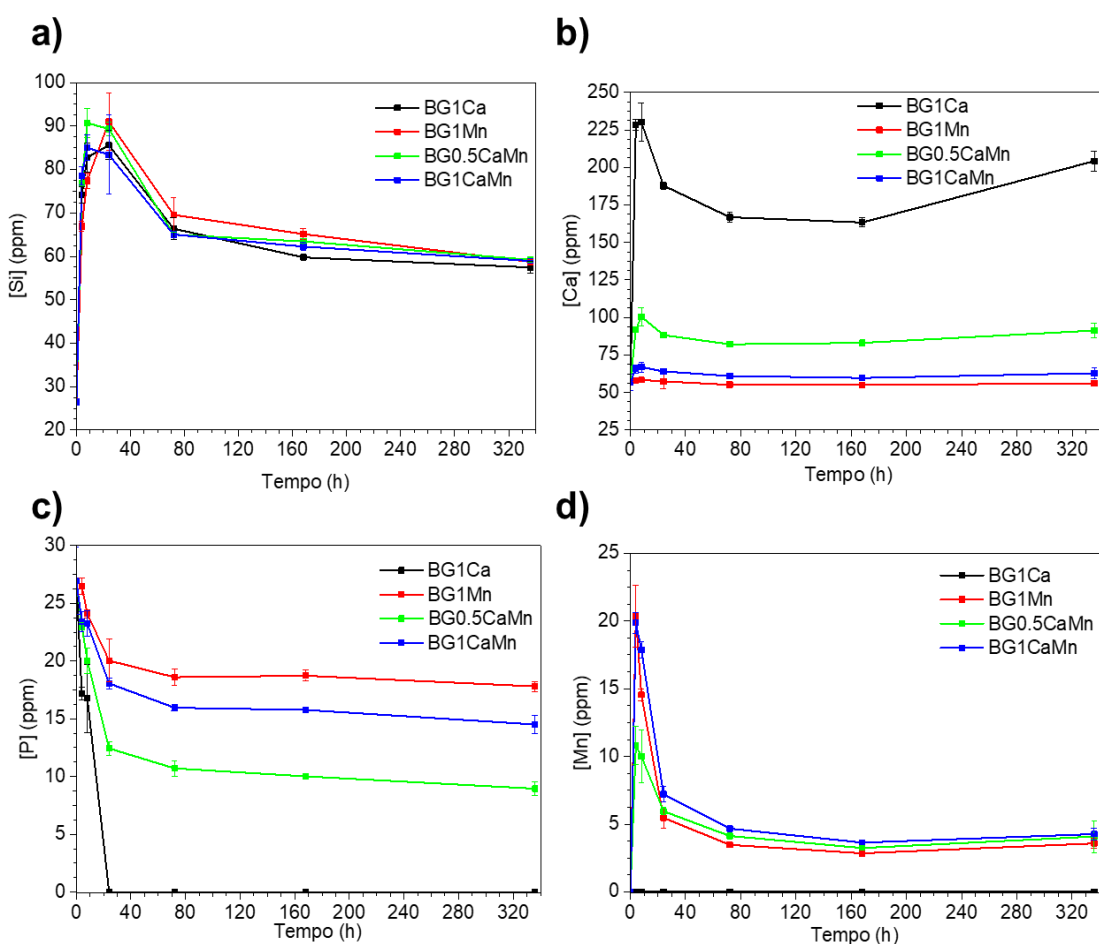


Figura 4.9. Perfil de liberação de íons Si, Ca, P e Mn para amostras BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn em imersão de SBF.

A concentração de Ca em solução durante o período de estudo para todas as amostras é apresentada na Figura 4.9(b). A concentração de Ca aumentou nas horas iniciais de estudo, proporcionalmente ao teor de Ca de cada amostra, chegando a 230 ppm após 8 horas de imersão para BG1Ca (que possui maior teor de Ca). BG0.5CaMn e BG1CaMn apresentaram perfil de liberação de Ca semelhante, chegando a 100 e 67 ppm após 8 horas de imersão em SBF, respectivamente. Foi observada redução na concentração de Ca após 24 horas de estudo para todas as amostras contendo esse íon, o que pode estar relacionado à migração de Ca para a superfície das partículas e posterior deposição de uma camada rica em Ca, que então pode levar à formação de uma fase de fosfato de cálcio na superfície do vidro ⁽¹⁰¹⁾. BG1Mn, ao qual apenas Mn foi incorporado, não apresenta liberação de Ca, conforme esperado, e apenas manteve constante a concentração original presente em SBF. No entanto, uma leve redução, de 57 para 55 ppm, na concentração de Ca após 14 dias pode ser observada para essa amostra, o que também pode indicar a migração de íons e formação inicial de uma camada de fosfato de cálcio na superfície do vidro. A liberação de íons cálcio em meio fisiológico, além de atuar no processo de biomineralização, pode induzir a proliferação de osteoblastos aumentando o efeito bioativo do vidro bioativo ⁽¹⁵¹⁾.

A concentração de P reduziu rapidamente durante as 24 horas iniciais de imersão para todas as amostras, como apresentado na Figura 4.9(c), confirmando a migração deste íon da solução de SBF para a superfície de vidro para formar uma camada rica em Ca-P. Para BG1Ca, a concentração de P atingiu valores próximos a zero após 24 horas, então pode-se considerar que todo P presente na solução foi consumido para formar uma camada rica em Ca-P. Amostras com maior teor de Ca apresentaram redução mais rápida na concentração de P em SBF, reduzindo conforme o aumento na concentração de Mn, indicando que a precipitação dos íons fosfato na superfície do vidro foi mais lenta quando esse íon estava presente. No entanto, mesmo observando uma redução da cinética de bioatividade para amostras contendo Mn, a evidência da formação da camada de HCA foi encontrada em todas as amostras, tendo como base os perfis de liberação de P e Ca em SBF.

Uma liberação rápida de Mn também foi observada para as amostras contendo esse íon durante as 24 horas iniciais de imersão em SBF, atingindo valores máximos de 20 ppm para BG1Mn e BG1CaMn e 11 ppm para BG0.5CaMn. BG1CaMn e BG1Mn apresentaram liberação semelhante de Mn nas primeiras horas de estudo, apesar de BG1CaMn apresentar menor concentração de Mn em sua composição, o que pode ser explicado pela presença de Ca neste vidro, levando a uma rede menos conectada e

aumentando sua taxa de liberação de íons. Entre 24 e 72 horas, a concentração de Mn em solução reduziu para todas as amostras, estabilizando a partir de então. A redução observada pode estar relacionada à migração de íons Mn da solução para a superfície das partículas e à deposição de uma camada rica em Mn. Comportamento semelhante foi relatado anteriormente para vidros com menor teor de Mn do que o relatado neste trabalho, no entanto, a natureza do precipitado não pôde ser identificada ⁽³⁰⁾. A formação de um precipitado rico em Mn e P pode ter sido favorecido pelo excesso desses íons em solução, conforme estabelecido em estudos previamente relatados envolvendo óxidos de manganês em presença de fluidos ricos em fosfatos ^(152,153). No entanto, também é possível que íons Mn estejam envolvidos em mecanismos de bioatividade e sejam incorporados em precipitados de hidroxiapatita ou seu precursor fosfato de cálcio, como substitutos de íons Ca^{2+} , comportamento descrito em diferentes trabalhos reportados na literatura ^(154,155). Essa substituição é facilitada devido à mesma valência e raios iônicos não muito diferentes dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} ^(104,156). Após 72h, houve estabilização da concentração de Mn, atingindo patamares com valores entre 3,5 e 4,7 ppm. Estudos prévios estabeleceram que a liberação controlada de íons Mn até 5,5 ppm podem favorecer a proliferação de osteoblastos e o processo de mineralização óssea ^(156,157), valores que estão dentro do observado neste trabalho.

Os resultados do ensaio de liberação por imersão em SBF confirmaram que as nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo apresentam capacidade de liberação iônica dentro das faixas de concentração bioativas para íons Si, Ca e Mn e permitem ajuste da cinética de dissolução de acordo com concentração e propriedades texturais. Além disso, a redução no teor de P e Ca em solução é um indicativo da formação de uma camada rica em fosfato de cálcio na superfície dos vidros bioativos.

4.6.6 Avaliação preliminar de bioatividade *in vitro*

Diversos estudos evidenciam que um ensaio *in vitro* por imersão de biomateriais em um fluido corporal simulado (SBF) pode prever bioatividade *in vivo* através da avaliação da capacidade de deposição de uma camada de hidroxiapatita na superfície do material ^(96,158). Para confirmar a formação de camada rica em Ca-P e a bioatividade do material, as amostras produzidas foram avaliadas antes (0 h) e após 14 dias de imersão em SBF através de MEV/EDS, FTIR e DRX. As imagens de MEV das amostras e seus respectivos espectros de EDS são apresentados na Figura 4.10. Antes da imersão, nanopartículas esféricas e superfícies lisas podem ser observadas para todas as

amostras. Após o período de imersão, as imagens em MEV mostraram uma superfície rugosa e a perda da forma esférica bem definida, devido à dissolução das partículas de vidro e deposição da camada rica em Ca-P. O aumento do teor de P e Ca na superfície das partículas após o ensaio foi confirmado por EDS, e também é um indicativo da deposição de uma camada rica em Ca-P na superfície desse material, estando de acordo com o previamente observado no estudo de liberação de íons.

Nas amostras BG1Mn e BG1CaMn, foi observado ainda por MEV a formação de estruturas compostas por folhas dispostas radialmente (Figura 4.11), e os respectivos espectros de EDS mostram predominância de Mn e P nessas regiões. A estrutura observada pode estar relacionada à formação de fosfato de manganês, conforme também observado em trabalhos reportados na literatura ^(159–161). Jin e colaboradores identificaram uma rota de precipitação espontânea de fosfato de manganês II hidratado ($\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) a partir de soluções em que estão presentes íons Mn^{2+} e PO_4^{2-} , condição semelhante a obtida na imersão em SBF ⁽¹⁶²⁾. Além disso, vários estudos demonstraram a eficiência de óxidos de manganês e outros metais como sistemas de adsorção de íons fosfatos ^(152,163,164). Resultados de MEV/EDS apresentados neste trabalho sugerem a formação de uma estrutura rica em Mn e P após imersão em SBF das amostras contendo maiores concentrações de Mn, conforme relatado em outros trabalhos.

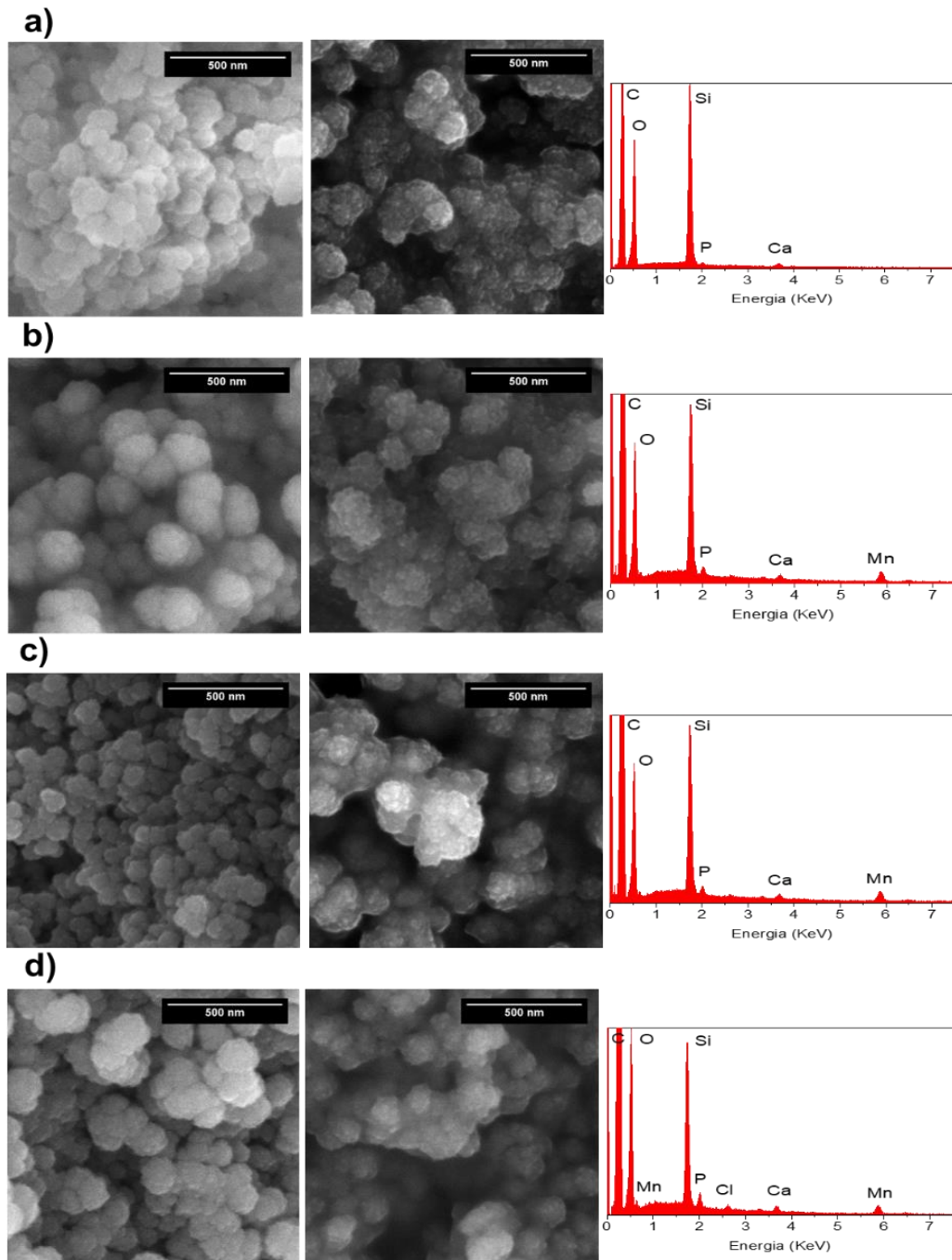


Figura 4.10. Imagens de MEV e respectivos EDS antes (0 h) e após 14 de imersão em SBF para a) BG1Ca, b) BG1Mn, c) BG0.5CaMn e d) BG1CaMn.

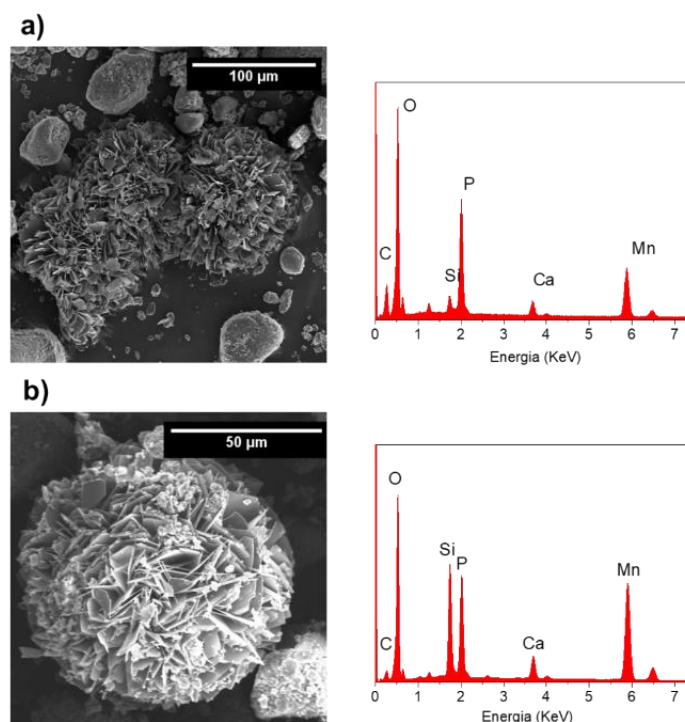


Figura 4.11. Imagens de MEV e respectivos EDS de estrutura em formato de flor identificadas para as amostras a) BG1Mn e b) BG1CaMn.

Os espectros de FTIR para todas as amostras antes e após imersão em SBF são apresentados na Figura 4.12. A presença de banda dupla entre 600 e 500 cm^{-1} , relacionada com a deformação angular P-O em grupos PO_4^{3-} , pode ser identificada em todas as amostras e é característica de fosfatos, sugerindo a formação de uma camada rica em Ca-P na superfície dos vidros ^(97,101). Um aumento da banda em aproximadamente 960 cm^{-1} , característico de ligações Si-NBO, também foi observado e pode ser relacionado à quebra de ligações Si-O-Si, aumentando a presença de oxigênio não-ligante, devido à dissolução das partículas ⁽¹⁰²⁾. Para a amostra BG1Ca, essas alterações no espectro de FTIR foram observadas a partir de 7 dias de imersão, indicando bioatividade do material, e estando de acordo com os resultados prévios de liberação iônica. As amostras contendo Mn apresentaram uma banda característica de estiramento de Mn-O entre 600 e 500 cm^{-1} antes da imersão, porém é possível observar alteração na intensidade dessas bandas, possivelmente devido à sobreposição das bandas de P-O. Essa influência da banda de fosfato decresce com aumento da concentração de Mn nas amostras, sendo que BG1Mn, com maior concentração de Mn, apresenta apenas uma discreta alteração nessas bandas.

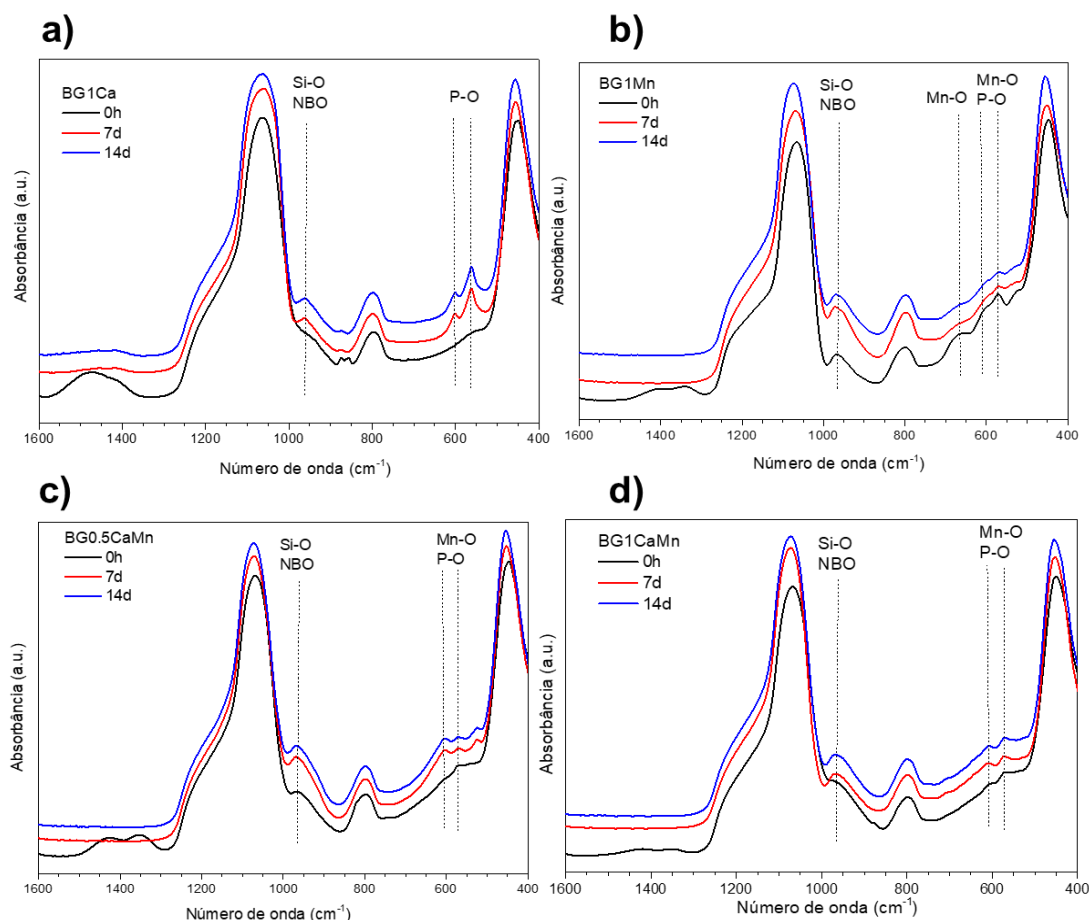


Figura 4.12. Espectro de FTIR antes (0 h) e após (7 e 14 dias) para a) BG1Ca, b) BG1Mn, c) BG0.5CaMn e d) BG1CaMn.

