

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

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

Dissertação de Mestrado

Síntese e caracterização de *scaffolds* do vidro bioativo 13-93 produzidos por processo *freeze-casting* para potencial aplicação em engenharia de tecidos ósseos

Autor: Francisco Bubantz Fantecelle

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes

Coorientador: Prof. Dr. Manuel Houmard

Belo Horizonte

Setembro/2022

Francisco Bubantz Fantecelle

Síntese e caracterização de *scaffolds* do vidro bioativo 13-93 produzidos por processo *freeze-casting* para potencial aplicação em engenharia de tecidos ósseos

Dissertação 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 para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Área de Concentração: Biomateriais

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes

Coorientador: Prof. Dr. Manuel Houmard

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Engenharia

2022

F216s

Fantecelle, Francisco Bubantz.

Síntese e caracterização de *scaffolds* do vidro bioativo 13-93 produzidos por processo *freeze-casting* para potencial aplicação em engenharia de tecidos ósseos [recurso eletrônico] / Francisco Bubantz Fantecelle. - 2022.

1 recurso online (122 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Eduardo Henrique Martins Nunes.

Coorientador: Manuel Houmard.

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

Bibliografia: f. 107-122.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Materiais - Teses. 2. Ciência dos materiais - Teses. 3. Vidros bioativos - Teses. 3. Processo sol-gel - Teses. 4. Engenharia de tecidos - Teses. I. Nunes, Eduardo Henrique Martins. II. Houmard, Manuel. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 620(043)



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



A dissertação intitulada "**Síntese e Caracterização de Scaffolds do Vidro Bioativo 13-93 Produzidos por Processo Freeze-casting para Potencial Aplicação em Engenharia de Tecidos Ósseos**", área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais, apresentada pelo candidato **Francisco Bubantz Fantecelle**, para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, foi aprovada pela comissão examinadora constituída pelos seguintes membros:

Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes
Orientador (UFMG)

Dr. Manuel Houmard
Coorientador (UFMG)

Dr. Breno Rocha Barrioni
(UFVJM)

Dra. Talita Martins
(Faculdade Pitágoras)

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

Belo Horizonte, 09 de setembro de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha mãe e a meu pai por todo o suporte durante minha vida e pela paciência infinita com causas perdidas.

Agradeço imensamente ao Professor Eduardo, que aceitou prontamente me orientar como mestrando e que sempre foi tão prestativo em relação a qualquer dúvida e necessidade durante o trabalho.

Ao professor Manuel pelo suporte e pelos comentários e observações pertinentes que acrescentaram muito ao conteúdo deste estudo.

Ao Diogo, ao Breno e ao Miguel, pela constante disponibilidade, boa vontade e ajuda com tarefas e procedimentos que eu não dominava. Seus conhecimentos técnicos, dicas e conselhos foram sempre valiosos e imprescindíveis à execução dessas tarefas e para minha melhor compreensão acerca do conteúdo.

À Hellen Andrade, à Taiane, ao Samuel Lima e ao Himad Alcamand, sempre muito solícitos ao me atender e me ajudar com as análises de que eu precisava.

Ao Marcelo Mantini, à Ingrid Souza e a outros já citados pela eventual companhia durante parte do tempo passado no laboratório.

RESUMO

Pesquisas envolvendo materiais sintéticos para utilização em terapias de regeneração óssea são motivadas, em grande parte, pelas limitações apresentadas pelos tratamentos convencionais. Vidros bioativos são materiais tradicionalmente utilizados nessa área e têm tido grande destaque em Engenharia de Tecidos. Contudo, o desempenho desses materiais na forma de *scaffolds* ainda é insuficiente no que diz respeito ao equilíbrio entre os parâmetros porosidade e propriedades mecânicas, e em relação à tendência que apresentam de se cristalizarem durante tratamentos térmicos. O fenômeno de cristalização reduz sua bioatividade, motivando o estudo de composições que apresentem menor tendência à formação de fases cristalinas. Este trabalho objetiva a produção de *scaffolds* do vidro bioativo 13-93, cuja composição química favorece a sinterização em temperaturas mais baixas, diminuindo a possibilidade de ocorrer cristalização. A síntese do vidro foi realizada via processo sol-gel devido à inerente porosidade e elevada pureza de materiais obtidos por este método. Em seguida, o vidro sintetizado foi utilizado na produção de *scaffolds* por meio do processo *freeze-casting*, que permite elevado controle sobre a estrutura de poros dos componentes, o que a torna adequada para a produção de estruturas destinadas a aplicações em Engenharia de Tecidos Ósseos. A caracterização dos materiais envolveu a análise da distribuição de tamanhos de partículas, área superficial específica, densidade, porosidade, cristalinidade, resistência mecânica e bioatividade. Os resultados sugerem que a distribuição granulométrica das partículas utilizadas no processo *freeze-casting* impediu a obtenção de uma estrutura de poros lamelar e orientada. No entanto, foi possível sinterizar os *scaffolds* sem a ocorrência de cristalização, e as porosidades mensuradas foram superiores a 60 %, com ampla distribuição de tamanhos de poros. Os valores de módulo de Young medidos variaram entre 1,10 e 1,40 GPa, e os de resistência à compressão, entre 12,7 e 22,4 MPa. Além disso, o desenvolvimento da camada de HA após três dias de imersão dos *scaffolds* em SBF confirmou a bioatividade do VB. Os resultados apresentados neste estudo indicam compatibilidade dos *scaffolds* com o osso trabecular humano e potencial para aplicação em Engenharia de Tecidos Ósseos.

PALAVRAS-CHAVE: vidro bioativo; *scaffolds*; sol-gel; *freeze-casting*; engenharia de tecido ósseo.

ABSTRACT

Studies focused on synthetic materials for use in bone regeneration therapies is largely driven by the limitations observed in conventional treatments. Traditionally, bioactive glass (BG) has been used to fill and restore defects. More recently, this material gained significance in Bone Tissue Engineering. However, its performance as *scaffolds* is still insufficient because they lack the requisite balance between porosity and mechanical properties. Although beneficial to the mechanical properties of BG, a heat treatment step can lead to crystallization, which impairs its bioactivity. Consequently, it is necessary to study BG compositions less susceptible to this phenomenon. This work aimed to prepare *scaffolds* from 13-93 BG, a material with a chemical composition that favors sintering at lower temperatures and displays a low tendency to crystallize. This glass was prepared by the sol-gel process due to the inherent porosity and high purity of materials derived from it. The glass powder was then used to prepare *scaffolds* through the *freeze-casting* process. This technique allows preparing specimens with high control over the pore structure, which makes it suitable to produce *scaffolds* for Bone Tissue Engineering. The obtained materials were examined according to their particle size distribution, specific surface area, density, porosity, crystallinity, mechanical properties, and bioactivity. The results suggest that the sizes of the particles used in the *freeze-casting* process prevented the obtainment of a lamellar and oriented pore structure for the *scaffolds*. However, it was possible to sinter the *scaffolds* without the occurrence of crystallization, and the measured porosities were greater than 60 %, with a wide pore size distribution. The *scaffolds* showed Young's modulus values ranging from 1.10 to 1.40 GPa and compressive strength values varying between 12.7 and 22.4 MPa. Furthermore, the development of the HA layer after three days of immersion of the *scaffolds* in SBF confirmed the bioactivity of VB. The results presented in this study indicate the compatibility of these *scaffolds* with human trabecular bone and their potential application in Bone Tissue Engineering.

KEYWORDS: bioactive glass; *scaffolds*; sol-gel; *freeze-casting*; bone tissue engineering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura hierárquica do osso em várias escalas	21
Figura 2 - Processo de reparação da fratura óssea por formação de novo tecido	22
Figura 3 - Diagrama esquemático dos elementos envolvidos na ET	23
Figura 4 - Fotografia e imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura de <i>scaffold</i> de espuma de VB produzida pelo método sol-gel	24
Figura 5 - Esquema bidimensional da estrutura de um vidro mostrando íons formadores e modificadores de rede	27
Figura 6 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície de uma amostra de VB antes e após imersão em SBF por 1, 3 e 7 dias	28
Figura 7 - Tetraedros de sílica produzidos a partir da hidrólise da molécula de TEOS formando uma partícula coloidal, e a rede tridimensional de sílica resultante da coalescência de várias dessas partículas	31
Figura 8 - Fluxograma com as etapas do processamento sol-gel	33
Figura 9 - Etapas do processo <i>freeze-casting</i>	40
Figura 10 - Efeitos de diferentes solventes sobre a estrutura de poros de <i>scaffolds</i>	41
Figura 11 - Estrutura cristalina do gelo e anisotropia de crescimento dos cristais, que dão origem a material e estrutura de poros lamelares	42
Figura 12 - Imagens por microscopia eletrônica de varredura de <i>scaffolds</i> de alumina produzidos por <i>freeze-casting</i> em naftaleno/cânfora	43
Figura 13 – Porosidade em função da carga de sólidos na suspensão para diversos materiais cerâmicos produzidos por <i>freeze-casting</i>	44
Figura 14 - Influência do tamanho de partícula sobre a morfologia dos poros	44
Figura 15 - Fluxograma do processo de síntese sol-gel do VB 13-93	47
Figura 16 – Fluxograma do processo <i>freeze-casting</i>	49

Figura 17 – Espectro EDS do VB particulado	59
Figura 18 - Padrões de DRX do vidro bioativo 13-93 antes e após tratamento térmico a 625 °C	62
Figura 19 - Padrões de DRX do VB 13-93 após tratamentos térmicos a 650 °C e 700 °C por 2, 4 ou 8 h	63
Figura 20 - Espectros FTIR do VB antes e após tratamento térmico a 625 °C	64
Figura 21 - Distribuição granulométrica do VB 13-93 após moagem	66
Figura 22 - Curvas de TG e DTA para o VB 13-93 após tratamento térmico e ampliação da curva de DTA	68
Figura 23 - Imagens de MEV do VB 13-93 particulado após tratamento térmico	71
Figura 24 - Isoterma de adsorção de N ₂ para o VB 13-93 após tratamento térmico	72
Figura 25 - Aspecto visual dos <i>scaffolds</i> antes e após sinterização	77
Figura 26 - Imagens de micro-CT obtidas para <i>scaffolds</i> após sinterização. As regiões escuras são poros e as claras representam a fase sólida	78
Figura 27 - Porosidades aberta, fechada e total dos <i>scaffolds</i> em função do tempo de sinterização	81
Figura 28 – Tamanho médio e distribuição de tamanhos de poros dos <i>scaffolds</i> em função do tempo de sinterização	82
Figura 29 – Micrografias de MEV das seções transversais paralelas ao sentido de solidificação dos <i>scaffolds</i> sinterizados por 2 h, 4 h e 8 h	86
Figura 30 - Micrografias de MEV das seções transversais perpendiculares ao sentido de solidificação dos <i>scaffolds</i>	87
Figura 31 – Micrografia de MEV evidenciando a presença de uma camada densa na superfície do <i>scaffold</i>	89

Figura 32 – Curvas de tensão x deformação obtidas para os <i>scaffolds</i>	92
Figura 33 - Valores de resistência à compressão dos <i>scaffolds</i>	92
Figura 34 – Resistência mecânica x porosidade para <i>scaffolds</i> do VB 13-93 produzidos por <i>freeze-casting</i>	95
Figura 35 - Espectros FTIR dos <i>scaffolds</i> sinterizados por 2 horas para diversos períodos de imersão em SBF e para a amostra não imersa	96
Figura 36 - Espectros FTIR dos <i>scaffolds</i> sinterizados por 4 horas para diversos períodos de imersão em SBF e para amostra não imersa	96
Figura 37 - Espectros FTIR dos <i>scaffolds</i> sinterizados por 8 horas para diversos períodos de imersão em SBF e para amostra não imersa	97
Figura 38– Espectro FTIR da hidroxiapatita	98
Figura 39 – Padrões de DRX dos <i>scaffolds</i> sinterizados por 2 h para diferentes períodos de imersão em SBF e para amostra não imersa	99
Figura 40 – Padrões de DRX dos <i>scaffolds</i> sinterizados por 4 h para diferentes períodos de imersão em SBF e para amostra não imersa	99
Figura 41 – Padrões de DRX dos <i>scaffolds</i> sinterizados por 8 h para diferentes períodos de imersão em SBF e para amostra não imersa	100
Figura 42 -Padrão de DRX da HA obtido na base de dados JCPDS	101
Figura 43 – Micrografias de MEV do VB, para cada tempo de sinterização, para 0, 1, 7 e 21 dias de imersão em SBF	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades térmicas do VB 13-93 obtidos em vários estudos	35
Tabela 2 - Ordem de adição dos reagentes na preparação da solução SBF	57
Tabela 3 - Composição do VB 13-93 medida por WDS após tratamento térmico	60
Tabela 4 - Grupos químicos e ligações identificadas no espectro FTIR e seus respectivos números de onda	65
Tabela 5 - Tamanhos de partículas do VB após moagem em moinho de bolas	66
Tabela 6 - Tamanhos médios de poros obtidos por Micro-CT e MEV	88
Tabela 7 - Porosidade e densidade aparente dos <i>scaffolds</i> obtidos por picnometria de He	90
Tabela 8 - Valores de propriedades mecânicas e de porosidade dos <i>scaffolds</i> produzidos e dos ossos trabecular e cortical	93

LISTA DE NOTAÇÕES

Abs	Absorbância
ASE	Área superficial específica
CR	Conectividade de rede
DRX	Difração de raios X
DTA	Análise térmica diferencial
EDS	Espectrometria de raios X por dispersão em energia
ET	Engenharia de tecido
ETO	Engenharia de tecidos ósseos
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatita
HAC	Hidroxiapatita carbonatada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Micro-CT	Microtomografia de raios X
NBO	Oxigênio não ligante (<i>non-bridging oxygen</i>)
P _A	Fração de poros abertos
PCL	Poli (ϵ -caprolactona)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
P _F	Fração de poros fechados
PGA	Poli (ácido glicólico)
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PTEFE	Politetrafluoretileno (Teflon [®])

PVA	Álcool polivinílico
SAOS	Células de osteosarcoma humano imortalizadas
SBF	Fluido corporal simulado (<i>simulated body fluid</i>)
TEOS	Tetraetilortossilicato
TEP	Trietilfosfato
T _c	Temperatura do pico da cristalização
TCP	Tricálcio fosfato
T _{ic}	Temperatura de início da cristalização
T _f	Temperatura de fusão
T _g	Temperatura de transição vítrea
TG	Termogravimetria
TGF-β	Fator de crescimento transformador - β
VB	Vidro bioativo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WDS	Espectrometria de raios X por dispersão em comprimento de onda

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	18
2.1. OBJETIVO GERAL	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
CAPÍTULO 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO.....	19
3.1.1. Contextualização.....	19
3.1.2. Breve resumo sobre a biologia do osso	20
3.1.3. <i>Scaffolds</i> para ETO	22
3.2. VIDROS BIOATIVOS	26
3.2.1. Apresentação.....	26
3.2.2. Vidros bioativos produzidos por processamento sol-gel	29
3.2.3. O vidro bioativo 13-93.....	33
3.3. PROCESSO <i>FREEZE-CASTING</i>	38
3.3.1. Fundamentos	38
3.3.2. Influência de alguns parâmetros de processo	40
CAPÍTULO 4. METODOLOGIA	46
4.1. SÍNTESE DO VIDRO BIOATIVO 13-93	46
4.2. PREPARO DOS <i>SCAFFOLDS</i> : PROCESSO <i>FREEZE-CASTING</i>	47
4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS PREPARADOS	50
CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS PARTÍCULAS DE VB 13-93	59
5.1.1. Composição química do VB	59
5.1.2. Padrões de DRX.....	61
5.1.3. Espectros FTIR	63

5.1.4. Distribuição granulométrica	66
5.1.5. Propriedades térmicas	67
5.1.6. Densidade real do VB	70
5.1.7. Imagens de MEV do material particulado	71
5.1.8. Área superficial específica e características de porosidade	72
5.1.9. Conclusões	74
5.2. <i>FREEZE-CASTING</i> E CARACTERIZAÇÕES DOS <i>SCAFFOLDS</i>	76
5.2.1. Aspecto visual dos <i>scaffolds</i>	76
5.2.2. Sinterização e estrutura de poros dos <i>scaffolds</i>	77
5.2.2. Propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i>	91
5.2.3. Imersão em SBF.....	95
5.2.4. Conclusões	103
CAPÍTULO 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	105
CAPÍTULO 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

O campo dos biomateriais teve início em meados do século XX e vem crescendo desde então, impactando a ciência, economia e saúde humana. O envelhecimento da população, o aumento da expectativa de vida e o contínuo progresso da medicina têm ampliado a demanda por tratamentos de substituição e reparo de órgãos e tecidos defeituosos [1]. A incidência de doenças e lesões em ossos, por exemplo, têm aumentado, e este tecido já é o segundo mais transplantado no mundo e o número de operações envolvendo enxertos ou materiais que substituem ossos ultrapassa dois milhões anualmente [2].

Implantes artificiais inertes pertencentes à primeira geração de biomateriais e transplantes são tratamentos bastante comuns para defeitos e lesões em ossos. Os primeiros, porém, não são degradáveis, não se integram bem ao tecido e se adaptam mal ao ambiente fisiológico. Para os segundos, a quantidade de doadores é restrita, havendo risco de transmissão de doenças ou rejeição pelo organismo receptor e, no caso de autoenxertos, morbidades nos locais doadores são frequentes e há limites para a fração de tecido extraída. A Engenharia de Tecidos Ósseos (ETO) se apresenta como alternativa a essas limitações, consistindo na utilização de matrizes porosas (*scaffolds*), que proveem suporte temporário ao desenvolvimento de tecidos estruturais e mecanicamente equivalentes àquele a ser tratado [3] e ambiente adequado que estimule sua regeneração enquanto o material é degradado e absorvido pelo organismo. Pode-se tanto fazer o implante *in vivo* do componente permitindo que o crescimento tecidual ocorra *in situ*, quanto cultivar células do paciente *in vitro* na matriz para posterior implante do conjunto tecido/*scaffold* e continuidade do processo de regeneração [4].

Os vidros bioativos (VBs) estão entre os materiais mais estudados para aplicações em ETO. O VB foi inicialmente desenvolvido em 1969 por Larry Hench [5], que produziu o *Bioglass®* (também chamado VB 45S5), de composição molar 46,2% SiO₂ - 26,9% CaO - 24,3% Na₂O - 2,6% P₂O₅. Ao serem implantados, a dissolução desses materiais induz rápida resposta biológica e estimula o crescimento tecidual para além da interface com o implante [6]. Esse feito levou à elaboração dos conceitos de *osteoprodução* e

osteoidução, impulsionando o campo das cerâmicas bioativas. Desde então, vários novos produtos foram criados via modificação da composição química desses materiais e obtendo-se propriedades específicas para diferentes aplicações [7].

Alternativamente ao tradicional método de fusão e têmpera (*melt-quenching*), o processo sol-gel tem sido cada vez mais utilizado para a obtenção de VBs. Trata-se de uma rota química que consiste na hidrólise e polimerização de precursores em temperaturas próximas à ambiente para formar um gel que, após secagem, é tratado termicamente. Esta técnica se caracteriza por sua simplicidade, versatilidade e pela obtenção de produtos de elevada pureza e homogeneidade. Além disso, a inerente porosidade dos vidros obtidos confere a eles elevada área superficial específica e interconectividade de poros, características essenciais à bioatividade dos *scaffolds* [8]. Porém, as desvantagens desses materiais são sua fragilidade e baixa tenacidade à fratura, que restringem sua utilização a componentes de pequenas dimensões e a regiões não submetidas a cargas elevadas [9]. Ademais, esses materiais usualmente exibem forte tendência à cristalização durante tratamento térmico, etapa fundamental para a consolidação das partículas. Apesar de melhorar a resistência mecânica, a cristalização induzida por altas temperaturas reduz significativamente sua bioatividade, podendo provocar a instabilidade do implante [10]. Tais limitações tornam essenciais estudos visando diminuir a propensão dos vidros a se cristalizarem e estratégias que tornem suas propriedades mecânicas mais adequadas.

Este trabalho detalha a produção, via processo sol-gel, de um VB com baixa tendência a se cristalizar e, a partir dele, a fabricação de *scaffolds* que apresentassem propriedades mecânicas e biológicas adequadas à aplicação em ETO. Para evitar a cristalização, foi escolhido o VB 13-93, de composição molar (%) igual a 54,6 SiO₂ - 22,1 CaO - 6,0 Na₂O - 1,7 P₂O₅ - 7,7 MgO - 7,9 K₂O. Seu maior teor de sílica e a presença de mais óxidos modificadores de rede lhe conferem melhor processabilidade, permitindo a sinterização por fluxo viscoso e, conseqüentemente, a preservação do estado amorfo e maior grau de densificação [11]. A escolha deste vidro se deu também pelo fato de haver poucos estudos sobre sua obtenção através da síntese sol-gel. Para a fabricação dos *scaffolds* optou-se pelo processo *freeze-casting* que permite grande controle sobre a

estrutura de poros e por ser simples, barato e de baixo impacto ambiental [12]. Esta técnica consiste em resfriar uma suspensão de partículas e, à medida que o solvente se solidifica, as partículas são rejeitadas e concentradas entre os cristais do solvente, formando o corpo verde (estrutura não sinterizada). A isso segue-se a aplicação de vácuo para a sublimação do solvente solidificado e a sinterização dos corpos verdes obtidos [13]. Entretanto, diferentemente de Santos *et al.* [13] que utilizaram uma mistura de naftaleno e cânfora como solvente, para este estudo optou-se pelo uso de água, que é um solvente sem risco de manuseio e que permite a utilização de ampla variedade de aditivos.

A organização da dissertação foi feita em capítulos que seguem a ordem das atividades envolvidas na elaboração do trabalho. No Capítulo 1 é feita uma breve introdução do tema Biomateriais e sobre o uso de vidros bioativos e *scaffolds* nesta área de pesquisa. O Capítulo 2 expõe sucintamente os objetivos da pesquisa. O Capítulo 3 consiste em uma revisão bibliográfica que aborda os fundamentos da ETO, as características e utilização de VBs neste campo de pesquisa e a técnica de *freeze-casting* para a produção de *scaffolds*. No Capítulo 4 é descrita a metodologia utilizada para a síntese do VB, o preparo dos *scaffolds* e a caracterização dos materiais preparados por meio de diversas técnicas. O Capítulo 5 é dedicado à apresentação e discussão dos resultados obtidos. Por fim, no Capítulo 6 constam as considerações finais, as conclusões obtidas com o trabalho e sugestões para possíveis trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Utilizar o processo *freeze-casting* em meio aquoso, considerando fatores ambientais, de custo e de segurança, para produzir *scaffolds* de VB 13-93 com estrutura de poros controlada para potencial aplicação em ETO.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar partículas de VB 13-93 através do método sol-gel;
- Caracterizar o material sintetizado em relação a propriedades que afetem seu desempenho como biomaterial;
- Produzir *scaffolds* que possam ser sinterizados sem ocorrência da cristalização e que apresentem porosidade, resistência mecânica e bioatividade adequadas para a utilização em ETO;
- Caracterizar os *scaffolds* produzidos em relação à sua estrutura de poros, propriedades mecânicas e bioatividade.

CAPÍTULO 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO

3.1.1. Contextualização

O aumento da expectativa de vida e o envelhecimento da população são as causas para o crescimento significativo do número de casos de doenças e lesões em ossos. A enorme incidência de enfermidades como fraturas, escoliose, osteoporose, infecções ou tumores, defeitos congênitos e osteoartrite já fazem do tecido ósseo o segundo mais transplantado (atrás apenas do sangue), com mais de dois milhões de operações realizadas anualmente em todo o mundo e custo estimado de U\$ 2,5 bilhões por ano [14]. O impacto sobre a qualidade de vida das pessoas, os elevados custos dos tratamentos [3] e a carência de soluções satisfatórias demandam estudos que busquem terapias mais eficientes [2]. Atualmente, os enxertos autólogos, ou autoenxertos, ainda são a alternativa mais eficiente em tratamentos de doenças e lesões ósseas. Eles são compatíveis com o tecido, não originam resposta imunológica e apresentam todas as características biológicas essenciais à regeneração óssea, provendo estímulo à diferenciação celular, suporte para sua adesão, migração e crescimento e a formação de novos vasos sanguíneos. Contudo, as limitações dessas terapias impulsionam a busca por alternativas mais viáveis e eficientes [15,16].

A Engenharia de Tecidos (ET) é um campo da Medicina Regenerativa que combina princípios de biomedicina e engenharia viabilizando o crescimento, o desenvolvimento e a regeneração de tecidos e órgãos danificados por lesões, doenças ou envelhecimento, com o objetivo de restaurar, manter ou melhorar a execução de suas funções. É uma abordagem que visa a obtenção de tecidos funcionais baseando-se na compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na formação e regeneração tecidual, indo muito além dos implantes e de materiais sintéticos e transplantes [17]. A ET surgiu como estratégia promissora para superar, por exemplo, a disponibilidade reduzida de órgãos e tecidos vivos para transplantes, as morbidades nos locais doadores e a eventual falta de compatibilidade entre tecidos com funções diferentes nas cirurgias reconstrutivas, a vida

útil limitada dos materiais sintéticos e as cirurgias de revisão comumente necessárias [18]. De fato, nas últimas três décadas, verificou-se resultados bem-sucedidos na regeneração de peles, ossos e cartilagens [19], bem como na produção e implantes de vasos, bexigas, vias aéreas, uretra e válvulas cardíacas [20].

Devido a seu alto potencial de regeneração, o tecido ósseo é o mais investigado no campo da ET [21]. Ao serem implantados, os materiais devem dar suporte à fixação e adesão de células, vascularização, deposição da matriz extracelular e à organização hierárquica da matriz óssea [6]. A ETO se baseia na simulação dos processos de regeneração óssea em laboratório, o que requer o uso de *scaffolds* altamente porosos e com poros interconectados, que estimulem o crescimento do tecido em três dimensões [22]. *Scaffolds* já encontram utilização na regeneração de ossos, sendo fabricados por meio de várias técnicas a partir de metais, vidros e outras cerâmicas, polímeros e compósitos. Entretanto, a aplicação clínica dessas estruturas ainda mostra resultados insuficientes, já que todas essas classes de materiais apresentam limitações. Para ETO, especificamente, o tratamento de doenças e defeitos de tamanhos críticos e em locais que suportam cargas ainda é um grande desafio [4,6,23]. VBs têm bastante destaque neste campo de pesquisa devido à sua capacidade de liberar íons que, uma vez em contato com o meio biológico, formam um composto que lhe permite estabelecer ligações fortes e estáveis com ossos [24].

3.1.2. Breve resumo sobre a biologia do osso

Com uma estrutura complexa e hierarquicamente organizada (Figura 1), o tecido ósseo é um compósito natural e faz parte do sistema musculoesquelético, exercendo funções como prover sustentação mecânica de músculos, proteger órgãos, facilitar a mobilidade, absorver metais pesados, manter o equilíbrio e servir como reserva de cálcio, fosfato e outros íons [25]. Sua nanoestrutura é constituída por uma fase mineral majoritariamente formada por nanocristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), por uma fase orgânica, cujos principais componentes são colágeno Tipo I, lipídios e proteínas não colágenas, e por água [6,26]. A combinação desses componentes em escala nanométrica é o que garante ao tecido rigidez, resistência à compressão e alta tenacidade à fratura [16,27].

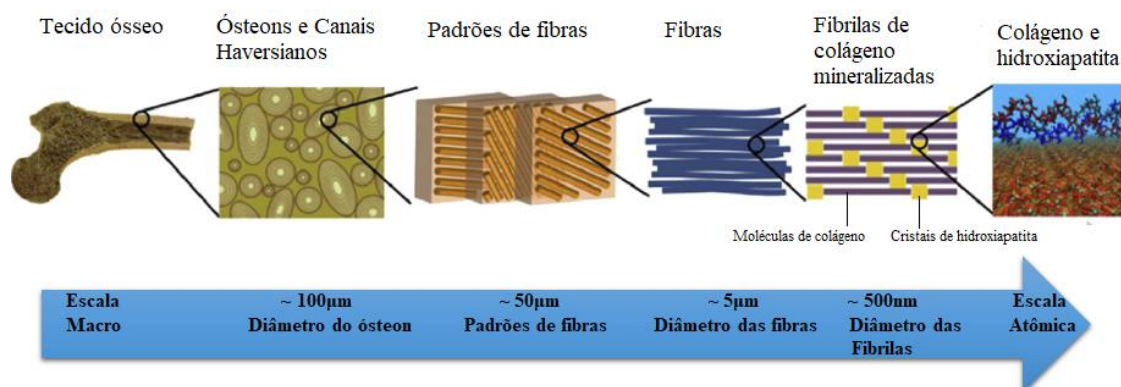


Figura 1 - Estrutura hierárquica do osso em várias escalas. Na escala nanométrica, a estrutura é constituída por fibras de colágeno compostas de grupos de fibrilas de colágeno e cristais de hidroxiapatita. Adaptado de [28].

As células que compõem o tecido ósseo são os osteoblastos (células formadoras), os osteócitos (células maduras) e os osteoclastos (células de reabsorção). Os osteoblastos produzem a fase orgânica do tecido e atuam na mineralização da matriz devido à sua capacidade de concentrarem cálcio e fosfato. Eles se localizam na superfície do osso e, à medida que a matriz vai sendo sintetizada, essas células se diferenciam e acabam completamente circundadas, passando a ser denominadas osteócitos. Os osteoclastos são células grandes e móveis, responsáveis pela reabsorção do tecido e que contribuem para a reestruturação dos ossos durante toda a vida [27], alterando seu tamanho, forma e estrutura com base em solicitações mecânicas internas e externas. Este mecanismo é responsável pela manutenção das funções do tecido através da constante substituição de partes danificadas por tecido novo [28].

Em escala macroscópica, o tecido é dividido em osso cortical e osso esponjoso. O primeiro, também denominado osso compacto, corresponde à parte externa, é denso, pouco poroso e constitui cerca de 80% da massa do tecido. A parte interna é ocupada pelo osso esponjoso (ou trabecular), de alta porosidade, menos denso e resistente. Representando 20% da massa, o osso trabecular envolve a medula óssea, é altamente vascularizado e composto por placas finas designadas trabéculas [25,27].

O crescimento dos ossos ocorre com a formação de novo tecido e a reabsorção parcial de tecido já existente, o que possibilita que os ossos mantenham sua forma durante o

processo. No caso de fraturas, as membranas que envolvem os ossos (periósteo e endósteo) promovem intensa proliferação de células osteoprogenitoras. Estas penetram nas extremidades quebradas promovendo a criação de tecido ósseo primário ao redor e entre essas extremidades. Posteriormente, este tecido evolui para um calo ósseo que as envolve e as une provisoriamente (Figura 2). As trações e pressões exercidas sobre o osso durante a reparação da fratura e pelo retorno do paciente a suas atividades normais remodelam o calo e o substituem por tecido ósseo secundário [27].

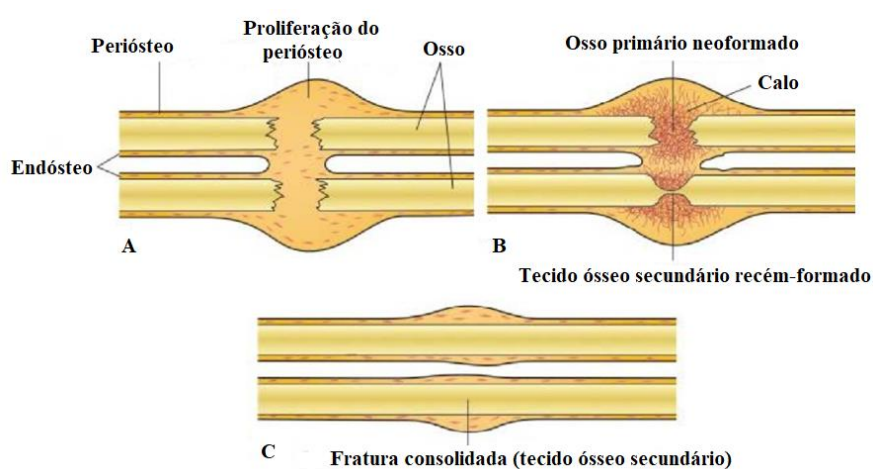


Figura 2 - Processo de reparação da fratura óssea por formação de novo tecido.

Adaptado de [27].

Neste contexto, vidros bioativos [28,29] e, mais especificamente, *scaffolds* produzidos a partir desses materiais são uma alternativa promissora para o tratamento de fraturas e doenças que afetam o tecido ósseo devido à sua habilidade de suportar o crescimento de células ósseas e criar fortes ligações com o osso [3,30,31].

3.1.3. *Scaffolds* para ETO

A estratégia mais comum em ETO é a utilização de *scaffolds* como estruturas que substituem temporariamente a parte danificada do tecido, fornecendo suporte às células e provendo o ambiente adequado que estimule e guie sua proliferação e diferenciação. Moléculas bioativas, proteínas de matriz celular e hormônios também são alocadas na matriz de modo a orientar a regulação de funções celulares durante a regeneração,

aumentando a biocompatibilidade das estruturas [19,22,32]. Após células (do paciente ou de doadores) serem acondicionadas no *scaffold* e maturadas *in vitro*, obtém-se um biocompósito que é implantado no local lesionado e a regeneração tecidual continua à medida que o material sintético é biodegradado e substituído por tecido. Outra alternativa é implantar o componente sem o prévio cultivo celular *ex vivo*, caso em que o preenchimento da estrutura por células é feito *in situ* pelo tecido hospedeiro [4]. A Figura 3 ilustra os três componentes necessários para a ET.