Os resultados de DRX após imersão das amostras em SBF são apresentados na Figura 4.13 e mostram picos característicos hidroxiapatita carbonatada (HAC) (COD 96-900-3551) em todas as amostras, confirmando a bioatividade dos materiais ⁽⁹¹⁾. Após 7 dias de imersão, já é possível observar picos cristalinos compatíveis com padrão de hidroxiapatita carbonatada para as amostras BG1Ca. O mecanismo de deposição de hidroxiapatita envolve formação inicial de uma camada rica em sílica na superfície do vidro, seguida por troca catiônica, sendo que grupos Si-OH agem como sítios de nucleação para fosfato de cálcio amorfo ⁽⁹⁷⁾, de forma que a grande presença desses grupos em vidros bioativos de estrutura mesoporosa e menos conectada, favorece precipitação de HAC ⁽¹⁰⁹⁾. As amostras contendo Mn apresentaram picos de difração relacionados a estruturas de Mn₂O₃ e MnO antes da imersão, que se mantiveram mesmo após 14 dias de estudo. Picos referentes à HAC também foram observados em todas as amostras contendo Mn. Além disso, amostras com maior teor de Mn (BG1Mn e BG1CaMn) apresentaram também picos cristalinos relacionados ao fosfato de

manganês, de acordo com padrão COD (90-152-9151), confirmando a sua deposição na superfície das partículas, corroborando resultados prévios obtidos por MEV.

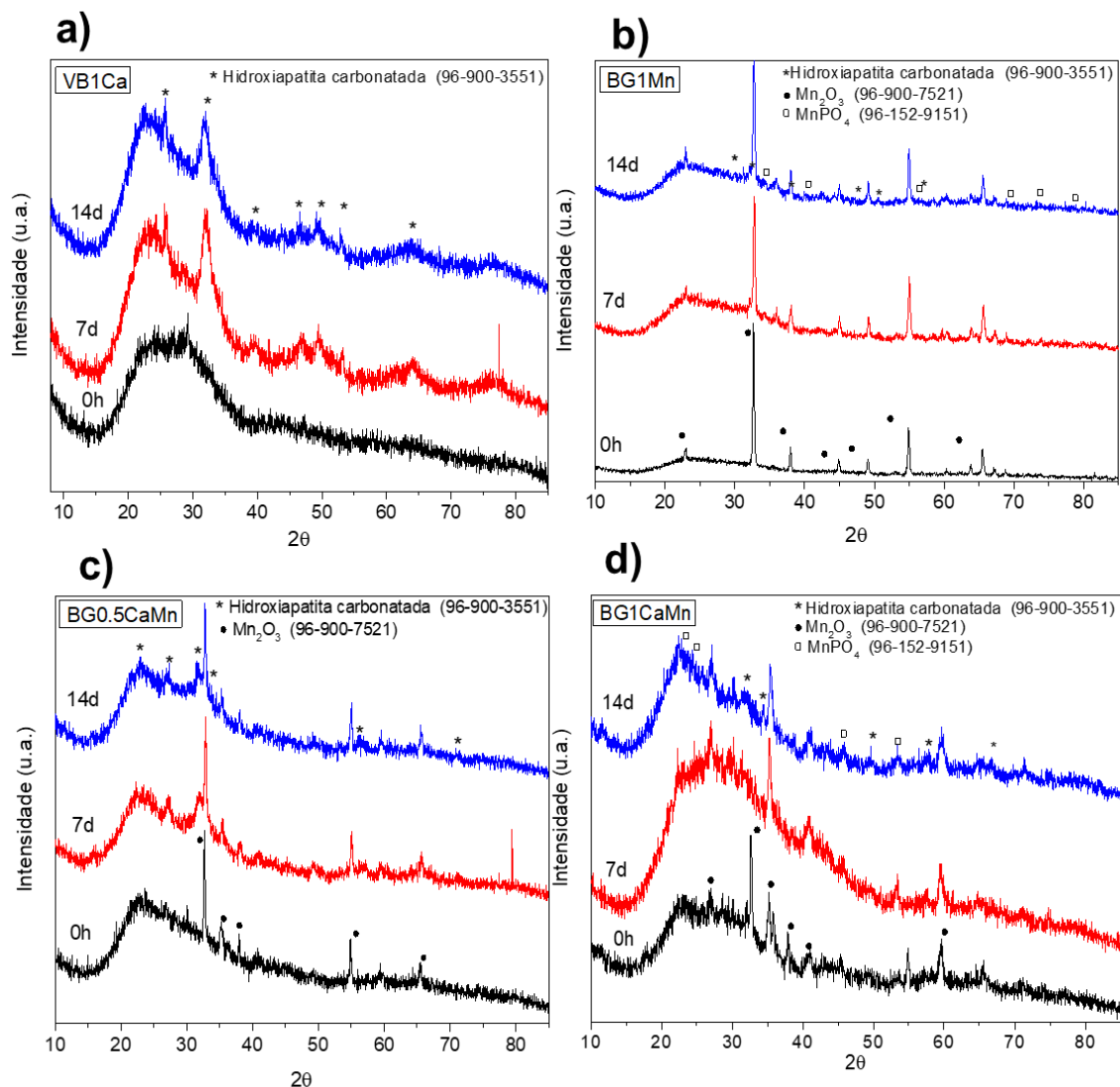


Figura 4.13. Padrões de DRX antes (0 h) e após (7 e 14 dias) para a) BG1Ca, b) BG1Mn, c) BG0.5CaMn e d) BG1CaMn.

As análises de MEV, FTIR e DRX do vidro bioativo após imersão em SBF indicam que o aumento da concentração de Mn reduz a cinética de bioatividade do vidro bioativo, ao menos para as etapas iniciais de formação de camada de hidroxiapatita, em acordo com estudos prévios^(30,90). Outros estudos mostram que a adição de íons como Zn^{2+} e Sr^{2+} também retardam processo de nucleação e reduzem bioatividade do vidro bioativo^(101,145). A deposição de íons PO_4^{2-} como fosfato de manganês, nas amostras com maior concentração de Mn, pode ter reduzido a formação de fosfato de cálcio. No entanto, resultados sugerem que, ajustando composição e propriedades físicas, os materiais se tornam promissoras plataformas para liberação controlada de íons terapêuticos para

regeneração óssea. Partículas nanométricas com estrutura mesoporosa e rede menos conectada, conforme avaliado para esses materiais, podem explicar a dissolução rápida observada e a formação de camada de hidroxiapatita carbonatada, sendo um importante indicativo da bioatividade dos materiais analisados.

4.6.7 Avaliação de citotoxicidade – MTT

A presença de Mn^{2+} em biomateriais para regeneração óssea tem sido muito estudada devido a sua influência na remodelação extracelular, adesão celular e potencial osteogênico ^(30,88,89,165). Por outro lado, muitos estudos mostraram efeitos negativos do uso de altas dosagens de Mn sobre viabilidade e proliferação celular ^(31,85,92). Portanto, a verificação do efeito de diferentes dosagens de Mn sobre o comportamento celular e níveis de tolerância são fundamentais na avaliação de biomateriais para liberação controlada desse íon e aplicação em tecidos ósseos.

O efeito da exposição de células pré-osteoblásticas ao produto iônico (PI) das NPs de vidro bioativo em diferentes concentrações e tempos de exposição foi avaliado por MTT utilizando diferentes diluições do PI, conforme apresentado na Figura 4.13. A análise em diferentes períodos de tempo permite avaliação de um efeito agudo, nos primeiros ciclos celulares, bem como um efeito mais crônico, após 72 h, que correspondem a 3 ciclos celulares. Estudo de diferentes concentrações do PI das amostras permite uma investigação do efeito de uma faixa de concentrações sobre o comportamento celular. Conforme ISO 10993-5, um material é considerado não citotóxico quando a viabilidade celular se apresenta acima de 70% ⁽¹⁶⁶⁾. As amostras NP-SiO₂, BG1Ca, BG0.5CaMn e BG1CaMn apresentaram viabilidade celular acima desse nível para todos os tempos e todas as concentrações estudadas, sendo consideradas não citotóxicas. A atividade mitocondrial dessas amostras foi comparável ao grupo controle de viabilidade, não sendo observada diferença significativa nas condições avaliadas. Em 72 h, a maior concentração (2000 $\mu g.mL^{-1}$) apresentou maior viabilidade celular, com diferença significativa em relação às concentrações inferiores para BG1Ca, BG0.5CaMn e BG1CaMn indicando que o produto iônico das amostras estimula a proliferação celular. Estudos recentes demonstraram que vidros bioativos contendo Mn em baixas concentrações não apresentaram citotoxicidade, e favoreceram a viabilidade e proliferação de diferentes linhagens celulares ^(29,30,167).

No entanto, a amostra BG1Mn, com maior teor de Mn, apresentou efeito citotóxico mesmo na concentração mais baixa do produto iônico ($1000 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) para todos os períodos de tempo estudados. O estudo de Westhauser e colaboradores avaliou o efeito de diferentes concentrações de nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo no sistema $\text{SiO}_2\text{--P}_2\text{O}_5\text{--CaO--MnO}$ por contato direto e relatou efeito citotóxico para dosagem mais elevada em tempos prolongados ⁽⁹²⁾. As partículas utilizadas por Westhauser e colaboradores são similares ao estudo de Nawaz e colaboradores, cujo resultado de liberação iônica mostrou liberação contínua de Mn atingindo valores de mais de 10 ppm em 7 dias ⁽³²⁾. Outro estudo, reportado por Torres e colaboradores, também relatou que a incorporação de mais de 10 % molar de MnO em fosfato de cálcio e mostrou efeito negativo na viabilidade de células MC3T3-E1 em exposição a longo prazo ⁽⁸⁵⁾. Dessa forma, o resultado apresentado neste trabalho corrobora a ação dose-dependente da liberação de íons Mn durante a degradação de vidro bioativo.

Após 72 h, as amostras BG1Ca e BG1CaMn em $2000 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ apresentaram viabilidade celular significativamente superior ao grupo controle de viabilidade e a amostra BG0.5CaMn também apresentou valores da mesma ordem de grandeza do grupo controle, indicando ambiente favorável para células. Portanto essa concentração foi escolhida para realização de ensaio de ALP para avaliação preliminar de diferenciação osteogênica.

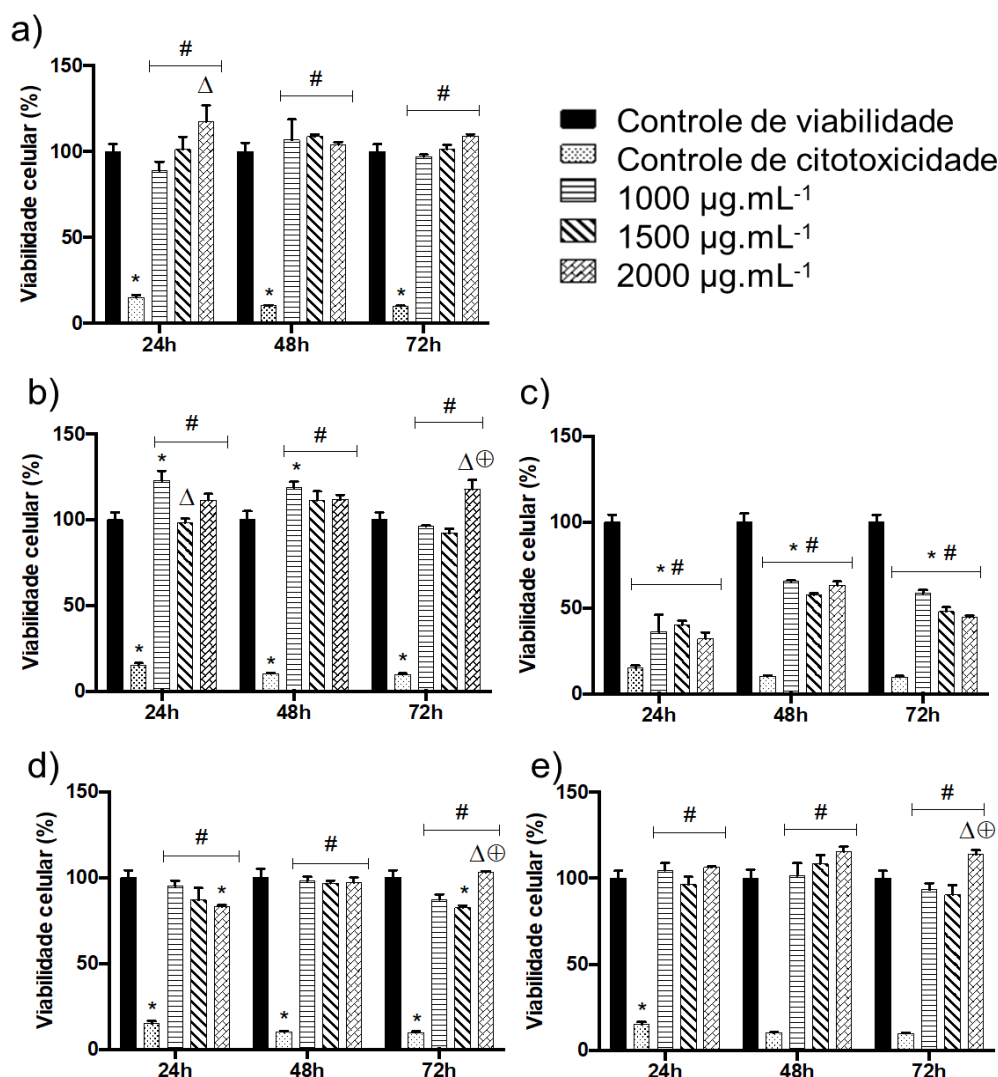


Figura 4.14. Gráficos de viabilidade celular avaliada por ensaio de MTT em três tempos (24, 48 e 72 h) e três concentrações (1000, 1500 e 2000 µg.mL⁻¹) para a) NP-SiO₂, b) BG1Ca, c) BG1Mn, d) BG0.5CaMn e e) BG1CaMn. *p<0,05 vs Controle de viabilidade; #p<0,05 vs Controle de Citotoxicidade; Δ p<0,05 vs 1000 µg.mL⁻¹; ⊕ p<0,05 vs 1500 µg.mL⁻¹.

4.6.8 Avaliação da atividade de fosfatase alcalina

ALP é considerada um marcador inicial de diferenciação osteogênica ^(98,168). Em geral, o desenvolvimento dos osteoblastos pode ser subdividido em três estágios: proliferação, maturação da matriz extracelular e mineralização ⁽¹⁶⁹⁾. As células MC3T3-E1 exibem um padrão de desenvolvimento sequencial de proliferação e diferenciação, resultando em tecido ósseo calcificado semelhante à formação óssea *in vivo* ^(98,170), sendo utilizada em muitos estudos para avaliação de potencial osteogênico de biomateriais ^(168,171,172). A

Figura 4.14(a) apresenta imagens das placas em diferentes períodos do ensaio de ALP das células MC3T3-E1 tratadas com produto iônico das amostras BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn. A alteração da coloração com aumento de cor arroxeada a partir de 7 dias, e maior quantidade em 14 e 21 dias, evidencia aumento da atividade de fosfatase alcalina. Os resultados da produção de ALP normalizados pelo grupo controle são apresentados na Figura 4.14 (b-e). Todas as amostras apresentaram valores estatisticamente significativos de produção de ALP, com exceção da amostra BG1Mn, em acordo com resultado de viabilidade celular, corroborando a avaliação de que o produto iônico dessa amostra atingiu níveis tóxicos, comprometendo a proliferação celular. BG1Ca apresentou aumento da expressão de ALP a partir de 3 dias, atingindo valor máximo em 7 dias, e posteriormente redução em 14 e 21 dias. As amostras BG0.5CaMn e BG1CaMn apresentaram aumento na produção de ALP atingindo valores máximos em 7 e 14 dias e na sequência, apresentando redução em 21 dias. Estudos mostram que durante as primeiras 1-2 semanas, as células proliferam lentamente, expressando a atividade de ALP e outros genes e proteínas específicos. Posteriormente, ocorre um estágio de maturação em que a mineralização da matriz é observada e o nível de ALP diminui ⁽¹⁷⁰⁾. O perfil de expressão de ALP dessas amostras está em acordo com a descrição da literatura indicando o processo de mineralização possivelmente teve início a partir de 21 dias.

Os resultados de estudos celulares são preliminares, sendo importante a avaliação de outros marcadores osteogênicos, no entanto são indicativos de que os produtos iônicos das amostras BG1Ca, BG0.5CaMn e BG1CaMn apresentam ambiente adequado para proliferação celular e potencial de estimular a diferenciação osteogênica. Resultados também reforçam a necessidade de controle da composição e propriedades físico-químicas do vidro bioativo que influenciam a liberação de íons, especialmente o manganês, para garantir liberação dentro da faixa terapêutica, evitando possíveis efeitos tóxicos em altas concentração de Mn.

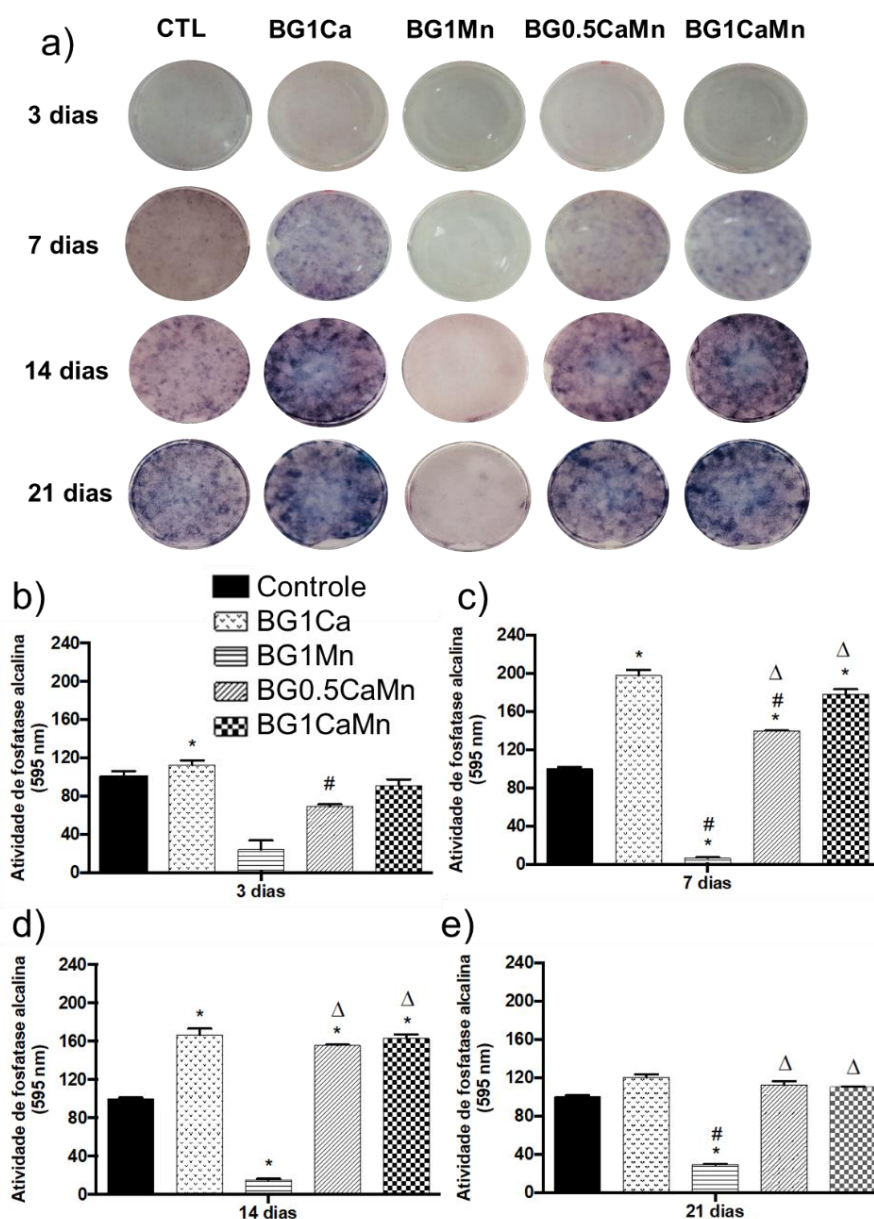


Figura 4.15. a) Imagens das placas do ensaio de ALP em cultura de MC3T3-E1 expostas a meio osteogênico (Grupo controle – CTL) e ao produto iônico de BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn. Gráficos de ALP em cultura de MC3T3-E1 expostas a meio osteogênico (Controle) e ao produto iônico de BG1Ca, BG1Mn, BG0.5CaMn e BG1CaMn em b) 3 dias, c) 7 dias, d) 14 dias e e) 21 dias. * $p < 0,05$ vs Controle; # $p < 0,05$ vs BG1Ca; $\Delta p < 0,05$ vs BG1Mn.

O estudo de viabilidade celular e fosfatase alcalina permitiu a exploração de diferentes composições de nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo, reforçando a necessidade de controle de liberação de íons para evitar níveis tóxicos. Nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo contendo até 8 %mol de MnO apresentaram liberação iônica adequada para potencial aplicação como material para regeneração óssea.

4.7 Conclusão

Nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo contendo diferentes concentrações de íon manganês foram obtidas utilizando um método de síntese em duas etapas, no qual os íons foram adicionados à nanopartículas de sílica previamente produzida através de processo de impregnação. A composição das amostras foi confirmada pelo método de fusão de metaborato de lítio e ICP-OES, obtendo amostras no sistema binário, em % molar, 87%SiO₂-13%CaO e 87%SiO₂-13%MnO e no sistema ternário 85%SiO₂-7%CaO-8%MnO e 89%SiO₂-2%CaO-9%MnO. Análise morfológica confirmou o tamanho das partículas em escala nanométrica, variando de 50 a 67 nm, e presença de porosidade. Análises de XPS indicaram que, apesar da presença de óxidos de manganês identificadas como segunda fase, ao menos uma parte de Mn²⁺ foi incorporada à estrutura das nanopartículas de vidro bioativo. As amostras apresentaram área superficial específica elevada, com valores entre 105 e 376 m².g⁻¹, e capacidade de liberação controlada de íons e bioatividade em ensaio de imersão em SBF. A adição de Mn reduziu a cinética de formação de camada de HAC. Resultados de ensaios de viabilidade celular e atividade de fosfatase alcalina indicaram a necessidade de controle da composição e propriedades físico-químicas do vidro bioativo para garantir liberação de íons dentro da faixa terapêutica, evitando possíveis efeitos tóxicos em alta concentração de Mn. Os resultados indicam que a incorporação de Mn em etapa de impregnação foi bem-sucedida e é uma alternativa promissora para obtenção de vidro bioativo com incorporação de íons com efeitos terapêuticos. As características físico-químicas das nanopartículas de vidro bioativo demonstram potencial para produção de compósitos como estratégia para aplicações em engenharia de tecidos. Além disso, a incorporação de Mn em nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo demonstrou potencial para aplicações como materiais osteogênicos em regeneração de tecidos ósseos. Ensaios biológicos complementares e estudos *in vivo*, bem como estudos de produção de nanocompósitos devem ser realizados para confirmação das propriedades superiores dos materiais.

Os resultados apresentados neste capítulo demonstram que a incorporação de íons Mn na estrutura de nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo, em concentrações controladas, permite obtenção de materiais bioativos com desempenho aprimorado. No próximo capítulo, a estratégia de incorporação de nanopartículas de vidro bioativo em matriz polimérica injetável é estudada com objetivo de obter um nanocompósito com aplicação minimamente invasiva.

CAPÍTULO 5. Estudo de Nanocompósito injetável de Pluronic® F-127 e Vidro Bioativo

5.1 Introdução

Na área dos tecidos conjuntivos, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos em todo o mundo na regeneração de ossos ^(6,173,174), tendões ⁽¹⁷⁵⁾ e cartilagens ^(3,176,177). Materiais bioativos como fosfatos de cálcio, hidroxiapatita e vidros bioativos são utilizados como materiais para implantes ósseos devido à capacidade de estimular respostas biológicas e particularmente se ligar ao tecido hospedeiro ⁽⁵⁾. Dentre esses materiais, o vidro bioativo se destaca por formar ligação com osso mais rapidamente, uma vez que, em um meio fisiológico, forma uma camada de apatita carbonatada em sua superfície, que é muito semelhante à apatita no osso ⁽²⁾. Uma das aplicações mais importantes para vidro bioativo é como preenchimento de defeitos ósseos que podem surgir devido a trauma, defeitos congênitos ou doenças como osteoporose ou remoção de tumor, com objetivo principal de estimular o reparo local ⁽⁵⁾. Para aplicação do material, em geral, são necessárias cirurgias, resultando em traumas de tecidos adjacentes e dor pós-operatória. Uma alternativa muito promissora é utilização de hidrogéis injetáveis como carreador de vidro bioativo permitindo preenchimento de defeitos irregulares através de procedimentos minimamente invasivos ^(6,7).

Hidrogéis termossensíveis de Pluronic® F-127 tem sido intensamente investigados para liberação controlada de medicamentos e de genes, bem como em engenharia de tecidos, graças à sua baixa toxicidade e capacidade de gelificar em condições fisiológicas em concentrações relativamente baixas ^(8,53). Hidrogéis de Pluronic® F-127 apresentam comportamento semelhante a líquido em temperaturas abaixo da temperatura de transição de fase (fase “sol”) e, acima de sua temperatura de gelificação, o material se comporta como um sólido (fase “gel”) ^(178,179). Adicionalmente, hidrogéis de F-127 são comparativamente mais baratos quando comparados a outros copolímeros similares, são fáceis de obter em grande quantidade e aprovados pelo FDA para injeções subcutâneas ou intravenosas ⁽¹⁸⁰⁾. Essas características conferem funcionalidades muito interessantes: 1) fácil incorporação de nanopartículas de vidro bioativo em solução de hidrogel F-127 à baixas temperaturas, através de procedimento simples de mistura; 2) aplicação minimamente invasiva através de injeção diretamente no defeito ósseo; 3) formação de gel *in situ* com liberação das nanopartículas ao longo do tempo pela decomposição do gel. O grande desafio de hidrogéis F-127 é sua taxa de dissolução relativamente rápida em meio fisiológico, resultando em baixo tempo de

residência ^(8,63). Alguns estudos mostraram que a adição de diferentes materiais inorgânicos ou poliméricos, como óxido de grafeno e hidroxietilcelulose, tiveram efeito na redução da taxa de dissolução de hidrogéis F-127 ^(9,180). Nesse aspecto, a adição de nanopartículas de vidro bioativo também apresenta potencial de interagir com as cadeias poliméricas melhorando a estabilidade do material.

Diante das vantagens de geração de efeitos sinérgicos em sistemas nanocompósitos obtendo materiais com propriedades superiores, esse trabalho se propôs a produzir um hidrogel nanocompósito termossensível que atenda requisitos para aplicação injetável e, ao mesmo tempo, apresente potencial para aplicação em regeneração óssea pela adição de vidro bioativo. O efeito da incorporação de nanopartículas de vidro bioativo sobre comportamento termossensível, propriedades reológicas, estabilidade e injetabilidade dos nanocompósitos foi avaliado.

5.2 Preparação do hidrogel de Pluronic® F-127

Soluções de F-127 foram obtidas pelo método “à frio” ⁽¹⁷⁸⁾. Quantidades pré-definidas do polímero F-127 foram pesadas e adicionadas a 10 mL de água deionizada em béqueres de vidro sob branda agitação magnética em banho de gelo até completa dissolução, obtendo soluções poliméricas nas concentrações de trabalho para formação do hidrogel. As soluções obtidas foram armazenadas em refrigeração à 4 °C até utilização. Conforme literatura de soluções de F-127, a concentração ideal para aplicações como materiais injetáveis se encontra na faixa entre 15 %m/v e 30 %m/v ^(178,181). Dessa forma, concentrações de Pluronic® F-127 de 20 e 25 % m/v foram investigadas para produção dos nanocompósitos (NCs).

5.3 Obtenção do Nanocompósito de Pluronic® F-127 e Vidro Bioativo

Para obtenção das amostras de nanocompósitos, quantidades pré-definidas de nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo, BG1Ca, foram pesadas e adicionadas lentamente a solução aquosa de hidrogel F-127, previamente preparada conforme procedimento descrito no item 5.2. Durante todo processo de incorporação, a solução foi mantida sob agitação magnética em banho de gelo para garantir que não houvesse formação de gel. Concentrações de vidro bioativo de 0, 5 e 10 % (m_{BG1Ca}/m_{F-127}) foram utilizadas nesse estudo, sendo m_{BG1Ca} a massa de nanopartículas de BG1Ca incorporadas à solução e m_{F-127} a massa de polímero F-127 na solução. A Tabela 5.1 apresenta a identificação das amostras produzidas, bem como as concentrações

utilizadas. Para formação do NC gelificado, as soluções produzidas foram imersas em banho térmico a 37 °C para completa gelificação e mantidas nessa temperatura até realização dos ensaios de caracterização.

Tabela 5.1. Identificação e composição das amostras de nanocompósitos.

Amostras	F-127 (%m/v)	BG1Ca (%m/m)
20P	20	0
20PBG5	20	5
20PBG10	20	10
25P	25	0
25PBG5	25	5
25PBG10	25	10

5.4 Caracterização dos Nanocompósitos de Pluronic® F-127 e Vidro Bioativo

5.4.1 Comportamento termossensível qualitativo

O comportamento de transição de fase sol-gel das soluções aquosas do nanocompósito foi investigado de forma qualitativa usando o método de inversão de tubos estabelecido na literatura ⁽⁴⁸⁾. Nesse ensaio, 1,5 mL de cada amostra foi colocado em um tubo transparente e submetido a um aumento de temperatura controlada de 5°C a 40°C, a uma taxa de 1 °C/etapa. Cada etapa consiste em um aumento de temperatura de 1°C, seguido de manutenção isotérmica por 5 minutos e inversão do tubo, para inspeção visual da ocorrência da transição de fase. A cada temperatura, os tubos foram invertidos por 30 s e o material foi considerado na fase “sol” (comportamento líquido) quando foi observado escoamento e fase “gel” quando escoamento não foi observado. A temperatura em que o escoamento deixou de ocorrer foi anotada como temperatura de gelificação do NC.

5.4.2 Comportamento reológico

O estudo do comportamento reológico dos nanocompósitos foi conduzido em um reômetro de tensão controlada, modelo MCR-302 (Anton Paar, Austria), equipado com

geometria de placas paralelas de 50 mm e gap de 0,5 mm. A temperatura do sistema foi controlada com o auxílio de um sistema Peltier C-PTD 180/AIR e um “trap” de solvente foi adaptado a fim de minimizar a evaporação de água. Para garantir que as condições dos ensaios reológicos estejam dentro da região de viscoelasticidade linear (LVE), primeiramente foram escolhidas duas amostras - 25PBG10 e 20P, sendo uma com elevada viscosidade e outra com baixa viscosidade aparente - e realizado ensaio oscilatório de varredura de amplitude (*Amplitude Sweep*), variando a deformação de 0,01% a 100% à 37 °C e frequência constante de 10 rad.s⁻¹. Com os parâmetros definidos, foram realizados ensaios oscilatórios em uma rampa de aquecimento de 4 a 45 °C, a uma taxa de 1 °C.min⁻¹ para determinar a temperatura de transição de fase sol-gel das amostras. A evolução dos módulos de perda (G'') e armazenamento (G') em função da temperatura foi avaliada para comparação do comportamento termo-responsivo e propriedades reológicas dos NCs e avaliação da influência da incorporação de nanopartículas de vidro bioativo. Posteriormente, para determinar o tempo de gelificação, foi realizado ensaio de varredura de tempo (*Time Sweep*), utilizando os mesmos parâmetros de frequência constante de 10 rad.s⁻¹ e deformação previamente estabelecida.

5.4.3 Espectrometria do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise dos grupos químicos dos NCs foi realizada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em equipamento Bruker Alpha utilizando técnica de ATR (*Attenuated Total Reflectance*) equipado com cristal de diamante. Os espectros foram obtidos na faixa de comprimento de onda entre 4000 – 400 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹ e 128 varreduras. Para essa análise, as amostras de NC gelificadas a 37°C foram congeladas em nitrogênio líquido e submetidas à liofilização a -80 °C, durante 24 h, no equipamento Liotop, modelo K105.

5.4.4 Análise morfológica

A análise morfológica dos NCs foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando microscópio FEI-INSPECT S50, operando a 20kV. Para essa análise, as amostras de NC gelificadas à 37°C foram congeladas em nitrogênio líquido e submetidas à liofilização a -80°C, durante 24 h, no equipamento Liotop, modelo K105. As amostras liofilizadas foram cortadas transversalmente e recobertas por uma fina camada de carbono por pulverização catódica. A microestrutura e a distribuição do

tamanho dos poros dos NC foram investigadas por microtomografia computadorizada de raios-X (Micro-CT) usando um scanner de desktop compacto SkyScan 1174, Bruker micro-CT (Bélgica), operando a 50 kV, corrente 800 μ A e tamanho de pixel de 10 μ m, sem uso de filtro. As amostras foram liofilizadas conforme descrito na seção 5.4.3 e então fixadas em um suporte, com giro de 180 ° e aquisição de imagens a cada 0.7 °. As imagens 2D foram reconstruídas usando software NRecon (Bruker micro-CT, Bélgica) e as análises em 3D e reconstrução de superfície em 3D utilizaram software CT Analyzer (Bruker micro-CT, Bélgica).

5.4.5 Estudo do comportamento dos Nanocompósitos em ensaio de imersão em SBF

Os NCs foram submetidos a imersão em fluido corporal simulado (SBF) para avaliação da estabilidade através da medição de perda de massa ^(178,182). Para esse ensaio, 2 mL das dispersões de cada amostra de NCs foram dispostos em tubos Falcon de 15 mL, previamente pesados, e levados ao banho térmico a 37 °C até completa gelificação. Então, 4 mL de SBF, a 37 °C, foram adicionados e os sistemas mantidos a 37 °C durante todo o experimento. Em intervalos de tempo pré-determinados (de 1 h a 2 semanas), a solução de SBF foi removida, e os tubos com gel residual foram cuidadosamente pesados para avaliação da perda de massa. Em seguida, retornou-se com solução de SBF, completando volume, se necessário. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados expressos em valor médio $\pm$ desvio-padrão.

5.4.6 Injetabilidade dos Nanocompósitos

A injetabilidade dos nanocompósitos foi avaliada em função da força aplicada para a injeção do material a determinada taxa de injeção ^(183,184). Os testes de injetabilidade foram realizados à temperatura ambiente pelo acoplamento de uma seringa descartável polimérica de 1mL, equipada com agulha 18 G x 1 1/2, a uma máquina de teste universal (EMIC DL 3000) no modo de compressão, conforme descrito por Moreira e colaboradores ⁽⁶⁶⁾. O teste foi realizado em mínimo de 5 repetições, usando célula de carga de 500 N, com uma velocidade de compressão de 1,0 mm.s⁻¹ que é comparável com taxas usuais de injeção manual ^(183,184).

5.5 Resultados e Discussão

5.7.1 Caracterização dos Nanocompósitos de F-127 e Vidro bioativo

5.7.1.1 Avaliação do comportamento termossensível qualitativo

Hidrogéis nanocompósitos termossensíveis de Pluronic F-127 e nanopartículas de vidro bioativo foram produzidos usando diferentes concentrações de polímero e vidro bioativo para investigação do comportamento termo-responsivo. A temperaturas abaixo da temperatura de gelificação (fase sol), os NC comportam-se como líquido, escoando quando o tubo é inclinado. Acima da temperatura de gelificação (fase gel), o material se comporta como sólido, que não flui com a inclinação do tubo ⁽⁵²⁾. A temperatura de gelificação (T_{gel}), também chamada temperatura de transição de fase sol-gel, é definida como a temperatura em que a fase líquida (sol) faz a transição para a fase gel ⁽³⁸⁾. O método de inversão de tubo é aplicado para determinação da temperatura de gelificação de muitos géis termossensíveis, conforme relatado na literatura ^(48,178). A Figura 5.2 apresenta fotografias das amostras dos NCs à temperatura sub-resfriada, 15 °C, e à temperatura fisiológica, 37 °C. Observa-se que, à temperatura de 15 °C, todas as formulações estudadas se comportam como líquido (fase sol), enquanto que, à temperatura fisiológica, todos os NCs gelificaram, perdendo capacidade de escoar (fase gel). A temperatura de transição de fase sol-gel para todos os nanocompósitos está dentro da faixa de 15 a 37 °C, que seria adequada para utilização como sistema injetável ^(13,178).