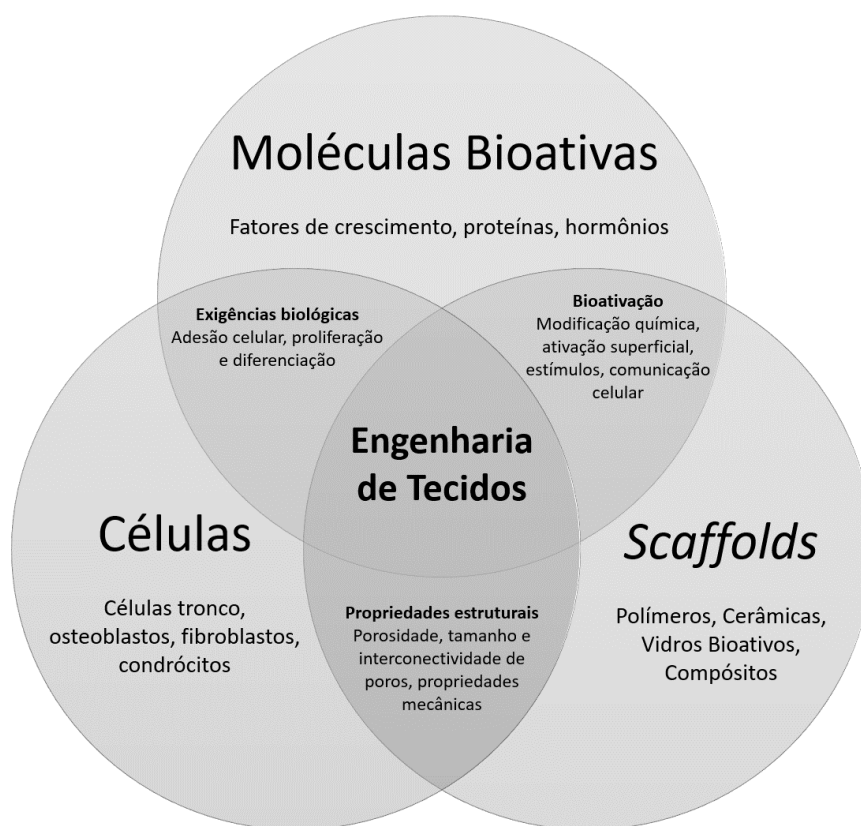


Figura 3 - Diagrama esquemático dos elementos envolvidos na ET. Adaptado de [33].

Os biomateriais são fundamentais para que a regeneração óssea aconteça de forma expressiva. *Scaffolds* devem propiciar condições à ocorrência dos fenômenos de osteogênese, osteoindução, osteocondução e angiogênese. O primeiro refere-se à diferenciação de células ósseas que induz a formação de novo tecido a partir de células do próprio indivíduo ou de doadores. A osteoindução é o estímulo dado a células primitivas e indiferenciadas para promover sua diferenciação em osteoblastos que atuarão na formação de novo tecido. A osteocondução corresponde à capacidade que

uma superfície tem de dar suporte estrutural à fixação de células osteoblásticas e osteoprogenitoras, permitindo sua migração e crescimento dentro da estrutura [28]. Por último, os *scaffolds* devem ter a capacidade de induzir a angiogênese, isto é, a formação de novos vasos sanguíneos, pois a vascularização lenta ou insuficiente atrasa o processo de cura [15]. Para tanto, os biomateriais devem estimular a habilidade natural que células vivas possuem de regenerarem tecidos danificados [7] e, dessa forma, características e propriedades essenciais aos *scaffolds* são [4,34,35]:

(a) porosidade aberta (mínimo de 50%) altamente interconectada e poros com tamanhos entre pelo menos 100 e 300 μm (Figura 4) para favorecer o crescimento celular, a vascularização do tecido e o transporte de nutrientes. É desejável também certo grau de porosidade em escala nanométrica para facilitar adesão de células [4,34];

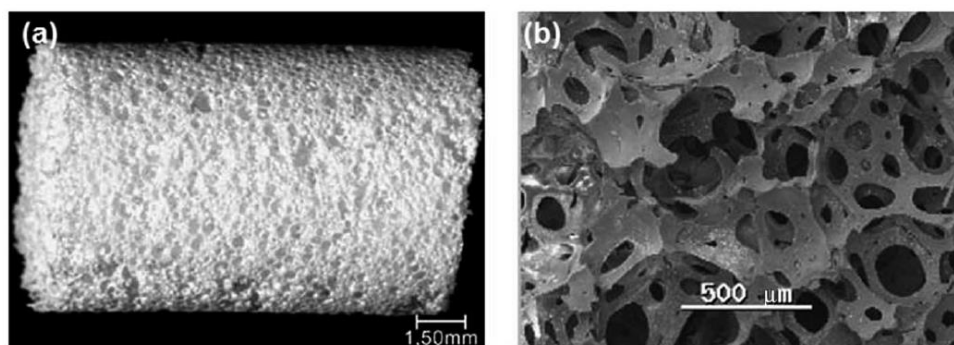


Figura 4 - Fotografia (a) e imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (b) de *scaffold* de espuma de VB produzida pelo método sol-gel. A porosidade total é de 88%, com poros entre 100 e 500 μm altamente interconectados. Fonte: [36].

(b) bioatividade, isto é, a habilidade de interagir ou se ligar ao tecido vivo;

(c) biocompatibilidade, de modo a garantir baixa resposta imunológica do organismo;

(d) taxa de biodegradação semelhante à taxa de formação do tecido, dado que essas matrizes não se destinam a ser implantes permanentes. A necessidade de *scaffolds* reabsorvíveis ou degradáveis também se deve ao contínuo processo de remodelação ao qual o osso é submetido; a ausência dessas características aumenta o tempo de regeneração e restauração do tecido [37].

- (e) química de superfície adequada para a adesão, diferenciação e proliferação celular;
- (f) propriedades mecânicas compatíveis com aquelas do tecido a ser regenerado e que sejam preservadas durante a degradação do componente;
- (g) simular a composição e função biológica da matriz extracelular, favorecendo a regeneração;
- (h) apresentar um equilíbrio entre porosidade, taxa de degradação e comportamento mecânico [17,37,38].

Os processos de diferenciação e proliferação das células nos *scaffolds* são potencializados com a adição de moléculas biológicas que atuam favorecendo a osteogênese. Fatores de crescimento como proteínas morfogenéticas ósseas, fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) são exemplos de moléculas utilizadas para otimizar a capacidade de regeneração óssea das matrizes [37]. Cerâmicas são comumente utilizados na produção de *scaffolds*. Materiais como a hidroxiapatita (HA), o tricálcio fosfato (TCP) e os vidros e vitrocerâmicas bioativos à base de sílica e fosfato são notórios por se ligarem fortemente a tecidos duros e macios como consequência de reações químicas com fluidos fisiológicos e por sua bioabsorção e biodegradação gradual no organismo. Apesar da excelente bioatividade e resistência mecânica superior à dos polímeros, sua utilização ainda é limitada por sua fragilidade e baixa tenacidade à fratura [3,33,37]. Dentre as diversas técnicas para a produção de *scaffolds*, o método *freeze-casting* se apresenta como um dos mais promissores para a fabricação de estruturas com poros interconectados por ser simples, relativamente barato e sustentável, e permitir elevado controle sobre a estrutura de poros [12,13].

3.2. VIDROS BIOATIVOS

3.2.1. Apresentação

VBs são materiais amplamente estudados no campo da ETO [29]. Sua bioatividade, osteoindução e osteocondução já são propriedades bem estabelecidas e VBs têm sido utilizados como próteses em cirurgias ortopédicas e maxilofaciais, como grânulos e particulados substituindo enxertos ósseos em tratamentos de osteomielite crônica e em aplicações dentárias. Desde o desenvolvimento do primeiro VB (*Bioglass®* ou 45S5) por Larry Hench e colaboradores em 1969, várias outras composições foram desenvolvidas com a intenção de obter produtos com processabilidade e bioatividade aprimoradas, mas o 45S5 continua sendo o VB de maior bioatividade conhecido [39].

Assim como outros vidros, VBs são compostos por óxidos formadores de rede (SiO_2 , P_2O_5) e podem conter modificadores de rede (Na_2O , K_2O , CaO) e também óxidos intermediários (ZnO , MgO , Al_2O_3). Sua estrutura tridimensional é constituída por tetraedros de óxidos formadores ligados covalentemente uns aos outros por átomos de oxigênio [8,40]. Os óxidos modificadores alteram a estrutura, quebrando algumas dessas ligações e aumentando o número de oxigênios não ligantes (Figura 5). O grau de polimerização da estrutura, também denominado conectividade de rede (CR), é representado pela razão entre o número de oxigênios ligantes e tetraedros de SiO_4 e varia entre 0 e 4 [41], influenciando características como tendência à cristalização, temperatura de transição vítrea (T_g) e bioatividade. O teor de sílica relativamente baixo (45 – 55%) dos VBs tradicionais faz com sua CR esteja entre 2,0 e 2,6, valores ideais para taxas de dissolução e bioatividade adequadas [8]. No caso de vidros obtidos por fusão, valores de CR maiores os tornam não bioativos; para vidros obtidos por processamento sol-gel, composições bioativas são possíveis mesmo para teores bem elevados de sílica [41].

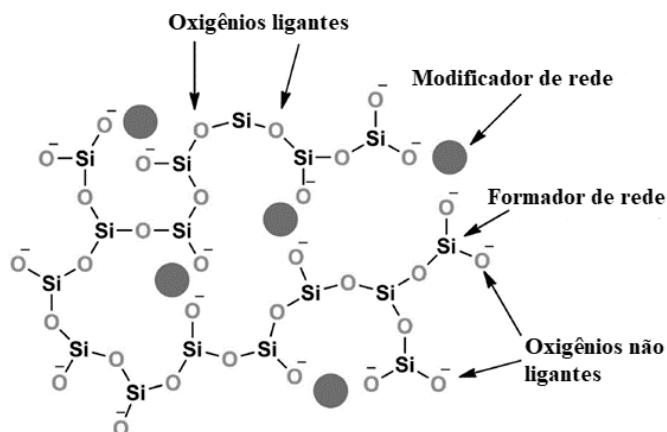
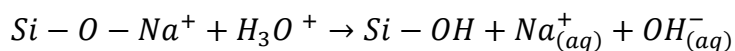


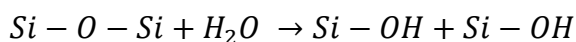
Figura 5 - Esquema bidimensional da estrutura de um vidro mostrando íons formadores e modificadores de rede. Adaptado de [8].

Ao serem implantados, os VBs reagem com o fluido fisiológico, dissolvendo-se gradualmente e liberando íons. Este processo leva à formação, em sua superfície, de uma camada biologicamente ativa de hidroxiapatita carbonatada (HAC) similar à fase mineral do osso, promovendo o desenvolvimento de uma interface que se liga química e fisicamente ao tecido [42]. Cinco etapas são propostas para esse mecanismo [40]:

- Rápida troca de íons Na^+ e/ou Ca^{2+} com íons H_3O^+ do fluido, formando grupos silanol (Si-OH) na superfície do vidro e elevando o pH do meio devido à liberação de íons. Se o vidro possuir fosfato em sua composição, íons PO_4^{3-} também são liberados. Esta etapa é representada pela reação a seguir:



- Ataque da rede de sílica devido ao aumento da concentração de íons OH^- no meio, causando a quebra das ligações Si-O-Si , a liberação de sílica solúvel na forma de Si(OH)_4 , e a continuação da formação de grupos silanóis na superfície do vidro através da seguinte reação:



- Condensação e polimerização dos grupos Si-OH , formando uma camada rica em sílica na superfície;

- d) Migração de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} para a superfície através da camada rica em sílica do fluido circundante, formando um filme amorfo composto por $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ sobre a camada polimerizada de grupos silanol;
- e) Cristalização do filme de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ pela incorporação de ânions OH^- e CO_3^{2-} do fluido, produzindo uma camada de hidroxiapatita carbonatada, na qual tanto os íons PO_4^{3-} quanto os íons OH^- da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) podem ser substituídos por íons CO_3^{2-} [43]. Essa camada garante forte ligação com o osso, uma vez que a hidroxiapatita é a fase mineral presente neste tecido [40].

A Figura 6 mostra o desenvolvimento da hidroxiapatita sobre a superfície de um VB após imersão em SBF (*Simulated Body Fluid*), solução que se assemelha ao plasma humano em relação à sua natureza e concentração de íons [44].

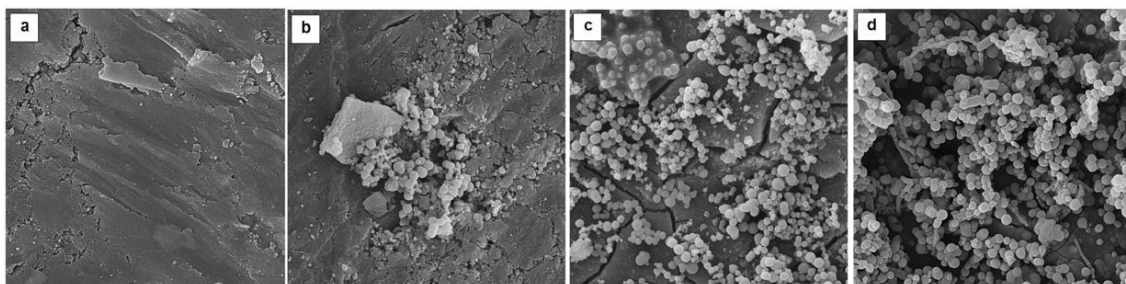


Figura 6 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície de uma amostra de VB antes (a) e após imersão em SBF por 1 (b), 3 (c) e 7 dias (d). Fonte: [45].

A estrutura interconectada de poros garante aos VBs excelente capacidade angiogênica e osteocondutora [6,8,19,46]. O fácil controle de sua composição química permite controlar também sua taxa de degradação de forma torná-la mais ajustada à taxa de crescimento e remodelação do osso [38]. Sua capacidade osteoindutora é resultado de seus produtos de dissolução, como cálcio e sílica, que estimulam a diferenciação dos osteoblastos, regulando a expressão de genes que controlam a osteogênese e a proliferação e adesão dos osteoblastos [33,39,42]. A liberação de íons solúveis e biologicamente ativos a taxas compatíveis com a proliferação e diferenciação celular é uma característica que os distingue de outras classes de biomateriais e os torna muito atrativos para a ETO [37].

Apesar da sua excelente bioatividade, fatores que ainda limitam a utilização de VBs, principalmente em locais submetidos a cargas elevadas, são sua fragilidade e baixa tenacidade à fratura. A tenacidade à fratura de vidros pertencentes ao sistema CaO-Al₂O₃-P₂O₅, por exemplo, costuma estar na faixa de 0,2 a 0,6 MPa·m^{1/2}. Estes valores se assemelham à tenacidade à fratura do osso trabecular (0,8 MPa·m^{1/2}), mas são muito inferiores àqueles correspondentes ao osso cortical (2 – 12 MPa·m^{1/2}) [47]. Além disso, VBs de silicato apresentam forte tendência a se cristalizarem durante sinterização, tratamento essencial para a consolidação das partículas e melhoria da estabilidade mecânica. A presença de fases cristalinas afeta negativamente a bioatividade do material, pois atrasa a formação da camada de HAC [10], podendo também levar à instabilidade do implante caso a cristalização seja parcial, uma vez que as regiões amorfas se degradam mais rapidamente [40]. A busca por soluções para o problema da cristalização envolve o desenvolvimento de vidros com diferentes composições, de modo a avaliar a influência da adição e substituição de óxidos sobre o comportamento dos materiais durante tratamento térmico [48].

3.2.2. Vidros bioativos produzidos por processamento sol-gel

Apresentando-se como alternativa ao método convencional de fusão e têmpera, o processo sol-gel vem sendo cada vez mais explorado para a produção de VBs. Trata-se de técnica de síntese química que envolve a formação, em temperaturas próximas à ambiente, de uma suspensão coloidal (sol) de precursores, como alcóxidos metálicos e sais (inorgânicos ou orgânicos), mediante reações de hidrólise e a subsequente policondensação dos produtos, formando uma rede interconectada e tridimensional (gel) com poros submicrométricos e cadeias micrométricas. Após secagem, o gel passa por um tratamento de sinterização que elimina produtos remanescentes das reações e promove o adensamento da estrutura amorfa [8,11,34]. Este método permite alto controle da composição e obtenção de vidros de maior pureza e homogeneidade que aqueles produzidos por fusão [49], além de possibilitar maior gama de composições com comportamento bioativo [8]. Algumas outras vantagens dos VBs obtidos por sol-gel são:

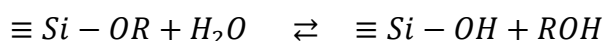
(a) baixas temperaturas de síntese, o que diminui as perdas por evaporação, o custo energético, a poluição atmosférica e evitam reações com o recipiente;

(b) nanoporosidade inerente – variando de microporos (< 2 nm) a mesoporos (entre 2 e 50 nm), sendo possível até mesmo a obtenção de macroporos (> 50 nm) – e, conseqüentemente, alta área superficial específica. Tais características, atribuídas às baixas temperaturas de processamento, proporcionam a eles bioatividade e taxa de dissolução mais elevadas, melhorando sua resposta celular;

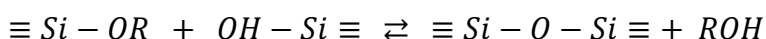
(c) possibilidade de se obter composições mais simples, pois não é necessário adicionar óxidos que melhorem a processabilidade do material;

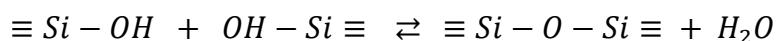
(d) diferentes morfologias, texturas e propriedades podem ser obtidas alterando-se a taxa de hidrólise, concentração e tipo de catalisador (ácido ou básico), pH da solução, tempos de condensação, envelhecimento e secagem, e temperatura de calcinação [8,34,50].

As reações envolvidas no processo sol-gel podem ser representadas utilizando-se como exemplo a síntese de um vidro de sílica. Os precursores mais comumente utilizados neste caso são alcóxidos de fórmula química $\text{Si}(\text{OR})_n$, no qual R é um grupo alquil, como a função etil (C_2H_5) no caso do tetraetilortosilicato (TEOS, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$). Tais precursores sofrem hidrólise geralmente na presença de um catalisador ácido, como HCl, HNO_3 ou CH_3COOH , com a substituição do grupo OR pelo íon hidroxila (reação a seguir) [51,52]:



Hidrólises catalisadas por ácidos levam a tempos de condensação mais longos que aquelas catalisadas por bases, causando maior contração volumétrica do gel e, conseqüentemente, produtos mais densos. A polimerização ocorre a partir de reações de condensação que envolvem grupos silanol ($\text{Si}-\text{OH}$), podendo haver formação tanto de água quanto de álcool como subprodutos através das seguintes reações:





Quando um número suficiente de ligações Si-O-Si é estabelecido, ocorre a formação das partículas coloidais que formam a chamada sol. A continuidade das reações de polimerização e a coalescência de partículas coloidais, processos que continuam a ocorrer nas etapas de condensação e envelhecimento, levam à formação de uma rede tridimensional (Figura 7) [51,53].

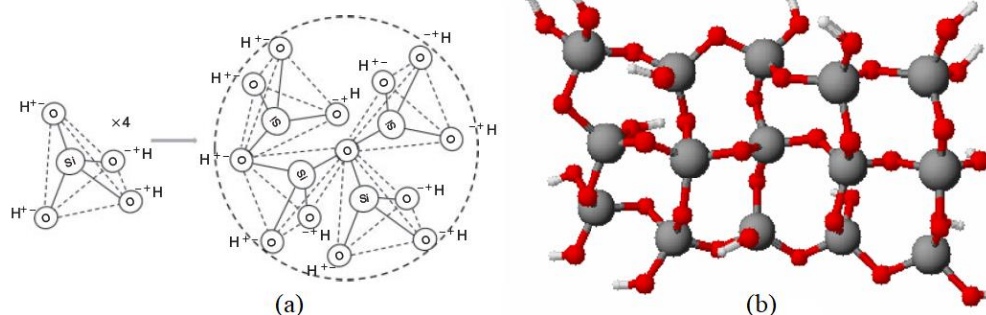


Figura 7 - Tetraedros de sílica produzidos a partir da hidrólise da molécula de TEOS formando uma partícula coloidal (a), e a rede tridimensional de sílica resultante da coalescência de várias dessas partículas (b). Adaptado de [51,53].

A taxa de hidrólise depende do pH e da razão molar água/alcóxido (R) utilizada. O valor estequiométrico de R é quatro, mas é possível usar menos água, pois esta é um dos produtos das reações de condensação [34,52]. Valores elevados de R (12 ou 15, por exemplo) são mais comuns [11,54,55], pois aumentam a possibilidade de que a hidrólise se complete antes que a condensação atinja estágios avançados [34,52].

Obter um produto homogêneo é o maior desafio no preparo de géis multicomponentes, pois as diferentes reatividades dos precursores levam a taxas de hidrólises distintas, podendo originar separação de fases. Para que isso seja evitado, pode-se realizar primeiro a hidrólise dos compostos menos reativos, utilizar agentes complexantes como acetilacetona, e usar precursores organometálicos menos reativos, como acetato de cálcio e trietilfosfato ao invés de $Ca(NO_3)_2$ e P_2O_5 , respectivamente [52]. A rota mais comum para produção de VBs envolve as etapas listadas a seguir [34,53], podendo

haver a moagem do material antes e/ou após o tratamento térmico para a produção de particulados.

a) Adição dos precursores e catalisador à água: a hidrólise dos precursores produz o sol, uma dispersão de partículas coloidais (1 a 100 nm). A condensação começa a ocorrer simultaneamente à hidrólise e de maneira concorrente durante a mistura;

b) Transferência da solução para moldes (etapa desnecessária caso o recipiente onde a mistura foi realizada for feito de material e formato adequado);

c) Condensação ou gelificação: uma rede tridimensional de ligações Si-O-Si é formada através do agrupamento e crescimento de unidades poliméricas (policondensação). É a transição do sol para o gel, na qual a viscosidade aumenta consideravelmente;

d) Envelhecimento: continuidade da policondensação simultaneamente à densificação e contração do material, redução da porosidade e aumento da resistência. Essa etapa é essencial para diminuir a possibilidade de ocorrência de fraturas durante a secagem. É realizada durante alguns dias, à temperatura ambiente ou a temperaturas na faixa de 50 a 60 °C com o gel imerso na solução aquosa dos subprodutos das reações;

e) Secagem: consiste na eliminação do líquido e dos subprodutos das reações de condensação presentes nos poros, originando uma rede interconectada de poros. Geralmente é feita em temperaturas por volta de 120 °C, entre 24 e 48 horas.

f) Estabilização química: primeira etapa do tratamento térmico na qual ocorre remoção de ligações de silanol (Si-OH) da estrutura de poros, o que estabiliza o sólido através da eliminação de grupos OH⁻ e formação de mais ligações Si-O-Si.

g) Sinterização: segunda etapa do tratamento térmico para consolidar e densificar o material, ocorrendo diminuição da porosidade e aumento de sua resistência mecânica. A Figura 8 ilustra as etapas do processo sol-gel.

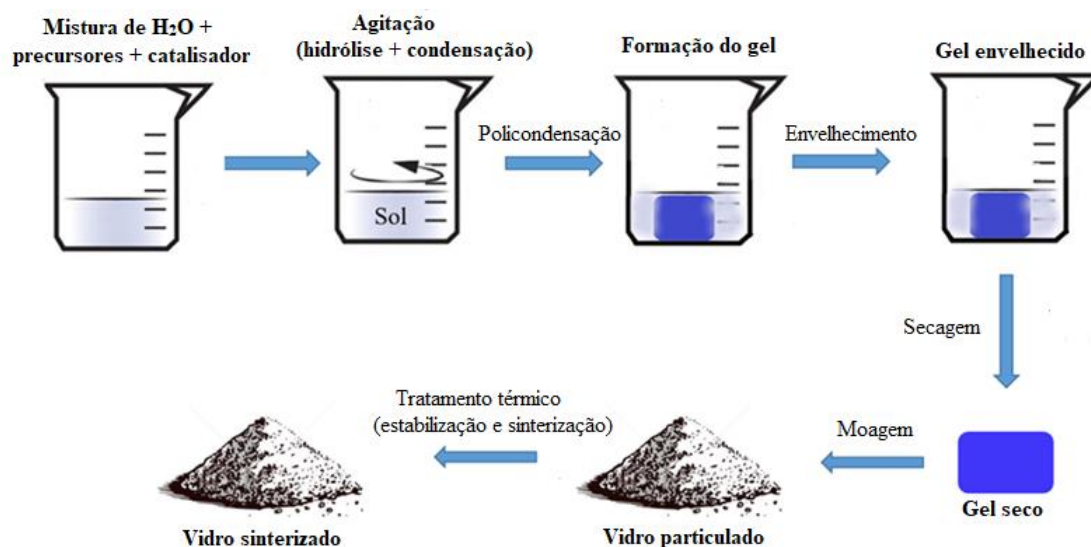


Figura 8 - Fluxograma com as etapas do processamento sol-gel. Adaptado de [41].

3.2.3. O vidro bioativo 13-93

Para evitar a cristalização durante tratamento térmico, a temperatura deve ser mantida entre sua temperatura de transição vítrea (T_g) e de início de cristalização (T_{ic}), intervalo denominado janela de processabilidade. A extensão desse intervalo depende da conectividade de rede (CR) da sílica e, portanto, da composição do vidro. A maioria dos VBs disponíveis comercialmente possuem $CR \sim 2$, o que torna sua janela de processabilidade estreita. Além disso, elevadas áreas superficiais específicas, apesar de atuarem como força motriz para a sinterização, também favorecem a cristalização, fenômeno que se inicia na superfície [40,56]. A tendência à cristalização pode ser reduzida aumentando-se o teor de SiO_2 , o que diminui a propensão à separação de fases [57], mas isso aumenta a CR e reduz a bioatividade e a taxa de degradação do vidro. Outra alternativa é a adição de óxidos modificadores de rede, que expandem o intervalo entre T_g e T_{ic} , aumentando a energia de ativação para a cristalização [40].

Com composição baseada no 45S5, o VB 13-93 possui maior teor de SiO_2 e a presença de K_2O e MgO como modificadores de rede adicionais, fatores que lhe conferem maior CR [40,58] e janela de processabilidade mais extensa, respectivamente. O maior intervalo entre T_g e T_{ic} possibilita a sinterização por fluxo viscoso, fenômeno que

consiste em uma diminuição considerável da viscosidade do material e uma consequente fusão parcial, que facilita o transporte de matéria para as regiões entre as partículas [59,60] e garante uma densificação mais eficiente, frequentemente preservando a estrutura amorfa [11,61]. Sua CR mais elevada (2,6) o torna menos bioativo que o *Bioglass*® (CR = 2,12), podendo ser necessários até sete dias para a formação da camada de HAC sobre sua superfície, enquanto para partículas de tamanho similar do VB 45S5, esse processo leva cerca de oito horas [40]. Fu *et al.* [62], por exemplo, produziram *scaffolds* do VB 13-93 e realizaram testes de bioatividade *in vitro*. Após 7 dias de imersão em SBF, imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e padrões de difração de raios X (DRX) comprovaram o desenvolvimento de uma fina camada superficial de HA. Já é estabelecido que o VB 13-93 forma fortes ligações com tecidos duros quando implantado [63] e é aprovado para uso *in vivo* tanto nos Estados Unidos [64] quanto na Europa [55], comercializado pela *Mo-Sci Corporation* (não foi encontrado nome comercial para o produto).

Análises conduzidas por análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) mostram que os valores de T_g , T_{ic} e T_c (temperatura de cristalização) do VB 13-93 variam em função da taxa de aquecimento empregada e do tamanho de partícula (e, conseqüentemente, da área superficial específica) da amostra. Groh *et al.* [65] analisaram, utilizando DTA, as propriedades térmicas de duas amostras deste vidro obtidas por fusão: a primeira consistia de partículas com tamanhos variando entre 160 e 250 μm , para a qual a curva obtida não apresentou nenhum pico exotérmico correspondente à cristalização e o valor de T_g medido foi 587 °C; no caso da segunda amostra, composta por partículas menores que 160 μm , verificou-se a ocorrência de cristalização e obteve-se os valores de 592, 932 e 977 °C para T_g , T_{ic} e T_c , respectivamente. Nawaz *et al.* [11] produziram este VB por processamento sol-gel, obtendo valores de T_g e T_{ic} consideravelmente menores que aquelas dos vidros preparados por fusão, como mostrado na Tabela 1, que compila propriedades térmicas do VB 13-93 obtidas em alguns estudos.

Tabela 1 - Propriedades térmicas do VB 13-93 obtidos em vários estudos

Técnica de análise	Taxa de aquecimento	Tamanho de partícula (μm)	T _g (°C)	T _{ic} (°C)	T _c (°C)	Autores
<i>DTA</i>	10 °C/min	160 a 250	587	–	–	Groh <i>et al.</i> [65]
<i>DTA</i>	10 °C/min	< 160	592	932	977	
<i>DTA</i>	20 °C/min	300 a 500	612	~ 800	1038	Fagerlund <i>et al.</i> [66]
<i>DTA</i>	10 °C/min	< 32	586	914	–	Blaeß <i>et al.</i> [58]
<i>DTA</i>	20 °C/min	–	–	853	–	Arstila <i>et al.</i> [67]
<i>HTM</i> *	20 °C/min	–	–	855	–	
<i>DSC</i>	10 °C/min	< 1,5	550	746	–	Nawaz <i>et al.</i> [11]**

* *High-temperature optical microscopy*

** Única amostra produzida por processamento sol-gel dentre as que constam na tabela

Coon *et al.* [63] estudaram a cristalização do VB 13-93 obtido por fusão por meio do tratamento térmico de discos deste vidro. Amostras tratadas a 650, 700, 800, 900 e 1000 °C por 1 h foram analisadas por DRX e mostraram que o VB permaneceu amorfo até pelo menos 800 °C. Picos de difração foram verificados a partir de 900 °C, sendo que a única fase cristalina detectada foi a wollastonita (CaSiO₃). Fagerlund *et al.* [66] sinterizaram amostras monolíticas deste vidro e relatam que os primeiros cristais foram detectados após tratamento de 1 h a 800 °C, identificando apenas a fase wollastonita. Esta também foi a única fase cristalina encontrada por Blaeß *et al.* [58] após sinterização de compactos cilíndricos a 810 °C por 1 h. Fu *et al.* [62] prepararam *scaffolds* do VB 13-93 pela técnica de replicação polimérica a partir de partículas com tamanho médio de 2 μm . Os *scaffolds* permaneceram amorfos após sinterização a 700 °C por 1 h. Em todos esses estudos citados neste parágrafo, foi utilizado VB 13-93 obtido por fusão.

Apesar das características de processabilidade superiores do VB 13-93, sua síntese através do método sol-gel não é muito explorada. Durante a elaboração desta revisão bibliográfica, foram encontrados apenas três artigos [11,55,68] que relatam a utilização

desta técnica para a produção deste vidro. Os resultados de dois deles são resumidos a seguir. Deliormanli e Yildirim [55] obtiveram um produto parcialmente cristalino e reportam que após tratamento térmico de partículas do vidro a 610 °C ainda havia nitratos remanescentes na estrutura. Sua remoção foi verificada após tratamento a 625 °C por 4 h, temperatura que também foi baixa o suficiente para evitar a cristalização. Em análise por FTIR, foram detectadas bandas na região 950 – 1050 cm⁻¹, atribuídas ao modo de vibração de alongamento da ligação Si–O–Si, e bandas na região 850 – 950 cm⁻¹, correspondentes à vibração de grupos Si–O–2NBO e, segundo os autores, associadas à presença dos íons Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ na rede vítrea. A bioatividade do material sintetizado foi testada *in vitro* imergindo-se 1 g do vidro em 100, 500 e 1000 mL de SBF. Análises foram realizadas após 30 e 60 dias para verificação da formação da camada de HA. Em 30 dias de imersão, observou-se, nas amostras imersas em 500 e 1000 mL, precipitados de fosfato de cálcio com formato de agulha cobrindo a superfície do vidro. Para a solução de 100 mL, uma quantidade significativa de tais precipitados formou-se apenas após 60 dias, com agregados cobrindo parcialmente a superfície do VB. Análises por FTIR das amostras imersas por 30 dias em 100 e 1000 mL de SBF mostraram bandas de absorção correspondentes ao modo de vibração de estiramento de ligações Si–O em aproximadamente 1040 cm⁻¹, e também bandas características da ligação P–O em 560 cm⁻¹ e por volta de 600 cm⁻¹, tomadas como indicação da formação da HA.