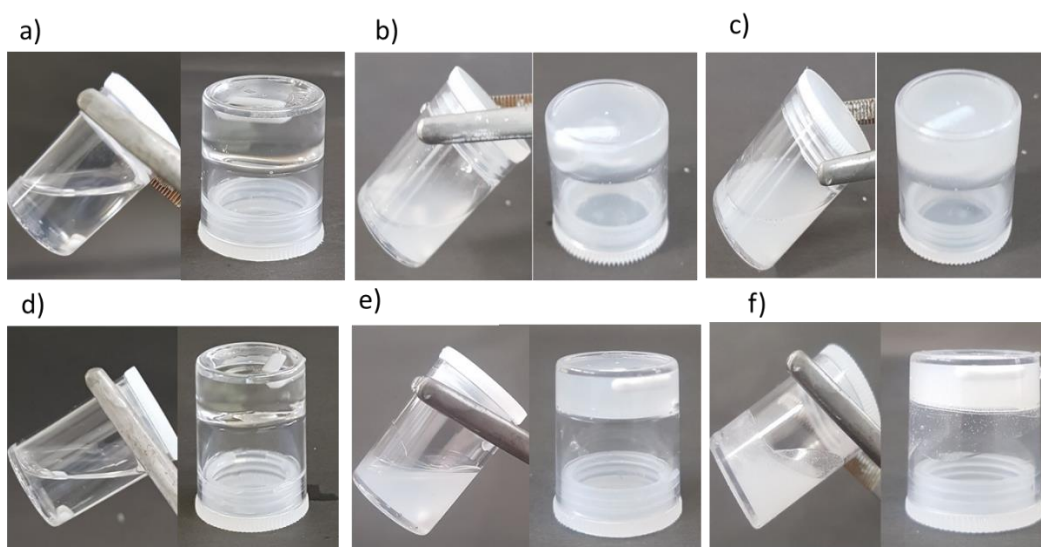


Figura 5.1. Imagens dos nanocompósitos a) 20P; b) 20PBG5; c) 20PBG10; d) 25P; e) 25PBG5; f) 25PBG10 à 15 °C e 37 °C.

Os valores de temperatura obtidos pelo ensaio de inversão de tubo são apresentados na Figura 5.3. Nesse ensaio, a cada aumento de 1 °C na temperatura dos sistemas, os tubos contendo os NCs foram invertidos e foi considerada temperatura de gelificação aquela na qual a amostra deixar de escoar sob ação gravitacional ⁽¹⁸⁵⁾. As amostras com 20 %m/v (20P, 20PBG5 e 20PBG10) e 25 %m/v (25P, 25PBG5 e 25PBG10) de F-127 apresentaram temperatura média de gelificação de $22-23 \pm 1$ °C e 18 ± 1 °C, respectivamente. A adição de nanopartículas de VB apresentou pouca ou nenhuma influência sobre a temperatura de gelificação das amostras, já o aumento da concentração de polímero reduziu a temperatura de gelificação, resultado compatível com estudos anteriores sobre hidrogéis de F-127 ⁽¹⁸¹⁾. Hidrogéis com temperatura de gelificação abaixo da temperatura ambiente (considerada 25 °C) exigem cuidados de controle de temperatura e refrigeração para manuseio da solução e injeção. No entanto, o aumento na diferença de temperatura entre temperatura de armazenamento (15 °C ou inferior) e a temperatura fisiológica de formação do gel (37°C) significa maior “força-motriz”, uma vez que a temperatura é o estímulo necessário para gelificação, e pode implicar em gelificação mais rápida.

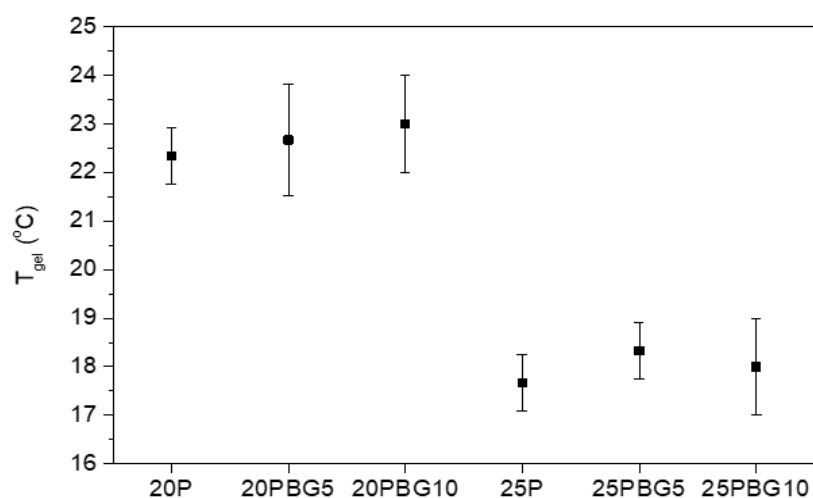


Figura 5.2. Gráfico das temperaturas de gelificação medidas no ensaio de inversão de tubo para os nanocompósitos produzidos.

O mecanismo de gelificação de hidrogéis Pluronic de F-127 é muito discutido na literatura ⁽⁵⁴⁾. Sabe-se que a diferença de solubilidade, em solução aquosa, dos blocos de Poli(óxido de etileno) (PEO) e Poli(óxido de propileno) (PPO), que compõem o copolímero F-127, é a principal responsável pelo processo de gelificação ⁽¹⁸⁶⁾. A formação de micelas é resultado da desidratação do bloco de PPO, formando estrutura micelar composta de núcleo de blocos PPO e coroa de blocos PEO ⁽⁵⁹⁾. Abaixo de uma

temperatura micelar crítica, os blocos de PEO e de PPO são hidratados e o bloco PPO é relativamente solúvel. À medida que a temperatura aumenta, as cadeias PPO tornam-se menos solúveis e a micelização torna-se mais importante. À certa temperatura, definida como temperatura de gelificação, a interação entre as micelas é favorecida e há a formação de uma estrutura de rede conectada, o gel. Assim, o empacotamento de micelas é aceito como principal mecanismo de gelificação de copolímero Pluronic F-127 em solução aquosa em resposta ao aumento da temperatura ^(54,181,187). Esse processo é reversível com a redução da temperatura, e o desenho esquemático dos processos de micelização e gelificação pode ser observado na Figura 5.4.

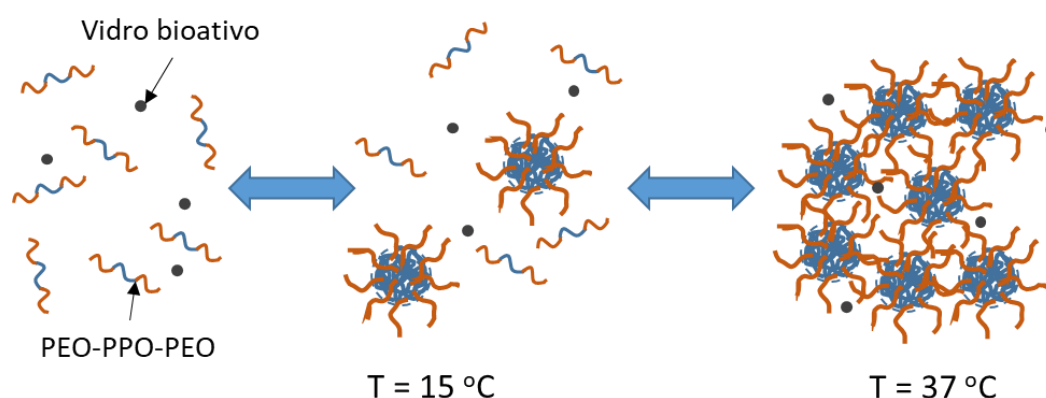


Figura 5.3. Desenho esquemático dos processos de micelização e gelificação.

5.7.1.2 Avaliação do comportamento reológico dos nanocompósitos

A compreensão do processo de gelificação dos NCs termossensíveis é fundamental para o desenvolvimento de um material para utilização como sistema injetável. O estudo reológico permite investigar o comportamento desses materiais frente a alterações de temperatura e a influência da adição de diferentes quantidades de nanopartículas de vidro bioativo sobre os parâmetros viscoelásticos. O comportamento viscoelástico dos NCs foi avaliado medindo-se os módulos de armazenamento (G') e módulo de perda (G''), que descrevem respectivamente o comportamento elástico e o comportamento viscoso do material, em ensaio oscilatório usando rampa de aquecimento. Ensaios oscilatórios devem ser realizados na região de viscoelasticidade linear (LVE), em que os módulos são independentes da deformação ⁽¹⁸⁸⁾. Para determinação da LVE, foi realizado ensaio de varredura de amplitude para duas amostras (20P e 25PBG10), que correspondem a uma amostra de baixa viscosidade e uma de alta viscosidade, respectivamente. As curvas são apresentadas na Figura 5.5. Observou-se que os módulos G' e G'' apresentaram comportamento linear para deformações de 0,01 a 1 %,

caracterizando essa faixa de deformação como LVE. O módulo viscoso, especialmente, apresenta maior variação a baixas temperaturas, e o valor de 1% de deformação, para a frequência de 10 rad.s^{-1} , apresentou dados estáveis e dentro da região de LVE, sendo definido para utilização nos ensaios reológicos.

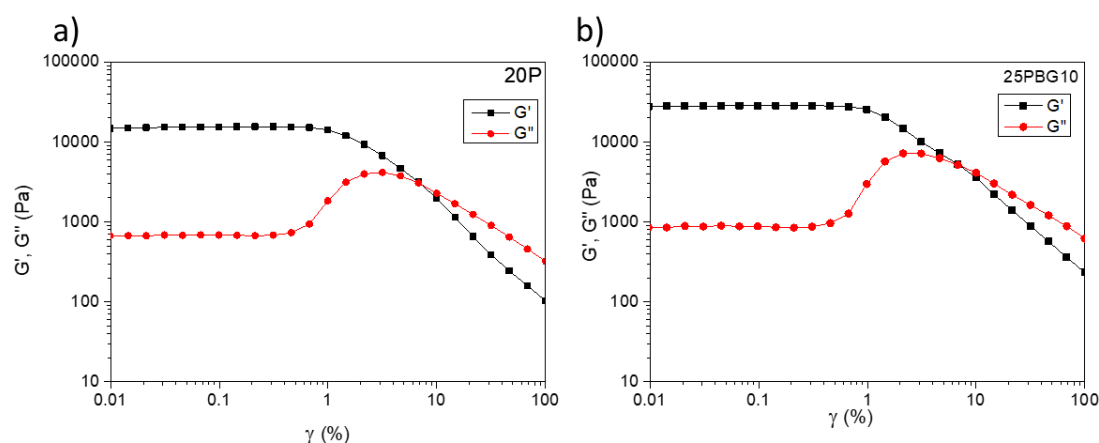


Figura 5.4. Curvas de G' e G'' em função da deformação para determinação da Região de Viscoelasticidade Linear dos nanocompósitos para a) 20P e b) 25PBG10.

Os ensaios reológicos foram realizados em triplicata e as curvas médias dos valores dos módulos viscoelásticos, G' e G'' , em função da temperatura, são apresentadas na Figura 5.6. Curvas típicas de hidrogéis F-127 termossensíveis foram observadas para todos os NCs ^(189–191), onde três regiões distintas podem ser identificadas. Na primeira região, a baixas temperaturas, ambos os módulos possuem valores baixos, sendo que módulo viscoso, G'' , apresenta valores ligeiramente superiores ao módulo elástico, indicando comportamento viscoso. Maior detalhe dessa região pode ser visto na Figura 5.6 a) e c). Esse comportamento está de acordo com o verificado no ensaio de inversão de tubos, em que, abaixo da temperatura de gelificação, o hidrogel apresentou escoamento compatível com o fluido viscoso. Na segunda região, ambos os módulos apresentaram aumento pronunciado, de várias ordens de grandeza, dependendo da composição das amostras (Figura 5.6 a) e c)). A agregação das micelas na formação da rede tridimensional, reduzindo a mobilidade do sistema, pode ser responsável pelo comportamento observado ⁽¹⁹²⁾. Em uma dada temperatura, que é definida em muitos estudos como a temperatura de gelificação, há o cruzamento dos módulos G' e G'' ^(38,189,193). Na terceira região, o comportamento elástico prevalece, com G' apresentando valores de 3 a 5 vezes maiores que G'' , dependendo da composição das amostras. Nessa região, a estrutura tridimensional do gel está completamente formada ⁽¹⁹²⁾.

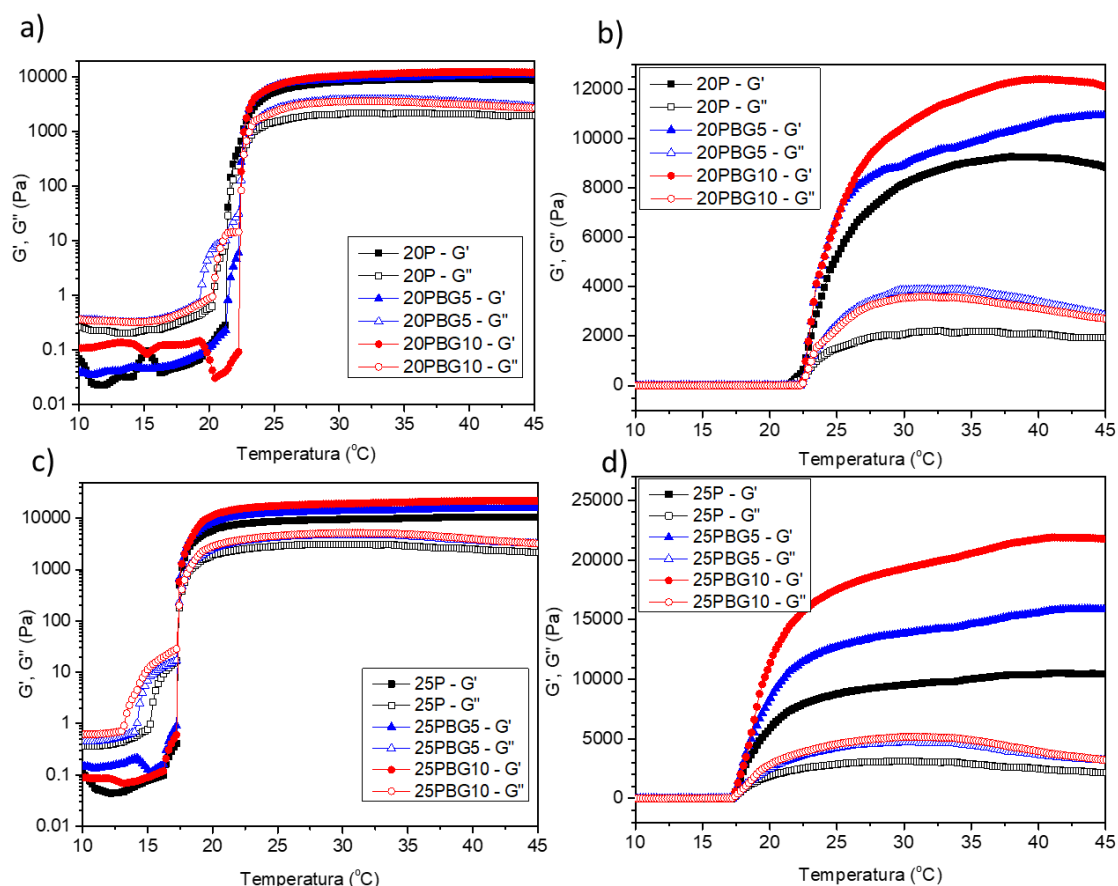


Figura 5.5. Curvas médias de G' e G'' em função da temperatura para a-b) 20P, 20PBG5 e 20PBG10; e c-d) 25P, 25PBG5 e 25PBG10, em escala liner e logarítmica.

As principais propriedades reológicas avaliadas são apresentadas na Tabela 5.2. O aumento da concentração de F-127, de 20 %m/v (20P) para 25 %m/v (25P), reduziu a temperatura de gelificação, de 21,5 °C para 17,5 °C e aumentou o G' à 37 °C, de 9208 Pa para 10204 Pa. Esse comportamento é explicado pela teoria de formação e empacotamento das micelas. A maior concentração de unímeros, cadeias separadas do copolímero, em solução, favorece a formação de micelas, e a maior concentração de micelas resulta em menor distância micelar, aumentando o número de interações entre micelas vizinhas e favorecendo formação da rede tridimensional do gel a temperaturas mais baixas ^(181,194). Esse resultado de temperaturas de gelificação confirmam resultados obtidos pelo ensaio de inversão de tubos.

Tabela 5.2. Principais parâmetros reológicos medidos para os nanocompósitos.

Amostras	T _{gel} (°C)*	Tempo (s)	15 °C		37 °C	
			G' (Pa)*	G'' (Pa)*	G' (Pa)*	G'' (Pa)*
20P	21,5	44,7 ± 0,7	0,08	0,23	9218	2152
20PBG5	22,5	33,4 ± 3,1	0,05	0,32	10204	3636
20PBG10	22,5	35,8 ± 0,3	0,09	0,33	12188	3324
25P	17,4	19,7 ± 0,1	0,08	0,77	10294	2675
25PBG5	17,4	13,5 ± 2,1	0,13	6,83	15092	4072
25PBG10	17,4	15,3 ± 0,4	0,09	11,32	21187	4498

*Os valores de temperatura de gelificação (T_{gel}) e dos módulos G' e G'' foram definidos a partir da curva média.

A incorporação de nanopartículas de vidro bioativo nos NCs com 20 %m/v de F-127 aumentou a temperatura de gelificação de 21,5 °C (20P) para 22,5 °C (20PBG5 e 20PBG10), e apresentou um impacto importante sobre G' a 37 °C, aumentando em mais de 30 % o valor medido (de 9208 Pa para 12188 Pa) com a incorporação de 10 %m/m de BG1Ca. Na série de 25 %m/v de F-127, não houve alteração na temperatura de gelificação medida entre as amostras com e sem incorporação de NP. No entanto, a influência sobre G' à 37 °C foi ainda mais relevante, sendo que a incorporação de 10 %m/m de BG1Ca aumentou em mais de 100% o valor de G' (10204 Pa para 21187 Pa). Alterações pequenas na temperatura de gelificação implicam que a presença de uma segunda fase cerâmica não alterou significativamente a geometria e o empacotamento das micelas. Won e colaboradores estudaram o efeito da adição de óxido de grafeno sobre a temperatura de gelificação de F-127 e também não foi observada diferença significativa entre as amostras ⁽¹⁹⁵⁾. Para as amostras com maior concentração de polímero e, conseqüentemente, de micelas, a incorporação de 10 %m/m de nanopartículas de vidro bioativo não alterou a interação micela-micela. Por outro lado, quando a concentração de F-127 foi menor (20% m/v), a presença das NP foi suficiente para impactar no empacotamento, necessitando de temperatura cerca de 1 °C maior para formação da rede 3D.

A adição de NP de vidro bioativo aumentou a rigidez dos géis formados, como verificado pelo aumento dos módulos viscoelásticos para todas as amostras proporcionalmente à concentração de vidro bioativo utilizada. A magnitude dessa influência da incorporação de vidro bioativo sobre os valores de G' podem ser melhor visualizados na Figura 5.6 b) e d). O maior valor de G', 21187 Pa, foi encontrado para 25PBG10, amostra com maior concentração de F-127 e de vidro bioativo. Esse resultado sugere interação entre as micelas de F-127 formadas e NP de vidro bioativo. Resultado similar foi obtido por Branca e colaboradores com a adição de 1 %m/m de montmorilonita (MMT), obtendo hidrogéis com maiores valores de G' ⁽¹⁹⁶⁾. No entanto, o efeito de adição de partículas

de argila (Laponite®) variou em função da concentração utilizada em diferentes estudos (71,191). Hom e colaboradores estudaram diferentes concentrações de Laponite® incorporadas e mostraram que parece haver uma concentração ótima de partículas que produz NC com maior rigidez (197). No estudo de Moreira e colaboradores, o efeito da incorporação de nanopartículas de vidro bioativo em hidrogel termossensível de quitosana e quitosana/colágeno foi avaliado. Foi observado aumento da rigidez dos hidrogéis a 37 °C com a incorporação de 2 %m/m de vidro bioativo (36). É esperado que a presença de nanopartículas de vidro bioativo, fase cerâmica com elevados módulos de elasticidade, aumente a rigidez dos hidrogéis. Muitos estudos de diferentes compósitos poliméricos com adição de nano ou micropartículas de vidro bioativo mostram melhoria nas propriedades mecânicas dos materiais compósitos (198–201). Além disso, a interação de nanopartículas com duas ou mais micelas formando pontos adicionais de reticulação física aumenta interconectividade da rede de gel e poderia explicar a formação de um gel mais rígido.

Outro parâmetro importante de material termossensível para aplicação como matriz injetável é o tempo de gelificação, uma vez que tempos de gelificação prolongados podem permitir que o material extravase do local desejado, levando a falha na formação do gel (178,193). Todas as amostras apresentaram tempos de gelificação curtos, de aproximadamente 30 a 40 s. A mudança abrupta nas curvas de G' mostradas na Figura 5.6 demonstraram esse processo rápido de formação de gel e estão de acordo com medidas de tempo de gelificação. Os NCs possuem temperaturas de gelificação entre 17 e 22 °C, e essa diferença entre as temperaturas de gelificação e a temperatura estudada de 37 °C favorecem a rápida transição de fase, uma vez que a força-motriz (aumento da temperatura) é alta. Além disso, a incorporação de NP de vidro bioativo reduziu o tempo de gelificação das amostras. A diminuição do tempo de gelificação pode ser correlacionada com um aumento da viscosidade do NCs devido a incorporação de nanopartículas (202).

Valores de G' , a 37 °C, da ordem de 10^4 Pa para todas as amostras, são compatíveis com os valores descritos na literatura para hidrogéis Pluronic F-127, e evidenciam a formação de um gel rígido (203,204). Esses valores, embora muito menores do que os encontrados em tecidos ósseos, são comparados aos módulos relatados para outros tecidos biológicos, como o tecido conjuntivo (aproximadamente 10^4 Pa) (203), e seriam adequados para utilização proposta de preenchimento de defeitos pequenos e irregulares, onde grandes esforços mecânicos seriam requisitados (66). Além disso, a incorporação de NP de vidro bioativo melhorou as propriedades mecânicas, sugerindo

que os NCs formaram um gel rígido e estável à temperatura fisiológica e apresentaram processo de gelificação rápido, que são propriedades importantes para definição de um material injetável ⁽⁶⁶⁾.

5.7.1.3 Espectrometria do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia no infravermelho foi empregada para avaliação qualitativa dos principais grupos químicos presentes nos nanocompósitos. Os espectros de FTIR dos NCs liofilizados são apresentados na Figura 5.7. As principais bandas de vibração identificadas foram listadas na Tabela 5.3. Os espectros de todas as formulações são muito semelhantes e os grupos funcionais característicos de F-127 foram identificados em todas as amostras. Como os materiais foram liofilizados, as bandas características de F-127 são correspondentes ao polímero anidro. As bandas observadas em 1342 e 1360 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações de deformação simétrica “*wagging*” dos grupos CH_2 , enquanto as vibrações de deformação “*twisting*” de CH_2 dão origem a duas bandas em 1278 e 1241 cm^{-1} ⁽¹⁹⁶⁾. A presença dos grupos metil é confirmada pela banda em 1372 cm^{-1} ⁽¹⁷⁸⁾. As vibrações de estiramento C–O–C correspondem a três bandas principais em 1146, 1099 e 1060 cm^{-1} ^(178,182). Em 960, 946 e 840 cm^{-1} , observa-se bandas associadas a deformação assimétrica “*rocking*” de CH_2 ⁽²⁰⁵⁾. A absorbância observada em 1466 e 1451 cm^{-1} pode ser relacionada à presença de carbonato ⁽⁷²⁾. As bandas relacionadas aos grupos químicos do vidro bioativo não foram identificadas nos espectros de FTIR para as amostras com incorporação de nanopartículas de vidro bioativo, possivelmente por se apresentarem em faixas onde há sobreposição de bandas do F-127. Adicionalmente, as nanopartículas foram incorporadas em baixas concentrações, o que pode ter dificultado ainda mais a detecção das bandas características.

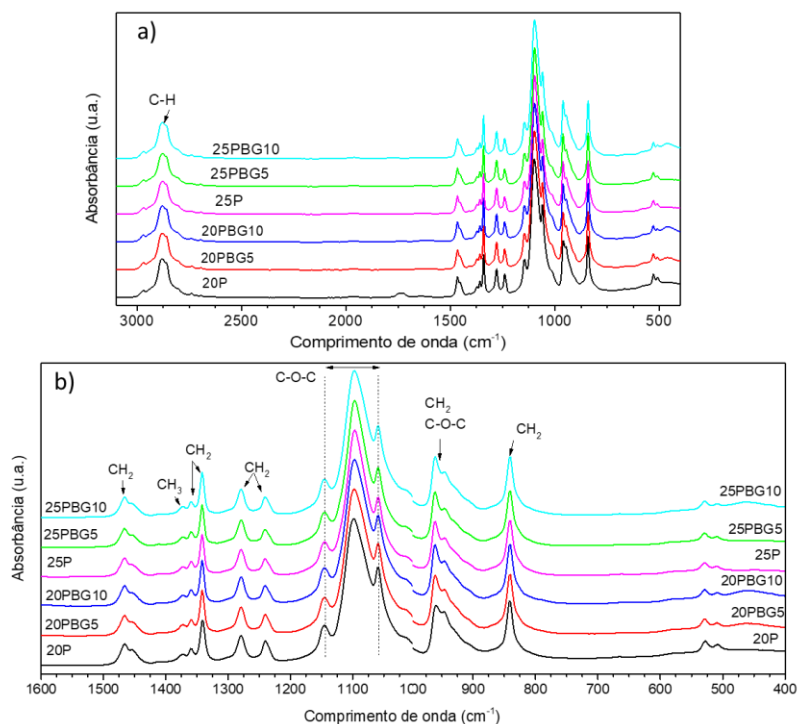


Figura 5.6. a) Espectro de FTIR dos Nanocompósitos. Ampliação dos espectros de b) 1600 a 400 cm^{-1} .

Tabela 5.3. Principais bandas de absorvância identificadas nos espectros de FTIR dos nanocompósitos.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Referência
2971	Estiramento assimétrico CH	(206)
2879, 2810	Estiramento simétrico CH	(206,207)
1466, 1451	Deformação simétrica "scissoring" CH_2	(208)
1372	Estiramento simétrico CH_3	(178)
1360, 1342	Deformação simétrica "wagging" CH_2	(196)
1278, 1241	Deformação assimétrica "twisting" CH_2	(196)
1146, 1099, 1060	Estiramento C-O-C	(178,182)
960, 946, 840	Deformação assimétrica "rocking" de CH_2	(205,208)

5.7.1.4 Análise morfológica

A morfologia dos NCs liofilizados, avaliada por MEV, é apresentada na Figura 5.8. As imagens de corte transversal das amostras mostram uma estrutura de poros interconectados e com diferentes tamanhos. Como esperado e bem descrito na literatura, a amostra 25P parece apresentar menor tamanho de poros e estrutura mais densa que a amostra 20P devido ao aumento da concentração do polímero, e consequentemente aumento da quantidade de micelas formadas e do entrelaçamento entre micelas com aumento da temperatura ^(178,190). A incorporação de vidro bioativo parece distorcer a estrutura do gel, efeito especialmente visível para as amostras com 20 %m/v, 20PBG5 e 20PBG10, (Figuras 5.8 (b-c), respectivamente), uma vez que menor concentração de F-127 produz um gel menos rígido e mais susceptível à influência das nanopartículas. Essas amostras apresentaram poros menores e com formato mais irregular quando comparadas a amostras sem vidro bioativo (20P). Além disso, para as amostras com maior concentração de vidro bioativo, 20PBG10 e 25PBG10, é possível identificar agregados de nanopartículas de vidro nas paredes dos poros, estruturas indicadas por setas amarelas na Figura 5.8 (c-d). Fu e colaboradores estudaram o efeito da adição de nanopartículas de hidroxiapatita (HA) em hidrogel de Polietileno glicol - Poli-ε-caprolactona - Polietileno glicol e observaram resultados similares de distorção da estrutura e formação agregados com o aumento da concentração de HA ⁽²⁰⁹⁾, possivelmente devido a interação maior entre os materiais cerâmicos.

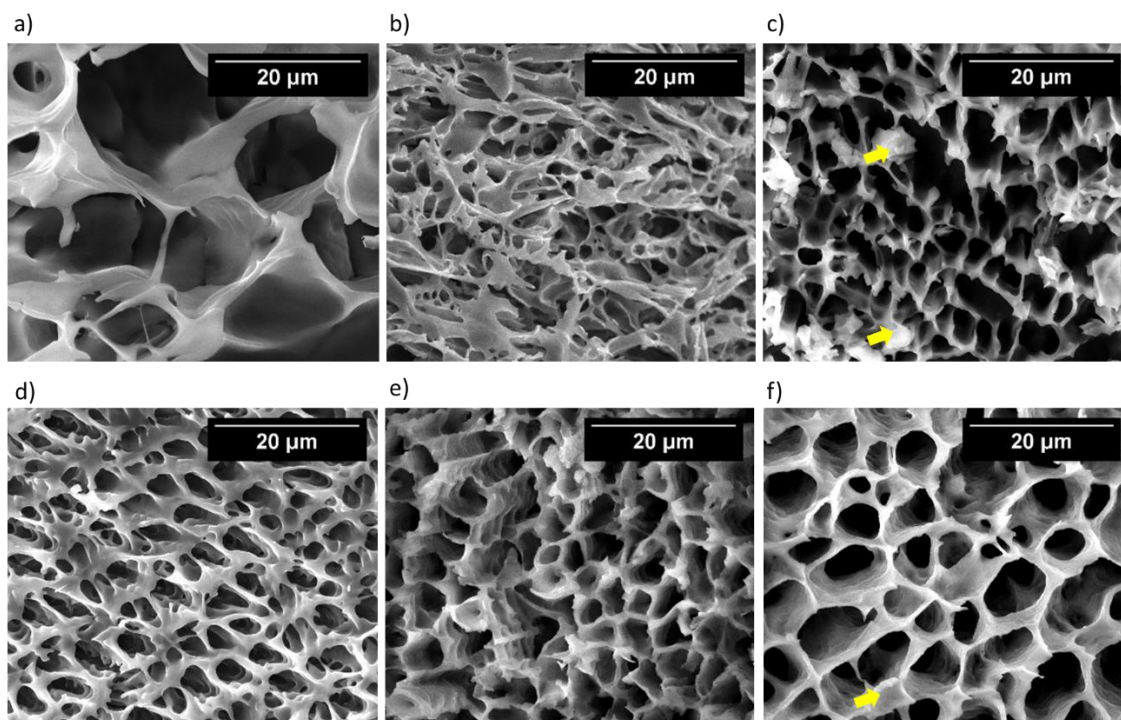


Figura 5.7. Imagens de MEV das amostras liofilizadas de a) 20P, b) 20PBG5, c) 20PBG10, d) 25P, e) 25PBG5, f) 25PBG10.

A microestrutura dos NCs foi também avaliada por micro-CT. As imagens 3D reconstruídas, bem como os cortes transversais das amostras, apresentadas na Figura 5.9, confirmam a formação de uma estrutura porosa interconectada em todas as formulações obtidas. A presença de aglomerados das partículas de vidro bioativo dispersas na matriz polimérica também pode ser confirmada pela visualização, nas imagens de corte transversal, de pontos com maiores atenuações (mais claros), que podem ser relacionados a materiais mais densos. Os dados médios de porosidade fechada, porosidade aberta e porosidade total dos NCs são listados da Tabela 5.4. Todas as amostras apresentaram majoritariamente poros abertos, com uma porosidade total acima de 57 %. Biomateriais com estrutura de poros altamente interconectada apresentam propriedades superiores para aplicação em regeneração de tecidos ósseo⁽²¹⁰⁾. A maior concentração de F-127 reduziu a porosidade total de 73,85 % para 67,05 % para as amostras 25P e 20P respectivamente, confirmando resultado do MEV. A adição de nanopartículas de vidro bioativo também provocou redução da porosidade total proporcionalmente à concentração de vidro bioativo utilizada. Esse resultado pode ser indicativo de interação das nanopartículas com micelas de F-127, aumentando o grau de reticulação física do material. Um material nanocompósito mais reticulado formando um gel mais rígido está de acordo com resultados obtidos de maiores módulos de elasticidade nos ensaios reológicos.

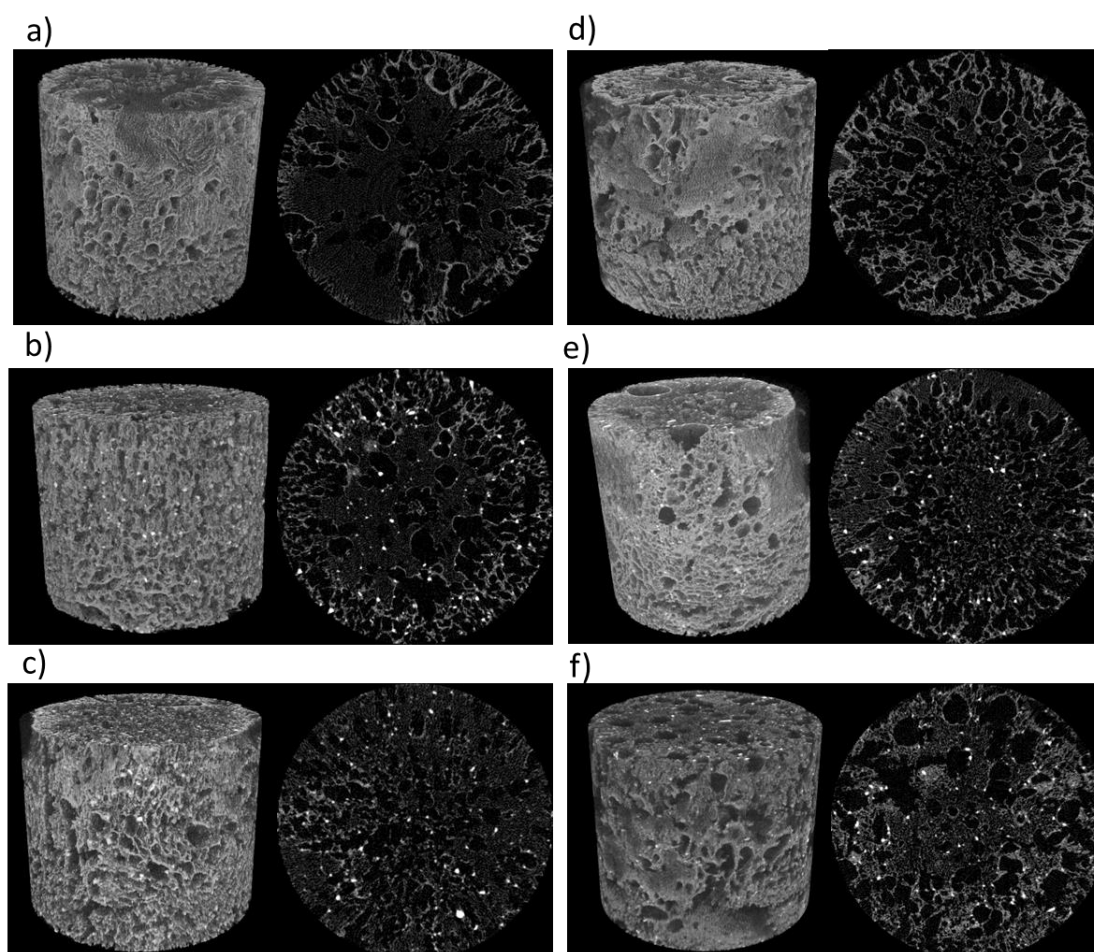


Figura 5.8. Imagens 3D reconstruídas e corte transversal das amostras liofilizadas de a) 20P, b) 20PBG5, c) 20PBG10, d) 25P, e) 25PBG5, f) 25PBG10 obtidas por microtomografia.

Tabela 5.4. Dados de Porosidade fechada, porosidade aberta e porosidade total dos nanocompósitos calculados por análise de μ -CT.

Amostras	Porosidade fechada Po(cl) %	Porosidade aberta Po(op) %	Porosidade Total Po(tot) %
20P	$0,03 \pm 0,01$	$73,85 \pm 1,35$	$73,86 \pm 1,35$
20PBG5	$0,03 \pm 0,02$	$69,03 \pm 1,89$	$69,04 \pm 1,89$
20PBG10	$0,02 \pm 0,01$	$66,12 \pm 0,98$	$66,12 \pm 0,98$
25P	$0,30 \pm 0,02$	$67,05 \pm 2,81$	$67,14 \pm 2,80$
25PBG5	$0,20 \pm 0,24$	$58,38 \pm 4,39$	$58,46 \pm 4,29$
25PBG10	$0,21 \pm 0,02$	$57,10 \pm 4,02$	$57,17 \pm 3,98$

5.7.1.5 Estudo do comportamento dos Nanocompósitos em ensaio de imersão em SBF

É bem estabelecido na literatura que hidrogéis de F-127 possuem alta taxa de dissolução em exposição a fluido corporal, e consequentemente baixo tempo de residência ^(61,211), portanto estratégias para aumentar tempo de permanência *in situ* são importantes para muitas aplicações, como por exemplo para o reparo ósseo. A incorporação de nanopartículas de vidro bioativo para a obtenção do novo biomaterial injetável objetivou produzir um material com propriedades biológicas aprimoradas, especialmente em relação ao estímulo à regeneração óssea. Adicionalmente, a introdução de partículas cerâmicas deve ter influência sobre o processo de dissolução do material. Uma avaliação preliminar de perda de massa foi realizada, submetendo os hidrogéis nanocompósitos a condições fisiológicas simuladas através da exposição à solução de fluido corporal simulado (SBF).