O produto sintetizado por Nawaz *et al.* [11] apresentava fases cristalinas, que foram decompostas e substituídas por outras durante os tratamentos térmicos posteriores. Picos exotérmicos observados a 633 e 703 °C em análises de DSC foram atribuídos ao início do fenômeno de sinterização baseado no fato de que, após tratamento a 600 °C, o grau de cristalinidade do material ainda era inferior a 10%, e também por não haver associação desses picos a eventos de cristalização na literatura existente sobre VBs obtidos por fusão. Tratamentos térmicos foram realizados a 600, 650, 700 e 750 °C por 4 h. Para as duas temperaturas mais baixas, verificou-se, majoritariamente, a decomposição de nitratos e fases cristalinas já presentes no vidro antes de qualquer aquecimento. No entanto, houve também o desenvolvimento de fases cristalinas em pequena quantidade, de modo que, a 650 °C, o grau de cristalinidade do vidro era em

torno de 5%, com presença de pequenas quantidades de β -tricálcio fosfato (β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e trimagnésio fosfato ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$). A 700 e 750 °C foi verificada a decomposição de mais algumas fases e o aparecimento de outras em quantidade mais significativa (combeíta ($\text{Na}_2\text{O}\cdot 2\text{CaO}\cdot 3\text{SiO}_2$), CPS ($\text{Ca}_{15}(\text{PO}_4)_2(\text{SiO}_4)_6$) e também traços de cristobalita (SiO_2) e arkemanita ($\text{Ca}_2\text{Mg}(\text{Si}_2\text{O}_7)$), levando o grau de cristalinidade para 90 e 57% respectivamente.

Quanto à produção de *scaffolds* com o VB 13-93, os únicos trabalhos encontrados envolviam vidros obtidos por fusão. Liu *et al.* [61], através do processo *freeze-casting* utilizando canfeno como meio dispersante, prepararam estruturas cilíndricas (7 mm de diâmetro x 7 mm de altura) solidificadas de modos distintos e sinterizadas a 700 °C por 1 hora. Para amostras resfriadas à taxa constante de 7 °C·min⁻¹, os valores obtidos para resistência à compressão e módulo de elasticidade foram 47 ± 5 MPa e 11 ± 3 GPa, respectivamente. No caso de amostras resfriadas em substrato à temperatura constante de 3 °C, essas grandezas apresentaram, nessa mesma ordem, os valores de 35 ± 11 MPa e 8 ± 3 GPa. A porosidade total das amostras (~ 50%) e a distribuição de tamanhos dos poros não variaram em função do tipo de resfriamento: todos os *scaffolds* apresentaram porosidade total em torno de 50%, com tamanho de poros variando entre 50 e 150 µm e tamanho médio de cerca de 100 µm. No entanto, os autores verificaram que taxas de resfriamento mais elevadas resultam em poros mais alinhados e conseqüentemente, melhores propriedades mecânicas, de modo que chegou-se à conclusão de que as amostras resfriadas à taxa de 7 °C·min⁻¹ apresentam uma combinação favorável de resistência, rigidez e características de poros para aplicação potencial no reparo de ossos que suportam carga. Fu *et al.* [64], utilizando dois tipos de solventes, também prepararam *scaffolds* através da técnica *freeze-casting*. Amostras produzidas em água apresentaram poros lamelares cujos tamanhos ficaram em torno de 20 a 30 µm e resistência à compressão que variou entre 5 MPa (para estruturas com 75% de porosidade) e cerca de 20 MPa (para porosidade de 40%). No caso de amostras produzidas em mistura de água e dioxano, a estrutura de poros obtida foi colunar e os tamanhos de poros variaram entre 90 e 110 µm. A resistência à compressão destas estruturas aumentou de 10 MPa para 50 MPa, para valores de porosidade iguais a 70 e 35% respectivamente. Os autores concluíram que as amostras com estrutura colunar

apresentaram potencial para serem aplicadas no reparo de ossos que suportam carga. Em outro estudo destes mesmos autores [62], a técnica de replicação polimérica foi utilizada para produzir *scaffolds* em forma de discos com 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Os autores realizaram um ensaio de compressão com 8 amostras (porosidade de $85 \pm 2\%$) e tomaram o maior valor de tensão na curva tensão \times deformação como a resistência à compressão. O valor médio obtido para esta grandeza foi igual a 11 ± 1 MPa, que está na faixa do que é reportado para o osso trabecular humano.

Os dados apresentados nos parágrafos anteriores deixam evidente o potencial de aplicação do VB 13-93 e de *scaffolds* desse material em ETO. No entanto, essa composição ainda é muito pouco explorada em sínteses sol-gel e em processos *freeze-casting*. Portanto, mais estudos são necessários para melhor compreensão tanto da influência que o processamento sol-gel exerce sobre as propriedades deste vidro quanto das performances mecânica e biológica de *scaffolds* deste material fabricados por *freeze-casting*.

3.3. PROCESSO FREEZE-CASTING

3.3.1. Fundamentos

Para estimular e suportar o crescimento de novo tecido, os *scaffolds* devem apresentar estrutura com poros suficientemente grandes, com diâmetros típicos variando entre 100 e 300 μm [4,38], e interconectividade de poros elevada de modo a favorecer a adesão, migração e proliferação de células [69,70]. Além de ser simples e relativamente barato, o método *freeze-casting* apresenta-se como uma estratégia viável para a obtenção de matrizes com estrutura de poros adequada por permitir excelente controle sobre a morfologia, orientação, tamanho, fração volumétrica e interconectividade dos poros através da alteração de parâmetros de processo, tais como tipo de solvente, concentração da suspensão, temperatura de solidificação, taxa de resfriamento, adição e tipos de aditivos e distribuição de tamanhos das partículas coloidais [13,71].

O processo se inicia com o preparo de uma suspensão coloidal na qual as partículas do material são misturadas a um líquido juntamente com dispersantes e ligantes. A dispersão das partículas é importante para evitar a ocorrência de segregação, o que levaria a gradientes de densidade e porosidade na estrutura obtida. Os ligantes proporcionam integridade e resistência aos corpos verdes (estruturas recém-fabricadas que ainda não foram submetidas ao processo de sinterização), evitando sua desintegração durante ou após a sublimação do solvente e garantindo manuseio seguro. A suspensão é então resfriada [72], geralmente de maneira unidirecional, em molde com laterais isolantes e base condutora, para obtenção de uma estrutura verticalmente alinhada e alongada [13]. Temperaturas negativas são necessárias caso água seja utilizada, enquanto alguns solventes orgânicos permitem a ocorrência do processo à temperatura ambiente. Conforme os cristais do solvente se formam, as partículas em suspensão são rejeitadas, ficando presas e concentradas entre os canais formados pelo sólido. O controle da solidificação é de grande importância, pois é nesta etapa que a estrutura de poros é desenvolvida. Em seguida o sistema é submetido à etapa de liofilização, na qual a redução da pressão a valores extremamente baixos provoca a sublimação do solvente. A porosidade é criada no local dos cristais e o corpo verde é obtido a partir das partículas de soluto acumuladas. Ao fim da sublimação, o corpo verde é sinterizado para que se densifique e adquira resistência mecânica [72]. As etapas do processo estão ilustradas na Figura 9.

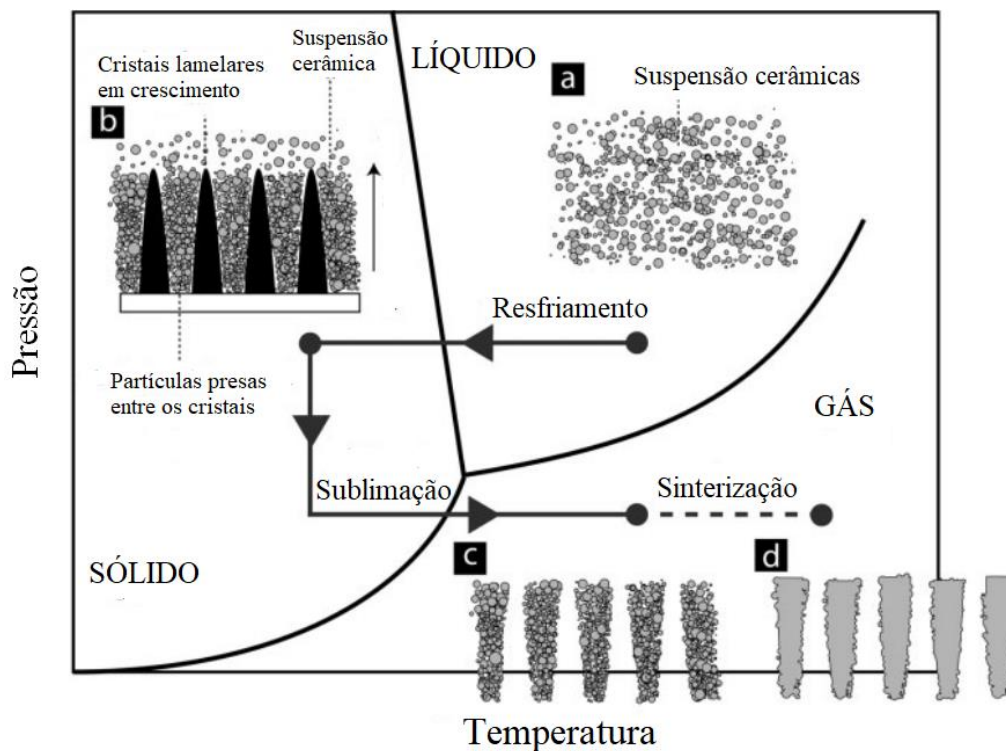


Figura 9 - Etapas do processo *freeze-casting*. Fonte: [72].

3.3.2. Influência de alguns parâmetros de processo

- **Solvente**

As características do solvente (viscosidade, tensão superficial, pressão de vapor no estado sólido e a mudança de volume durante a passagem para o estado sólido) influenciam as condições de solidificação e as características da estrutura de poros final, uma vez que a porosidade é uma réplica dos cristais solidificados. Solventes comumente utilizados são a água, canfeno, álcool terc-butílico e a mistura de naftaleno e cânfora [72]. A Figura 10 mostra estruturas de poros obtidas com cada um desses solventes.

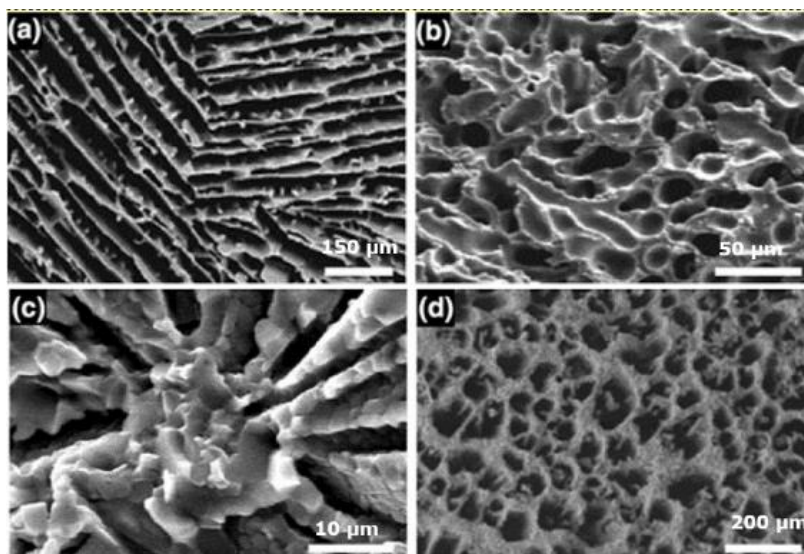


Figura 10 - Efeitos de diferentes solventes sobre a estrutura de poros de *scaffolds*: (a) hidroxiapatita em água, (b) alumina em canfeno, (c) alumina em naftaleno/cânfora e (d) titanato zirconato de chumbo em álcool tercbutílico. Fonte: [73].

O canfeno origina uma estrutura de poros dendrítica. A utilização de álcool tercbutílico, por sua vez, resulta em poros prismáticos e, para a mistura de naftaleno e cânfora, a morfologia dos poros varia em função da proporção dos dois líquidos que é utilizada [74,75]. Quando o solvente é água, a estrutura de poros é lamelar [13,72,73], resultado das características de crescimento dos cristais de gelo (Figura 11) que, ao longo da direção *a*, é entre cem e mil vezes mais rápido que ao longo da direção *c* [72]. Até onde se sabe, não existem estudos que relacionam um tipo específico de estrutura de poros a melhores propriedades para aplicação dos *scaffolds* em ETO, mas propriedades mecânicas distintas são obtidas com solventes diferentes [64,76]. Além disso, os estudos envolvendo a técnica *freeze-casting* para o preparo de *scaffolds* [61,76–78] apresentam uma variabilidade muito grande no que diz respeito aos parâmetros de processo (tipo de solvente, tipo e quantidade de aditivos, carga de sólidos, taxa de resfriamento etc.), de modo que comparações diretas não são adequadas para se decidir que solvente utilizar.

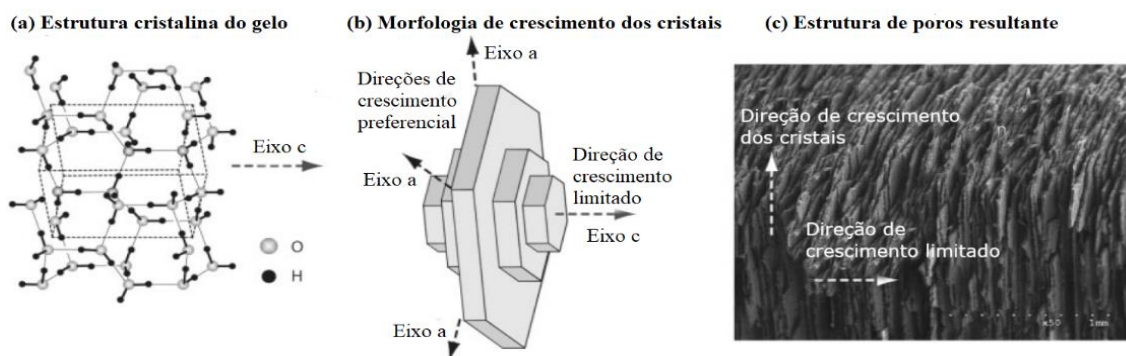


Figura 11 - Estrutura cristalina do gelo (a) e anisotropia de crescimento dos cristais (b), que dão origem a material e estrutura de poros lamelares (c). Adaptado de [79].

- **Condições de solidificação**

O crescimento dos cristais se dá ao longo do gradiente de temperatura e, com controle adequado, canais de poros são originados na amostra inteira. A taxa de nucleação também é importante: se a suspensão é posicionada sobre suporte mantido a uma temperatura negativa e constante, a solidificação inicial é instável e a orientação dos canais lamelares paralelos é aleatória; por outro lado, o resfriamento do suporte a uma taxa constante a partir da temperatura ambiente faz com que a nucleação ocorra de maneira relativamente homogênea, e uma estrutura de poros mais orientada e contínua é formada [72].

A cinética de solidificação também influencia a porosidade. Quanto maior a taxa de resfriamento, maior o gradiente de concentração e mais rapidamente a frente de solidificação avança, originando poros mais finos e desordenados. Como consequência, o material obtido apresenta resistência mais elevada. No caso da água, quanto mais rápido o crescimento dos cristais na direção do gradiente de temperatura, mais limitado torna-se o crescimento ao longo do eixo *c* (ver Figura 11) e mais finas são as lamelas. Quando as taxas de resfriamento são baixas, a difusão das partículas na interface é mais eficiente e cristais maiores são gerados. Ou seja, resfriamentos mais lentos são necessários para se obter poros de algumas centenas de micrômetros [12,79]. A Figura 12 evidencia o efeito da velocidade de resfriamento sobre a estrutura de poros. Considerando a aplicação dos *scaffolds*, é necessário um equilíbrio entre porosidade e

propriedades mecânicas [12], de modo que, com uma taxa de resfriamento muito elevada, é menos provável de se obter poros grandes o suficiente para o crescimento adequado do tecido dentro da estrutura e taxas muito lentas podem gerar poros tão grandes, que os componentes produzidos acabam apresentando fragilidade muito elevada [4,38].

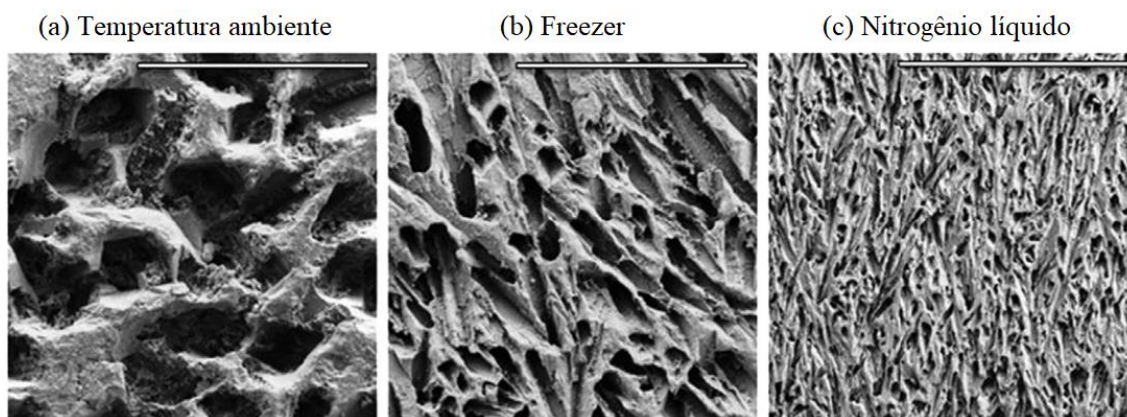


Figura 12 - Imagens por microscopia eletrônica de varredura de *scaffolds* de alumina produzidos por *freeze-casting* em naftaleno/cânfora. Os materiais foram resfriados à temperatura ambiente (a), em um freezer (b) e em nitrogênio líquido (c). Fonte: [80].

- **Formulação da suspensão**

A porosidade da estrutura está fortemente relacionada à carga de sólidos na suspensão (Figura 13). Cargas menores geram volume e tamanho de poros maiores, mas originam *scaffolds* mais frágeis e menos resistentes. Para porosidades abaixo de 40%, a estrutura deixa de ser interconectada, de modo que um equilíbrio razoável entre porosidade e resistência mecânica é obtido em *scaffolds* com volume de poros entre 40 e 60% [12].

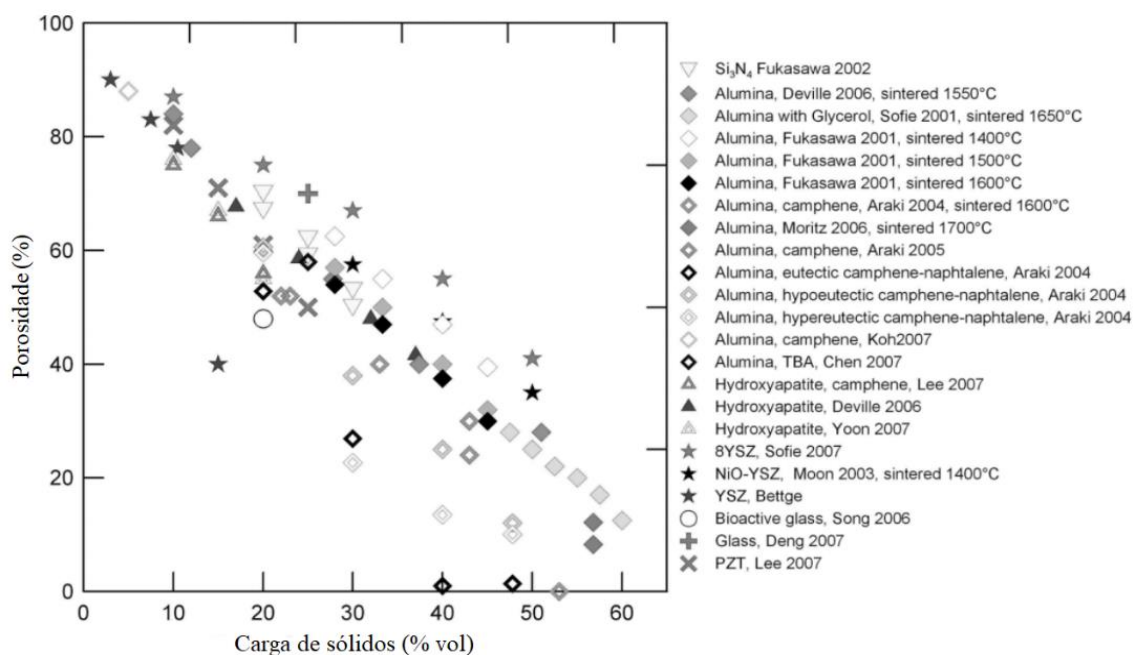


Figura 13 – Porosidade em função da carga de sólidos na suspensão para diversos materiais cerâmicos produzidos por *freeze-casting*. Fonte [72].

A distribuição de tamanho das partículas também exerce influência sobre a porosidade (Figura 14): quanto mais finas aquelas, mais homogênea e densa será a estrutura, pois partículas grandes se empacotam de maneira menos eficiente, tornando mais difícil que a morfologia dos cristais do solvente seja replicada [72].

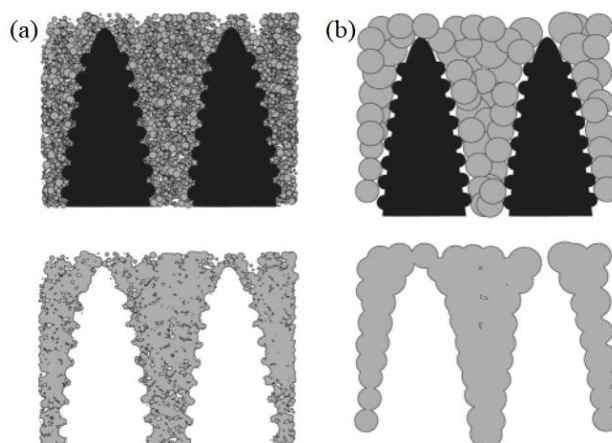


Figura 14 - Influência do tamanho de partícula sobre a morfologia dos poros. Partículas finas (a) replicam detalhes do cristal do solvente, o que não ocorre no caso de partículas grosseiras (b). Fonte [72].

A estabilidade das suspensões é obtida com aditivos que evitam a aglomeração e garantem a homogeneidade do material [72]. Texaphor® e ácido cítrico são exemplos, respectivamente, de tensoativo e anticoagulante que estabilizam a suspensão [81]. Além disso, aditivos também podem alterar a cinética de solidificação, modificando a forma dos cristais do solvente e, conseqüentemente, a morfologia dos poros. Gelatina, glicerol, cloreto de sódio e sistemas binários água/álcool são comumente empregados para esse fim [12,13]. Zuo *et al.* [80] constataram que o uso de PVA na produção de hidroxiapatita por *freeze-casting* aumentou a porosidade aberta e a conectividade dos poros em relação ao processo sem o aditivo, e que a presença do polímero e o aumento de sua concentração originaram poros menores. Lebreton *et al.* [82] compararam o uso de glicerol e PVA na produção de alumina por *freeze-casting*, verificando que o segundo gerou poros maiores. Além disso, a adição de 2 a 4% (em massa) de PVA foi suficiente para produzir *scaffolds* que resistissem ao manuseio, enquanto o teor de glicerol precisou ser de 10% (em massa) para a obtenção de estruturas resistentes.

São vários os parâmetros de processo que influenciam o *freeze-casting*. Considerando esse fator e o pequeno número de estudos que envolvem a utilização dessa técnica para a produção de *scaffolds* do VB 13-93, principalmente utilizando-se água como meio dispersante, é evidente a necessidade de uma melhor verificação e compreensão acerca das propriedades das estruturas produzidas com vidros de composições complexas através desse processo em meio aquoso. Dentre os poucos estudos envolvendo a fabricação de estruturas desse vidro por meio desta técnica, apenas um [64], já detalhado na seção 3.2.3, reporta a utilização de água como meio dispersante. Mais estudos se fazem necessários utilizando-se parâmetros diferentes para a verificação de como as propriedades dos *scaffolds* são afetadas, principalmente em termos de tamanhos de poros e propriedades mecânicas. Quanto à utilização de aditivos, resolveu-se que a literatura seria seguida como referência com o objetivo de se obter uma suspensão estável e corpos verdes resistentes o suficiente para serem manuseados, considerando também que quantidades muito elevadas desses compostos, apesar de melhorarem as propriedades mecânicas, contribuem para a obtenção de poros muito pequenos.

CAPÍTULO 4. METODOLOGIA

4.1. SÍNTESE DO VIDRO BIOATIVO 13-93

A síntese do VB 13-93 foi realizada por meio do método sol-gel. Sua composição molar é dada por 54,6 %SiO₂ – 22,1 %CaO – 6 %Na₂O – 1,7 %P₂O₅ – 7,7 %MgO – 7,9 %K₂O. Os precursores desses óxidos foram: tetraetilortosilicato (TEOS / Aldrich / 98%), o nitrato de cálcio tetra hidratado (Ca(NO₃)₂·4H₂O / Sigma-Aldrich / 99%), o nitrato de sódio (NaNO₃ / Sigma-Aldrich / 99%), o trietilfosfato (TEP / Aldrich / 99,8%), o nitrato de magnésio hexa hidratado (Mg(NO₃)₂·6H₂O / Anidrol / PA) e o nitrato de potássio (KNO₃ / Sigma-Aldrich / 99%). Utilizou-se ainda água deionizada MilliQ[®] como solvente para as reações de hidrólise e ácido nítrico (HNO₃ / Anidrol / 65%) como catalisador.

O procedimento de síntese foi similar àquele descrito por Deliormanh e Yildirim [55]. À temperatura ambiente foi inicialmente preparada solução aquosa de HNO₃ (0,3 M). Em seguida, TEOS foi adicionado lentamente e o sistema foi mantido sob agitação à temperatura ambiente até homogeneização (cerca de 30 min). A relação molar H₂O: TEOS foi mantida em 15: 1. Após esse intervalo foram adicionados, nesta sequência, TEP, NaNO₃, Ca(NO₃)₂·4H₂O, KNO₃ e Mg(NO₃)₂·6H₂O. Cada precursor foi adicionado cerca de 30 min após o anterior, quando a solução já tinha se tornado homogênea. A relação molar TEOS: TEP: NaNO₃: Ca(NO₃)₂·4H₂O: Mg(NO₃)₂·6H₂O: KNO₃ foi fixada em 1: 0,06: 0,22: 0,40: 0,14: 0,29. No momento da adição do KNO₃, o sistema foi aquecido a 60 °C, pois, em tentativas anteriores da síntese, verificou-se que o sal KNO₃ não estava sendo dissolvido completamente à temperatura ambiente. Não foram encontrados outros trabalhos que mencionassem tal procedimento, mas o aquecimento foi a única alternativa encontrada para tentar aumentar o limite de solubilidade do sal em questão. Ainda a 60 °C, a solução final foi agitada por 2 h em recipiente fechado para garantir sua homogeneização e, então, armazenada à temperatura ambiente por 3 dias para permitir a formação do gel. Após esse intervalo, o recipiente foi aberto parcialmente e o gel foi acondicionado em estufa para envelhecimento a 60 °C por 48 h e secagem ao ar a 120 °C por 24 h. A amostra seca foi macerada em almofariz de ágata

e parte dela foi utilizada para caracterizações e outra parte tratada termicamente por 4 h a 625 °C utilizando taxa de aquecimento de 3 °C/min. Essa temperatura foi escolhida com base nos trabalhos de Deliormanli e Yildirim [55,83], que verificaram que 625 °C foi suficiente para eliminar nitratos e conservar a natureza amorfa do vidro. Após o tratamento térmico, o material foi macerado em moinho de bolas por 12 h para quebra de aglomerados e homogeneização do seu tamanho de partícula. O processo de síntese do VB está representado na Figura 15.

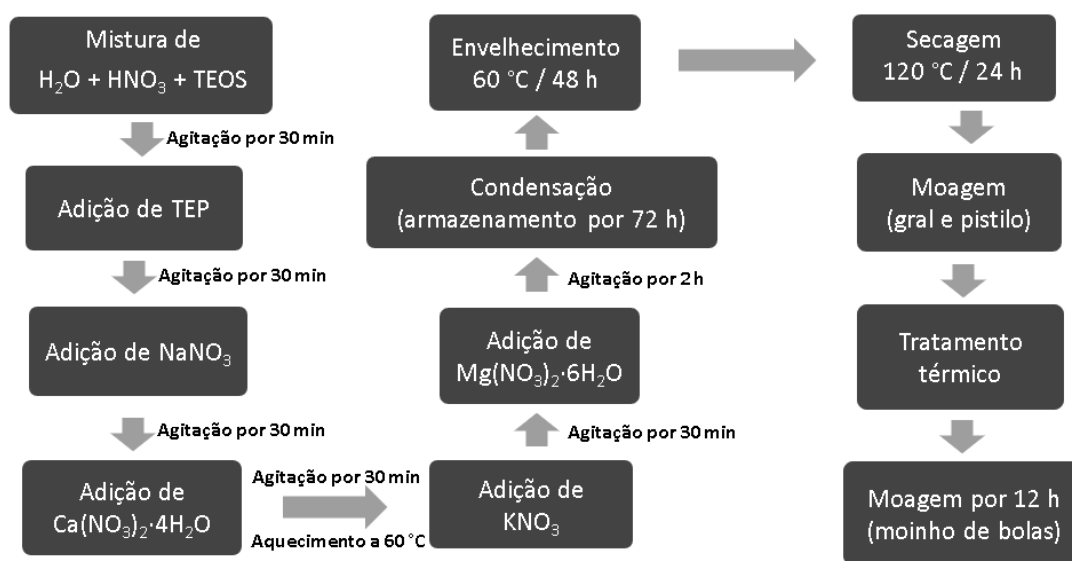


Figura 15 - Fluxograma do processo de síntese sol-gel do VB 13-93.

4.2. PREPARO DOS SCAFFOLDS: PROCESSO FREEZE-CASTING

Os *scaffolds* foram produzidos pelo processo *freeze-casting*, utilizando-se água como solvente. Esta escolha deve-se ao fato de este líquido tornar o processo ambientalmente sustentável, apresentar baixo custo, à versatilidade que seu uso proporciona em relação à grande variedade de ligantes e dispersantes hidrofílicos que podem ser escolhidos. Além disso, considerou-se que, durante a revisão bibliográfica, foi encontrado apenas um estudo utilizando o VB 13-93 no preparo de *scaffolds* do VB 13-93 por freeze casting, o que proporciona certo grau de originalidade à pesquisa. As amostras produzidas foram separadas em grupos caracterizados pelos diferentes tempos de sinterização: 2, 4 ou 8 h.

Após a moagem, visando maior eficiência no processo *freeze-casting* e maior estabilidade da suspensão preparada com o vidro, decidiu-se pelo peneiramento das partículas de VB para a obtenção de uma distribuição de tamanhos mais fina do que aquela proporcionada apenas pela moagem. Utilizou-se peneira com malha de 38 μm (400 Mesh), pois foi aquela com malha mais fina disponível no laboratório. Apenas o material passante nesta peneira foi utilizado para a produção dos *scaffolds*, na tentativa de se obter uma suspensão estável e eficiência no processo *freeze-casting*. Além disso, seguindo como referência a literatura disponível sobre a utilização do VB 13-93 na fabricação de *scaffolds* por *freeze-casting* [64,76] e objetivando-se a obtenção de estruturas que apresentassem um equilíbrio entre porosidade e resistência mecânica [12], a carga de partículas de VB foi fixada em 20 % vol. Ácido cítrico (Synth, pureza $\geq 99,5\%$) e PVA ($M_w = 9.000 - 10.000$, 80% hidrolisado, Sigma Aldrich) foram utilizados como dispersante e ligante, respectivamente. Para o preparo da suspensão, primeiramente, o PVA (2% em peso da massa de VB) e o ácido cítrico (1% em peso da massa de VB) foram adicionados a um recipiente com água à temperatura ambiente e a solução foi agitada durante 30 min. As frações desses compostos foram decididas com base em valores geralmente encontrados na literatura para ligantes e dispersantes [64,82]. As partículas de VB foram acrescentadas ao sistema e a suspensão foi mantida sob agitação por 3 h.

As suspensões foram vertidas em moldes cilíndricos (10 mm de diâmetro e 30 mm de altura) de politetrafluoretileno (PTFE) e submetidas ao processo *freeze-casting*. Para o congelamento, uma das extremidades dos moldes foi posicionada sobre placa de cobre (*cold finger*) que, por sua vez, estava em contato com nitrogênio líquido. As laterais dos moldes não estavam em contato direto com o nitrogênio e, portanto, foi possível garantir que a solidificação ocorresse unidirecionalmente, criando uma estrutura de poros orientada verticalmente. Estudos envolvendo o preparo por meio do processo *freeze-casting* em água de *scaffolds* de VBs e biocerâmicas a taxas de resfriamento bem elevadas [64,70,77,82], inclusive com utilização de nitrogênio líquido em alguns casos, relatam a obtenção de poros com diâmetro de apenas algumas dezenas de micrômetros, valores insuficientes para estruturas destinadas à ETO. A utilização de um congelador permitiria que poros maiores fossem obtidos devido à menor taxas de resfriamento [84].

Entretanto, testes preliminares realizados mostraram que as partículas de vidro em suspensão decantavam antes que a solidificação ocorresse, levando à decisão de se usar nitrogênio líquido para acelerar a etapa de congelamento.

Para a etapa de liofilização (*freeze-drying*), foi utilizado liofilizador Liotop L101. À temperatura ambiente, os corpos verdes foram submetidos à condição de pressão reduzida ($\sim 200 \mu\text{mHg}$) para a sublimação do solvente. Os corpos verdes passaram, então, por um tratamento térmico que envolveu duas etapas: um patamar a $300 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 h para eliminação dos aditivos orgânicos, e sinterização a $650 \text{ }^\circ\text{C}$ para consolidação e densificação da estrutura. A escolha desta temperatura foi baseada nas temperaturas de fusão (T_f), transição vítrea (T_g), e de início (T_{ic}) e pico (T_c) da cristalização do VB sintetizado, obtidas por análises térmicas. De modo a verificar a influência da sinterização sobre as propriedades dos *scaffolds*, amostras foram sinterizadas por 2, 4 ou 8 h e as estruturas obtidas foram caracterizadas quanto às suas propriedades mecânicas e físicas. O fluxograma exibido na Figura 16 ilustra o processo *freeze-casting* utilizado, seguido das etapas de liofilização e sinterização.

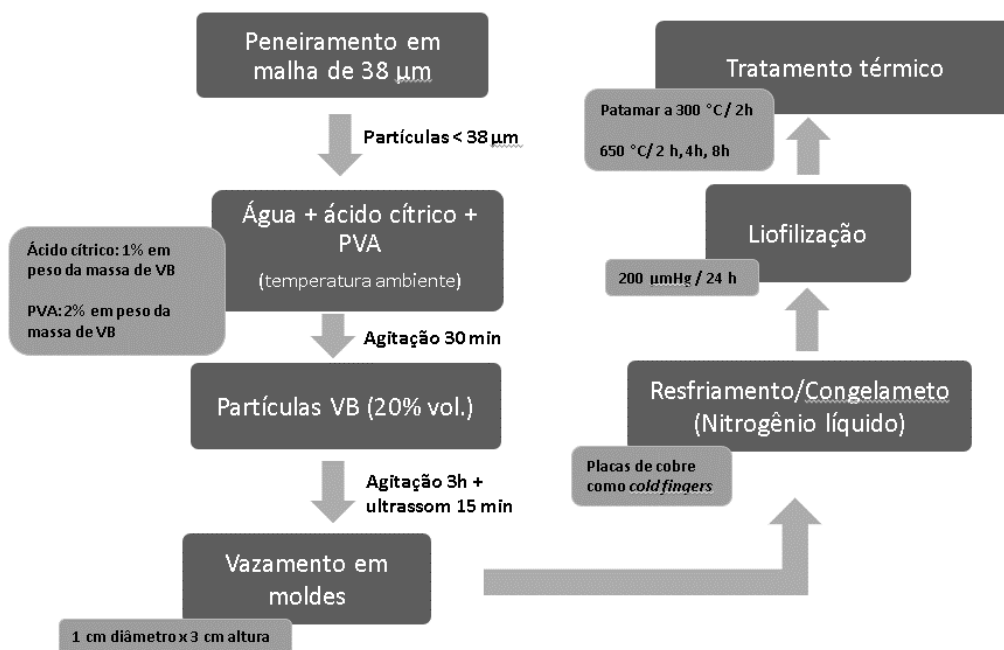


Figura 16 – Fluxograma do processo *freeze-casting*.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS PREPARADOS

As partículas de VB foram caracterizadas por granulometria a laser, picnometria de gás He, adsorção de N₂, termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA), difração de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectrometria de raios X por dispersão em comprimento de onda (WDS).

Os *scaffolds* sinterizados foram caracterizados por MEV, picnometria de gás He, microtomografia de raios X (micro-CT) e sua resistência à compressão uniaxial foi medida à temperatura ambiente. Também foram realizados ensaios de bioatividade por meio da imersão de fragmentos das estruturas em SBF e, após esta etapa, as estruturas foram analisadas novamente por DRX, MEV, FTIR e EDS para verificação da formação da camada de HA sobre sua superfície.

- **Granulometria a laser**

O conhecimento da granulometria é importante antes de executar o processo *freeze-casting*, que requer partículas de tamanhos pequenos para o preparo de uma suspensão estável e para melhor eficiência na formação das estruturas. Para obter a distribuição de tamanho das partículas após a moagem em moinho de bolas, ensaios de granulometria a laser foram realizados em duplicata. O ensaio se baseia no fenômeno de espalhamento de luz por partículas em suspensão. Um feixe de luz é incidido em uma suspensão de partículas contida em uma célula estreita e transparente. Após ser difratada e espalhada pelas partículas, a luz passa por uma lente e é focalizada em detectores, formando um padrão de difração na forma de anéis concêntricos. O ângulo entre a luz incidente e a luz difratada é inversamente proporcional aos tamanhos das partículas e está relacionado ao espaçamento entre os anéis do padrão de difração. A distribuição dos tamanhos de partículas é obtida combinando-se o padrão de difração obtido com o um padrão calculado por modelos matemáticos [85].

As análises foram realizadas em um granulômetro Cilas 1064, operando-se com laser de 820 nm, com determinação da distribuição pelo método *Fraunhofer*. A faixa de

detecção do equipamento é de 0,04 μm a 500,00 μm . Ultrassom foi aplicado durante toda a análise, não foi utilizado agente dispersante e os ensaios foram conduzidos em água filtrada. As análises foram realizadas em duplicata.

- **Picnometria de gás Hélio**

O picnômetro de Hélio é constituído por duas câmaras de volumes conhecidos ligadas por uma válvula: a câmara na qual a amostra é colocada e a câmara de expansão. Antes da análise, a amostra é colocada na respectiva câmara e é purgada com gás He por vários minutos para remoção de impurezas e umidade. O sistema é então isolado do ambiente externo e colocado a uma pressão baixa, próxima da atmosférica. A válvula de expansão é fechada e a câmara da amostra é pressurizada até uma pressão P_1 . Depois disso, abre-se a válvula e o gás se expande, passando a ocupar ambas as câmaras, agora a uma pressão P_2 , menor que P_1 . Admitindo-se um comportamento ideal do He, o volume do sólido pode ser calculado a partir da Equação (1) [86,87]:

$$P_1 \cdot (V_{CA} - V_A) = P_2 \cdot (V_{CA} - V_A + V_E) \quad (\text{Equação 1})$$

em que V_{CA} é o volume da câmara da amostra, V_E é o volume da câmara de expansão e V_A é o volume da amostra. A densidade do sólido é automaticamente calculada pelo picnômetro através da relação entre sua massa (introduzida como dado de entrada) e o volume derivado da Equação 1.

Os ensaios foram realizados em equipamento Quantachrome – Ultrapycnometer 1000. Aplicada ao material particulado (após moagem em moinho de bolas), a técnica permitiu estimar sua densidade teórica ou verdadeira (ρ_V) [88,89]. A amostra analisada, já tratada termicamente a 625 $^{\circ}\text{C}$, exibiu massa de 2,59 g e seu preparo envolveu secagem ao ar à temperatura de 100 $^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Ao todo, vinte medições foram realizadas e a densidade foi obtida como a média dessas vinte medições. Para os *scaffolds*, a picnometria de He foi utilizada para estimar a densidade aparente da amostra e, a partir deste valor, foi realizado o cálculo da porosidade da estrutura através da Equação (2), onde ρ_S ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) é a densidade aparente e ρ_V ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), a densidade verdadeira do material [29,90].

$$\text{Porosidade(\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\rho_s}{\rho_v}\right) \quad (\text{Equação 2})$$

- **Adsorção de N₂**

A técnica de adsorção de N₂ se baseia na fisissorção de moléculas gasosas na superfície do sólido analisado. A etapa de preparação da amostra (desgaseificação) envolve aquecimento e aplicação de vácuo para a remoção de umidade e outros contaminantes de sua superfície e do interior de seus poros. A amostra é então colocada na câmara de análise e resfriada a 77 K. O gás adsorvato (N₂) é injetado na câmara e curva isotermica de adsorção é derivada das medições do volume de gás adsorvido em função da pressão relativa. À medida que o processo prossegue, o gás adsorvido forma uma fina camada (monocamada) em toda a superfície da amostra e nas paredes internas dos poros. Nessa fase, a área superficial específica pode ser calculada usando a teoria de Brunauer, Emmett e Teller (BET) e o modelo de Langmuir. A adsorção continua e formam-se várias camadas de adsorção, resultando no preenchimento dos mesoporos, fenômeno chamado de condensação capilar. Nesse ponto, os tamanhos dos poros podem ser derivados usando o método de Barnett, Joyner e Halenda (BJH). Quando os poros estão completamente saturados com moléculas de adsorbato, o volume total de poros da amostra é calculado. Depois disso, o gás é retirado e as isotermas de dessorção são geradas. Uma histerese é notada quando as isotermas de adsorção e dessorção não se sobrepõem completamente e, a partir dessas isotermas e *loops* de histerese, várias informações importantes podem ser obtidas, incluindo formas de poros, distribuições de tamanhos de poros, volume de poros e áreas de mesoporos e microporos [91,92].

A área superficial específica, o volume específico de poros e o tamanho médio de poros do VB após tratamento térmico foram utilizando equipamento Quantachrome Nova 2200. Essas análises são importantes, pois a área superficial específica e a porosidade influenciam fortemente a bioatividade do VB. As amostras foram previamente desgaseificadas sob vácuo a 120 °C por 12 h. A área superficial específica foi calculada por meio do método de Branauer–Emmett–Teller (BET), enquanto o volume específico

e a distribuição de tamanhos de poros foram estimados pelo método Barrett–Joyner–Halenda (BJH).

- **TG e DTA**

O estudo do comportamento térmico do VB foi realizado por meio de análise termogravimétrica (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA). A TG possibilita determinar faixas de temperaturas nas quais ocorrem processos físico-químicos como decomposição, desidratação, oxidação, combustão, vaporização e dessorção. Por meio da técnica de DTA, avalia-se quantitativamente as frações de energia envolvidas em processos endotérmicos e exotérmicos, possibilitando a obtenção de propriedades como T_g , T_{ic} , T_c e T_f , o que facilita a definição da temperatura adequada para a sinterização. Os ensaios foram realizados com uma amostra em analisador térmico simultâneo TA Instruments Q600 sob fluxo de N_2 (500 mL/min) e taxa de aquecimento de 10 °C/min, utilizando-se cadinho de platina (Pt) e partindo-se da temperatura ambiente até 1000 °C.

- **DRX**

Esta técnica é baseada na interação entre raios X e a amostra. O material é irradiado com raios X e a interação da radiação com a matéria difrata os raios incidentes. Quando a interferência é construtiva, é possível relacionar o comprimento de onda da radiação eletromagnética com o ângulo de difração e o espaçamento da rede em uma amostra cristalina. Os raios X difratados são então detectados, processados e contados. Ao escanear a amostra através de uma faixa de ângulos, todas as direções possíveis de difração da rede devem ser alcançadas devido à orientação aleatória do material em pó. A leitura dos raios difratados gera um padrão de difração com picos e a conversão dos picos de difração em espaçamentos d permite a identificação do mineral porque cada mineral possui um conjunto de espaçamentos d únicos. Se o material não apresentar fases cristalinas ou essas fases estiverem abaixo do limite de detecção da técnica, picos não são gerados, indicando uma estrutura majoritária ou completamente amorfa [93].

A técnica de DRX foi utilizada antes e após sinterização para determinar se os materiais preparados apresentavam natureza amorfa ou cristalina. Além disso, a técnica

possibilita avaliar também a formação da camada de HA após sua imersão em SBF. As análises foram realizadas em difratômetro PANalytical Empyrean a 40 kV e 40 mA. Os difratogramas foram obtidos de 3,03 a 89,6° utilizando passo de 0,06 °/s (2 θ) e radiação CuK α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). Não houve preparação das amostras além da moagem em moinho de bolas. A base de dados JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) foi usada como referência.

- **FTIR**

Esta técnica se baseia na absorção de radiação na região do infravermelho por moléculas, que convertem essa radiação em vibração molecular característica da natureza das ligações químicas presentes na amostra. O espectrômetro mede essa absorção em função do comprimento de onda e o resultado é um espectro específico para cada tipo de molécula [94,95]. Dessa forma, esta técnica possibilita verificar a composição do VB por meio da identificação de bandas de absorção típicas de certos grupos químicos. Ela foi aplicada ao vidro particulado, antes e após tratamento térmico, e a amostras pulverizadas dos *scaffolds* referentes aos três tempos de sinterização logo após sua sinterização e depois dos ensaios de bioatividade em SBF. Os ensaios foram realizados em espectrômetro Bruker Alpha equipado com acessório de refletância total atenuada (ATR) e cristal de diamante. Os espectros foram obtidos na faixa espectral entre 4000 e 400 cm $^{-1}$, com resolução de 4 cm $^{-1}$ e 128 varreduras. Para a plotagem dos espectros, para cada um deles, as curvas foram normalizadas dividindo-se todos os valores de absorbância pelo maior valor presente na curva.

- **MEV, EDS e WDS**

A análise por MEV do material particulado, realizada para verificar a morfologia e tamanho das partículas, foi feita em equipamento FEG - Quanta 200 FEI, operando a uma tensão de 20 kV. A amostra foi recoberta com fina camada de ouro pelo método *sputtering*, pois o vidro não é um material condutor de eletricidade. A comparação entre a distribuição granulométrica obtida através da análise de Granulometria a Laser com os tamanhos das partículas observados por MEV, foi utilizado, nas imagens apresentadas, o *software ImageJ* para traçar retas que destacassem as dimensões dessas partículas.

Os testes de EDS, que fornecem informações qualitativas sobre a composição química do material, foram realizados usando um sistema NORAN acoplado ao microscópio supracitado. O princípio de funcionamento do EDS se baseia na detecção de raios-X emitidos pela amostra durante as transições eletrônicas ocasionadas por um feixe de elétrons que incide na amostra. As transições eletrônicas causadas pelo bombardeamento da amostra promovem a emissão de raios X, que são lidos pelo equipamento. Como cada elétron de cada elemento químico possui energia de emissão bem definida, o equipamento o identifica. Assim que o detector lê esses sinais, um espectro de contagens de raio-X (cps/eV) versus energia (keV) é gerado, com o eixo de contagens fazendo referência às unidades de fótons, relativos à energia das transições eletrônicas de cada elemento químico que atingem o detector por unidade de área.

A técnica de WDS é usada para isolar os raios X de interesse para análises quantitativas. Assim como no EDS, raios X são emitidos pela amostra após excitação por um feixe de elétrons. Essa radiação é filtrada (por um cristal analítico) e um único comprimento de onda é transmitido para o detector, ou seja, os elementos de interesse são analisados um de cada vez e, para cada um deles, o comprimento de onda que passa pelo filtro é selecionado através da alteração da posição relativa entre o cristal e a amostra. Uma vez que as intensidades de raios X de cada elemento são “contadas” pelo detector, as taxas de contagem são comparadas às de padrões contendo valores conhecidos desses elementos. O ensaio de WDS foi executado para a obtenção da composição química quantitativa do VB. A análise foi realizada em 13 pontos e a composição do VB foi expressa como a média dos teores obtidos para cada óxido em cada ponto analisado. Após o tratamento térmico, o material particulado foi embutido em resina epóxi e polido para a obtenção de uma superfície plana. Empregou-se a Microsonda Eletrônica Jeol JXA 8900RL Combined Microanalyser, acoplada ao microscópio Jeol JSM-6360LV, utilizando-se feixe focado, tensão de aceleração de 20 kV e corrente de 2×10^{-8} A. O equipamento foi calibrado com padrões contendo teores conhecidos dos elementos de interesse. Este microscópio também foi utilizado para análises por MEV dos *scaffolds*, com tensão de aceleração de 20 kV. As amostras foram previamente recobertas com uma fina camada de ouro através da técnica de *sputtering*. Após obtenção das micrografias, retas foram traçadas nas imagens (utilizando-se o próprio

software presente no equipamento) a fim de se mensurar o tamanho médio de poros e comparar com os valores obtidos por micro-CT.

- **Micro-CT**

Nesta técnica, a amostra é irradiada com raios-X e o escaneamento a divide em uma série de fatias 2D. Ao atravessar a fatia, os raios X são atenuados e a radiação emergente, com intensidade reduzida, é capturada por detectores. A partir das medições, um mapa de pixels 2D é criado e cada pixel corresponde a um coeficiente de atenuação medido em um local dentro da amostra. Como o coeficiente de atenuação se correlaciona com a densidade do material, os mapas 2D resultantes revelam as fases do material dentro da amostra. A qualidade dos mapas 2D depende da resolução de digitalização que varia de 1 a 50 μm [96].

Os *scaffolds* foram analisados por micro-CT para se obter a distribuição de tamanhos e o volume de poros. Esse ensaio foi executado em equipamento SkyScan 1174 utilizando tensão de 50 kV, corrente de 800 μA , filtro de alumínio (0,25 mm) e tamanho de pixel de 10 μm . As amostras foram rotacionadas em 180°, com aquisição de imagens a cada 0,7°. Utilizou-se o *software* NRecon para a reconstrução 2D das seções transversais das amostras e o *software* CTVol para a visualização volumétrica dos materiais analisados. As porosidades aberta, fechada e total, bem como a distribuição de tamanho de poros, foram mensuradas através do *software* CTAnalyzer.

- **Resistência à compressão uniaxial**

A caracterização mecânica é indispensável para saber se os *scaffolds* apresentarão resistência satisfatória para aplicação em ETO. Os ensaios de compressão uniaxial dos *scaffolds* foram conduzidos à temperatura ambiente, com análise de cinco amostras cilíndricas correspondentes a cada tempo de sinterização. As amostras foram medidas quanto a seu diâmetro e altura (dados inseridos como parâmetros de ensaio), obtendo-se os valores de $8,2 \pm 0,1$ e $19,3 \pm 0,1$, respectivamente. Antes das análises as amostras foram limpas com etanol e deixadas em estufa a 60 °C por 24 h. Os pratos do equipamento também foram limpos com etanol. Após estas etapas, os corpos de prova

foram cuidadosamente centralizados no prato inferior do equipamento com auxílio dos círculos concêntricos de referência. Foi utilizada máquina universal de teste Shimadzu AGS-X a uma velocidade de deslocamento de 0,01 mm/s com aplicação da carga perpendicularmente ao eixo central das amostras. O carregamento foi cessado apenas quando houve queda de força que indicou a ruptura dos corpos de prova.

- **Imersão em SBF**

Os *scaffolds* preparados foram testados quanto à sua bioatividade por meio da imersão em SBF. Essa solução, que se assemelha ao plasma humano em relação à sua natureza e concentração de íons, foi preparada seguindo o procedimento descrito por Kokubo e Takadama [44]. A Tabela 2 indica os reagentes utilizados na ordem em que foram adicionados, bem como as quantidades utilizadas para o preparo de 1 L de solução.

Tabela 2 - Ordem de adição dos reagentes na preparação da solução SBF

Ordem	Reagente	Massa / Volume
1	NaCl	8,04 g
2	NaHCO ₃	0,36 g
3	KCl	0,23 g
4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,23 g
5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,31 g
6	HCl 1 M	39 mL
7	CaCl ₂	0,29 g
8	Na ₂ SO ₄	0,07 g
9	((HOCH ₂) ₃ (CNH ₂))	6,12 g
10	HCl 1 M	Adição gota a gota até pH adequado

O preparo da solução SBF seguiu as seguintes etapas:

- Adicionou-se 500 mL de água deionizada em um béquer plástico de 1 L;
- Sob agitação constante, procedeu-se à adição dos reagentes na ordem indicada na Tabela X. Cada composto foi adicionado apenas quando o anterior já estava completamente dissolvido;

- c) A temperatura da solução foi mantida a $36,5 \pm 0,5$ °C, monitorada utilizando-se um pHmetro;
- d) O nono reagente foi adicionado pouco a pouco, tomando-se o cuidado de não deixar que o pH subisse acima de 7,45;
- e) Após a adição do nono reagente, o pH da solução foi ajustado para $7,42 \pm 0,01$ adicionando-se HCl 1 M gota a gota;
- f) Após estabilização do pH, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente e o volume de água foi completado até 1 L;
- g) A solução foi armazenada em refrigerador, entre 5 e 10 °C.

Para os ensaios de bioatividade, fragmentos dos *scaffolds* sinterizados por 2, 4 e 8 h, com massa de $0,015 \pm 0,001$ g, foram imersos em SBF por 1, 3, 7, 14 e 21 dias. A razão entre a massa do fragmento e o volume de SBF foi mantida constante em 1 mg/mL [55,83]. Após o tempo de imersão, os materiais foram lavados com um jato suave de água deionizada por 10 s, secos a 60 °C por 24 h e analisados por DRX, FTIR e MEV a fim de se verificar a formação da camada de HA.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS PARTÍCULAS DE VB 13-93

Nesta seção são abordadas as caracterizações físico-químicas do VB antes e após tratamento térmico.

5.1.1. Composição química do VB

A Figura 17 exibe o espectro de EDS obtido para o VB particulado após tratamento térmico, evidenciando a presença dos seis elementos que esperava-se encontrar no material (Si, Ca, Na, K, P e Mg).

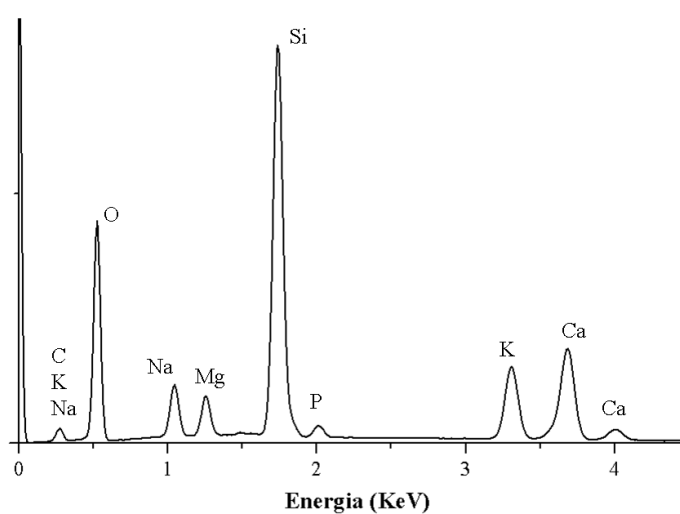


Figura 17 – Espectro EDS do VB particulado.

A composição química quantitativa do material tratado termicamente, obtida por WDS, é apresentada na Tabela 3, juntamente com a composição nominal do VB 13-93 e a composição do material fabricado pela *Mo-Sci Corporation* (fabricante comercial do VB 13-93), encontrada no próprio *site* da empresa (<https://mo-sci.com/>).

Tabela 3 - Composição do VB 13-93 medida por WDS após tratamento térmico

Composição	Concentração dos óxidos (% em massa)					
	SiO ₂	CaO	Na ₂ O	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO
Medida	58,2 ± 0,3	21,0 ± 0,5	5,6 ± 0,1	2,0 ± 0,1	7,9 ± 0,2	5,1 ± 0,1
Nominal	53,0	20,0	6,0	4,0	12,0	5,0
<i>Mo-Sci Corporation</i>	50 – 56	17 – 23	5 – 7	3 – 5	10 – 14	4 – 6

Verificou-se que a amostra preparada neste trabalho apresenta desvios em relação à composição nominal, principalmente nos casos dos óxidos SiO₂, P₂O₅ e K₂O. É possível que os dois últimos óxidos não tenham sido totalmente incorporados à rede de sílica e tenham formado composto que foi removido durante o tratamento térmico. A incorporação insuficiente dos sais precursores não é incomum em sínteses sol-gel [97–99] e pode causar a cristalização de certas fases que necessitam de temperaturas elevadas para serem decompostas [55,100]. No trabalho de Nawaz *et al.* [11], único estudo encontrado que avaliou a composição do VB 13-93 produzido por sol-gel, o material obtido também apresentou desvios em relação à composição nominal. Outra possibilidade é que tenha ocorrido algum grau de segregação desses óxidos e, como as análises de WDS são pontuais, as regiões analisadas de fato não conteriam os teores nominais dos óxidos se a segregação ocorreu. Além disso, a técnica WDS utiliza difração de raios X e se baseia na Lei de Bragg, de modo que a morfologia da superfície da amostra analisada interfere na interação do feixe de elétrons com o material [101]. Como a amostra de vidro é porosa, é possível que a irregularidade da sua superfície tenha afetado a qualidade das medições, prejudicando a difração dos raios X e sua detecção.

É válido destacar também o fato de a *Mo-Sci Corporation*, fabricante comercial do VB 13-93 citada como fornecedora deste material em alguns estudos [61,102,103], estabelecer uma faixa de composição aceitável para cada óxido em seu produto. Considerando essa informação, os desvios encontrados no vidro sintetizado para este estudo tornam-se menos significativos. Além disso, o material obtido apresenta, de fato,

os seis óxidos em sua composição, o que significa que foi possível obter um vidro de composição complexa através da síntese sol-gel.

5.1.2. Padrões de DRX

Os padrões de DRX do VB, antes e após tratamento térmico a 625 °C, são apresentados na Figura 18. A ausência de picos nítidos em ambos os difratogramas evidencia sua estrutura predominantemente amorfa, embora a região entre $2\theta = 37,5^\circ$ e $2\theta = 45^\circ$ indique que pode ter havido a formação de alguma fase cristalina durante alguma etapa da síntese. Se isso de fato aconteceu, pode ter ocorrido a formação de nitratos [11,55] ou difosfato de silício [11], fases cristalinas encontradas por outros autores em análises do VB 13-93 sintetizado por sol-gel antes de tratamentos térmicos. O halo localizado entre 25° e 30° (2θ), típico de um vidro amorfo, foi igualmente verificada por Luo *et al.* [104], Fu *et al.* [105], Doiphode *et al.* [106], e por Mehatlaf *et al.* [68], cujo material foi obtido por síntese sol-gel. Já os vidros produzidos por Nawaz *et al.* [11] e Deliormanli e Yildirim [55] apresentavam caráter semicristalino evidente antes do tratamento térmico, o que é comum em sistemas com múltiplos óxidos preparados via síntese sol-gel [11,107], pois, como já mencionado, alguns precursores nem sempre reagem completamente, originando fases secundárias [55,100]. O sódio, por exemplo, pode reagir com o nitrogênio proveniente do ácido nítrico (catalisador) formando cristais de nitrato de sódio [108]. No entanto, a ausência de picos expressivos no difratograma sugere que, caso a cristalização de alguma fase tenha ocorrido, esse fenômeno não foi expressivo e a hipótese da segregação dos óxidos parece ser mais provável para explicar as diferenças observadas em relação à composição nominal.

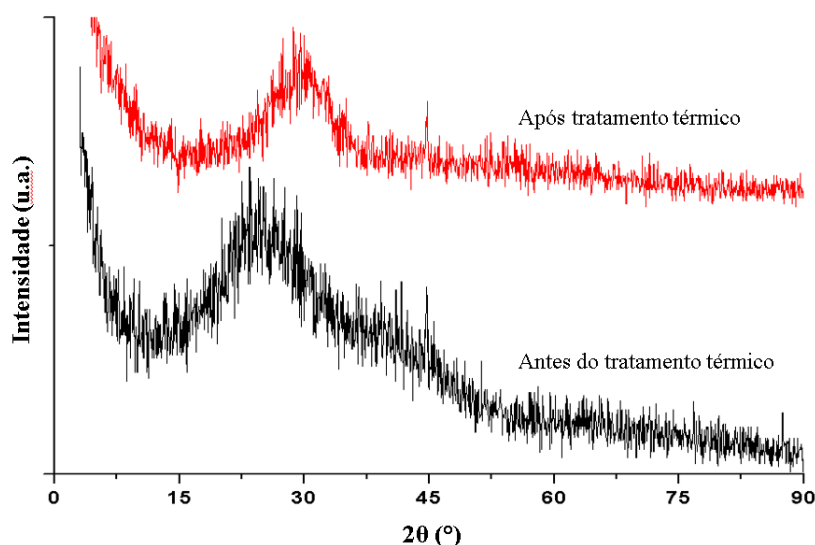


Figura 18 - Padrões de DRX do vidro bioativo 13-93 antes e após tratamento térmico a 625 °C.

O difratograma do VB após ser tratado a 625 °C é muito semelhante àquele do material não tratado, indicando que a temperatura utilizada foi baixa o suficiente para manter sua estrutura majoritariamente amorfa. O possível pico próximo a $2\theta = 45^\circ$ talvez seja referente a algum nitrato que não foi decomposto durante o tratamento térmico [55], o que reforça a possibilidade de algum grau de cristalização ter ocorrido durante a síntese, mesmo que de maneira não muito expressiva. Esse resultado está em concordância com o trabalho de Mehatlaf *et al.* [68], cujo vidro permaneceu predominantemente amorfo mesmo após tratado a 600 °C por 3 h, e também com o estudo de Nawaz *et al.* [11], cujo vidro apresentava grau de cristalinidade de apenas 5% após tratamento térmico a 650 °C por 4 h. Para melhor compreensão acerca do início da cristalização do vidro e posterior definição da temperatura de sinterização dos *scaffolds*, tratamentos térmicos também foram realizados a 650 e 700 °C, por 2, 4 ou 8 h, conforme apresentado na Figura 19. Os padrões evidenciam que a natureza predominantemente amorfa do vidro é preservada mesmo após sinterização a 650 °C, o que não ocorre a 700 °C, temperatura na qual algumas fases cristalinas (combeíta, akermanita e β -tricálcio fosfato) são identificadas [11]. Esses resultados, juntamente com aqueles das análises térmicas, foram utilizados para a definição da temperatura de sinterização dos *scaffolds*.

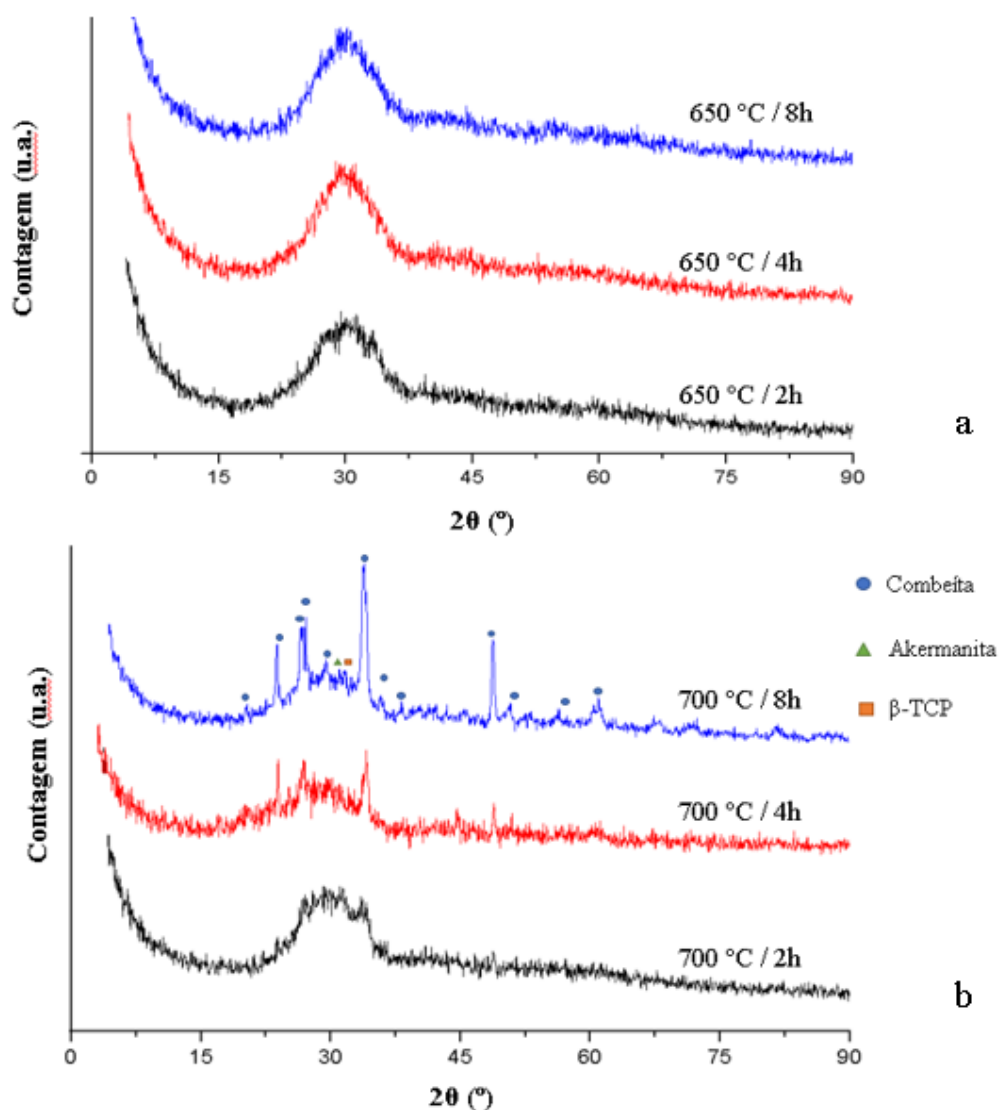


Figura 19 - Padrões de DRX do VB 13-93 após tratamentos térmicos a 650 °C (a) e 700 °C (b) por 2, 4 ou 8 h.

5.1.3. Espectros FTIR

A Figura 20 apresenta os espectros de FTIR do vidro antes e após tratamento térmico. De acordo com a literatura, o típico espectro de FTIR de vidros à base de sílica possui uma banda entre 750 e 800 cm^{-1} , correspondente ao modo de vibração por dobramento das ligações Si–O–Si, e várias bandas no intervalo aproximado de 1000 a 1300 cm^{-1} , relativas ao modo de vibração por estiramento assimétrico dessas ligações [104,109]. Outros trabalhos mencionam uma banda de absorção por volta de 460 cm^{-1} , atribuída ao

dobramento de ligações Si–O–Si [83,105]. Dessa forma, para a amostra não tratada, pode-se dizer que as bandas observadas em 1048 e 1060 correspondem ao estiramento assimétrico das ligações mencionadas, enquanto aquelas presentes em 787 e 422 cm^{-1} se relacionam ao modo de vibração por dobramento dessas mesmas ligações. As bandas localizadas em 964 e 1637 cm^{-1} indicam a presença de grupos silanol (Si-OH) e aquela situada em 3395 cm^{-1} , de grupos OH⁻ presentes na rede de sílica [110]. A banda em 1331 cm^{-1} pode ser atribuída ao grupo NO₃⁻ [111], assim como o ombro em 1380 cm^{-1} [49,112]. Tais grupos podem ser provenientes do ácido nítrico (catalisador) e/ou de sais de nitrato resultantes do processo de síntese [112], reforçando a hipótese de que o fenômeno de cristalização tenha ocorrido, mesmo que em pequeno grau, ainda durante a síntese sol-gel. No entanto, a cristalização parcial não é, necessariamente, um fator problemático, dado que vitrocerâmicas (materiais parcialmente cristalinos) também possuem aplicação como biomateriais no campo da ETO [5,69,113].