A massa residual de hidrogel foi medida em diferentes intervalos (1, 2, 3, 5, 7, 10 e 14 dias) e os valores estão apresentados na Figura 5.10. Todas as amostras apresentaram inicialmente um perfil de perda de massa acelerado, conforme estabelecido na literatura ⁽¹⁷⁹⁾. A adição de SBF sobre as amostras de NCs gelificadas (37 °C) provocou um aumento da hidratação das cadeias poliméricas devido ao excesso de água. Assim, ocorreu relaxação do empacotamento micelar e consequentemente degradação da superfície do gel ⁽¹⁷⁸⁾ e dissolução ou degradação do material.

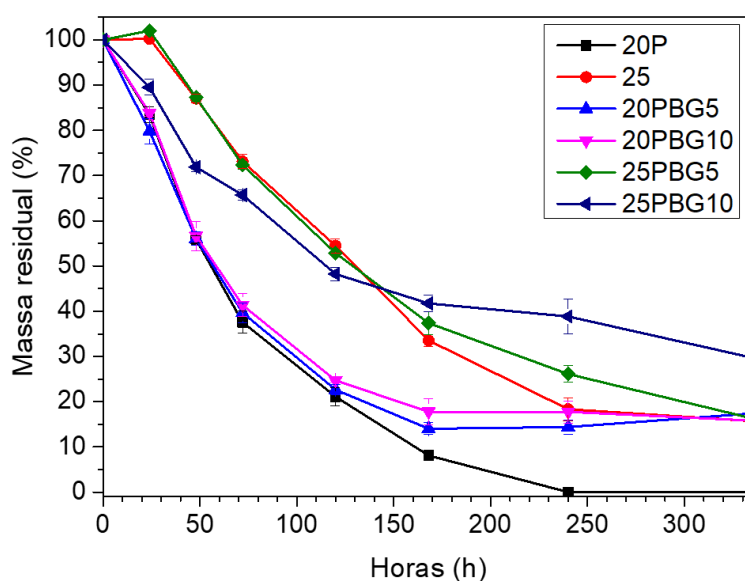


Figura 5.9. Perfil de dissolução dos Nanocompósitos em imersão em SBF.

As amostras com menor concentração de F-127 (20 %m/v), já haviam perdido mais de 50 % da massa inicial ao final de 3 dias. Até esse período, a presença de vidro bioativo praticamente não influenciou na perda de massa dessas amostras. A partir de então, os NCs apresentaram uma desaceleração da perda de massa em comparação com as amostras 20P de hidrogel puro. A massa residual da amostra 20P, após 7 dias de estudo, foi de apenas 8 %, contra 18 % de massa para a amostra 20PBG10. No décimo dia, a amostra 20P havia perdido 100 % da massa de gel. Aumentando-se a concentração de F-127 (amostras com 25 %m/v), houve uma desaceleração da perda de massa. Após 3 dias, as amostras com 25 %m/v de F-127 ainda mantiveram aproximadamente 70 % da massa inicial. A influência das nanopartículas de vidro bioativo na redução da velocidade de perda de massa dos NCs também foi observada. Ao final de 14 dias, a amostra 25PBG10 manteve aproximadamente 30 % da massa inicial, enquanto 25P, hidrogel puro, manteve apenas aproximadamente 15 %.

Embora a massa de gel não dissolvido após 14 dias tenha aumentado para amostras com adição de vidro bioativo, uma quantidade significativa de gel se dissolveu rapidamente nas primeiras horas, para ambas concentrações de polímero utilizadas. Uma possível explicação seria devido à interação das micelas com as nanopartículas, como sugere Kjoniksen e colaboradores na avaliação de comportamento similar obtido na interação das micelas de F-127 com pequenas quantidades (0,5 %m/m) de hidroxietilcelulose ⁽¹⁸⁰⁾. Nessa hipótese, as micelas de F-127 que não estavam interagindo diretamente com as NPs apresentaram relativa facilidade para escapar da rede do gel. A interação das NPs distribuídas na matriz polimérica com as micelas, bem como a possibilidade de uma partícula interagir com mais de uma micela formando uma reticulação física e aumentando a interconectividade da rede de gel, permite explicar a formação de um gel mais rígido e a maior estabilidade em solução. Consequentemente, o gel se dissolveu inicialmente de forma bastante rápida devido à liberação das micelas que não estão interagindo com NPs. Embora as NPs também se degradem, esse processo é mais lento. Quando a maior parte das micelas não conectadas com NPs foi dissolvida, a rede de gel residual consistia em micelas estabilizadas com as NPs que atuaram como pontos adicionais de reticulação. Nesse momento, o processo de dissolução tornou-se mais lento, causando o comportamento observado nos perfis de dissolução. Esse resultado está de acordo com a avaliação de formação de hidrogel nanocompósito mais rígido, com maiores módulos de elasticidade, conforme avaliado no ensaio reológico, e reforça o potencial de utilização de nanopartículas de vidro

bioativo para melhorar a estabilidade do hidrogel. Portanto, os resultados do ensaio de dissolução demonstram que a adição de nanopartículas de vidro pode ser uma estratégia promissora para aumentar a estabilidade e o tempo de residência de hidrogéis de F-127

5.7.1.6 Injetabilidade dos nanocompósitos

A avaliação da injetabilidade, capacidade de injeção dos nanocompósitos produzidos, é essencial para avaliar o desempenho do material para utilização como matriz injetável. A injetabilidade dos NCs foi avaliada pela medição da força aplicada sobre a seringa para expulsão de 1 mL de material, à uma taxa de deslocamento de $1,0 \text{ mm.s}^{-1}$, conforme descrito por Moreira e colaboradores ⁽²¹²⁾. A curva representativa da força aplicada por volume de gel injetado (expulso da seringa) para cada amostra é mostrada na Figura 5.11. O perfil das curvas de força é semelhante para todas as amostras. Pode ser identificado um pico de força inicial que corresponde a força necessária para iniciar o movimento do êmbolo ⁽⁶⁸⁾. Após vencer essa resistência inicial, a força para extrusão do volume de solução de hidrogel fica praticamente constante, com uma ligeira elevação até 70 % do volume expulso, seguida de uma tendência de queda.

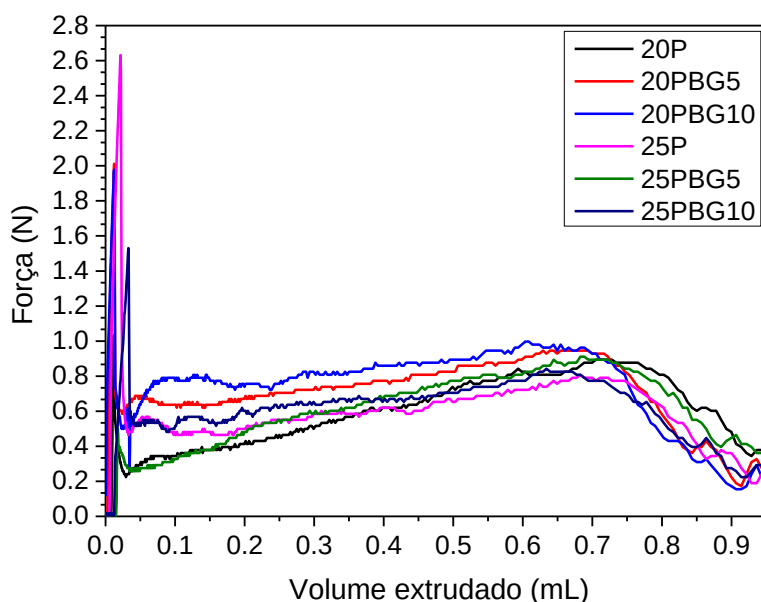


Figura 5.10. Gráfico representativo das curvas de força x volume extrudado dos nanocompósitos.

Assim, uma avaliação da força máxima necessária para iniciar a injeção se faz mais importante. Os valores médios das forças máximas medidas durante os experimentos

para todos os nanocompósitos são apresentados na Tabela 5.5. Não houveram diferenças significativas entre os valores de força máxima obtidos para as amostras com e sem nanopartículas de vidro bioativo. Esse resultado está de acordo com o ensaio reológico, que mostrou que abaixo da temperatura de gelificação, os módulos viscosos G'' são baixos para todos os NCs (da ordem de 10^{-1} Pa), indicando comportamento de fluido com baixa viscosidade e adequados para injeção por seringas. Valores de força máxima abaixo de 25 N são considerados adequados para aplicação por injeção manual⁽²¹³⁾, portanto todas as formulações estudadas atenderam o requisito. No entanto, atenção deve ser dada para o resfriamento da amostra, uma vez que o aumento da temperatura acima da temperatura de gelificação, aumenta rapidamente o módulo de elasticidade, como visto nos ensaios reológicos, e prejudicaria a capacidade de injeção. Mesmo com a incorporação de NP de vidro bioativo, todas as amostras foram injetadas com seringa utilizando força compatível com aplicação manual, sugerindo que as formulações apresentam potencial para aplicação como sistema injetável para liberação de vidro bioativo *in situ*.

Tabela 5.5. Força máxima medida em ensaio de injetabilidade para nanocompósitos.

Amostras	Força máxima (N)
20P	2,13 ± 0,36
20PBG5	2,24 ± 0,57
20PBG10	2,20 ± 0,56
25P	2,43 ± 0,38
25PBG5	2,13 ± 0,38
25PBG10	1,98 ± 0,62

5.6 Conclusão

Nanocompósitos termossensíveis de *Pluronic*® F-127 e vidro bioativo foram obtidos. A incorporação de vidro bioativo não apresentou grande impacto sobre as propriedades de gelificação, mantendo temperatura e tempo de gelificação dentro da janela adequada para aplicação como material injetável. Os resultados de MEV e μ -CT revelaram estrutura altamente porosa, com porosidade aberta variando entre 57 e 74%, característica adequada para aplicação em engenharia de tecidos. Ensaio reológico e de dissolução dos nanocompósitos confirmaram aumento da rigidez dos hidrogéis com

adição de vidro bioativo, atingindo módulos de elasticidade de até 21 KPa e aumentando estabilidade dos hidrogéis expostos ao meio fisiológico. A avaliação da injetabilidade demonstrou que todas as formulações de nanocompósitos foram injetadas utilizando força compatível com aplicação manual, indicando que os nanocompósitos têm potencial para aplicação como sistema injetável para liberação de vidro bioativo *in situ* e, portanto, são candidatos promissores para aplicação em regeneração de tecido ósseo.

CAPÍTULO 6. Considerações Finais

6.1 Conclusões gerais

Nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo contendo diferentes concentrações de íon manganês foram obtidas utilizando um método de síntese em duas etapas, no qual os íons foram adicionados à nanopartículas de sílica previamente produzida através de processo de impregnação. Análises morfológicas, estruturais e texturais confirmaram obtenção de partículas nanométricas, esféricas, amorfas e mesoporosas com alta área superficial que proporcionam propriedades biológicas superiores. Análises de XPS indicaram que, apesar da presença de óxidos de manganês identificadas como segunda fase, ao menos uma parte de Mn^{2+} foi incorporada a estrutura das nanopartículas de vidro bioativo. A capacidade de liberação controlada de íons e bioatividade foi confirmada em ensaio de imersão em SBF. A adição de Mn reduziu a cinética de formação de camada de HAC. Resultados de ensaios de viabilidade celular e atividade de fosfatase alcalina indicaram que o efeito da presença de Mn é dose-dependente, sendo, portanto, necessária criteriosa avaliação da composição e propriedades físico-químicas do vidro bioativo para garantir liberação de íons dentro da faixa terapêutica, evitando possíveis efeitos tóxicos em altas concentração de Mn. Os resultados indicam que a incorporação de Mn em etapa de impregnação foi bem-sucedida e é uma alternativa promissora para obtenção de vidro bioativo com incorporação de íons com efeitos terapêuticos. As características físico-químicas das nanopartículas de vidro bioativo demonstram potencial para produção de compósitos como estratégia para aplicações em engenharia de tecidos. Além disso, a incorporação de Mn em nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo mostrou-se um ambiente favorável às células e apresenta potencial para aplicações como materiais osteogênicos na regeneração do tecido ósseo.

A incorporação de íons manganês por meio de processo de impregnação para obtenção de nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo com propriedades osteogênicas melhoradas foi estudada neste trabalho. Os resultados confirmaram a produção de partículas em escala nanométrica, variando de 50 a 67 nm, e presença de porosidade. A adição de manganês tem efeito sobre a área superficial e liberação de íons, reduzindo a cinética de formação de camada de hidroxiapatita. O efeito da adição de manganês sobre viabilidade celular e atividade de fosfatase alcalina é dose-dependente, sendo, portanto, necessária criteriosa avaliação da composição e propriedades físico-químicas do vidro bioativo para seleção da capacidade de liberação de íons ótima para aplicação

como agente osteogênico. As nanopartículas produzidas apresentam grande potencial para aplicações em engenharia de tecidos e estudos de aplicação são altamente recomendados.

Uma importante estratégia para aplicações de materiais com potencial de reparo de defeitos ósseos é a incorporação de materiais bioativos a matrizes poliméricas obtendo nanocompósitos com propriedades aprimoradas. Neste trabalho, nanocompósitos termossensíveis com propriedades superiores foram obtidos através de uma rota de processamento simples utilizando um hidrogel sintético termossensível F-127 de relativo baixo custo, comparado com outros copolímeros tribloco, e incorporação de material bioativo com potencial osteogênico. Foram obtidas formulações de hidrogel termossensível com maior rigidez e estabilidade, além de capacidade de injeção minimamente invasiva através de seringa e agulha. Essas características indicam que os novos nanocompósitos produzidos apresentam grande potencial para aplicação em medicina regenerativa para reparo ósseo.

6.2 Sugestões para trabalhos futuros

- Caracterização das nanopartículas de vidro bioativo por ^{29}Si NMR para confirmação da incorporação de Mn na rede do material.
- Avaliação de outros marcadores osteogênicos como osteocalcina, osteopontina e colágeno tipo I, de células expostas ao produto iônico dos vidros bioativos contendo Mn.
- Avaliação de potencial osteogênico de células a partir do contato direto com vidros bioativos contendo Mn.
- Avaliação *in vivo* do potencial de regeneração óssea dos vidros bioativos contendo Mn.
- Produção de nanocompósitos a partir da incorporação de nanopartículas de vidro bioativo contendo Mn em hidrogel de F-127.
- Avaliação de liberação iônica em ensaio de degradação do nanocompósito.
- Avaliação de citotoxicidade de nanocompósitos de F-127 e nanopartículas de vidro bioativo com e sem Mn.
- Avaliação de potencial osteogênico de nanocompósitos de F-127 e nanopartículas de vidro bioativo com e sem Mn.

CAPÍTULO 7. Referências bibliográficas

1. Gerhardt, L. C. & Boccaccini, A. R. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials (Basel)*. 3, 3867–3910 (2010).
2. Jones, J. R. New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure. *J. Eur. Ceram. Soc.* 29, 1275–1281 (2009).
3. Liu, M. *et al.* Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Res.* 5, (2017).
4. Barrioni, B. R., Oliveira, A. A. A. & Pereira, M. M. The Evolution, Control, and Effects of the Compositions of Bioactive Glasses on Their Properties and Applications. in *Advanced Struc. Mat.* (ed. Publ., S. I.) V.53 (2016).
5. Jones, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 9, 4457–4486 (2013).
6. Moreira, C. D. F. *et al.* Injectable chitosan/gelatin/bioactive glass nanocomposite hydrogels for potential bone regeneration: In vitro and in vivo analyses. *Int. J. Biol. Macromol.* 132, 811–821 (2019).
7. Utech, S. & Boccaccini, A. R. A review of hydrogel-based composites for biomedical applications: enhancement of hydrogel properties by addition of rigid inorganic fillers. *J. Mater. Sci.* 51, 271–310 (2016).
8. Klouda, L. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications A seven-year update. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2015). doi:10.1016/j.ejpb.2015.05.017
9. Won, D., Kim, M. & Tae, G. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Systemic modulation of the stability of pluronic hydrogel by a small amount of graphene oxide. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 128, 515–521 (2015).
10. Oréface, R., Pereira, M. & Mansur, H. *Biomateriais - Fundamentos e Aplicações*. (2012).
11. Brien, F. J. O. Biomaterials & scaffolds Every day thousands of surgical procedures are performed to replace. *Mater. Today* 14, 88–95 (2011).
12. O'Brien, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today* 14, 88–95 (2011).
13. Moreira, C. D. F. Hidrogéis injetáveis a base de quitosana / gelatina / nanopartículas de vidro bioativo com potencial para regeneração óssea : estudo in vitro e in vivo Hidrogéis injetáveis a base de quitosana / gelatina / nanopartículas de vidro bioativo. *Univ. Fed. Minas Gerais Doutorado*, 149p (2018).
14. A to Z Research. Biomaterials Market (Cardiovascular Biomaterials, Orthopedic Biomaterials, Wound Care Biomaterials, Urological Biomaterials Plastic Surgery Biomaterials and Gastrointestinal Biomaterials) Forecast, 2016 – 2022. A to Z Research. Available at: <http://atozresearch.com/healthcare-it/biomaterials-market-brazil-industry-perspective-by-2022/>. (Accessed: 30th July 2018)
15. Naahidi, S. *et al.* Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* (2017).

doi:10.1016/j.biotechadv.2017.05.006

16. Tozzi, G., De Mori, A., Oliveira, A. & Roldo, M. Composite hydrogels for bone regeneration. *Materials* 9, (2016).
17. Hertz, A. & Bruce, I. J. Inorganic materials for bone repair or replacement applications. 2, 899–918 (2007).
18. Kane, R. & Ma, P. X. Mimicking the nanostructure of bone matrix to regenerate bone. *Biochem. Pharmacol.* 16, 418–423 (2013).
19. Hannink, G. & Arts, J. J. C. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? *Injury* 42, S22–S25 (2011).
20. Lin, S., Ionescu, C., Pike, K. J., Smith, M. E. & Jones, J. R. Nanostructure evolution and calcium distribution in sol-gel derived bioactive glass. *J. Mater. Chem.* 19, 1276–1282 (2009).
21. Pereira, M. M., Clark, A. E. & Hench, L. L. Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 28, 693–698 (1994).
22. Bairo, F. Bioactive glasses – When glass science and technology meet regenerative. *Ceram. Int.* 0–1 (2018). doi:10.1016/j.ceramint.2018.05.180
23. Pereira, M. & Hench, L. Bioactive Glass. in *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* 53–61 (2004).
24. Pereira, M. M., Jones, J. R. & Hench, L. L. Bioactive glass and hybrid scaffolds prepared by sol-gel method for bone tissue engineering. *Adv. Appl. Ceram.* 104, 35–42 (2005).
25. Hench, L. L. & West, J. O. N. K. The Sol-Gel Process. 33–72 (1990). doi:10.1021/cr00099a003
26. De Oliveira, A. A. R. *et al.* Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications. *Biomed. Mater.* 8, (2013).
27. Stober, W. E. R. N. E. R. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range 1. 69, 62–69 (1968).
28. De Oliveira, A. A. R., De Carvalho, S. M., De Fátima Leite, M., Oréfice, R. L. & De Magalhães Pereira, M. Development of biodegradable polyurethane and bioactive glass nanoparticles scaffolds for bone tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 100 B, 1387–1396 (2012).
29. Barrioni, B. R., Oliveira, A. C., de Fátima Leite, M. & de Magalhães Pereira, M. Sol-gel-derived manganese-releasing bioactive glass as a therapeutic approach for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci.* 52, 8904–8927 (2017).
30. Miola, M. *et al.* In vitro study of manganese-doped bioactive glasses for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* 38, 107–118 (2014).
31. Lüthen, F. *et al.* Influence of manganese ions on cellular behavior of human osteoblasts in vitro. *Biomol. Eng.* 24, 531–536 (2007).