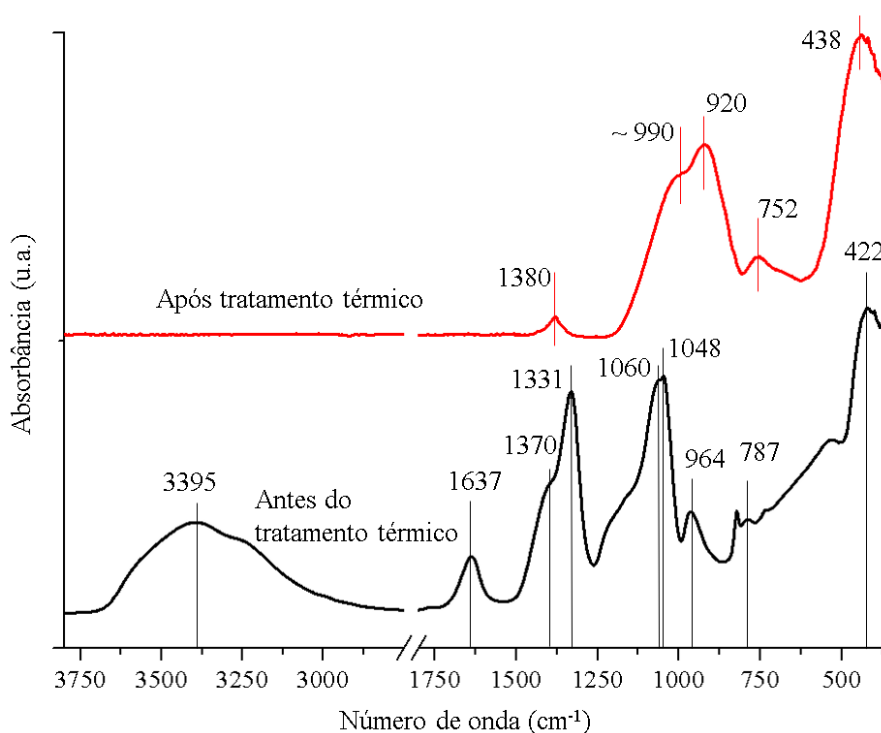


Figura 20 - Espectros FTIR do VB antes e após tratamento térmico a 625 °C.

Para o material tratado termicamente verifica-se a redução do número de bandas, evidenciando a decomposição térmica de certos compostos, como é o caso dos grupos silanol. As bandas localizadas em 438 e 752 cm^{-1} são, provavelmente, resultado do

deslocamento daquelas registradas em 422 e 787 cm^{-1} para o material não aquecido. Tal deslocamento ocorre, possivelmente, devido a alterações estruturais provocadas pelas altas temperaturas. O espectro do material após tratamento térmico é similar àquele obtido por Deliormanli e Yildirim [55] para o VB 13-93 sintetizado via processamento sol-gel. Segundo os autores, a banda entre 950 e 1050 cm^{-1} , indicada em 990 cm^{-1} na Figura 20, é referente ao estiramento das ligações Si–O–Si, e a banda que surgiu em 920 cm^{-1} corresponde a modos de vibração da ligação Si–O com átomos de oxigênio não ligantes (Si–O–2NBO), consequência da ruptura parcial da rede causada pela presença de óxidos de Na, K, Ca e Mg. É válido mencionar que Luo *et al.* [104], trabalhando com o VB 13-93, e Serra *et al.* [109], analisando vidros com composição próxima àquela do VB 13-93, também verificaram uma banda na região entre 850 e 950 cm^{-1} e, em ambos os casos, ela foi atribuída à ligação do Si com átomos de oxigênio não ligantes. A banda em 1380 cm^{-1} é provavelmente referente aos grupos NO_3^- identificados pelo ombro no espectro do material não tratado, uma vez que a banda em 1331 cm^{-1} desapareceu após o tratamento térmico. A existência das bandas relacionadas a íons nitrato antes e depois do tratamento térmico indica que o vidro não era completamente amorfo, mesmo antes da calcinação.

A Tabela 4 lista os números de onda das bandas encontradas nos espectros de FTIR do VB antes e após tratamento, relacionando-as às respectivas ligações ou grupos químicos.

Tabela 4 - Grupos químicos e ligações identificadas no espectro FTIR e seus respectivos números de onda

Grupos / Ligações	Número de Onda (cm^{-1})
Estiramento Si – O – Si	1048, 1060, 990
Dobramento Si – O – Si	422, 438, 752, 787
Si–O–2NBO	920
Si – OH	964, 1637
OH ⁻	3395
NO ₃ ⁻	1331, 1380

5.1.4. Distribuição granulométrica

De acordo com Deville *et al.* [72], a presença de aglomerados e partículas grandes deve ser evitada na execução do processo *freeze-casting*. Quanto mais finas as partículas em suspensão, maior é sua estabilidade e mais homogênea é a estrutura de poros do *scaffold*. Dessa forma, o VB sintetizado foi submetido a moagem por 12 h e peneiramento em malha de 38 μm antes de ser analisado por granulometria a laser. Como mencionado anteriormente, essa peneira possuía a malha mais fina dentre as peneiras disponíveis. A Tabela 5 e a Figura 21 apresentam a distribuição de tamanhos de partículas do VB após esses procedimentos, evidenciando a obtenção de partículas com diâmetro médio de 7,33 μm , 90% das quais menores que cerca de 17 μm . Os valores são uma média dos dados obtidos em uma análise em duplicata.

Tabela 5 - Tamanhos de partículas do VB após moagem em moinho de bolas

d₁₀ (μm)	d₅₀ (μm)	d₉₀ (μm)	d_{médio} (μm)
1,04 \pm 0,02	5,08 \pm 0,23	16,99 \pm 0,37	7,33 \pm 0,22

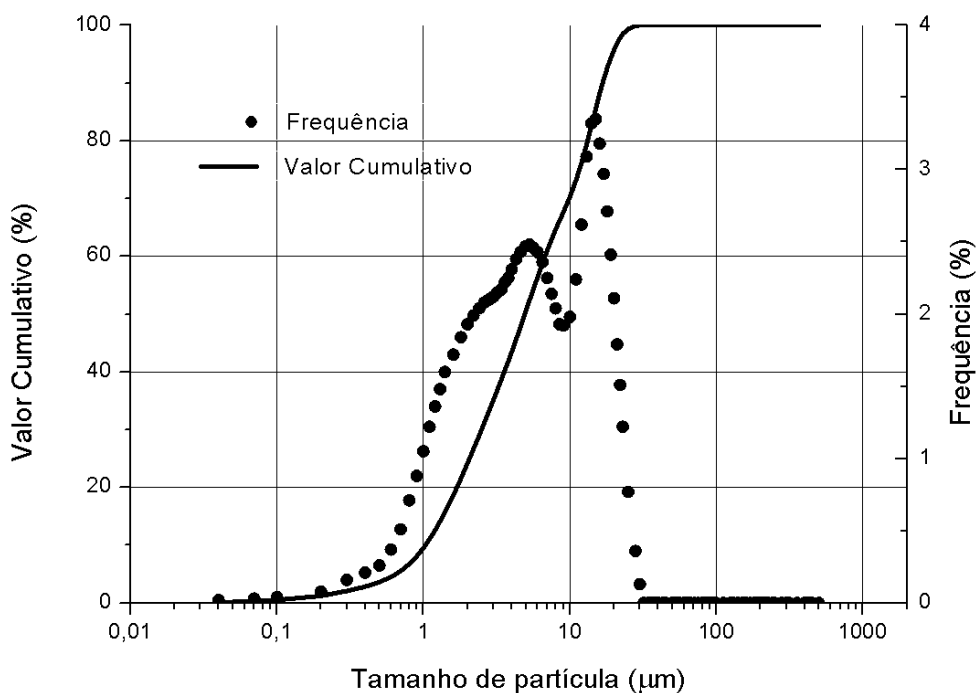


Figura 21 - Distribuição granulométrica do VB 13-93 após moagem.

É importante mencionar que essa distribuição de tamanhos de partículas é maior que aquelas comumente utilizados para o processo *freeze-casting*: em dois estudos de Liu *et al.* com o VB 13-93 [61,76], as partículas utilizadas tinham diâmetro médio de 1 μm , e diversos trabalhos com VBs e outros materiais citam diâmetros médios de partículas ainda menores [71,75,114] ou não muito maiores que este valor [77,79]. Dessa forma, 7,33 μm pode ser um tamanho mais grosseiro do que o recomendado para que o processo *freeze-casting* ocorra da maneira mais eficiente possível, podendo ocorrer algum imprevisto em relação à estrutura de poros que será obtida para os *scaffolds*, uma vez que quanto maiores as partículas, mais difícil é a replicação da estrutura dos cristais do solvente [72] e menos estável é a suspensão a partir da qual as estruturas são fabricadas [12,72].

5.1.5. Propriedades térmicas

O VB foi submetido a análise térmica para determinação de suas temperaturas de transição vítrea (T_g) e de início (T_{ic}) e pico (T_c) da cristalização. Esses dados são importantes para que a sinterização dos *scaffolds* seja realizada sem promover a cristalização do vidro, uma vez que este fenômeno afeta negativamente sua bioatividade. As curvas de TG e DTA são apresentadas na Figura 22, na qual também constam os valores de T_g , T_{ic} e T_c .

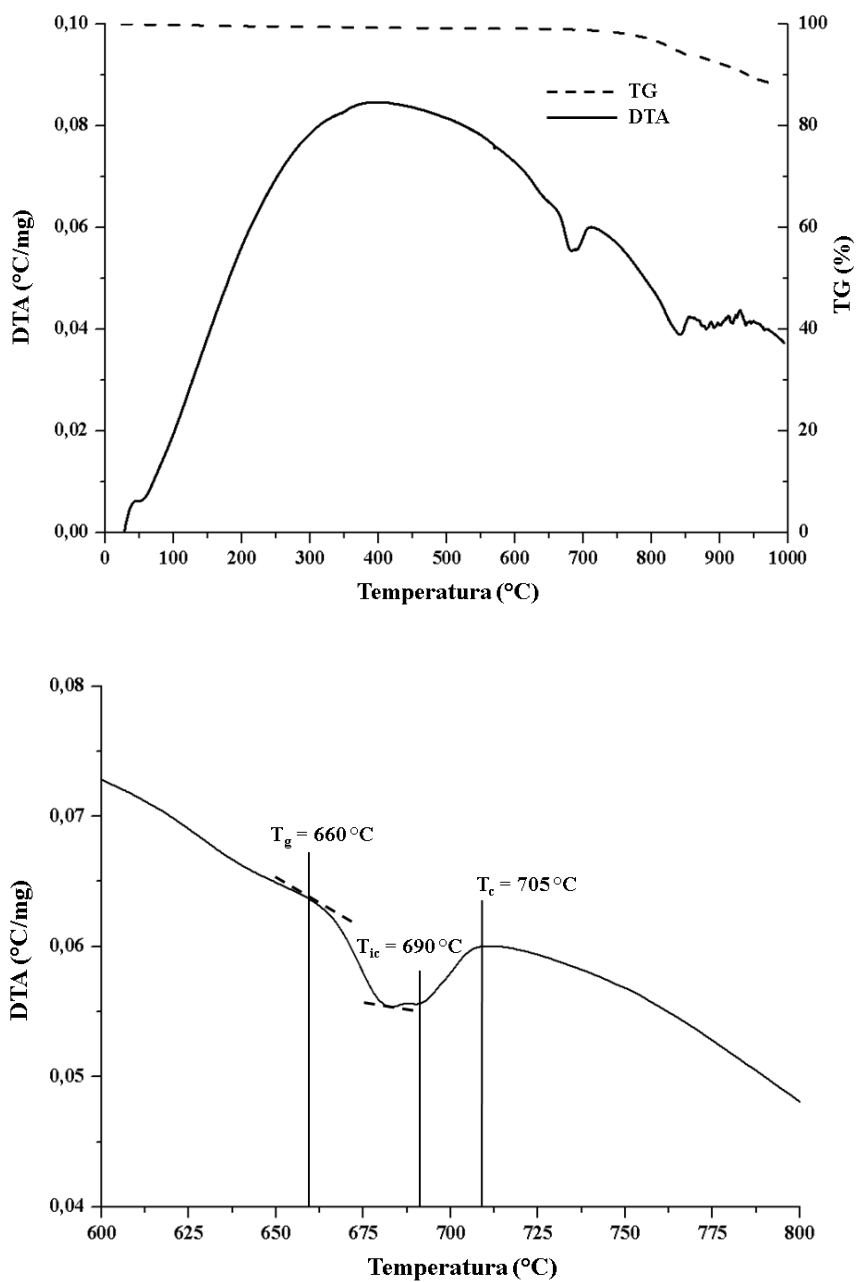


Figura 22 - Curvas de TG e DTA para o VB 13-93 após tratamento térmico (a) e ampliação da curva de DTA (b).

Como o material já havia sido tratado a 625 °C, a curva de TG não registrou as perdas de massa que estariam associadas à eliminação de água e outros subprodutos voláteis do processo sol-gel. Somente a partir de 750 °C uma perda de massa é detectada, que pode ser referente à decomposição de nitratos. Cacciotti *et al.* [46] reportam a decomposição do nitrato de sódio entre 700 e 900 °C, enquanto Nawaz *et al.* [100] citam que a decomposição desse mesmo sal, em seu VB 45S5 obtido por sol-gel, ocorreu em temperaturas acima de 650 °C. Já Rezabeigi *et al.* [115] menciona que alguns nitratos se decompõem apenas entre 610 e 800 °C. Nas seções 5.1.2 e 5.1.3, quando foram apresentados os resultados de DRX e FTIR, foi discutido que pode ter havido formação de alguma fase cristalina durante a síntese sol-gel e que, caso isso tenha ocorrido, o tratamento térmico a 625 °C pode não ter sido suficiente para decompor esses cristais. Alternativamente, essa perda de massa pode ser referente à decomposição de cristais formados durante a própria análise térmica. Percebe-se, na curva de DTA, um pico de cristalização que se inicia por volta de 690 °C e outros presentes a partir de cerca de 800 °C. É possível que alguns desses cristais tenham sido formados e, logo em seguida, decompostos, uma vez que a perda de massa se inicia logo após o aparecimento do primeiro pico de cristalização. Na Figura 19, as fases cristalinas formadas durante o tratamento térmico a 700 °C foram identificadas, baseando-se no trabalho de Nawaz *et al.* [11], como sendo combeíta, akermanita e β -tricálcio fosfato. É possível que a perda de massa registrada a partir de 750 °C esteja relacionada à decomposição dessas fases, mas não foram encontrados estudos sobre VBs que fizessem menção à decomposição térmica desses cristais.

As linhas tangentes traçadas na curva da Figura 22b evidenciam a mudança de linha de base (*baseline*) tipicamente observada para o fenômeno de transição vítrea, com a T_g ocorrendo em torno de 660 °C. Este valor é mais elevado que aqueles obtidos em estudos sobre o VB 13-93 [11,58,65-67], nos quais a T_g variou entre 586 e 612 °C para vidros obtidos por fusão e, no caso de uma amostra preparada por sol-gel, apresentou o valor de 550 °C [11]. Percebe-se, ainda, um pico exotérmico localizado em aproximadamente 705 °C (mais evidente na Figura 22a), atribuído a um dos fenômenos de cristalização do vidro, iniciado em $T_{ic} \sim 690$ °C. Tais conclusões estão de acordo com as análises de DRX realizadas, que mostram o surgimento de alguns picos de

cristalização após o material ser tratado a 700 °C por 2, 4 ou 8 h (Figura 19). Os demais picos existentes nas curvas, observados a partir de 850 °C, provavelmente referem-se à cristalização de outras fases. Como o objetivo da análise de DTA era apenas identificar em que temperatura os fenômenos de cristalização se iniciavam a fim de possibilitar a escolha da temperatura de sinterização dos *scaffolds*, essas fases cristalinas não foram investigadas. Portanto, com base nos valores de T_g e T_{ic} e nos resultados de DRX após tratamento do VB a 650 e 700 °C, a temperatura de sinterização determinada para os *scaffolds* foi 650 °C. Com este valor, a intenção era evitar a cristalização do material e obter algum grau de fluxo viscoso durante o processo para que a sinterização ocorresse de maneira mais eficiente. Vale mencionar que esta temperatura é menor que aquelas utilizadas nos estudos encontrados sobre o preparo de *scaffolds* do VB 13-93 por meio de *freeze-casting* [61,64,68,76], nos quais as sinterizações foram realizadas a 690 ou 700 °C. Tais temperaturas não seriam apropriadas para o VB produzido neste estudo devido ao processo de cristalização que, como evidenciado nas Figuras 19 e 22, tinha início pouco antes dos 700 °C.

5.1.6. Densidade real do VB

A densidade verdadeira (ρ_v) do vidro após tratamento térmico foi estimada através da técnica de Picnometria de gás Hélio. O ensaio foi executado vinte vezes para garantir a reprodutibilidade do resultado e o valor de densidade obtido foi de:

$$\rho_v = 2,70 \pm 0,01 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$$

Conhecer o valor de ρ_v é importante para a fabricação de *scaffolds* pelo processo *freeze-casting*, pois, uma vez determinado o volume de suspensão a ser preparado e a fração volumétrica de carga sólida que será utilizada para a fabricação dos *scaffolds*, é possível calcular a massa de VB a ser medida através da Equação 3, onde m é a massa e V é o volume de material a ser utilizado.

$$m = \rho_v \cdot V \quad (\text{Equação 3})$$

5.1.7. Imagens de MEV do material particulado

A Figura 23 exibe micrografias de MEV das partículas do VB 13-93 após sinterização. As imagens mostram, por meio de retas traçadas e medidas com a utilização do *software ImageJ*, tamanhos de partículas em concordância com a ampla distribuição granulométrica obtida pela técnica de granulometria a laser, que forneceu valores de $d_{\text{médio}}$ e d_{90} iguais a 7,33 e 16,99 μm , respectivamente. Percebe-se claramente a existência de partículas muito finas (com menos de 1 μm de diâmetro), partículas com tamanhos próximos a $d_{\text{médio}}$ e até partículas com cerca de 20 μm (maior que d_{90}). Conforme mencionado anteriormente, essa distribuição granulométrica com grande quantidade de partículas com diâmetros consideravelmente maiores que 1 μm pode afetar negativamente o processo *freeze-casting*, prejudicando a estabilidade da suspensão e tornando difícil a replicação da morfologia dos cristais de água no momento da solidificação [12,72].

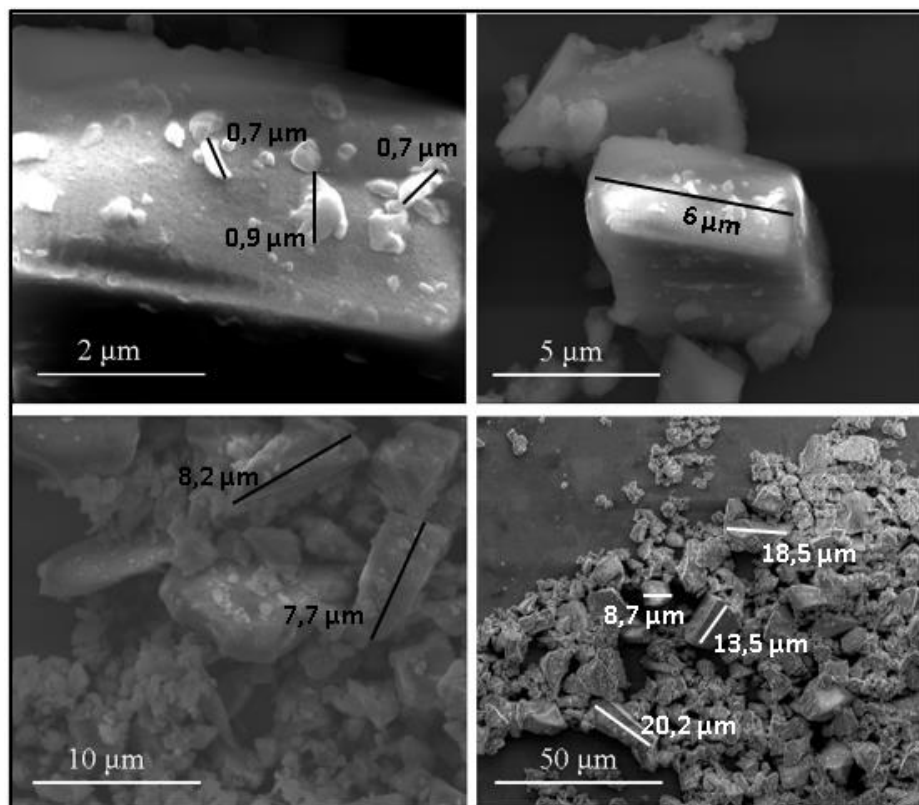


Figura 23 - Imagens de MEV do VB 13-93 particulado após tratamento térmico.

5.1.8. Área superficial específica e características de porosidade

A isoterma de adsorção de N_2 obtida para o VB, após o material passar por moagem e tratamento térmico, é exibida na Figura 24, juntamente os resultados mais importantes obtidos com o ensaio. Conforme classificação da IUPAC [91], trata-se de uma isoterma do tipo III, observada para materiais não porosos ou macroporosos (poros maiores que 50 nm). Para este tipo de isoterma, a adsorção é determinada por interações relativamente fracas entre adsorvente e adsorbato, e as moléculas adsorvidas se aglomeram nos locais mais favoráveis da superfície do sólido, não ocorrendo formação de monocamada. Dessa forma, conclui-se que o volume de macroporos no material é o que determina o modo como a adsorção do N_2 ocorre. Contudo, a existência de histerese indica que a estrutura do material também é composta por mesoporos (2 a 50 nm), que são tamanhos de poros mais típicos em materiais à base de sílica obtidos por meio de sínteses sol-gel convencionais [34].

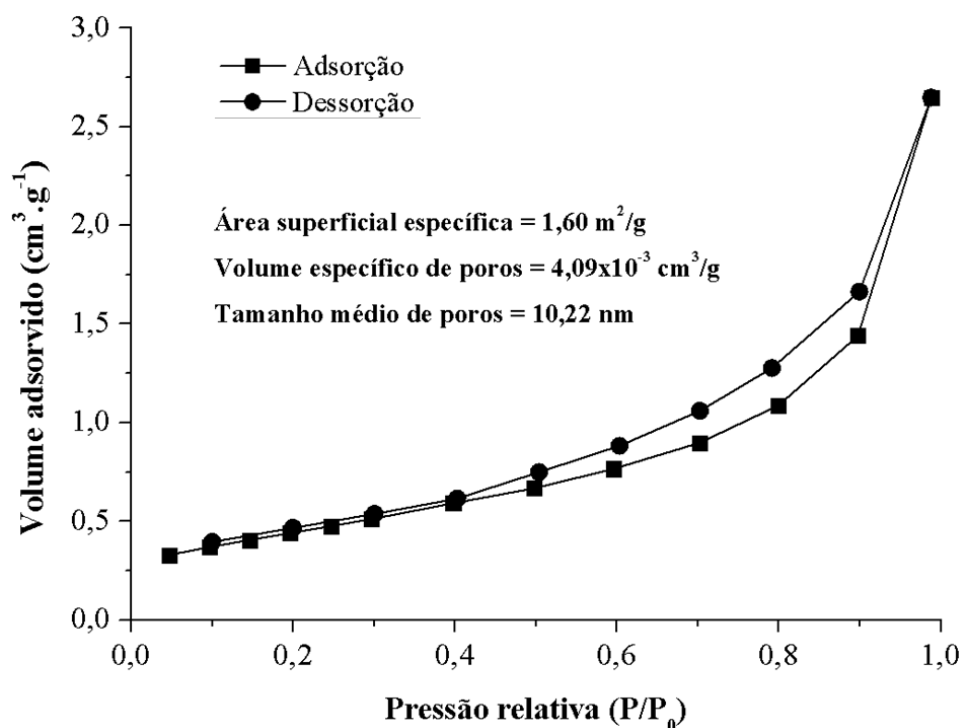


Figura 24 - Isoterma de adsorção de N_2 para o VB 13-93 após tratamento térmico.

A área superficial específica do VB 13-93 estimada através do método BET ($1,6 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) é consideravelmente menor que aquelas geralmente observadas para VBs com outras composições obtidos por síntese sol-gel [54,116,117]. Vale mencionar, porém, que baixos valores de área superficial também são verificados. Fiume *et al.* [107] estudaram um vidro similar ao VB 13-93, composto pelos mesmos seis óxidos, mas diferindo deste em relação aos teores de cada um. Foram avaliadas amostras preparadas tanto pelo método sol-gel quanto por fusão, a fim de comparar propriedades obtidas com cada uma das técnicas. Para a amostra obtida por fusão, verificou-se uma área superficial específica de $0,6 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, enquanto as duas preparadas por sol-gel, uma tratada a 625 e outra a 800 °C, apresentaram os valores de $2,2$ e $1,2 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente. Em outro estudo, Maçon *et al.* [118] avaliaram alguns VBs obtidos por fusão compostos por quatro ou mais óxidos, todos disponíveis comercialmente. As áreas superficiais específicas medidas variaram entre $0,09 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (para uma amostra do VB 13-93) e $0,36 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Faure *et al.* [119], sintetizando o VB 45S5 através do método sol-gel, utilizando um ácido orgânico como catalisador, também obtiveram baixo valor de área superficial ($0,9 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) e, assim como Fiume *et al.* [107], observaram um ligeiro aumento nessa grandeza em relação ao vidro produzido por fusão ($0,4 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), como é esperado ao comparar-se os dois processos [37,55,107]. Possíveis motivos para valores de área superficial específica tão pequenos não foram investigados em nenhum dos trabalhos mencionados. Entretanto, no estudo de Fiume *et al.* [107] foi mencionado que esses baixos valores talvez possam ser atribuídos à complexa composição do vidro, bem como ao desenvolvimento de fases cristalinas durante os tratamentos térmicos, e que mais estudos são necessários para investigar esse aspecto. No presente trabalho, podem ser estes, também, os motivos para a baixa área superficial específica medida.

Aliado à questão da composição complexa, o tratamento térmico para eliminação de subprodutos do processo sol-gel (625 °C por 4 h) poderia estar relacionado à baixa área superficial específica verificada. A transição vítrea, assim como a cristalização, é um fenômeno que depende tanto de aspectos cinéticos quanto de termodinâmicos e, apesar de a T_g do material ter sido observada por volta de 660 °C, as duas temperaturas são relativamente próximas. Logo, um aquecimento por um período tão longo quanto 4 h poderia ter ocasionado o início da transição vítrea, mesmo que de maneira branda,

afetando apenas microporos (< 2 nm) que eventualmente existiam nas partículas. É importante destacar que o VB 13-93 é composto por quantidade significativa de óxidos modificadores de rede, que facilitam o amolecimento do vidro e a sua posterior sinterização [11,61]. Uma elevada área superficial específica é preferível para materiais aplicados em ETO, pois favorece maiores bioatividade e resposta celular [34]. Mas é válido lembrar que o VB, quando implantado, sofre dissolução, o que provoca o aumento de sua área superficial e maior exposição ao ambiente biológico. Portanto, o baixo valor observado para esta grandeza pode não ser algo tão problemático, principalmente levando-se em consideração que o VB foi utilizado para a fabricação de *scaffolds*, que tem uma estrutura de poros propícia ao desenvolvimento do tecido em recuperação [15,120].

O tamanho médio e o volume específico de poros foram estimados pelo método BJH. O volume de poros verificado para o VB 13-93 ($4,1 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) é condizente com o valor da área superficial, uma vez que esta grandeza é tão maior quanto mais poroso for o material. Fiume *et al.* [107] também obtiveram volumes de poros muito pequenos ($1,7 \times 10^{-2}$ e $2,7 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) para suas amostras do vidro composto pelos mesmos seis óxidos que o VB 13-93. Para materiais aplicados em ETO um baixo volume de poros não é ideal, pois é através deles que o tecido regenerado se desenvolve dentro do material [4,34]. No entanto, o preparo de *scaffolds* via *freeze-casting* propicia a obtenção de estruturas porosas [77,121], de modo que o baixo volume de poros verificado para o VB não é uma característica que deve prejudicar a aplicação biológica deste material. O tamanho médio de poros apresentado pelo VB (10,2 nm) está dentro da faixa definida como mesoporos. Como VBs produzidos por sol-gel apresentam nanoporosidade inerente [8,34], este valor está de acordo com a literatura.

5.1.9. Conclusões

Apesar de o material sintetizado não possuir a composição nominal do VB 13-93, pode-se concluir que a síntese sol-gel de um vidro com composição complexa é possível de ser realizada, pois as análises de EDS e WDS confirmaram a presença dos seis óxidos no VB preparado. Os desvios verificados não são incomuns em sínteses sol-gel e podem

ser resultado de fenômenos de cristalização ou segregação sobre os quais não é possível exercer completo controle durante o processo, exigindo que mais estudos se debrucem sobre essa questão na busca de melhor compreensão e controle dos parâmetros de síntese. Foi apresentado, inclusive, outro estudo em que desvios em relação à composição nominal na síntese sol-gel do VB 13-93 também foram verificados, bem como dados referentes a um fabricante comercial deste material que estabelece uma faixa de teores aceitável para cada óxido que compõe o vidro.

Quanto à natureza do material preparado, os resultados de FTIR mostraram características típicas de vidros à base de sílica e, nas análises de DRX, embora tenha havido alguns indícios da presença de fases cristalinas desenvolvidas durante a síntese, foi observado que sua natureza predominantemente amorfa foi conservada mesmo após tratamento térmico, o que é favorável e promissor para sua aplicação como biomaterial. Além disso, a cristalização parcial não é um impedimento para aplicações biológicas, pois vitrocerâmicas também podem ser bioativas e utilizadas ETO.

As análises térmicas, juntamente com ensaios de DRX após tratamentos térmicos a 650 e 700 °C, permitiram a definição da temperatura de sinterização dos *scaffolds* visando a conservação da natureza amorfa do VB, uma vez que foi possível identificar a transição vítrea e o início do fenômeno de cristalização do material. Em relação à área superficial específica, a comparação com outros estudos permitiu a constatação de que não é incomum que composições mais complexas resultem em VBs com baixos valores para esta grandeza. Há estudos com o próprio Bioglass® 45S5, referência em bioatividade, que relatam áreas superficiais específicas da mesma ordem de grandeza daquela verificada para o VB preparado neste estudo. Pelo que foi verificado na literatura, esse aspecto ainda não está elucidado e requer mais estudos para melhor compreensão de possíveis fatores que podem levar a isso. No entanto, deve-se levar em consideração que um biomaterial, quando implantado e em contato com o meio biológico, passa por processo de degradação à medida que íons são liberados no meio, de modo que a área superficial específica do componente aumenta à medida que sua dissolução ocorre. Ou seja, o valor verificado para esta grandeza não é um impedimento para sua aplicação como biomaterial. É necessário considerar que a taxa de degradação do componente

deve ser compatível com aquela de desenvolvimento do tecido sendo regenerado e se a degradação do material é lenta devido a uma baixa área superficial específica, isso pode ser útil no caso de lesões ou doenças cuja recuperação seja mais demorada. Quanto ao volume específico de poros, verificou-se que o valor obtido é condizente com o valor da área superficial e com valores obtidos em outros trabalhos. Apesar do baixo volume de poros, como o material sintetizado destinou-se à fabricação de *scaffolds*, isso não é um empecilho à sua utilização em ETO, uma vez que a técnica *freeze-casting* possibilita a obtenção de poros adequados a esta aplicação.

No que diz respeito aos resultados obtidos com a técnica de Granulometria a Laser, foi constatado que a distribuição granulométrica do VB após moagem apresentou tamanhos de partículas maiores que aqueles utilizados em diversos estudos nos quais *scaffolds* são fabricados por meio da técnica de *freeze-casting*. Com base nessa informação, levantou-se a possibilidade de que o preparo dos *scaffolds* pudesse ser afetado de maneira negativa, com a obtenção de resultados não esperados em relação à estrutura de poros pretendida para as amostras, uma vez que partículas menores contribuem tanto para maior estabilidade da suspensão quanto para a eficiência na replicação da morfologia dos cristais do solvente solidificado. Como não havia a possibilidade de se utilizar algum processo que resultasse em partículas mais finas, a técnica *freeze-casting* foi conduzida com as partículas como foram obtidas após a moagem em moinho de bolas e peneiramento em malha de 38 μm .

5.2. FREEZE-CASTING E CARACTERIZAÇÕES DOS SCAFFOLDS

Nesta seção são abordadas as caracterizações dos *scaffolds* preparados, antes e após tratamentos térmicos, bem como os resultados dos testes de bioatividade após imersão em SBF.

5.2.1. Aspecto visual dos *scaffolds*

Os corpos verdes obtidos após a liofilização (Figura 25a) apresentavam resistência mecânica suficiente para serem manuseados. Suas dimensões correspondiam àsquelas dos moldes nos quais a solidificação ocorreu: 10 mm de diâmetro por aproximadamente

30 mm de altura. Após o tratamento térmico a 650 °C (Figura 25b), a redução de volume devido à sinterização ficou evidente: os valores médios registrados para a altura e diâmetro corresponderam a $23,2 \pm 2,3$ mm e $7,7 \pm 0,5$ mm, respectivamente. Ainda, o manuseio das amostras permitiu perceber que elas se tornaram mais resistentes após a etapa de sinterização.