32. Nawaz, Q. *et al.* Synthesis and characterization of manganese containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29, (2018).
33. Radhakrishnan, J., Krishnan, U. M. & Sethuraman, S. Hydrogel based injectable scaffolds for cardiac tissue regeneration. *Biotechnol. Adv.* 32, 449–461 (2014).
34. Buwalda, S. J. *et al.* Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *J. Control. Release* 190, 254–273 (2014).
35. Koetting, M. C., Peters, J. T., Steichen, S. D. & Peppas, N. A. Stimulus-responsive hydrogels : Theory , modern advances , and applications. *Mater. Sci. Eng. R* 93, 1–49 (2015).
36. Moreira, C. D. F., Carvalho, S. M., Mansur, H. S. & Pereira, M. M. Thermogelling chitosan-collagen-bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 58, 1207–1216 (2016).
37. Nguyen, M. M., Gianneschi, N. C. & Christman, K. L. Developing injectable nanomaterials to repair the heart. *Curr. Opin. Biotechnol.* 34, 225–231 (2015).
38. Yap, L. S. & Yang, M. C. Evaluation of hydrogel composing of Pluronic F127 and carboxymethyl hexanoyl chitosan as injectable scaffold for tissue engineering applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 146, 204–211 (2016).
39. Horbert, V. *et al.* In Vitro Analysis of Cartilage Regeneration Using a Collagen Type I Hydrogel (CaReS) in the Bovine Cartilage Punch Model. (2018). doi:10.1177/1947603518756985
40. Pascual-Garrido, C. *et al.* Current and novel injectable hydrogels to treat focal chondral lesions: Properties and applicability. *J. Orthop. Res.* 36, 64–75 (2018).
41. Vishnu Priya, M. *et al.* Injectable osteogenic and angiogenic nanocomposite hydrogels for irregular bone defects. *Biomed. Mater.* 11, (2016).
42. Al Khateb, K. *et al.* In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. *Int. J. Pharm.* 502, 70–79 (2016).
43. Yang, J. *et al.* Acta Biomaterialia Icariin conjugated hyaluronic acid / collagen hydrogel for osteochondral interface restoration. *Acta Biomater.* 74, 156–167 (2018).
44. Hawkins, A. M., Bottom, C. E., Liang, Z., Puleo, D. A. & Hilt, J. Z. Magnetic Nanocomposite Sol – Gel Systems for Remote Controlled Drug Release. 96–100 (2012). doi:10.1002/adhm.201100013
45. Bodratti, A. & Alexandridis, P. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *J. Funct. Biomater.* 9, 11 (2018).
46. Memic, A. *et al.* Hydrogels 2 . 0 : improved properties with nanomaterial composites for biomedical applications. *Biomed. Mater.* 11, 014104 (2016).
47. Yan, Q. *et al.* Controlled release of simvastatin-loaded thermo-sensitive PLGA-PEG-PLGA hydrogel for bone tissue regeneration : In vitro and in vivo characteristics. 3580–3589 (2015). doi:10.1002/jbm.a.35499
48. Boffito, M. *et al.* Novel polyurethane-based thermosensitive hydrogels as drug release and tissue engineering platforms: Design and in vitro characterization.

Polym. Int. (2016). doi:10.1002/pi.5080

49. Phan, V. H. G. *et al.* Pancreatic cancer therapy using an injectable nanobiohybrid hydrogel. *RSC Adv.* 6, 41644–41655 (2016).
50. Ward, M. A. & Georgiou, T. K. Thermoresponsive polymers for biomedical applications. *Polymers (Basel)*. 3, 1215–1242 (2011).
51. Gandhi, A., Paul, A., Sen, S. O. & Sen, K. K. ScienceDirect Studies on thermoresponsive polymers : Phase behaviour , drug delivery and biomedical applications. *Asian J. Pharm. Sci.* 10, 99–107 (2015).
52. Yang, J., Yeom, J., Woo, B., Hoffman, A. S. & Kwang, S. In situ -forming injectable hydrogels for regenerative medicine. *Prog. Polym. Sci.* 39, 1973–1986 (2014).
53. Gyles, D., Diniz, L., Otávio, J., Silva, C. & Ribeiro-costa, R. M. A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. 88, 373–392 (2017).
54. Bonacucina, G., Cespi, M., Mencarelli, G., Giorgioni, G. & Palmieri, G. F. Thermosensitive Self-Assembling Block Copolymers as Drug Delivery Systems. 779–811 (2011). doi:10.3390/polym3020779
55. Batrakova, E. V. *et al.* Distribution kinetics of a micelle-forming block copolymer Pluronic P85. *J. Control. Release* 100, 389–397 (2004).
56. Rassing, J. Ultrasonic velocity and light-scattering studies on the polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymer Pluronic F127 in aqueous solution. 3, 47–55 (1983).
57. John, L. & Vadnere, M. Thermodynamic studies on the gel-sol transition of some pluronic polyols. 22, 207–218 (1984).
58. Attwood, D. The micellar properties of the poly (oxyethylene) -poly (oxypropylene) copolymer Pluronic F127 in water and electrolyte solution. 26, 25–33 (1985).
59. Science, P., Wanka, G., Hoffmann, H. & Ulbficht, W. *Polymer Science*. 117, 101–117 (1990).
60. Alexandridis, P., Holzwarthf, J. F. & J, T. A. H. Micellization of Poly (ethylene oxide) -Poly (propylene oxide) -Poly (ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions : Thermodynamics of Copolymer Association. 2414–2425 (1994).
61. Jeong, B., Kim, S. W. & Bae, Y. H. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 154–162 (2012).
62. Pitto-barry, A. & Barry, N. P. E. and clinical advances. 5, 3291 (2014).
63. Akash, M. & Rehman, K. Recent progress in biomedical applications of Pluronic (PF127): Pharmaceutical perspectives. *J. Control. Release* 209, 120–138 (2015).
64. Grindel, J. M., Jaworski, T. E. D., Piraner, O., Emanuele, R. M. & Balasubramanian, M. Distribution , Metabolism , and Excretion of a Novel Surface-Active Agent , Purified Poloxamer 188 , in Rats , Dogs , and Humans.

- 90, 1936–1947 (2002).
65. Tran, R. T. & Gyawali, D. *Biodegradable Injectable Systems for Bone Tissue Engineering*. (2013).
 66. Moreira, C. D. F., Carvalho, S. M., Souza, R., Mansur, H. S. & Pereira, M. M. Nanostructured chitosan/gelatin/bioactive glass in situ forming hydrogel composites as a potential injectable matrix for bone tissue engineering. *Mater. Chem. Phys.* (2018). doi:10.1016/j.matchemphys.2018.07.039
 67. Leonardo, H., Alves, R., Luis, A. E. & Bergmann, C. P. Injectability evaluation of tricalcium phosphate bone cement. 2241–2246 (2008). doi:10.1007/s10856-007-3329-6
 68. Cilurzo, F. *et al.* Injectability Evaluation : An Open Issue. 12, 604–609 (2011).
 69. Hom, W. L. & Bhatia, S. R. Significant enhancement of elasticity in alginate-clay nanocomposite hydrogels with PEO-PPO-PEO copolymers. *Polymer (Guildf)*. 109, 170–175 (2017).
 70. Yeh, M. *et al.* RSC Advances Reverse thermo-responsive hydrogels prepared from Pluronic F127 and gelatin composite. 127, 21252–21257 (2017).
 71. Wu, C. J. & Schmidt, G. Thermosensitive and dissolution properties in nanocomposite polymer hydrogels. *Macromol. Rapid Commun.* 30, 1492–1497 (2009).
 72. de Laia, A. G. S. *et al.* Therapeutic cobalt ion incorporated in poly(vinyl alcohol)/bioactive glass scaffolds for tissue engineering. *J. Mater. Sci.* 55, 8710–8727 (2020).
 73. Boccaccini, A. R. *et al.* Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review. *Compos. Sci. Technol.* 70, 1764–1776 (2010).
 74. Song, F., Li, X., Wang, Q., Liao, L. & Zhang, C. Nanocomposite hydrogels and their applications in drug delivery and tissue engineering. *J. Biomed. Nanotechnol.* 11, 40–52 (2015).
 75. Gaharwar, A. K., Dammu, S. A., Canter, J. M., Wu, C. & Schmidt, G. Highly Extensible , Tough , and Elastomeric Nanocomposite Hydrogels from Poly (ethylene glycol) and Hydroxyapatite Nanoparticles. 1641–1650 (2011). doi:10.1021/bm200027z
 76. Zhou, A. J., Peel, S. A. F. & Clokie, C. M. L. An Evaluation of Hydroxyapatite and Biphasic Calcium Phosphate in Combination With Pluronic F127 and BMP on Bone Repair. *J. Craniofac. Surg.* 18, 1264–1275 (2007).
 77. Mirhosseini, M. M., Haddadi-asl, V. & Zargarian, S. S. RSC Advances Fabrication and characterization of polymer – ceramic nanocomposites containing pluronic F127 immobilized on hydroxyapatite nanoparticles †. *RSC Adv.* 6, 80564–80575 (2016).
 78. Braun, K. *et al.* Dissolution kinetics of mesoporous silica nanoparticles in different simulated body fluids. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 79, 319–327 (2016).
 79. Li, Y., Chen, X., Ning, C., Yuan, B. & Hu, Q. Facile synthesis of mesoporous bioactive glasses with controlled shapes. *Mater. Lett.* 161, 605–608 (2015).

80. Chen, S. *et al.* Biodegradable zinc-containing mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy. *Mater. Today Adv.* 6, (2020).
81. Greasley, S. L. *et al.* Controlling particle size in the Stöber process and incorporation of calcium. *J. Colloid Interface Sci.* 469, 213–223 (2016).
82. Hoppe, A., Güldal, N. S. & Boccaccini, A. R. Biomaterials A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. 32, (2011).
83. Hench, L. L. & Polak, J. M. Third-generation biomedical materials. *Science* (80-.). 295, 1014–1017 (2002).
84. Greasley, S. L. *et al.* Controlling particle size in the Stöber process and incorporation of calcium. *J. Colloid Interface Sci.* 469, 213–223 (2016).
85. Torres, P. M. C. *et al.* Effects of Mn-doping on the structure and biological properties of β -tricalcium phosphate. *J. Inorg. Biochem.* 136, 57–66 (2014).
86. Sopyan, I., Ramesh, S., Nawawi, N. A., Tampieri, A. & Sprio, S. Effects of manganese doping on properties of sol-gel derived biphasic calcium phosphate ceramics. *Ceram. Int.* 37, 3703–3715 (2011).
87. Rico, H. *et al.* Effects on bone loss of manganese alone or with copper supplement in ovariectomized rats A morphometric and densitometric study. 90, 97–101 (2000).
88. Wu, T. *et al.* Improving osteogenesis of calcium phosphate bone cement by incorporating with manganese doped β -tricalcium phosphate. *Mater. Sci. Eng. C* 109, (2020).
89. Wataru FUJITANI *et al.* Synthesis of Hydroxyapatite Containing Manganese and Its Evaluation of Biocompatibility. *Nano Biomed.* Volume 2, 37–46 (2011).
90. Barrioni, B. R., Oliveira, A. C., de Fátima Leite, M. & de Magalhães Pereira, M. Sol-gel-derived manganese-releasing bioactive glass as a therapeutic approach for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci.* 52, 8904–8927 (2017).
91. Nawaz, Q. *et al.* Synthesis and characterization of manganese containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29, (2018).
92. Westhauser, F. *et al.* Osteogenic properties of manganese-doped mesoporous bioactive glass nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 108, 1806–1815 (2020).
93. Chang, B. *et al.* Bioresponsive controlled drug release based on mesoporous silica nanoparticles coated with reductively sheddable polymer shell. *Chem. Mater.* 25, 574–585 (2013).
94. Rana, K. S. *et al.* Development and Characterization of Gallium-Doped Bioactive Glasses for Potential Bone Cancer Applications. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 3, 3425–3432 (2017).
95. Bahniuk, M. S., Pirayesh, H., Singh, H. D., Nychka, J. A. & Unsworth, L. D. Bioactive glass 45S5 powders: Effect of synthesis route and resultant surface chemistry and crystallinity on protein adsorption from human plasma. *Biointerphases* 7, 1–15 (2012).

96. Kokubo, T. & Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27, 2907–2915 (2006).
97. Maçon, A. L. B. *et al.* A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses and their variants. (2015). doi:10.1007/s10856-015-5403-9
98. Yan, X. Z. *et al.* Effects of continuous passaging on mineralization of MC3T3-E1 cells with improved osteogenic culture protocol. *Tissue Eng. - Part C Methods* 20, 198–204 (2014).
99. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63 (1983).
100. Martinez, A., Izquierdo-Barba, I. & Vallet-Regi, M. Bioactivity of a CaO - SiO₂ binary glasses system. *Chem. Mater.* 12, 3080–3088 (2000).
101. Neščáková, Z. *et al.* Multifunctional zinc ion doped sol – gel derived mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications. *Bioact. Mater.* 4, 312–321 (2019).
102. Zheng, K. *et al.* Ag modified mesoporous bioactive glass nanoparticles for enhanced antibacterial activity in 3D infected skin model. *Mater. Sci. Eng. C* 103, (2019).
103. Labbaf, S. *et al.* Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells in vitro. *Biomaterials* 32, 1010–1018 (2011).
104. Pandya, H. M. & Anitha, P. Influence of Manganese on the Synthesis of Nano Hydroxyapatite by Wet Chemical Method for in vitro Applications. *Am. J. Phytomedicine Clin. Ther.* 3, 394–402 (2015).
105. Zheng, K. & Boccaccini, A. R. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 249, 363–373 (2017).
106. Zheng, Y. *et al.* In vitro study of calcium phosphate layers on hydroxyapatite ceramics surface mineralized in different solutions. *Ceram. Int.* 42, 1660–1665 (2016).
107. Nawaz, A., Bano, S., Yasir, M., Wadood, A. & Ur Rehman, M. A. Ag and Mn-doped mesoporous bioactive glass nanoparticles incorporated into the chitosan/gelatin coatings deposited on PEEK/bioactive glass layers for favorable osteogenic differentiation and antibacterial activity. *Mater. Adv.* 1, 1273–1284 (2020).
108. Souza, I. E. P. e, De Carvalho, S. M., Martins, T. & De Magalhães Pereira, M. Fluorine-containing bioactive glass spherical particles synthesized by sol-gel route assisted by ultrasound energy or mechanical mixing. *Mater. Res.* 23, 16–19 (2020).
109. Fiorilli, S. *et al.* The incorporation of strontium to improve bone-regeneration ability of mesoporous bioactive glasses. *Materials (Basel)*. 11, (2018).
110. Bari, A. *et al.* Copper-containing mesoporous bioactive glass nanoparticles as multifunctional agent for bone regeneration. *Acta Biomater.* 55, 493–504 (2017).
111. El-Fiqi, A. *et al.* Capacity of mesoporous bioactive glass nanoparticles to deliver therapeutic molecules. *Nanoscale* 4, 7475–7488 (2012).

112. De Oliveira, A. A. R. *et al.* Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications. *Biomed. Mater.* 8, (2013).
113. Anand, A. *et al.* Preparation and in vivo biocompatibility studies of different mesoporous bioactive glasses. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 89, 89–98 (2019).
114. Cheng, L. *et al.* Crystal facet-dependent reactivity of α -Mn₂O₃ microcrystalline catalyst for soot combustion. *Appl. Catal. B Environ.* 204, 374–384 (2017).
115. Mosqueira, L. *et al.* In vitro effects of the co-release of icariin and strontium from bioactive glass submicron spheres on the reduced osteogenic potential of rat osteoporotic bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomed. Mater.* 15, (2020).
116. Riti, P. I., Vulpoi, A., Ponta, O. & Simon, V. The effect of synthesis route and magnesium addition on structure and bioactivity of sol-gel derived calcium-silicate glasses. *Ceram. Int.* 40, 14741–14748 (2014).
117. Ashuri, M., Moztarzadeh, F., Nezafati, N., Ansari Hamedani, A. & Tahriri, M. Development of a composite based on hydroxyapatite and magnesium and zinc-containing sol-gel-derived bioactive glass for bone substitute applications. *Mater. Sci. Eng. C* 32, 2330–2339 (2012).
118. Brauer, D. S. Bioactive glasses - Structure and properties. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 54, 4160–4181 (2015).
119. Lee, J. H., Sa, Y. J., Kim, T. K., Moon, H. R. & Joo, S. H. A transformative route to nanoporous manganese oxides of controlled oxidation states with identical textural properties. *J. Mater. Chem. A* 10435–10443 (2014). doi:10.1039/c4ta01272k
120. Motlagh, M. M., Hassanzadeh-Tabrizi, S. A. & Saffar-Teluri, A. Influence of Mn₂O₃ content on the textural and catalytic properties of Mn₂O₃/Al₂O₃/SiO₂ nanocatalyst. *Ceram. Int.* 40, 16177–16181 (2014).
121. Omid, H. *et al.* Synthesizing and staining manganese oxide nanoparticles for cytotoxicity and cellular uptake investigation. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 428–433 (2014).
122. Barrioni, B. R. *et al.* Effects of manganese incorporation on the morphology, structure and cytotoxicity of spherical bioactive glass nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 547, 382–392 (2019).
123. Mendonca, A. *et al.* The effect of tantalum incorporation on the physical and chemical properties of ternary silicon–calcium–phosphorous mesoporous bioactive glasses. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 107, 2229–2237 (2019).
124. Post, P., Wurlitzer, L., Maus-Friedrichs, W. & Weber, A. P. Characterization and applications of nanoparticles modified in-flight with silica or silica-organic coatings. *Nanomaterials* 8, 1–19 (2018).
125. Aghaei, R. & Eshaghi, A. Optical and superhydrophilic properties of nanoporous silica-silica nanocomposite thin film. *J. Alloys Compd.* 699, 112–118 (2017).
126. Guillet-Nicolas, R. *et al.* Manganese-impregnated mesoporous silica nanoparticles for signal enhancement in MRI cell labelling studies. *Nanoscale* 5,

11499–11511 (2013).