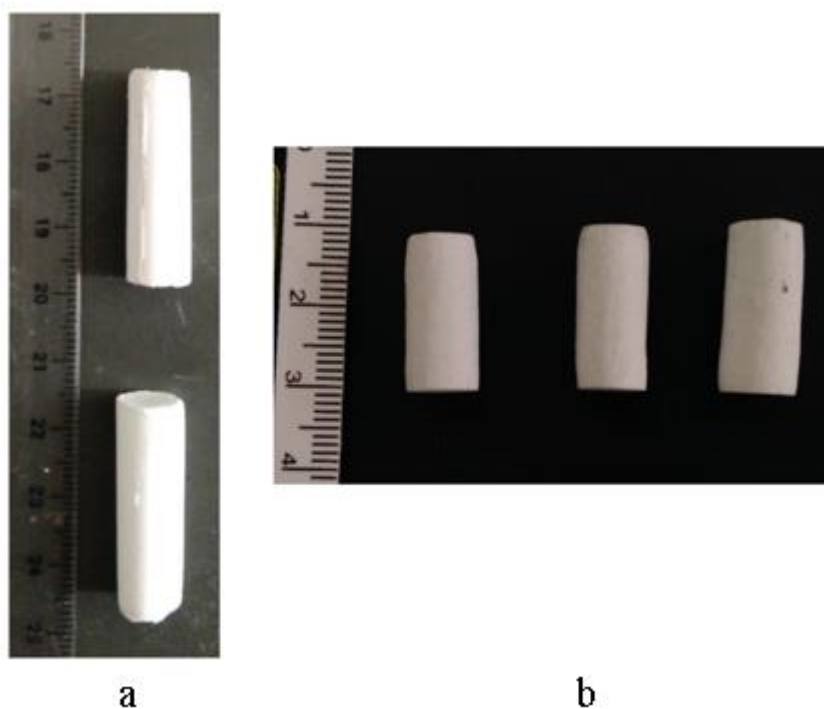


Figura 25 - Aspecto visual dos *scaffolds* antes (a) e após (b) sinterização.

5.2.2. Sinterização e estrutura de poros dos *scaffolds*

- **Microtomografia de Raios X**

A avaliação da estrutura de poros dos *scaffolds* após sinterização envolveu a utilização de micro-CT, MEV e Picnometria de He, de modo a se obter resultados que permitissem uma caracterização mais completa acerca da porosidade das amostras. A Figura 26 exibe imagens de micro-CT obtidas dos *scaffolds* sinterizados por 2, 4 e 8 h. Algumas características chamam a atenção nas imagens: a morfologia e a ausência de orientação da estrutura de poros, a presença de uma camada mais densa na superfície

dos *scaffolds*, a menor porosidade da amostra sinterizada por 2 h e uma distribuição homogênea da porosidade por todo o volume das amostras (desconsiderando-se a camada superficial).

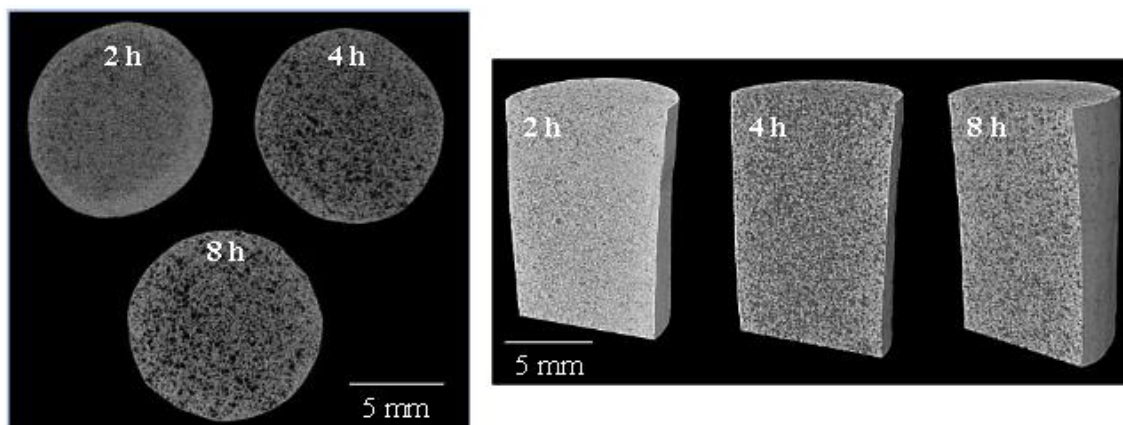


Figura 26 - Imagens de micro-CT obtidas para *scaffolds* após sinterização. As regiões escuras são poros e as claras representam a fase sólida.

Quanto à morfologia, observa-se que os poros não apresentam o formato lamelar característico da utilização de água no processo *freeze-casting* nem a orientação proveniente do congelamento unidirecional da suspensão [13,72,73]. Na Seção 5.1.4, em que se discutiu a distribuição granulométrica obtida para as partículas do VB 13-93 após a moagem e peneiramento e seus possíveis efeitos sobre a eficiência da técnica *freeze-casting*, foram apresentados os valores de $d_{\text{médio}} = 7,33 \mu\text{m}$ e $d_{90} = 16,99 \mu\text{m}$. Além disso, foram citados estudos [61,71,75-77,79,114] nos quais esta técnica foi aplicada para a produção de *scaffolds* (tanto de VBs como de outros materiais bioativos) utilizando-se partículas consideravelmente mais finas, com diâmetros médios de cerca de $1 \mu\text{m}$. Embora não tenham sido encontrados, para comparações mais diretas e definitivas, estudos em que partículas com distribuição granulométrica semelhante àquela obtida neste trabalho tenham sido utilizadas com a técnica *freeze-casting*, aparentemente as partículas não eram finas o suficiente para que o processo ocorresse da maneira mais eficiente possível, pois é bem estabelecido que quanto mais grosseiras as partículas, menor é a estabilidade da suspensão e mais difícil a replicação da morfologia dos cristais do solvente, uma vez que o empacotamento do material fica

prejudicado [12,72]. Portanto, se a suspensão preparada não era estável o suficiente, é provável que tenha havido decantação do material particulado quando o sistema foi vertido nos moldes, impedindo, então, um resfriamento que originasse corpos verdes com poros lamelares e orientados. Como os *scaffolds* não foram caracterizados antes da sinterização, não é possível saber se a estrutura de poros dos corpos verdes preservava algum grau de orientação e uma morfologia que se assemelhasse à lamelar. No entanto, a julgar pelos dados dos estudos apresentados, a hipótese de que as partículas aqui utilizadas eram mais grosseiras do que seria o ideal para a execução do processo *freeze-casting* parece ser razoável.

Outro fator que pode ter tido algum grau de influência sobre a estrutura de poros das amostras é a ocorrência de fluxo viscoso durante a sinterização. Não foi encontrado nenhum estudo que mencionasse que o fluxo viscoso possa promover alteração tão drástica sobre a estrutura de poros do material a ponto de alterar sua morfologia e desfazer algum grau de orientação, portanto, essa é apenas uma hipótese levantada na tentativa de justificar o que foi observado. Este fenômeno, em que uma fase líquida é formada durante o aquecimento devido à fusão parcial do material, possibilita um transporte de matéria mais eficiente dentro da estrutura e, conseqüentemente, o preenchimento dos espaços entre as partículas torna-se mais fácil devido à mobilidade da fase líquida [59,60]. E uma das características da composição 13-93 é justamente a maior quantidade de óxidos modificadores de rede, que possibilitam a ocorrência do fluxo viscoso, permitindo a sinterização em temperaturas mais baixas e de maneira mais eficiente [58,122]. Dessa forma, supondo que a estrutura de poros dos corpos verdes ainda conservasse uma morfologia parcialmente lamelar e relativamente orientada, talvez esse fenômeno tenha tido algum grau de contribuição para que a morfologia de poros obtida tenha sido tão diferente daquela que era esperada.

A camada mais densa recobrendo os *scaffolds*, evidente na Figura 26, também é uma característica em relação à qual não foram encontradas menções em outros estudos. Desse modo, é possível apenas especular sobre o que pode ter acontecido. Pensou-se na possibilidade de a causa para tal fenômeno ter sido o breve período que antecede a liofilização: quando os *scaffolds* são colocados no liofilizador e o equipamento é

fechado, eles não são imediatamente submetidos à condição de baixa pressão. São necessários vários segundos até que o equipamento atinja as condições para que a sublimação do solvente possa ocorrer. Durante esse intervalo de tempo, as amostras permanecem à temperatura ambiente enquanto a pressão dentro da câmara é diminuída e é possível que a fusão dos cristais de gelo tenha se iniciado na superfície, região dos *scaffolds* que estão em contato imediato com o ambiente da câmara. Outra possibilidade diz respeito ao fluxo viscoso. A ocorrência desse fenômeno durante a sinterização pode ter sido mais intensa nas superfícies das amostras, o que teria causado o maior amolecimento da região exterior, causando uma sinterização mais intensa. Quaisquer que sejam as causas que levaram à formação dessa camada mais densa na superfície, sua presença faz com que a porosidade dos *scaffolds* seja fechada, pois não há conexão dos poros com a superfície das amostras.

No entanto, vale destacar que a presença dessa camada superficial não é um impedimento para a utilização dos *scaffolds* em ETO, pois, pensando em aplicações comerciais, é possível que as amostras sejam processadas para a remoção dessa “casca” através de lixamento ou usinagem. Isso deixaria o interior poroso exposto e melhoraria o contato dos *scaffolds* como o ambiente biológico, tornando mais eficiente a regeneração do tecido danificado [6]. Destaca-se, ainda, o fato de as imagens de micro-CT evidenciarem uma distribuição homogênea de poros por todo o volume das amostras. Esse é um aspecto importante ao se pensar na aplicação dos *scaffolds* em ETO, uma vez que esses componentes devem prover um meio adequado para a adesão de células em sua superfície e para o desenvolvimento do tecido no interior da estrutura [16,123].

A menor porosidade das amostras sinterizadas por 2 h é confirmada pelos gráficos das Figuras 27 e 28, que exibem os valores de porosidade, distribuição de tamanhos e tamanhos médios de poros obtidos para os *scaffolds* com a análise de micro-CT. Os valores correspondem à média entre as medições realizadas em duas amostras referentes a cada tempo de sinterização. Observa-se não apenas que aquelas sinterizadas por 2 h são menos porosas, mas também que seus poros são menores. Além disso, os gráficos da Figura 28 mostram que os *scaffolds* submetidos à sinterização por 4 h apresentam

menor heterogeneidade em relação ao tamanho de poros e que as amostras sinterizadas por 8 h apresentaram porosidade total menor que as de 4 h, consequência da sinterização. Já foi discutido que a presença da camada superficial mais densa impediu que a porosidade dos *scaffolds* fosse aberta, pois a conexão das estruturas de poros com a superfície é impedida. No entanto, a Figura 27 indica que a maior parte da porosidade das amostras é aberta. Isso ocorre porque as medidas de porosidade por micro-CT foram realizadas excluindo-se o volume correspondente a essa “casca”. Portanto, a discussão sobre a porosidade dos *scaffold* será feita considerando-se apenas os valores de porosidade total, sabendo-se que essa porosidade é majoritariamente (senão completamente) fechada.

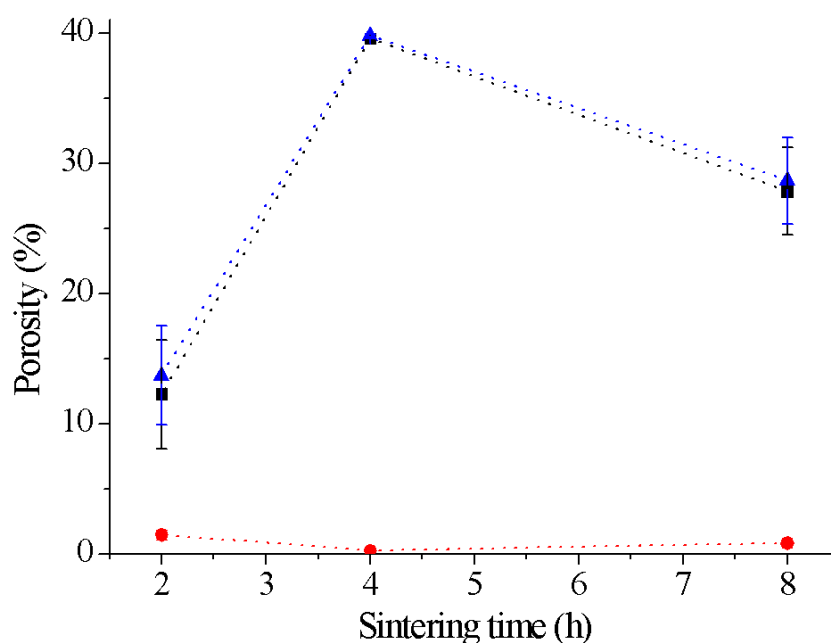


Figura 27 - Porosidades aberta, fechada e total dos *scaffolds* em função do tempo de sinterização.

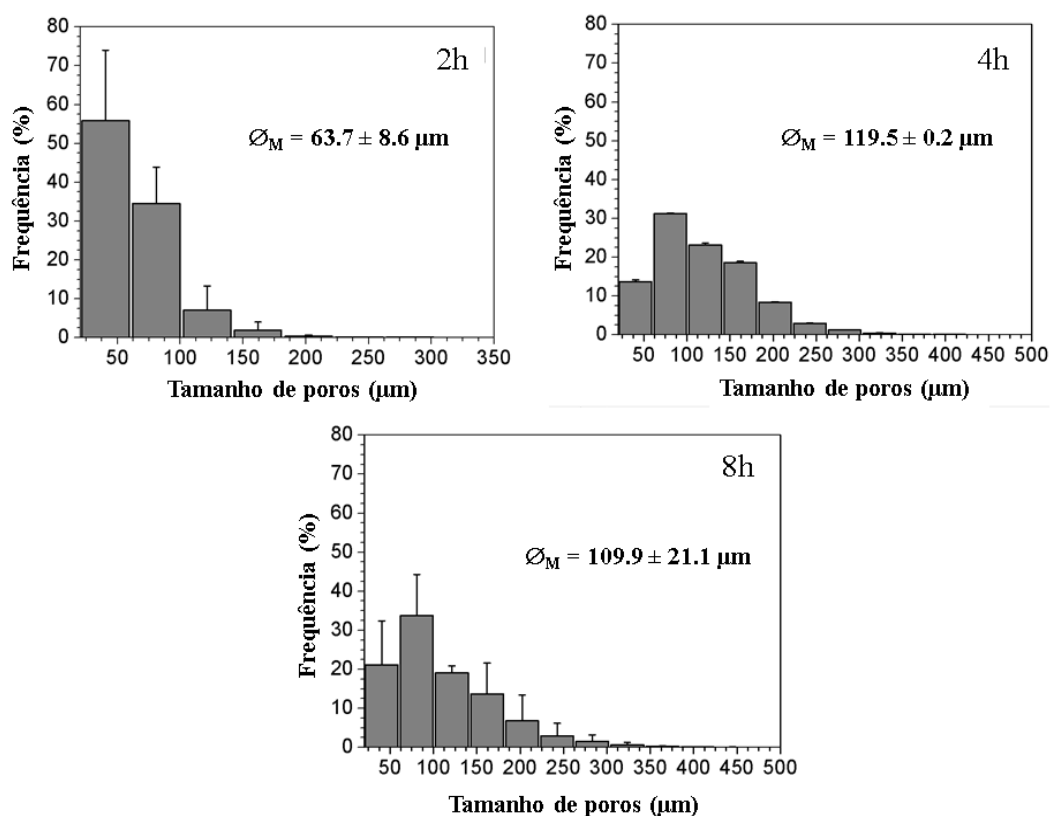


Figura 28 – Tamanho médio e distribuição de tamanhos de poros dos *scaffolds* em função do tempo de sinterização.

As porosidades totais verificadas para as amostras sinterizadas por 2, 4 e 8 h são iguais a $13,7 \pm 3,9 \%$, $39,8 \pm 0,1 \%$ e $28,7 \pm 3,3 \%$, respectivamente. Esses valores não são adequados para aplicação em ETO, pois *scaffolds* devem viabilizar condições para facilitar que fenômenos biológicos (osteogênese, osteoindução, osteocondução e angiogênese) possam ocorrer e, para isso, estudos mencionam que é necessária uma porosidade mínima de 50 % e um alto grau de interconectividade de poros [4,34,35]. Trabalhos envolvendo a fabricação de *scaffolds* do VB 13-93 por meio da técnica *freeze-casting* obtiveram valores mais promissores: Fu *et al.* [64], ao prepararem *scaffolds* em meio aquoso e em uma mistura de água e dioxano, conseguiram obter porosidades que variaram entre 40 e 75 % e entre 35 e 70 %, respectivamente. As amostras de Liu *et al.* [61], preparadas utilizando-se canfeno, apresentavam porosidade de cerca de 50 %. É necessário considerar que os parâmetros de processo (condições de resfriamento, carga de sólidos, temperatura e tempo de sinterização etc.) e a técnica utilizada para caracterização da porosidade nesses estudos citados não são os mesmos

daqueles adotados neste trabalho de pesquisa, de modo que diferenças são esperadas. No entanto, os valores de porosidade exibidos na Figura 27 são muito baixos. A provável causa para isso é que as análises de micro-CT foram realizadas utilizando-se pixels de 20 μm , o que não permite uma boa resolução e impede a detecção de poros menores que este valor. Esse foi um dos motivos para a utilização de outras técnicas de caracterização para avaliar a porosidade das amostras.

Em relação às dimensões dos poros, verifica-se que sua distribuição de tamanhos é relativamente ampla para os *scaffolds* sinterizados por 4 e 8 h. Embora a maior parte dos poros apresente menos de 150 μm de diâmetro, uma fração considerável está dentro da faixa de tamanhos de 100 a 300 μm , que, de acordo com a literatura [4,34,35], é a ideal para dar suporte ao crescimento do tecido ósseo. Esse resultado é, portanto, satisfatório em relação aos objetivos do trabalho. Além disso, esses valores obtidos são maiores que aqueles verificados para *scaffolds* do VB 13-93 em estudos citados na revisão bibliográfica [61,64], cujos tamanhos de poros não ultrapassaram 150 μm . No trabalho de Fu *et al.* [64], por exemplo, os *scaffolds* produzidos utilizando-se a técnica *freeze-casting* em água apresentavam poros com espaçamento interlamelar de 20 a 30 μm . Já aqueles com estrutura de poros colunar, produzidos em uma mistura de água e dioxano, tinham poros com diâmetro variando entre 90 e 110 μm .

Ainda em relação à porosidade dos *scaffolds*, ao contrário do que foi observado para as amostras submetidas a 4 e 8 h de sinterização, os valores de porosidade e tamanhos de poros das amostras sinterizadas por 2 h estão em desacordo com a relação que existe entre a duração do processo e o grau de densificação de amostras sinterizadas. Como não foram encontrados trabalhos sobre *scaffolds* de VBs que relatam que sinterizações mais longas tenham resultado em maiores porosidades e tamanhos de poros, não foi possível uma comparação com outros estudos.

Entretanto, especula-se que o maior tempo de tratamento térmico aplicado às amostras sinterizadas por 4 e 8 h ocasionou a coalescência de poros pequenos, o que teria aumentado seus tamanhos. Se isso de fato aconteceu, provavelmente a sinterização por 2 h não foi longa o suficiente para que os poros coalescessem, e eles permaneceram

pequenos. Já a redução de porosidade observada entre 4 e 8 h teria sido efeito da sinterização que de fato ocorreu após a coalescência dos poros ter atingido um limite a partir do qual seu crescimento já não era mais possível. Também não foram encontrados estudos que relatassem, para *scaffolds* de VBs ou cerâmicas bioativas, o aumento do tamanho dos poros durante a sinterização. Mas alguns trabalhos citam o fenômeno da coalescência de poros em materiais cerâmicos. Yoon [124], em seu estudo sobre cerâmicas pertencentes ao sistema $MgO-CaMgSiO_4$, escreve que o aumento da porosidade não é incomum durante a sinterização de materiais cerâmicos particulados se a temperatura de sinterização é muito alta ou o tempo de processo é muito longo. Ele cita que na sinterização em estado sólido de alguns óxidos, o aumento da porosidade acontece devido ao crescimento de poros isolados, enquanto na sinterização com formação de fase líquida (fluxo viscoso), além do aumento de tamanho de poros isolados, ocorre também a coalescência de poros devido à migração destes dentro da estrutura. Os trabalhos de Varela *et al.* [125] e Whittemore e Sipe [126] também mencionam o crescimento de poros durante a sinterização de óxidos cerâmicos. Segundo os autores, em materiais que possuem uma distribuição muito ampla de tamanhos de partículas, os poros são bem pequenos, pois os espaços entre as partículas maiores são preenchidos por aquelas que são mais finas. Durante a sinterização, a contração volumétrica da amostra é inibida pelas partículas grandes, que são relativamente inertes. Então, à medida que as partículas finas se densificam, grandes espaços vazios são formados nos espaços entre as partículas grandes, resultando no aumento do tamanho médio dos poros.

Com base no que foi apresentado no parágrafo anterior, é razoável presumir que o aumento da porosidade e dos tamanhos de poros nos *scaffolds* produzidos tenham ocorrido por pelo menos um dos mecanismos mencionados. É importante lembrar que a composição do VB 13-93 facilita a ocorrência do fluxo viscoso durante a sinterização e, neste caso, o aumento da porosidade estaria de acordo com aquilo que é relatado no trabalho de Yoon [124]. Por outro lado, a análise por Granulometria a Laser mostrou que as partículas utilizadas no processo *freeze-casting* apresentavam uma distribuição de tamanhos bastante ampla. Considerando esta característica, é possível que este

fenômeno tenha ocorrido de acordo com o que é descrito por Varela *et al.* [125] e Whittemore e Sipe [126].

- **Microscopia Eletrônica de Varredura**

As micrografias obtidas por MEV são apresentadas nas Figuras 29 e 30, que mostram imagens das seções transversais paralelas e perpendiculares ao sentido de solidificação das amostras. Algumas características observadas nessas imagens estão em concordância com aquelas verificadas por micro-CT: os poros estão homogeneamente distribuídos por todo o volume das amostras, é evidente a morfologia não lamelar e não orientada da estrutura, a distribuição de tamanhos de poros é bastante ampla, principalmente nas amostras sinterizadas por 4 e 8 h e, na Figura 30, que permite a comparação entre duas diferentes escalas, fica perceptível a maior porosidade e os maiores tamanhos de poros dos *scaffolds* sinterizados por 4 h, bem como os menores volume e tamanhos de poros daqueles submetidos a 2 h de sinterização. Outro aspecto importante de ser destacado é que as imagens de MEV deixam evidente a presença de poros inferiores a 20 μm , o que sustenta a tese de que a resolução utilizada nas análises de micro-CT de fato não foi suficiente para detectar todos os poros presentes nas estruturas. Dessa forma, fica confirmado que os valores de porosidade apresentados na Figura 27 não correspondem às verdadeiras porosidades dos *scaffolds*, que, na verdade, apresentam volumes de poros superiores àqueles mensurados por micro-CT.

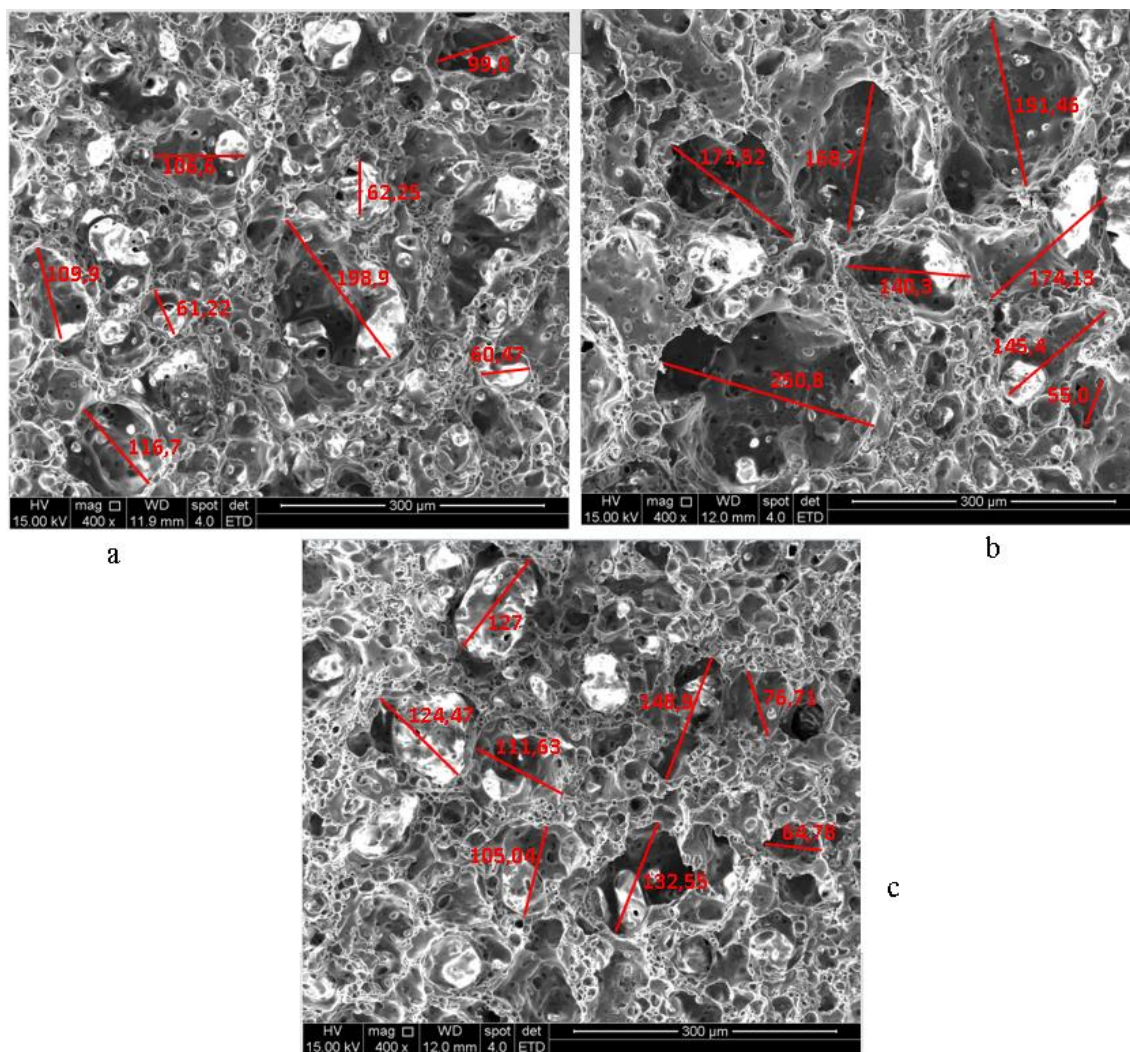


Figura 29 – Micrografias de MEV das seções transversais paralelas ao sentido de solidificação dos *scaffolds* sinterizados por 2 h (a), 4 h (b) e 8 h (c).

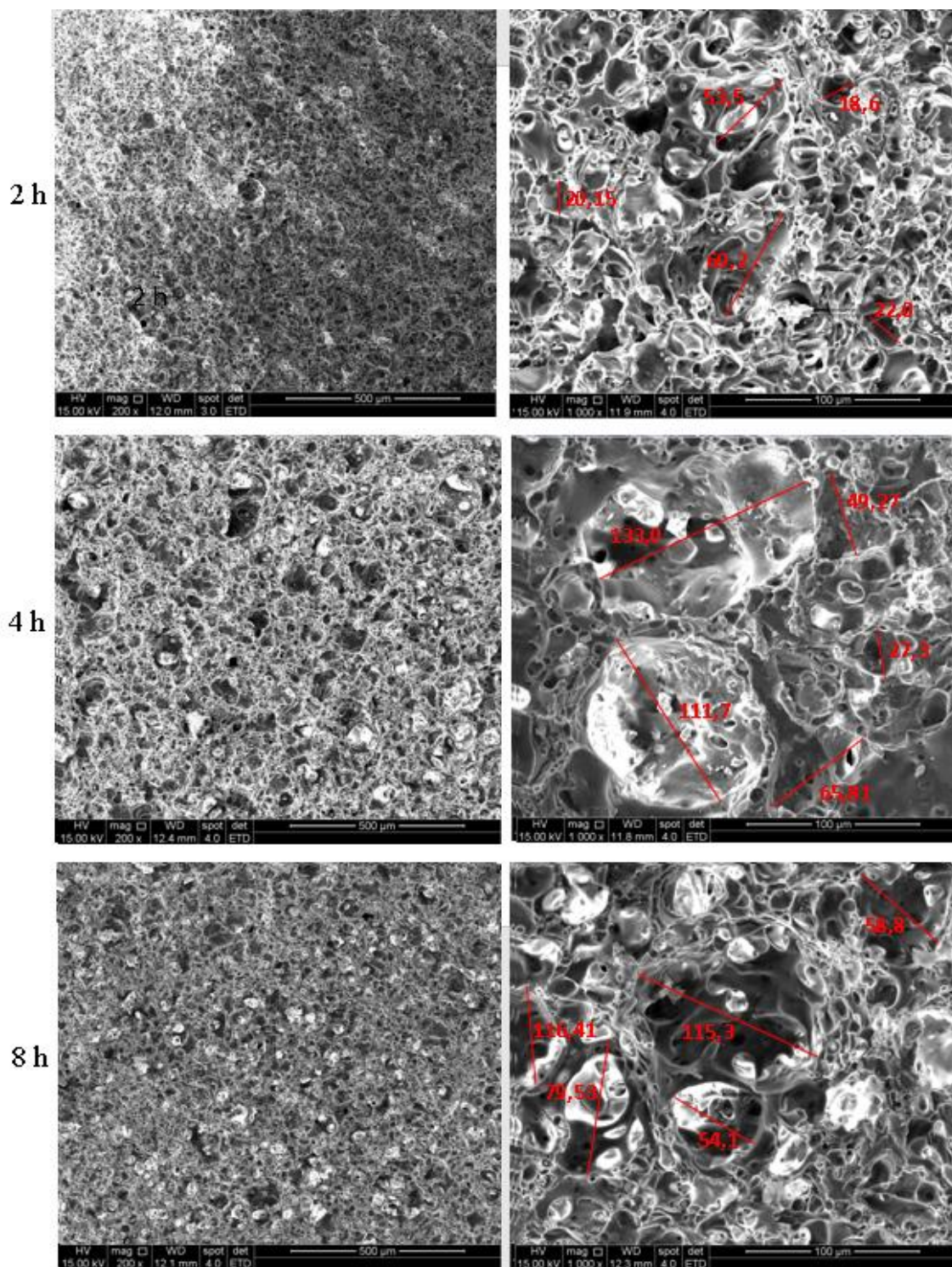


Figura 30 - Micrografias de MEV das seções transversais perpendiculares ao sentido de solidificação dos *scaffolds*.

As estruturas de poros completamente desordenada e com poros de tamanhos tão variados verificada nas imagens são mais uma comprovação de que o processo *freeze-casting* não ocorreu de maneira adequada. Conforme discutido previamente, as partículas de VB utilizadas não eram tão finas quanto o que é reportado na literatura [61,64,71,75 – 77,79,114], o que provavelmente contribuiu para a instabilidade da suspensão e provável decantação no momento de vazamento nos moldes. Não foram encontrados estudos em que algo similar tenha ocorrido. No único artigo encontrado em que *scaffolds* do VB 13-93 foram fabricados com a utilização de água como meio dispersante [64], foi possível a obtenção da estrutura de poros lamelar e orientada. Neste estudo não é mencionado o diâmetro médio das partículas, mas é dito que elas não ultrapassavam o tamanho de 5 μm , o que indica uma distribuição granulométrica muito mais fina que aquela obtida para este trabalho.

As retas traçadas nas imagens exibidas nas Figuras 29 e 30 (medidas em micrômetros) permitem mensurar o tamanho médio de poros dos *scaffolds* e comparar com aqueles obtidos por micro-CT (Figura 28). A Tabela 6 mostra que, de fato, as amostras sinterizadas por 4 h apresentam poros maiores e aquelas submetidas a 2 h de sinterização possuem os menores tamanhos de poros. Além disso, fica evidente os *scaffolds*, principalmente aqueles sinterizados por 4 e 8 h, apresentam poros de tamanhos consideráveis e adequados para sua utilização em ETO.

Tabela 6 - Tamanhos médios de poros obtidos por Micro-CT e MEV

Tempo de sinterização (h)	Tamanho médio de poros (μm)	
	Micro-CT	MEV
2	63,7 \pm 8,6	76,8 \pm 47,9
4	119,5 \pm 0,2	129,6 \pm 62,6
8	109,9 \pm 21,1	101,2 \pm 29,6

Outro aspecto importante visualizado nas imagens de MEV é a presença de quantidade considerável de poros pequenos, inferiores a 20 μm . Essa característica reforçou a hipótese de que as porosidades medidas por micro-CT não condizem com os

verdadeiros volumes de poros dos *scaffolds*, uma vez que a resolução utilizada na análise não permitia a detecção de poros menores que 20 μm . É válido lembrar, inclusive, que a presença de poros pequenos, principalmente em escala nanométrica, facilita a adesão de células durante o desenvolvimento do tecido, desempenhando um papel importante na capacidade de regeneração óssea de *scaffolds* [4,12,34]. Por isso a visualização desses poros nas imagens de MEV é um resultado importante para os objetivos do trabalho.

A camada superficial densificada foi visualizada através das análises de MEV de maneira ainda mais nítida que nas imagens de micro-CT, como pode ser verificado na Figura 31. Como já mencionado, a presença dessa “casca” faz com que a porosidade dos *scaffolds* seja fechada, o que não é ideal. No entanto, é importante destacar que, apesar disso, as imagens de MEV (Figuras 29 e 30) revelam uma estrutura de poros altamente interconectada. Essa característica, assim como a ampla distribuição de tamanhos, é imprescindível para o crescimento do tecido dentro da estrutura [61] e extremamente favorável à aplicação dessas estruturas em ETO [4,6,8].

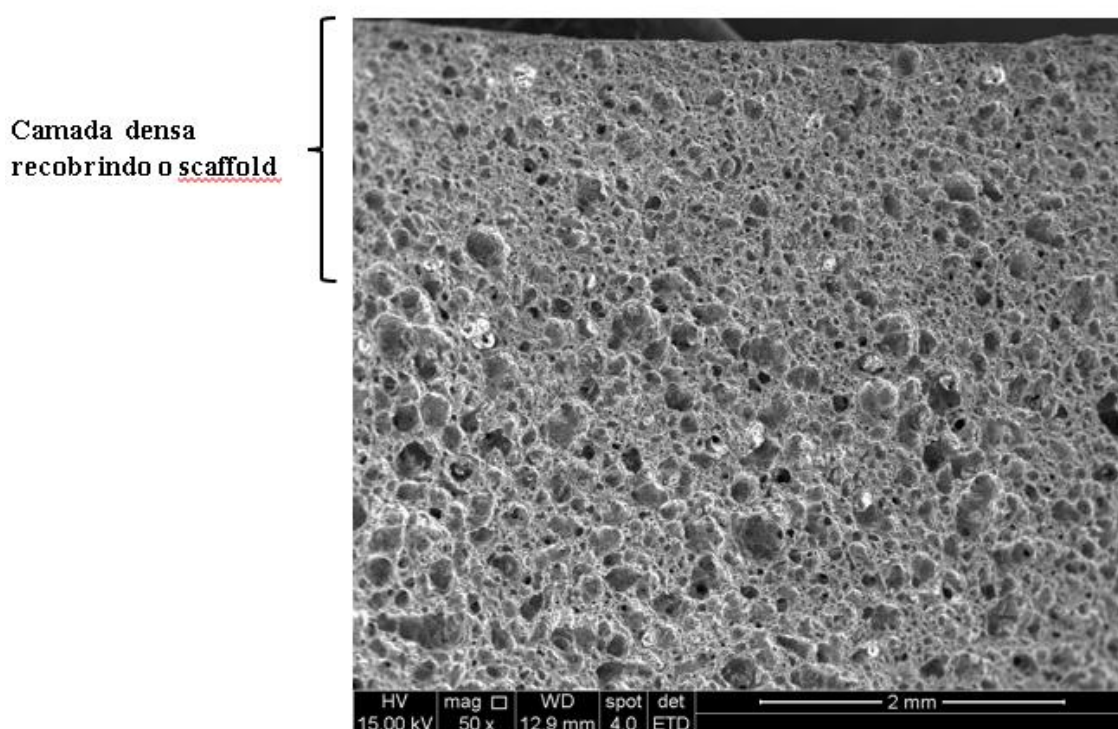


Figura 31 – Micrografia de MEV evidenciando a presença de uma camada densa na superfície do *scaffold*.

- **Picnometria de gás Hélio**

As análises de picnometria de He foram realizadas com o intuito de complementar as características de porosidade dos *scaffolds*. A porosidade desses materiais foi estimada através da Equação (2) após a obtenção da porosidade aparente através desta técnica de caracterização. A Tabela 7 exibe os valores de densidade obtidos e as porosidades calculadas para as amostras e confirmam que a amostra sinterizada por 2 h é a menos porosa, enquanto aquela submetida a 4 h de sinterização possui maior volume de poros. É importante lembrar que os valores exibidos correspondem à porosidade fechada, uma vez que o maior grau de densificação da superfície dos *scaffolds* impediu que os poros presentes no interior atingissem a superfície das amostras.

Tabela 7 - Porosidade e densidade aparente dos *scaffolds* obtidos por picnometria de He

Amostra	Densidade aparente (g·cm⁻³)	Porosidade (%)
2 h	0,99 ± 0,02	63
4 h	0,88 ± 0,02	67
8 h	0,92 ± 0,02	65

Os valores de porosidade exibidos na Tabela 7 são consideravelmente mais elevados que aqueles verificados por micro-CT. Como já mencionado, isso se deve à baixa resolução utilizada na técnica de microtomografia, que impediu a detecção de poros inferiores a 20 µm, os quais foram claramente visualizados nas micrografias de MEV. Isso explica as porosidades mais elevadas que foram calculadas por meio da Equação (2) e garantem resultados mais promissores para a aplicação dos *scaffolds* em ETO, que requer porosidades elevadas para otimizar o desenvolvimento do tecido dentro das estruturas [28,127]. Como já mencionado na discussão sobre os resultados obtidos por micro-CT, estudos que utilizaram o VB 13-93 na produção de *scaffolds* por *freeze-casting* [61,64] obtiveram porosidades que variavam entre 40 e 70 %, a depender da carga de sólidos utilizada, tipo de solvente, taxa de resfriamento durante a solidificação e outros parâmetros de processo.

Considerando-se a etapa de sinterização e a avaliação das porosidades dos *scaffolds* através das três técnicas utilizadas, é importante destacar que a maior parte dos estudos envolvendo o preparo de *scaffolds* com o VB 13-93 relatam que a sinterização foi realizada a 700 °C [61,62,105,106,128] ou um pouco abaixo [64,103], enquanto para outros biomateriais e VBs com outras composições não é incomum a necessidade da utilização de temperaturas a partir de 1000 °C [54,82,129,130]. O fato de, neste estudo, ter sido possível realizar este processo a 650 °C é relevante não apenas no que concerne a questão de impedir a cristalização do material, mas também em relação à economia de energia, aspecto importante a ser considerado em caso de produção em maior escala.

5.2.2. Propriedades mecânicas dos *scaffolds*

As curvas de tensão x deformação e os valores de propriedades mecânicas obtidos para os *scaffolds* são apresentados na Figuras 32 e 33 e na Tabela 8, na qual também consta as propriedades dos ossos trabecular e cortical. Os picos e vales presentes nas curvas podem estar relacionados à quebra progressiva da estrutura [62]. Os valores obtidos estão coerentes com as porosidades dos *scaffolds*: a amostra 4 h, devido ao seu maior volume de poros, se mostrou a mais frágil dentre as três; a resistência à compressão da amostra 8 h, por sua vez, deixa claro o efeito do tempo de sinterização sobre as propriedades mecânicas quando comparada àquela sinterizada por 4 horas; já amostra 2 h, menos porosa, apresentou propriedades comparáveis à da amostra 8 h.

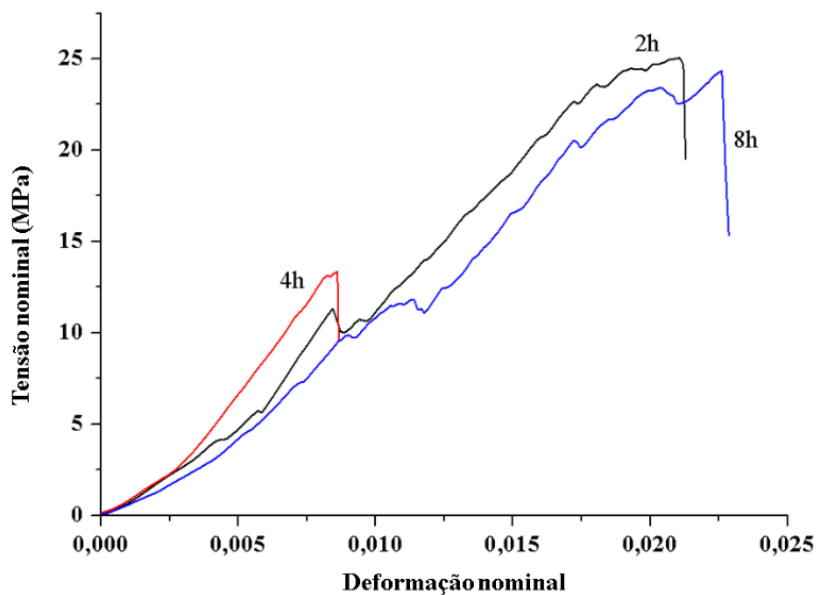


Figura 32 – Curvas de tensão x deformação obtidas para os *scaffolds*.

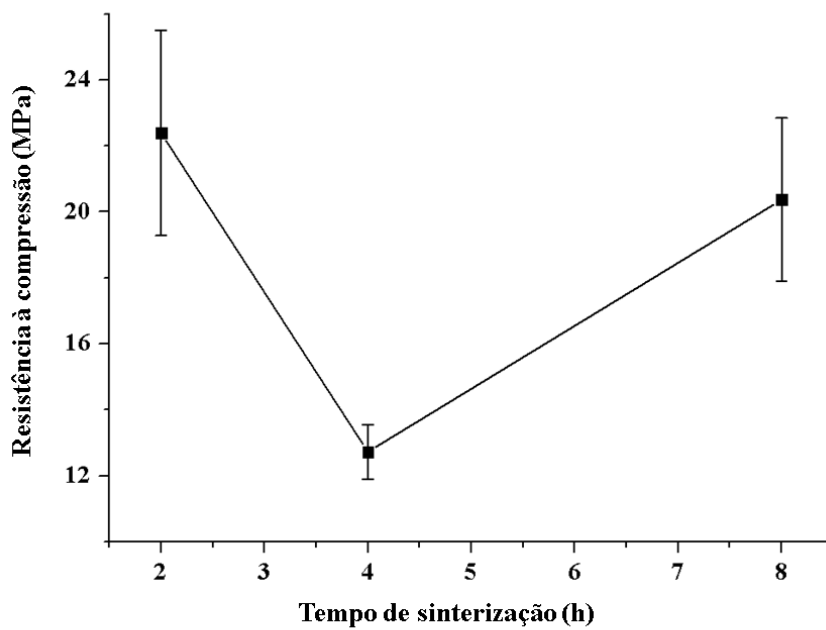


Figura 33 - Valores de resistência à compressão dos *scaffolds*.

Tabela 8 - Valores de propriedades mecânicas e de porosidade dos *scaffolds* produzidos e dos ossos trabecular e cortical

Amostra / Material	Propriedade			
	Módulo de Young (GPa)	Resistência à compressão (MPa)	Tenacidade (J·m ⁻³)	Porosidade aferida por picnometria de gás He (%)
<i>Scaffold</i> 2h	1.24 ± 0.01	22,4 ± 3,1	26.9 × 10 ⁻²	63
<i>Scaffold</i> 4h	1.40 ± 0.02	12,7 ± 0,8	5 × 10 ⁻²	67
<i>Scaffold</i> 8h	1.10 ± 0.01	20,4 ± 2,5	27 × 10 ⁻²	65
Osso trabecular	0,1 a 5 [64]	2 a 12 [34,131]	----	----
Osso cortical	5 a 20 [64]	100 a 150 [106]	----	----

Os dados apresentados na Tabela 8 mostram que as estruturas apresentam propriedades mecânicas compatíveis com aquelas do osso trabecular, exibindo, inclusive, valores de resistência à compressão ainda mais elevados. De acordo com Deville [13], um equilíbrio entre propriedades mecânicas e porosidade de *scaffolds* produzidos por *freeze-casting* é atingido quando esta grandeza fica entre 40 e 60%. Essa informação reforça o fato de que os *scaffolds* preparados apresentam potencial para aplicação em ETO, pois valores de resistência à compressão elevados foram obtidos mesmo com valores de porosidade superiores a 60%.

Scaffolds de VBs com porosidade não orientada preparados via processo sol-gel ou replicação polimérica, com porosidade entre 75 e 90%, frequentemente apresentam rigidez e resistência à compressão em uma faixa compatível com o osso trabecular, mas inapropriados para defeitos em regiões em que grandes solicitações mecânicas estão presentes [30,59,60,103]. Para o caso de *scaffolds* com estrutura de poros orientada, é comum valores de propriedades mecânicas que superam aquelas do osso trabecular, mas ainda insuficientes para o osso cortical. Como detalhado na Seção 3.2.3, Liu *et al.* [59] utilizaram canfeno como meio dispersante para o processo *freeze-casting* e produziram *scaffolds* do VB 13-93 com tamanho médio de poros de 100 µm e cerca de 50% de

porosidade cujos valores de resistência à compressão variaram entre 35 ± 11 e 47 ± 5 MPa, enquanto o módulo de Young das estruturas ficou na faixa de 8 ± 3 a 11 ± 3 GPa. Em outro estudo deste mesmo grupo [74], também envolvendo o preparo de *scaffolds* do VB 13-93 por *freeze-casting*, amostras com 60 % de porosidade e poros com diâmetro de 115 ± 50 μm apresentavam resistência mecânica de 16 ± 2 MPa e módulo de Young igual a $4 \pm 0,1$ GPa. No estudo de Fu *et al.* [62], os *scaffolds* produzidos por *freeze-casting* em água apresentaram poros lamelares com tamanhos entre 20 e 30 μm e resistência à compressão que variou entre 5 MPa (para estruturas com 75% de porosidade) e cerca de 20 MPa (para porosidade de 40%). Já as amostras preparadas utilizando-se uma mistura de água e dioxano exibiram estrutura de poros colunar, com tamanhos de poros entre 90 e 110 μm e resistência à compressão de 10 MPa e 50 MPa para porosidades de 70 e 35%, respectivamente.

A Figura 34 apresenta, para *scaffolds* mencionados no parágrafo anterior, valores de resistência à compressão em função da porosidade. Também constam no gráfico os valores referentes às amostras preparadas neste trabalho (pontos circulados), sendo que foram utilizadas as porosidades calculadas por meio da Equação (2), e não aquelas mensuradas por micro-CT. Fica claro que os valores de resistência à compressão dos *scaffolds* produzidos neste estudo são compatíveis com aqueles verificados para amostras com porcentagens de poros semelhantes, o que reforça a tese de que a microtomografia de raios-X não foi capaz de detectar todos os poros das amostras e que as porosidades obtidas por meio da Equação (2) são mais condizentes com os verdadeiros volumes de poros das estruturas. Se os *scaffolds* apresentassem as porcentagens de poros medidas por micro-CT (que variavam entre aproximadamente 14 %, para aqueles sinterizados por 2 h, e cerca de 39 %, para aqueles sinterizados por 4 h), seria mais provável que os valores de resistência à compressão estivessem acima de 25 MPa, assim como verificado, de maneira geral, para aquelas estruturas com porosidades inferiores ou iguais a 50 %.

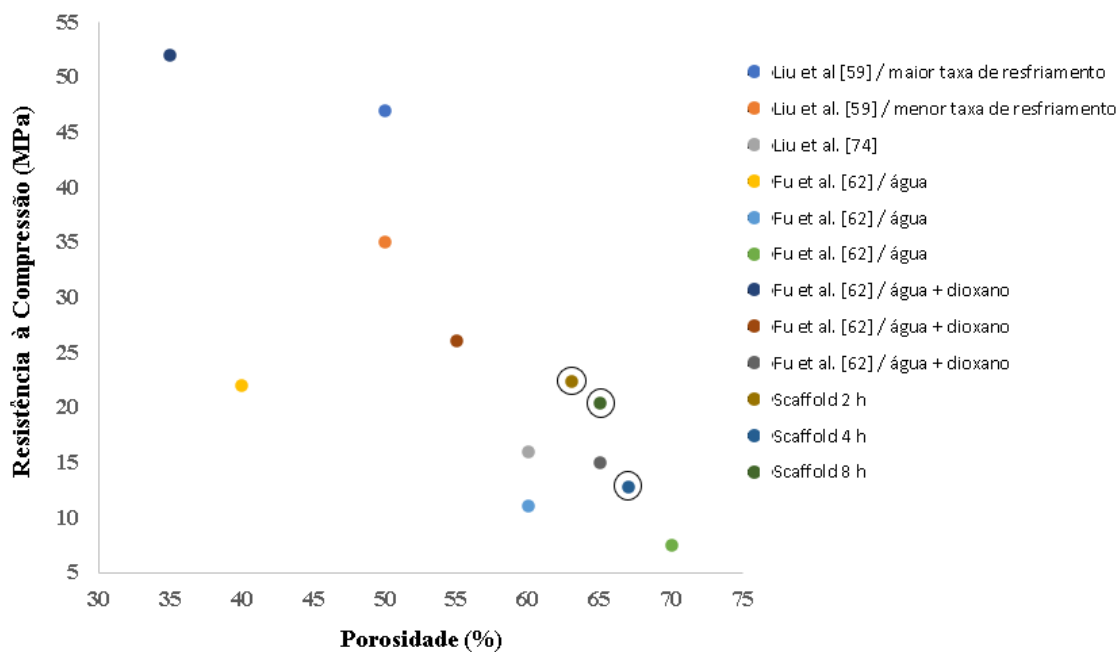


Figura 34 – Resistência mecânica x porosidade para *scaffolds* do VB 13-93 produzidos por *freeze-casting*. Os pontos circulados correspondem aos *scaffolds* preparados neste trabalho.

5.2.3. Imersão em SBF

As Figuras 35, 36 e 37 exibem, para cada tempo de sinterização, os espectros de FTIR obtidos após imersão dos fragmentos dos *scaffolds* em SBF por 1, 3, 7, 14 e 21 dias, bem como os espectros das amostras antes da imersão (0 dia).

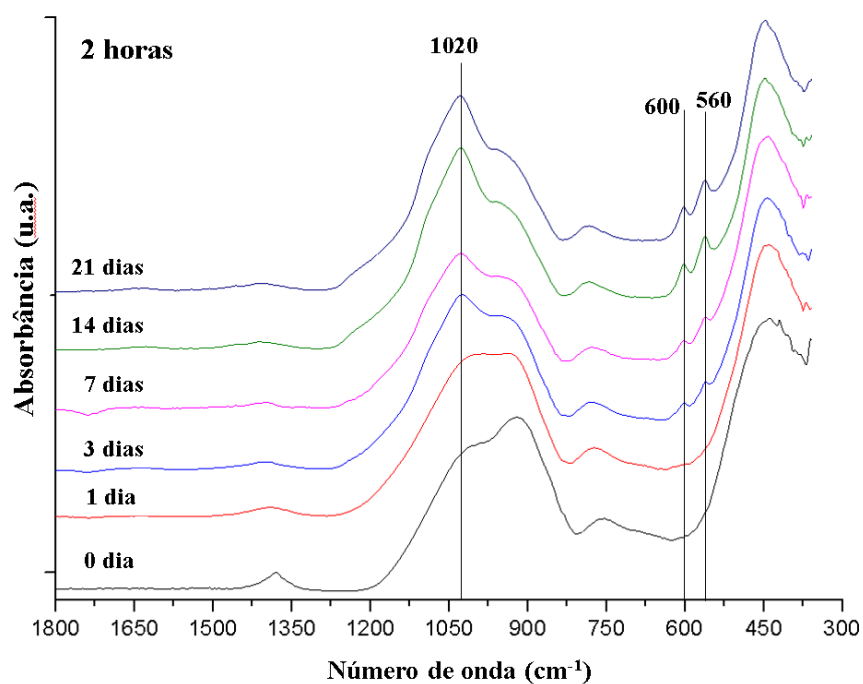


Figura 35 - Espectros FTIR dos *scaffolds* sinterizados por 2 horas para diversos períodos de imersão em SBF e para a amostra não imersa.

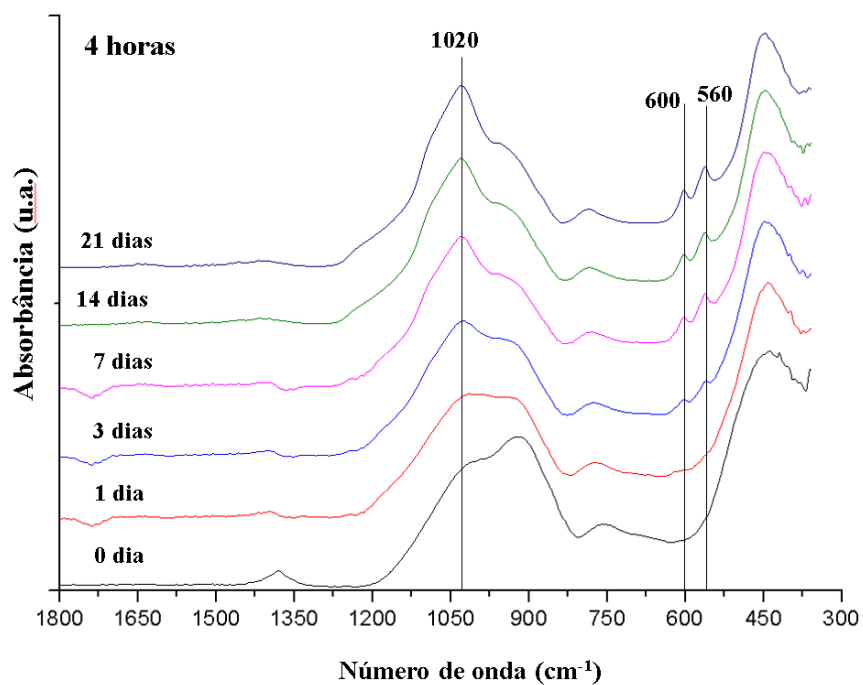


Figura 36 - Espectros FTIR dos *scaffolds* sinterizados por 4 horas para diversos períodos de imersão em SBF e para amostra não imersa.

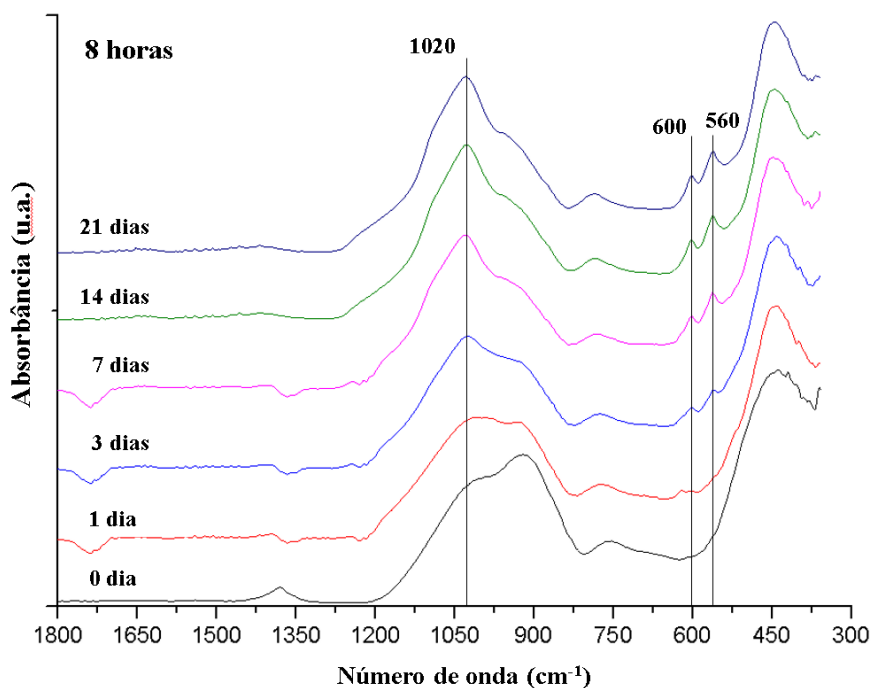


Figura 37 - Espectros FTIR dos *scaffolds* sinterizados por 8 horas para diversos períodos de imersão em SBF e para amostra não imersa.

Alterações no espectro de FTIR já são observadas com 1 e 3 dias de imersão em SBF, embora as bandas surgidas em 1020, 600 e 560 cm^{-1} tenham apresentado intensidades mais significativas apenas a partir de 7 dias em solução. Essas bandas são associadas aos grupos fosfato (PO_4^{3-}) presentes na estrutura da HA [132,133] e também foram verificadas por Deliormanli e Yildirim [55] para seu VB 13-93 obtido via síntese sol-gel. Os testes de bioatividade foram feitos com a mesma concentração de VB por volume de solução (1 mg/mL), embora as análises tenham sido feitas com material particulado e apenas após 30 dias de imersão. Para fim de comparação, a Figura 38 exibe o espectro FTIR deste mineral, disponível na base de dados RRUFF (<https://rruff.info/>). Fica claro que as bandas que surgiram nos *scaffolds* após imersão em SBF correspondem àquelas de maior intensidade no espectro da HA, indicando a formação desse composto sobre a superfície do material.

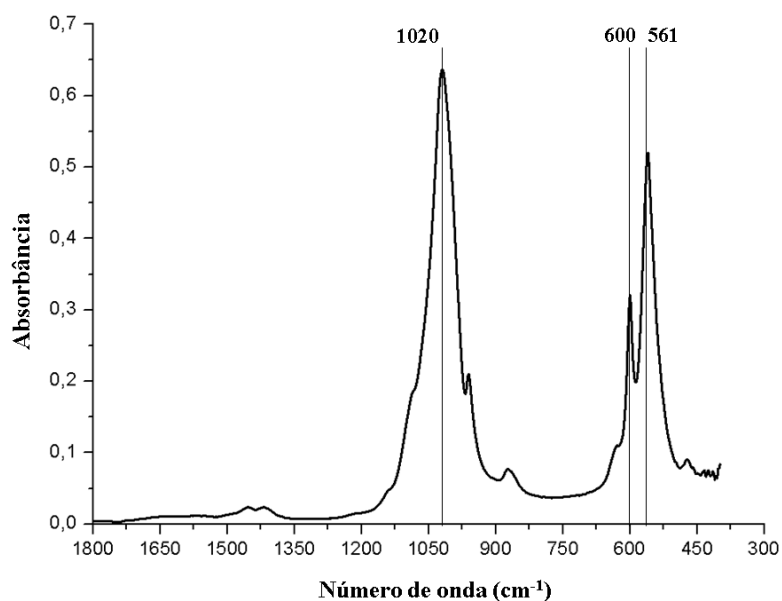


Figura 38– Espectro FTIR da hidroxiapatita (fonte: <https://rruff.info/>).

As Figuras 39, 40 e 41 apresentam, para cada tempo de sinterização, os difratogramas da amostra antes da imersão e SBF e dos fragmentos de *scaffolds* após imersão por 1, 3, 7, 14 e 21 dias. Comparando-se os resultados de antes e depois dos testes de bioatividade, verifica-se o aparecimento de vários picos de difração apontados em diversos estudos [105,108,118,134,135] como correspondentes à HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e à fase Combeíta ($\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$). Além disso, para todos os tempos de sinterização, a quantidade de picos aumenta com o tempo de imersão.

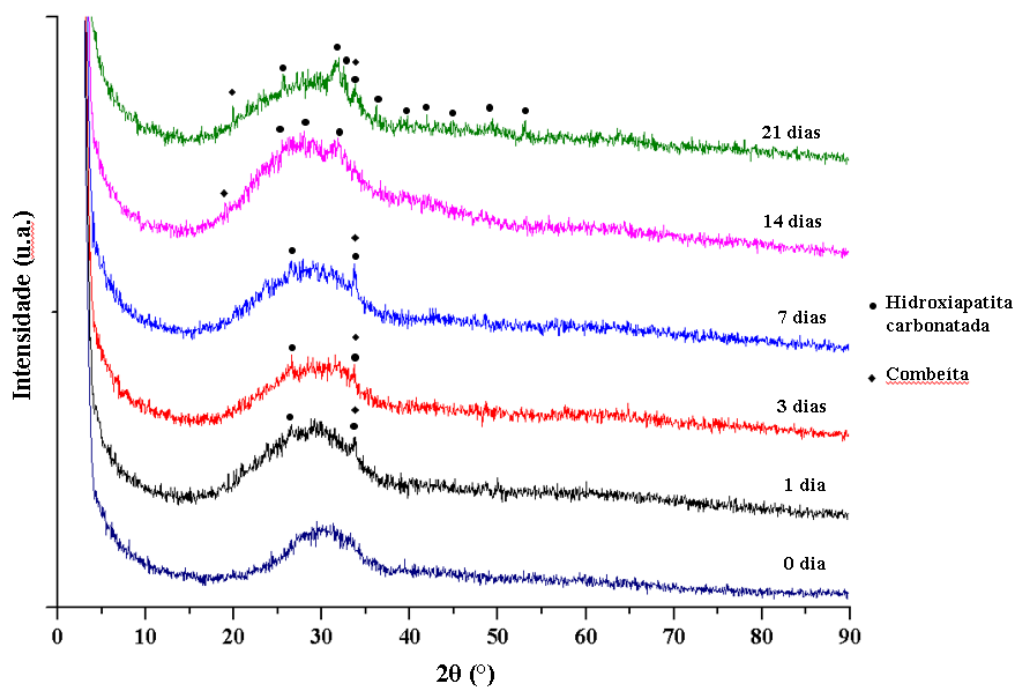


Figura 39 – Padrões de DRX dos *scaffolds* sinterizados por 2 h para diferentes períodos de imersão em SBF e para amostra não imersa.

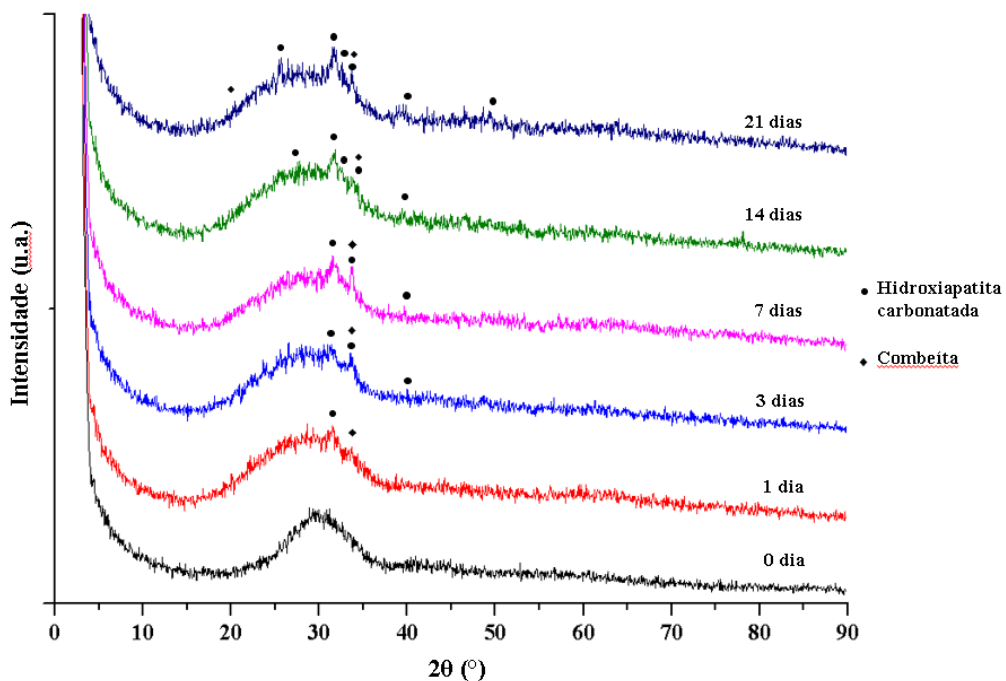


Figura 40 – Padrões de DRX dos *scaffolds* sinterizados por 4 h para diferentes períodos de imersão em SBF e para amostra não imersa.

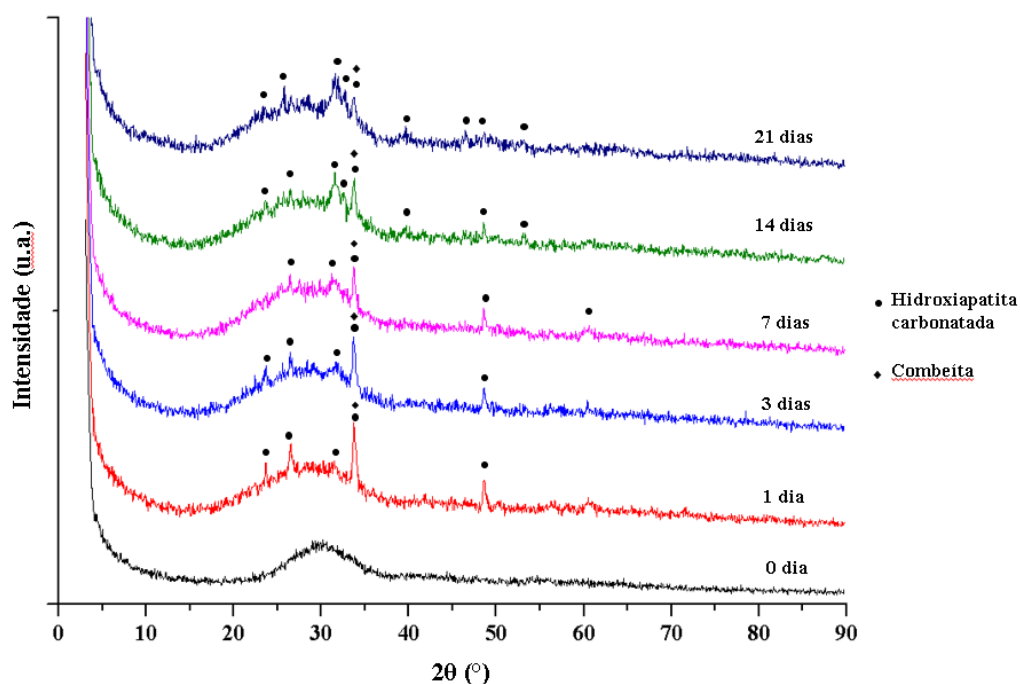


Figura 41 – Padrões de DRX dos *scaffolds* sinterizados por 8 h para diferentes períodos de imersão em SBF e para amostra não imersa.