127. Sawyer, R., Nesbitt, H. W. & Secco, R. A. High resolution X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) study of K₂O-SiO₂ glasses: Evidence for three types of O and at least two types of Si. *J. Non. Cryst. Solids* 358, 290–302 (2012).
128. Li, X., Cao, Z., Zhang, Z. & Dang, H. Surface-modification in situ of nano-SiO₂ and its structure and tribological properties. *Appl. Surf. Sci.* 252, 7856–7861 (2006).
129. Gross, T. *et al.* An XPS analysis of different SiO₂ modifications employing a C 1s as well as an Au 4f_{7/2} static charge reference. *Surf. Interface Anal.* 18, 59–64 (1992).
130. Nesbitt, H. W. *et al.* Bridging, non-bridging and free (O²⁻) oxygen in Na₂O-SiO₂ glasses: An X-ray Photoelectron Spectroscopic (XPS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) study. *J. Non. Cryst. Solids* 357, 170–180 (2011).
131. Dalby, K. N., Nesbitt, H. W., Zakaznova-Herzog, V. P. & King, P. L. Resolution of bridging oxygen signals from O 1s spectra of silicate glasses using XPS: Implications for O and Si speciation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71, 4297–4313 (2007).
132. Soulé, S. *et al.* Thermoresponsive gold nanoshell@mesoporous silica nano-assemblies: an XPS/NMR survey. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 28719–28728 (2015).
133. Serra, J. *et al.* FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses. *J. Non. Cryst. Solids* 332, 20–27 (2003).
134. Anwar, A. *et al.* Synthesis and characterization of pure and nanosized hydroxyapatite bioceramics. *Nanotechnol. Rev.* 6, 149–157 (2017).
135. Demri, B. & Muster, D. XPS study of some calcium compounds. *J. Mater. Process. Tech.* 55, 311–314 (1995).
136. Ni, M. & Ratner, B. D. Differentiating calcium carbonate polymorphs by surface analysis techniques - An XPS and TOF-SIMS study. *Surf. Interface Anal.* 40, 1356–1361 (2008).
137. Sun, H., Qin, X. & Zaera, F. Chemical nature of the thin films that form on SiO₂/Si(100) surfaces upon manganese deposition. *J. Phys. Chem. Lett.* 2, 2525–2530 (2011).
138. Mayer, I., Pető, G., Karacs, A., Molnár, G. & Popov, I. Divalent Mn in calcium hydroxyapatite by pulse laser deposition. *J. Inorg. Biochem.* 104, 1107–1111 (2010).
139. Biesinger, M. C. *et al.* Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni. *Appl. Surf. Sci.* 257, 2717–2730 (2011).
140. Gaddam, A., Fernandes, H. R., Tulyaganov, D. U., Pascual, M. J. & Ferreira, J. M. F. Role of manganese on the structure, crystallization and sintering of non-stoichiometric lithium disilicate glasses. *RSC Adv.* 4, 13581–13592 (2014).
141. Thommes, M. *et al.* Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report).

- Pure Appl. Chem.* 87, 1051–1069 (2015).
142. Philippart, A. *et al.* Novel ion-doped mesoporous glasses for bone tissue engineering: Study of their structural characteristics influenced by the presence of phosphorous oxide. *J. Non. Cryst. Solids* 455, 90–97 (2017).
 143. Sánchez-Salcedo, S. *et al.* In vitro antibacterial capacity and cytocompatibility of SiO₂-CaO-P₂O₅ meso-macroporous glass scaffolds enriched with ZnO. *J. Mater. Chem. B* 2, 4836–4847 (2014).
 144. Anand, V., Singh, K. J. & Kaur, K. Evaluation of zinc and magnesium doped 45S5 mesoporous bioactive glass system for the growth of hydroxyl apatite layer. *J. Non. Cryst. Solids* 406, 88–94 (2014).
 145. Mosqueira, L. *et al.* Strontium-releasing sol–gel bioactive glass spheres and their ability to stimulate osteogenic differentiation in osteoporotic bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Mater. Res.* 36, 459–474 (2021).
 146. Arcos, D., López-Noriega, A., Ruiz-Hernández, E., Terasaki, O. & Vallet-Regí, M. Ordered mesoporous microspheres for bone grafting and drug delivery. *Chem. Mater.* 21, 1000–1009 (2009).
 147. Yin, H. & Casey, P. S. Effects of iron or manganese doping of ZnO nanoparticles on their dissolution, ROS generation and cytotoxicity. *RSC Adv.* 4, 26149–26157 (2014).
 148. He, Q., Shi, J., Zhu, M., Chen, Y. & Chen, F. The three-stage in vitro degradation behavior of mesoporous silica in simulated body fluid. *Microporous Mesoporous Mater.* 131, 314–320 (2010).
 149. Naruphontjirakul, P., Greasley, S. L., Chen, S., Porter, A. E. & Jones, J. R. Monodispersed strontium containing bioactive glass nanoparticles and MC3T3-E1 cellular response. *Biomed. Glas.* 2, 72–81 (2016).
 150. Pourshahrestani, S. *et al.* Gallium-containing mesoporous bioactive glass with potent hemostatic activity and antibacterial efficacy. *J. Mater. Chem. B* 4, 71–86 (2016).
 151. Christodoulou, I. *et al.* Dose- and time-dependent effect of bioactive gel-glass ionic-dissolution products on human fetal osteoblast-specific gene expression. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 74, 529–537 (2005).
 152. Li, M., Liu, J., Xu, Y. & Qian, G. Phosphate adsorption on metal oxides and metal hydroxides: A comparative review. *Environ. Rev.* 24, 319–332 (2016).
 153. Mustafa, S., Zaman, M. I. & Khan, S. pH effect on phosphate sorption by crystalline MnO₂. *J. Colloid Interface Sci.* 301, 370–375 (2006).
 154. Bracci, B. *et al.* Effect of Mg²⁺, Sr²⁺, and Mn²⁺ on the chemico-physical and in vitro biological properties of calcium phosphate biomimetic coatings. *J. Inorg. Biochem.* 103, 1666–1674 (2009).
 155. Medvecký, Ľ. *et al.* Influence of manganese on stability and particle growth of hydroxyapatite in simulated body fluid. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 281, 221–229 (2006).
 156. Liu, Y. T., Kung, K. C., Lee, T. M. & Lui, T. S. Enhancing biological properties of porous coatings through the incorporation of manganese. *J. Alloys Compd.* 581,

- 459–467 (2013).
157. Zhang, J., Zhang, Q., Li, S., Hou, Y. & Zhang, H. The effects of Mn^{2+} on the proliferation, osteogenic differentiation and adipogenic differentiation of primary mouse bone marrow stromal cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 151, 415–423 (2013).
 158. Zadpoor, A. A. Relationship between in vitro apatite-forming ability measured using simulated body fluid and in vivo bioactivity of biomaterials. *Mater. Sci. Eng. C* 35, 134–143 (2014).
 159. Munyemana, J. C. *et al.* Synthesis of manganese phosphate hybrid nanoflowers by collagen-templated biomineralization. *RSC Adv.* 8, 2708–2713 (2018).
 160. Soni, S., Dwivedee, B. P. & Banerjee, U. C. An Ultrafast Sonochemical Strategy to Synthesize Lipase-Manganese Phosphate Hybrid Nanoflowers with Promoted Biocatalytic Performance in the Kinetic Resolution of β -Aryloxyalcohols. *ChemNanoMat* 4, 1007–1020 (2018).
 161. Zhang, Z. *et al.* Manganese(II) phosphate nanoflowers as electrochemical biosensors for the high-sensitivity detection of ractopamine. *Sensors Actuators, B Chem.* 211, 310–317 (2015).
 162. Jin, K. *et al.* Hydrated manganese(II) phosphate ($Mn_3(PO_4)_2 \cdot 3H_2O$) as a water oxidation catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 7435–7443 (2014).
 163. Afridi, M. N., Lee, W. H. & Kim, J. O. Effect of phosphate concentration, anions, heavy metals, and organic matter on phosphate adsorption from wastewater using anodized iron oxide nanoflakes. *Environ. Res.* 171, 428–436 (2019).
 164. Zhang, X. *et al.* Highly efficient adsorption and recycle of phosphate from wastewater using flower-like layered double oxides and their potential as synergistic flame retardants. *J. Colloid Interface Sci.* 562, 578–588 (2020).
 165. Pabbruwe, M. B., Standard, O. C., Sorrell, C. C. & Howlett, C. R. Bone formation within alumina tubes: Effect of calcium, manganese, and chromium dopants. *Biomaterials* 25, 4901–4910 (2004).
 166. Standard, I. *INTERNATIONAL STANDARD.* (2009).
 167. Barrioni, B. R. *et al.* Osteogenic potential of sol–gel bioactive glasses containing manganese. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 30, (2019).
 168. Huang, Y. *et al.* Improving the bioactivity and corrosion resistance properties of electrodeposited hydroxyapatite coating by dual doping of bivalent strontium and manganese ion. *Surf. Coatings Technol.* 291, 205–215 (2016).
 169. Safadi, F. F. *et al.* *Bone Structure, Development and Bone Biology. Bone Pathology* 2, (2009).
 170. Hoemann, C. D., El-Gabalawy, H. & McKee, M. D. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol. Biol.* 57, 318–323 (2009).
 171. Lee, S. C. *et al.* The effect of selenium nanoparticles on the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells. *Nanomaterials* 11, 1–15 (2021).
 172. Park, J. W., Kim, Y. J. & Jang, J. H. Surface characteristics and in vitro biocompatibility of a manganese-containing titanium oxide surface. *Appl. Surf.*

- Sci.* 258, 977–985 (2011).
173. de Laia, A. G. S. *et al.* Cobalt-containing bioactive glass mimics vascular endothelial growth factor A and hypoxia inducible factor 1 function. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 1–14 (2020). doi:10.1002/jbm.a.37095
 174. Salamanca, E., Hsu, C. C., Yao, W. L. & Choy, C. S. Porcine Collagen – Bone Composite Induced Osteoblast Differentiation and Bone Regeneration. (2020).
 175. No, Y. J., Castilho, M., Ramaswamy, Y. & Zreiqat, H. Role of Biomaterials and Controlled Architecture on Tendon/Ligament Repair and Regeneration. *Adv. Mater.* 32, 1–16 (2020).
 176. Ansari, M. & Eshghhanmalek, M. Biomaterials for repair and regeneration of the cartilage tissue. *Bio-Design Manuf.* 2, 41–49 (2019).
 177. Ma, K. *et al.* Application of robotic-assisted in situ 3D printing in cartilage regeneration with HAMA hydrogel: An in vivo study. *J. Adv. Res.* 23, 123–132 (2020).
 178. Boonlai, W., Tantishaiyakul, V., Hirun, N., Sangfai, T. & Suknuntha, K. Thermosensitive Poloxamer 407/Poly(Acrylic Acid) Hydrogels with Potential Application as Injectable Drug Delivery System. *AAPS PharmSciTech* 19, 2103–2117 (2018).
 179. Diniz, I. M. A. *et al.* Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26, 1–10 (2015).
 180. Kjørniksen, A., Calejo, M. T., Zhu, K., Nystr, B. & Sande, S. A. Stabilization of Pluronic Gels in the Presence of Different Polysaccharides. 40465, 1–8 (2014).
 181. Radivojša, M., Grabnar, I. & Grabnar, P. A. Thermoreversible in situ gelling poloxamer-based systems with chitosan nanocomplexes for prolonged subcutaneous delivery of heparin: Design and in vitro evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 50, 93–101 (2013).
 182. Pontremoli, C. *et al.* Evaluation of the effect of a gamma irradiated DBM-Pluronic F127 composite on bone regeneration in wistar rat. *RSC Adv.* 61, 1–19 (2016).
 183. Burckbuchler, V. *et al.* Rheological and syringeability properties of highly concentrated human polyclonal immunoglobulin solutions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76, 351–356 (2010).
 184. Xin, C., Lihong, W., Qiuyuan, L. & Hongzhuo, L. Injectable long-term control-released in situ gels of hydrochloric thiothixene for the treatment of schizophrenia: Preparation, in vitro and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 469, 23–30 (2014).
 185. Xie, Y., Tang, J., Lu, Z., Sun, Z. & An, L. Effects of Poly(Propylene Oxide)–Poly(Ethylene Oxide)–Poly(Propylene Oxide) Triblock Copolymer on the Gelation of Poly(Ethylene Oxide)–Poly(Propylene Oxide)–Poly(Ethylene Oxide) Aqueous Solutions. *J. Macromol. Sci. Part B* 52, 1183–1197 (2013).
 186. Matanović, M. R., Kristl, J. & Grabnar, P. A. Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. *Int. J. Pharm.* 472, 262–275 (2014).

187. Cabana, A., Aït-Kadi, A. & Juhász, J. Study of the gelation process of polyethylene oxide(a)-polypropylene oxide(b)-polyethylene oxide, copolymer (poloxamer 407) aqueous solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 190, 307–312 (1997).
188. Carlfors, J., Edsman, K., Petersson, R. & Jörnving, K. Rheological evaluation of Gelrite® in situ gels for ophthalmic use. *Eur. J. Pharm. Sci.* 6, 113–119 (1998).
189. Zhang, M., Djabourov, M., Bourgaux, C. & Bouchemal, K. Nanostructured fluids from pluronic® mixtures. *Int. J. Pharm.* 454, 599–610 (2013).
190. Park, K. M. *et al.* Thermosensitive chitosan-Pluronic hydrogel as an injectable cell delivery carrier for cartilage regeneration. *Acta Biomater.* 5, 1956–1965 (2009).
191. Boucenna, I., Royon, L., Colinart, P., Guedeau-Boudeville, M. A. & Mourchid, A. Structure and thermorheology of concentrated pluronic copolymer micelles in the presence of laponite particles. *Langmuir* 26, 14430–14436 (2010).
192. Gentile, L., De Luca, G., Antunes, F. E., Rossi, C. O. & Ranieri, G. A. Thermogelation analysis of F127-water mixtures by physical Chemistry techniques. *Appl. Rheol.* 20, 1–12 (2010).
193. Dumortier, G., Grossiord, J. L., Agnely, F. & Chaumeil, J. C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm. Res.* 23, 2709–2728 (2006).
194. Zhang, L., Parsons, D. L., Navarre, C. & Kompella, U. B. Development and in-vitro evaluation of sustained release Poloxamer 407 (P407) gel formulations of ceftiofur. *J. Control. Release* 85, 73–81 (2002).
195. Won, D. A., Kim, M. & Tae, G. Systemic modulation of the stability of pluronic hydrogel by a small amount of graphene oxide. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 128, 515–521 (2015).
196. Branca, C., Khouzami, K., Wanderlingh, U. & D'Angelo, G. Effect of intercalated chitosan/clay nanostructures on concentrated pluronic F127 solution: A FTIR-ATR, DSC and rheological study. *J. Colloid Interface Sci.* 517, 221–229 (2018).
197. Hom, W. L. & Bhatia, S. R. Significant enhancement of elasticity in alginate-clay nanocomposite hydrogels with PEO-PPO-PEO copolymers. *Polymer (Guildf)*. 109, 170–175 (2017).
198. Sergi, R., Bellucci, D. & Cannillo, V. A review of bioactive glass/natural polymer composites: State of the art. *Materials (Basel)*. 13, 1–38 (2020).
199. Martins, T. *et al.* Novel 3D composites with highly flexible behavior based on chitosan and bioactive glass for biomedical applications. *Mater. Chem. Phys.* 189, 1–11 (2017).
200. Gantar, A. *et al.* Nanoparticulate bioactive-glass-reinforced gellan-gum hydrogels for bone-tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 43, 27–36 (2014).
201. Leite, A. J. & Mano, J. F. Biomedical applications of natural-based polymers combined with bioactive glass nanoparticles. *J. Mater. Chem. B* 5, 4555–4568 (2017).
202. Pontremoli, C. *et al.* Hybrid injectable platforms for the in situ delivery of

- therapeutic ions from mesoporous glasses. *Chem. Eng. J.* 340, 103–113 (2018).
203. Quah, S. P., Smith, A. J., Preston, A. N., Laughlin, S. T. & Bhatia, S. R. Large-area alginate/PEO-PPO-PEO hydrogels with thermoreversible rheology at physiological temperatures. *Polymer (Guildf)*. 135, 171–177 (2018).
 204. Bonacucina, G., Cespi, M., Mencarelli, G., Giorgioni, G. & Palmieri, G. F. Thermosensitive self-assembling block copolymers as drug delivery systems. *Polymers (Basel)*. 3, 779–811 (2011).
 205. Su, Y. L., Wang, J. & Liu, H. Z. FTIR spectroscopic investigation of effects of temperature and concentration on PEO-PPO-PEO block copolymer properties in aqueous solutions. *Macromolecules* 35, 6426–6431 (2002).
 206. Martins, T. *et al.* Novel 3D composites with highly flexible behavior based on chitosan and bioactive glass for biomedical applications. *Mater. Chem. Phys.* 189, 1–11 (2017).
 207. Boffito, M. *et al.* Novel polyurethane-based thermosensitive hydrogels as drug release and tissue engineering platforms: Design and in vitro characterization. *Polym. Int.* 65, 756–769 (2016).
 208. Vrandečić, N. S., Erceg, M., Jakić, M. & Klarić, I. Kinetic analysis of thermal degradation of poly (ethylene glycol) and poly (ethylene oxide) s of different molecular weight. 498, 71–80 (2010).
 209. Fu, S. *et al.* Injectable biodegradable thermosensitive hydrogel composite for orthopedic tissue engineering. 1. Preparation and characterization of nanohydroxyapatite/ poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) hydrogel nanocomposites. *J. Phys. Chem. B* 113, 16518–16525 (2009).
 210. dos Santos, D. M. M., de Carvalho, S. M., Pereira, M. M., Houmard, M. & Nunes, E. H. M. Freeze-cast composite scaffolds prepared from sol-gel derived 58S bioactive glass and polycaprolactone. *Ceram. Int.* 45, 9891–9900 (2019).
 211. Jung, Y. P. *et al.* Thermo-sensitive injectable hydrogel based on the physical mixing of hyaluronic acid and Pluronic F-127 for sustained NSAID delivery. *Carbohydr. Polym.* 156, 403–408 (2017).
 212. Moreira, C. D. F., Carvalho, S. M., Sousa, R. G., Mansur, H. S. & Pereira, M. M. Nanostructured chitosan/gelatin/bioactive glass in situ forming hydrogel composites as a potential injectable matrix for bone tissue engineering. *Mater. Chem. Phys.* 218, 304–316 (2018).
 213. Rungseewijitprapa, W. & Bodmeier, R. Injectability of biodegradable in situ forming microparticle systems (ISM). *Eur. J. Pharm. Sci.* 36, 524–531 (2009).