A Figura 42 exibe o padrão de DRX da HA obtido na base de dados JCPDS (09-0432), pelo qual se nota que os picos de maior intensidade ($2\theta \sim 26^\circ$, $2\theta \sim 32^\circ$ e $2\theta \sim 33^\circ$), bem como outros de intensidade intermediária, coincidem com vários daqueles observados nos padrões dos *scaffolds*, principalmente após 14 e 21 dias de imersão. Os picos em torno de 26° e 32° também foram citados por Maçon *et al.* [118] e Moghanian *et al.* [136] como evidência para a formação de HA em seus estudos com VBs.

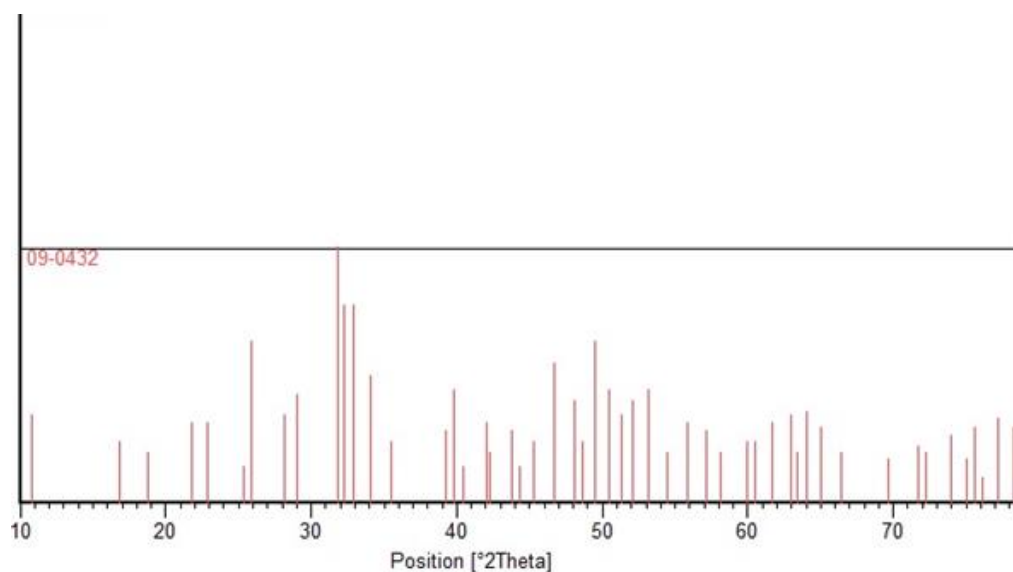


Figura 42 -Padrão de DRX da HA obtido na base de dados JCPDS.

As micrografias de MEV reforçam os resultados anteriores. Imagens referentes a 0, 1, 7 e 21 dias de imersão em SBF são apresentadas na Figura 43 para cada tempo de sinterização. De acordo com Jones [40], o desenvolvimento da camada de HA em partículas do VB 13-93 pode levar até 7 dias, enquanto para partículas de tamanho similar do 45S5, esse fenômeno ocorre dentro de 8 h. As imagens de MEV deixam claro que, após 7 dias em SBF, já é possível verificar o surgimento dos agregados globulares que caracterizam a HA [68,97,137]. Esse resultado está de acordo com Mehatlaf *et al.* [68], que, após esse período de tempo, observaram glóbulos semelhantes na superfície de *scaffolds* produzidos com VB 13-93 obtido por síntese sol-gel. Deliormanli e Yildirim [55] também verificaram a formação da camada de HA na superfície de seu vidro, embora a imersão do material em SBF tenha sido por 30 dias. Portanto, assim como verificado com as análises de FTIR e DRX, os resultados obtidos por MEV mostram que a formação da HA fica mais evidente a partir do sétimo dia de imersão, apesar de haver indícios de que o processo tenha começado antes disso.

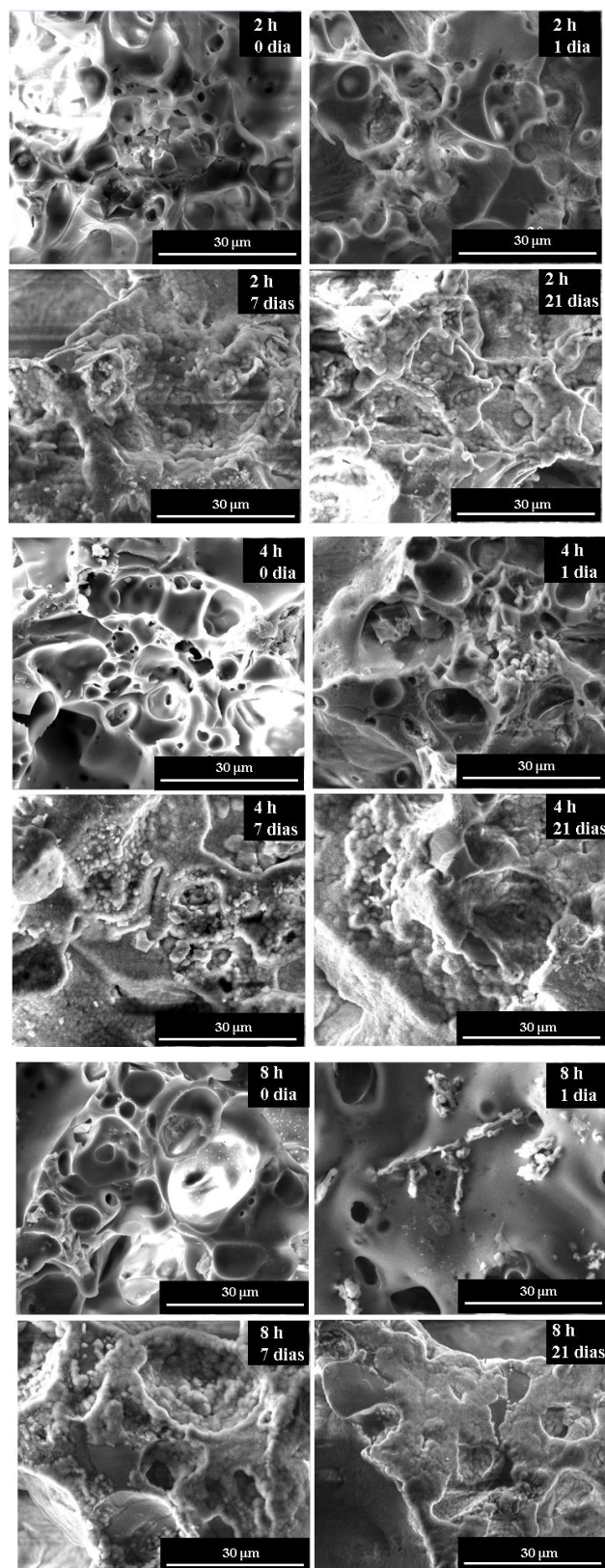


Figura 43 – Micrografias de MEV do VB, para cada tempo de sinterização, para 0, 1, 7 e 21 dias de imersão em SBF.

5.2.4. Conclusões

A avaliação da porosidade dos *scaffolds* após sinterização revelou uma estrutura de poros não lamelar e sem orientação. O provável motivo para isso foi a distribuição granulométrica relativamente grosseira das partículas utilizadas no processo *freeze-casting*, cujos tamanhos eram maiores que aqueles tipicamente utilizados nesta técnica. Isso pode ter resultado tanto na instabilidade da suspensão quanto na impossibilidade de se replicar a morfologia dos cristais do solvente. Considerou-se, ainda, a possibilidade de que tenha ocorrido fluxo viscoso durante a sinterização, fenômeno que pode ter exercido algum grau de influência sobre a morfologia da estrutura de poros obtida, embora não se tenha encontrado trabalhos que reportassem que a sinterização com formação de fase líquida pudesse influenciar de maneira tão intensa as características de porosidade de estruturas sinterizadas.

No entanto, as estruturas de poros dos *scaffolds* apresentam algumas características bastante favoráveis à sua aplicação em ETO. Foi constatado, para os três tempos de sinterização, que os poros são homoganeamente distribuídos nas amostras e apresentam alto grau de interconectividade. Os valores de porosidade mensurados após caracterização por Picnometria de He satisfazem os requisitos exigidos para *scaffolds* utilizados em ETO, e a comparação com dados da literatura mostrou que essas porosidades são similares ou mais elevadas que aquelas verificadas em vários outros estudos, inclusive naqueles em que a técnica *freeze-casting* foi executada com água. Nos casos específicos das amostras sinterizadas por 4 e 8 h, foram verificados tamanhos médios de poros que ultrapassam 100 μm e distribuição de tamanhos bastante ampla, com a presença de poros muito pequenos e outros que chegam a duas ou três centenas de diâmetro. Essas características são desejáveis em componentes utilizados para regeneração óssea, uma vez que poros grandes possibilitam maior suporte à regeneração do tecido e poros pequenos contribuem para a adesão de células na superfície do material. Em relação à densa camada superficial, foi discutido que sua presença não é um impedimento para a aplicação dos *scaffolds*, uma vez que existe a possibilidade de se utilizar processos adequados para sua retirada.

Outro aspecto importante de ser mencionado é que a sinterização dos *scaffolds* foi possível de ser realizada sem a ocorrência de cristalização. Sendo um dos objetivos do trabalho, esse resultado é muito importante por garantir que as amostras preparadas apresentem maior bioatividade do que teriam caso fases cristalinas tivessem se desenvolvido durante o tratamento térmico. No que diz respeito às propriedades mecânicas, que são influenciadas pela sinterização, os *scaffolds* produzidos apresentam módulos de Young compatíveis com o osso trabecular humano e resistência à compressão mais elevadas que os valores encontrados na literatura para esse tipo de osso. Além disso, as propriedades mecânicas das estruturas preparadas neste estudo são condizentes com aquelas de estruturas com porosidades semelhantes relatadas em outros trabalhos.

Os ensaios de imersão em SBF permitiram a constatação da bioatividade dos *scaffolds* produzidos. A presença da camada de HA foi confirmada por diferentes técnicas de caracterização e a comparação com outros estudos realizados com o VB 13-93 permitiu a verificação de características semelhantes que identificam a formação desse mineral, inclusive em relação ao tempo necessário para o desenvolvimento deste composto sobre a superfície dos *scaffolds*.

Com base nos resultados aqui resumidos, é possível concluir que, apesar de alguns resultados inesperados, o trabalho de pesquisa foi bem-sucedido, pois foi possível produzir *scaffolds* que são de fato bioativos, que puderam ser sinterizados sem ocorrência de cristalização e que apresentam propriedades mecânicas promissoras. Todas essas características indicam que as estruturas produzidas apresentam potencial para aplicação em ETO.

CAPÍTULO 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para trabalhos futuros é possível citar:

- A fim de se atingir a composição nominal do VB 13-93, investigar como a alteração de parâmetros da síntese sol-gel, ordem de adição e tipo de sais precursores, catalisador, tempo de condensação, envelhecimento e de secagem etc., influenciam a incorporação dos óxidos na rede de sílica;
- Investigar como os parâmetros de síntese e a composição do vidro influenciam a área superficial específica do vidro sintetizado, uma vez que não foram encontrados estudos que tenham se debruçado sobre essa questão, apenas menções à hipótese de que baixos valores de área superficial específica não são incomuns para VBs de composições complexas;
- Visando maior eficiência no processo *freeze-casting*, e obtenção de uma estrutura de poros lamelar e orientada, utilizar técnicas de moagem mais eficientes e peneira com malha mais fina que 38 μm , de forma a garantir a obtenção de partículas de VB consideravelmente mais finas do que aquelas que foram possíveis de se obter com a moagem em moinho de bolas;
- Avaliar se a etapa de solidificação, durante o processo *freeze-casting*, pode ser realizada a taxas de resfriamento menores, sem a utilização de nitrogênio líquido, para avaliar a influência desse parâmetro sobre a estrutura de poros dos *scaffolds*, objetivando a obtenção de poros maiores;
- Utilizar liofilizadores que operem em temperaturas negativas, a fim de se averiguar se o motivo para a formação da camada superficial densificada foi, de fato, o tempo que os *scaffolds* passaram dentro do equipamento antes de a pressão atingir o valor necessário para a sublimação ocorrer;

- Verificar se a sinterização é possível de ser realizada a temperaturas ainda mais baixas sem comprometer as propriedades mecânicas das estruturas preparadas;
- Por fim, propõe-se a realização de estudos de viabilidade celular, como ensaios MTT e LIVE/DEAD, em complementação aos ensaios de bioatividade por imersão em SBF.

CAPÍTULO 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor, in: Biomater. Sci. An Introd. to Mater. Third Ed., Third Edit, Elsevier, 2013: pp. xxv–xxxix. doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00153-4.
- [2] S. Yue, H. He, B. Li, T. Hou, Hydrogel as a biomaterial for bone tissue engineering: A review, Nanomaterials. 10 (2020) 1–25. doi:10.3390/nano10081511.
- [3] L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I. Bartolotti, B. Grigolo, *Scaffolds* for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives, Mater. Sci. Eng. C. 78 (2017) 1246–1262. doi:10.1016/j.msec.2017.05.017.
- [4] G.L. Koons, M. Diba, A.G. Mikos, Materials design for bone-tissue engineering, Nat. Rev. Mater. 5 (2020) 584–603. doi:10.1038/s41578-020-0204-2.
- [5] L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee, Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, J. Biomed. Mater. Res. 5 (1971) 117–141. doi:10.1002/jbm.820050611.
- [6] G. Turnbull, J. Clarke, F. Picard, P. Riches, L. Jia, F. Han, B. Li, W. Shu, 3D bioactive composite *scaffolds* for bone tissue engineering, Bioact. Mater. 3 (2018) 278–314. doi:10.1016/j.bioactmat.2017.10.001.
- [7] L.L. Hench, The story of Bioglass®, J. Mater. Sci. Mater. Med. 17 (2006) 967–978. doi:10.1007/s10856-006-0432-z.
- [8] K. Deshmukh, T. Kovářik, T. Křenek, D. Docheva, T. Stich, J. Pola, Recent advances and future perspectives of sol-gel derived porous bioactive glasses: a review, RSC Adv. 10 (2020) 33782–33835. doi:10.1039/d0ra04287k.
- [9] Y. Ding, M.T. Souza, W. Li, D.W. Schubert, A.R. Boccaccini, J.A. Roethner, Bioactive Glass-Biopolymer Composites for Applications in Tissue Engineering. In: Antoniac I. (eds), in: Iulian Vasile Antoniac (Ed.), Handb. Bioceram. Biocomposites, Springer, Cham, 2016: pp. 325–356. doi:10.1007/978-3-319-

12460-5_17.

- [10] E.P. Erasmus, O.T. Johnson, I. Sigalas, J. Massera, Effects of Sintering Temperature on Crystallization and Fabrication of Porous Bioactive Glass *Scaffolds* for Bone Regeneration, *Sci. Rep.* 7 (2017). doi:10.1038/s41598-017-06337-2.
- [11] Q. Nawaz, A. de Pablos-Martín, J. Martins de Souza e Silva, L. Berthold, K. Hurle, A.T. Contreras Jaimes, M. Sitarz, D.S. Brauer, A.R. Boccaccini, Crystallization study of sol–gel derived 13-93 bioactive glass powder, *J. Eur. Ceram. Soc.* 41 (2021) 1695–1706. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2020.09.052.
- [12] S. Deville, *Freeze-casting* of porous biomaterials: Structure, properties and opportunities, *Materials (Basel)*. 3 (2010) 1913–1927. doi:10.3390/ma3031913.
- [13] K.L. Scotti, D.C. Dunand, Freeze casting – A review of processing, microstructure and properties via the open data repository, *FreezeCasting.net*, *Prog. Mater. Sci.* 94 (2018) 243–305. doi:10.1016/j.pmatsci.2018.01.001.
- [14] M. Erol-Taygun, I. Unalan, M.I.B. Idris, J.F. Mano, A.R. Boccaccini, Bioactive Glass-Polymer Nanocomposites for Bone Tissue Regeneration Applications: A Review, *Adv. Eng. Mater.* 21 (2019). doi:10.1002/adem.201900287.
- [15] T. Winkler, F.A. Sass, G.N. Duda, K. Schmidt-Bleek, A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge, *Bone Jt. Res.* 7 (2018) 232–243. doi:10.1302/2046-3758.73.BJR-2017-0270.R1.
- [16] A.R. Amini, C.T. Laurencin, S.P. Nukavarapu, Bone tissue engineering: Recent advances and challenges, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 40 (2012) 363–408. doi:10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i5.10.
- [17] N. Shadjou, M. Hasanzadeh, Bone tissue engineering using silica-based mesoporous nanobiomaterials:Recent progress, *Mater. Sci. Eng. C.* 55 (2015) 401–409. doi:10.1016/j.msec.2015.05.027.
- [18] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, *An Introduction to Materials in Medicine*, 2004.

- [19] M.N. Rahaman, D.E. Day, B. Sonny Bal, Q. Fu, S.B. Jung, L.F. Bonewald, A.P. Tomsia, Bioactive glass in tissue engineering, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2355–2373. doi:10.1016/j.actbio.2011.03.016.
- [20] R.S. Katari, A. Peloso, G. Orlando, Tissue engineering, *Adv. Surg.* 48 (2014) 137–154. doi:10.1016/j.yasu.2014.05.007.
- [21] S. Pina, J.M. Oliveira, R.L. Reis, Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review, *Adv. Mater.* 27 (2015) 1143–1169. doi:10.1002/adma.201403354.
- [22] Z. Ahmadi, F. Moztarzadeh, Synthesizing and Characterizing of Gelatin-Chitosan-Bioactive Glass (58s) *Scaffolds* for Bone Tissue Engineering, *Silicon.* 10 (2018) 1393–1402. doi:10.1007/s12633-017-9616-z.
- [23] W. Xiao, M.A. Zaem, G. Li, B. Sonny Bal, M.N. Rahaman, Tough and strong porous bioactive glass-PLA composites for structural bone repair, *J. Mater. Sci.* 52 (2017) 9039–9054. doi:10.1007/s10853-017-0777-3.
- [24] W.C. Lepry, S.N. Nazhat, Sol–Gel-Derived Glasses for Bone Tissue Engineering, in: A.R. Boccaccinni, D.S. Brauer, L. Hupa (Eds.), *Bioact. Glas. Fundam. Technol. Appl.*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2017: pp. 496–521. doi:10.1039/9781782622017-FP001.
- [25] R.F. Canadas, S. Pina, A.P. Marques, J.M. Oliveira, R.L. Reis, Cartilage and Bone Regeneration-How Close Are We to Bedside?, in: J. Laurence, P. Baptista, A. Atala (Eds.), *Transl. Regen. Med. to Clin.*, 1st ed., Elsevier Inc., 2016: pp. 89–106. doi:10.1016/B978-0-12-800548-4.00007-3.
- [26] M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7591–7621. doi:10.1016/j.actbio.2013.04.012.
- [27] L.C. Junqueira, J. Carneiro, *Histologia básica: Texto e Atlas*, 12^a, Guanabara Koogan LTDA, Rio de Janeiro - RJ, 2013.
- [28] W. Wang, K.W.K. Yeung, Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review, *Bioact. Mater.* 2 (2017) 224–247.

doi:10.1016/j.bioactmat.2017.05.007.

- [29] J.R. Jones, L.M. Ehrenfried, L.L. Hench, Optimising bioactive glass *scaffolds* for bone tissue engineering, *Biomaterials*. 27 (2006) 964–973. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.07.017.
- [30] F.N. Alaribe, S.L. Manoto, S.C.K.M. Motaung, *Scaffolds* from biomaterials: Advantages and limitations in bone and tissue engineering, *Biologia (Bratisl)*. 71 (2016) 353–366. doi:10.1515/biolog-2016-0056.
- [31] X. Liu, M.N. Rahaman, Evaluation of bioactive glass (13-93) *scaffolds* with an oriented microstructure for regenerating load-bearing bones, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 1465 (2012) 13–19. doi:10.1557/opl.2012.963.
- [32] A.A. Review, K. Klimek, Proteins and Peptides as Important Modifiers of the Polymer Scaffolds for Tissue Engineering, *Polymers (Basel)*. 12 (2020). doi:10.3390/polym12040844.
- [33] L.C. Gerhardt, A.R. Boccaccini, Bioactive glass and glass-ceramic *scaffolds* for bone tissue engineering, *Materials (Basel)*. 3 (2010) 3867–3910. doi:10.3390/ma3073867.
- [34] F. Baino, E. Fiume, M. Miola, E. Verné, Bioactive sol-gel glasses: Processing, properties, and applications, *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 15 (2018) 841–860. doi:10.1111/ijac.12873.
- [35] E. Fiume, J. Barberi, E. Verné, F. Baino, Bioactive glasses: From parent 45S5 Composition to *Scaffold*-Assisted Tissue-Healing Therapies, *J. Funct. Biomater.* 9 (2018). doi:10.3390/jfb9010024.
- [36] P. Valerio, M.H.R. Guimarães, M.M. Pereira, M.F. Leite, A.M. Goes, Primary osteoblast cell response to sol-gel derived bioactive glass foams, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 16 (2005) 851–856. doi:10.1007/s10856-005-3582-5.
- [37] A.A. El-Rashidy, J.A. Roether, L. Harhaus, U. Kneser, A.R. Boccaccini, Regenerating bone with bioactive glass *scaffolds*: A review of in vivo studies in bone defect models, *Acta Biomater.* 62 (2017) 1–28. doi:10.1016/j.actbio.2017.08.030.

- [38] Q. Fu, E. Saiz, M.N. Rahaman, A.P. Tomsia, Bioactive glass *scaffolds* for bone tissue engineering: State of the art and future perspectives, *Mater. Sci. Eng. C* 31 (2011) 1245–1256. doi:10.1016/j.msec.2011.04.022.
- [39] V. Miguez-Pacheco, L.L. Hench, A.R. Boccaccini, Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft tissues, *Acta Biomater.* 13 (2015) 1–15. doi:10.1016/j.actbio.2014.11.004.
- [40] J.R. Jones, Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, *Acta Biomater.* 23 (2015) S53–S82. doi:10.1016/j.actbio.2015.07.019.
- [41] R.A. Martin, S. Yue, J. V. Hanna, P.D. Lee, R.J. Newport, M.E. Smith, J.R. Jones, Characterizing the hierarchical structures of bioactive sol-gel silicate glass and hybrid *scaffolds* for bone regeneration, *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 370 (2012) 1422–1443. doi:10.1098/rsta.2011.0308.
- [42] C. Vichery, J.M. Nedelec, Bioactive glass nanoparticles: From synthesis to materials design for biomedical applications, *Materials (Basel)*. 9 (2016). doi:10.3390/ma9040288.
- [43] A. Talal, S.K. Hamid, M. Khan, A.S. Khan, Structure of biological apatite: Bone and tooth, in: A.S. Khan, A.A. Chaudhry (Eds.), *Handb. Ion. Substituted Hydroxyapatites*, Elsevier Ltd, 2020: pp. 1–19. doi:10.1016/B978-0-08-102834-6.00001-X.
- [44] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials*. 27 (2006) 2907–2915. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [45] A. Moghanian, A. Sedghi, A. Ghorbanoghli, E. Salari, The effect of magnesium content on in vitro bioactivity, biological behavior and antibacterial activity of sol-gel derived 58S bioactive glass, *Ceram. Int.* 44 (2018) 9422–9432. doi:10.1016/j.ceramint.2018.02.159.
- [46] I. Cacciotti, M. Lombardi, A. Bianco, A. Ravaglioli, L. Montanaro, Sol-gel derived 45S5 bioglass: Synthesis, microstructural evolution and thermal behaviour, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 1849–1866. doi:10.1007/s10856-

012-4667-6.

- [47] G. Kaur, V. Kumar, F. Baino, J.C. Mauro, G. Pickrell, I. Evans, O. Bretcanu, Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: State-of-the-art review and future challenges, *Mater. Sci. Eng. C*. 104 (2019) 109895. doi:10.1016/j.msec.2019.109895.
- [48] H. Elsayed, A.R. Romero, D. Bellucci, V. Cannillo, E. Bernardo, Advanced open-celled structures from low-temperature sintering of a crystallization-resistant bioactive glass, *Materials (Basel)*. 12 (2019). doi:10.3390/ma12223653.
- [49] M. Montazerian, J.F. Schneider, B.E. Yekta, V.K. Marghussian, A.M. Rodrigues, E.D. Zanotto, Sol-gel synthesis, structure, sintering and properties of bioactive and inert nano-apatite-zirconia glass-ceramics, *Ceram. Int.* 41 (2015) 11024–11045. doi:10.1016/j.ceramint.2015.05.047.
- [50] W.C. Lepry, S. Naseri, S.N. Nazhat, Effect of processing parameters on textural and bioactive properties of sol-gel-derived borate glasses, *J. Mater. Sci.* 52 (2017) 8973–8985. doi:10.1007/s10853-017-0968-y.
- [51] A.A.R. de Oliveira, Síntese e caracterização de Espumas Híbridas Vidro Bioativo / PVA para Aplicação em Engenharia de Tecidos, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=121755.
- [52] M.M. Falk, T.J. Kowal, R.M. Almeida, M. Saad, M.K. Marei, U. Thamma, H. Jain, Sol-Gel Glass and Nano-Macro Porous Bioscaffold, in: A.R. Boccaccini, D.S. Brauer, L. Hupa (Eds.), *Bioact. Glas. Fundam. Technol. Appl.*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2017: pp. 105–135. doi:10.1039/9781782622017-FP001.
- [53] J.R. Jones, Sol-Gel Derived Glasses for Medicine, in: J.R. Jones, A.G. Clare (Eds.), *Bio-Glasses An Introd.*, 1st ed., John Wiley & Sons, Ltd., 2012: pp. 29–44. doi:10.1002/9781118346457.ch3.
- [54] D.M.M. dos Santos, S.M. de Carvalho, M.M. Pereira, M. Houmard, E.H.M.

- Nunes, Freeze-cast composite *scaffolds* prepared from sol-gel derived 58S bioactive glass and polycaprolactone, *Ceram. Int.* 45 (2019) 9891–9900. doi:10.1016/j.ceramint.2019.02.030.
- [55] A.M. Deliormanlı, M. Yıldırım, Sol-gel synthesis of 13-93 bioactive glass powders containing therapeutic agents, *J. Aust. Ceram. Soc.* 52 (2016) 9–19.
- [56] R. Müller, E.D. Zanotto, V.M. Fokin, Surface crystallization of silicate glasses: Nucleation sites and kinetics, *J. Non. Cryst. Solids.* 274 (2000) 208–231. doi:10.1016/S0022-3093(00)00214-3.
- [57] M. Brink, The influence of alkali and alkaline earths on the working range for bioactive glasses, *J. Biomed. Mater. Res.* 36 (1997) 109–117. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199707)36:1<109::AID-JBM13>3.0.CO;2-D.
- [58] C. Blaeß, R. Müller, G. Poologasundarampillai, D.S. Brauer, Sintering and concomitant crystallization of bioactive glasses, *Int. J. Appl. Glas. Sci.* 10 (2019) 449–462. doi:10.1111/ijag.13477.
- [59] B.-J. Skrifvars, M. Hupa, R. Backman, M. Hiltunen, Sintering of FBC ashes, *Fuel.* 73 (1994) 171–176.
- [60] H. Djohari, J.J. Derby, Transport mechanisms and densification during sintering: II. Grain boundaries, *Chem. Eng. Sci.* 64 (2009) 3810–3816. doi:10.1016/j.ces.2009.05.022.
- [61] X. Liu, M.N. Rahaman, Q. Fu, A.P. Tomsia, Porous and strong bioactive glass (13-93) *scaffolds* prepared by unidirectional freezing of camphene-based suspensions, *Acta Biomater.* 8 (2012) 415–423. doi:10.1016/j.actbio.2011.07.034.
- [62] Q. Fu, M.N. Rahaman, B. Sonny Bal, R.F. Brown, D.E. Day, Mechanical and in vitro performance of 13-93 bioactive glass *scaffolds* prepared by a polymer foam replication technique, *Acta Biomater.* 4 (2008) 1854–1864. doi:10.1016/j.actbio.2008.04.019.
- [63] E. Coon, A.M. Whittier, B.M. Abel, E.L. Stapleton, R. Miller, Q. Fu, Viscosity and crystallization of bioactive glasses from 45S5 to 13-93, *Int. J. Appl. Glas.*

- Sci. 12 (2021) 65–77. doi:10.1111/ijag.15837.
- [64] Q. Fu, M.N. Rahaman, B.S. Bal, R.F. Brown, Preparation and in vitro evaluation of bioactive glass (13-93) *scaffolds* with oriented microstructures for repair and regeneration of load-bearing bones, J. Biomed. Mater. Res. - Part A. 93 (2010) 1380–1390. doi:10.1002/jbm.a.32637.
- [65] D. Groh, F. Döhler, D.S. Brauer, Bioactive glasses with improved processing. Part 1. Thermal properties, ion release and apatite formation, Acta Biomater. 10 (2014) 4465–4473. doi:10.1016/j.actbio.2014.05.019.
- [66] S. Fagerlund, J. Massera, M. Hupa, L. Hupa, T-T-T behaviour of bioactive glasses 1-98 and 13-93, J. Eur. Ceram. Soc. 32 (2012) 2731–2738. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2011.10.040.
- [67] H. Arstila, E. Vedel, L. Hupa, H. Ylänen, M. Hupa, Measuring the Devitrification of Bioactive Glasses, Key Eng. Mater. 254–256 (2004) 67–70. doi:10.4028/www.scientific.net/kem.254-256.67.
- [68] A.A. Mehatlaf, S.B.H. Farid, A.A. Atiyah, Synthesis and Characterisation of Bioactive Glass 13-93 *Scaffolds* for Bone Tissue Regeneration, IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng. 1067 (2021) 012136. doi:10.1088/1757-899x/1067/1/012136.
- [69] E. Boccardi, F.E. Ciraldo, A.R. Boccaccini, Bioactive glass-ceramic *scaffolds*: Processing and properties, MRS Bull. 42 (2017) 226–232. doi:10.1557/mrs.2017.28.
- [70] L.M. Henning, S. Zavareh, P.H. Kamm, M. Höner, H. Fischer, J. Banhart, F. Schmidt, A. Gurlo, Manufacturing and Characterization of Highly Porous Bioactive Glass Composite *Scaffolds* Using Unidirectional Freeze Casting, Adv. Eng. Mater. 19 (2017) 1–9. doi:10.1002/adem.201700129.
- [71] M. Mozafari, F. Moztarzadeh, Synthesis, characterization and biocompatibility evaluation of sol-gel derived bioactive glass *scaffolds* prepared by freeze casting method, Ceram. Int. 40 (2014) 5349–5355. doi:10.1016/j.ceramint.2013.10.115.
- [72] S. Deville, *Freeze-casting* of porous ceramics: A review of current achievements and issues, Adv. Eng. Mater. 10 (2008) 155–169. doi:10.1002/adem.200700270.

- [73] M.M. Porter, J. McKittrick, M.A. Meyers, Biomimetic materials by freeze casting, *J. Miner. Met. Mater. Soc.* 65 (2013) 720–727. doi:10.1007/s11837-013-0606-3.
- [74] M.M. Porter, J. McKittrick, M.A. Meyers, Biomimetic materials by freeze casting, *Jom.* 65 (2013) 720–727. doi:10.1007/s11837-013-0606-3.
- [75] L.D. Lacerda, D.F. Souza, E.H.M. Nunes, M. Houmard, Macroporous alumina structures tailored by *freeze-casting* using naphthalene–camphor as freezing vehicle, *Ceram. Int.* 44 (2018) 16010–16016. doi:10.1016/j.ceramint.2018.06.036.
- [76] X. Liu, M.N. Rahaman, Q. Fu, Oriented bioactive glass (13-93) *scaffolds* with controllable pore size by unidirectional freezing of camphene-based suspensions: Microstructure and mechanical response, *Acta Biomater.* 7 (2011) 406–416. doi:10.1016/j.actbio.2010.08.025.
- [77] K.K. Mallick, Freeze casting of porous bioactive glass and bioceramics, *J. Am. Ceram. Soc.* 92 (2009) 85–94. doi:10.1111/j.1551-2916.2008.02784.x.
- [78] K.K. Mallick, J. Winnett, Preparation and characterization of porous bioglass ® and PLLA *scaffolds* for tissue engineering applications, *J. Am. Ceram. Soc.* 95 (2012) 2680–2686. doi:10.1111/j.1551-2916.2012.05071.x.
- [79] S. Farhangdoust, A. Zamanian, M. Yasaei, M. Khorami, The effect of processing parameters and solid concentration on the mechanical and microstructural properties of freeze-casted macroporous hydroxyapatite *scaffolds*, *Mater. Sci. Eng. C.* 33 (2013) 453–460. doi:10.1016/j.msec.2012.09.013.
- [80] K.H. Zuo, Y.P. Zeng, D. Jiang, Effect of polyvinyl alcohol additive on the pore structure and morphology of the freeze-cast hydroxyapatite ceramics, *Mater. Sci. Eng. C.* 30 (2010) 283–287. doi:10.1016/j.msec.2009.11.003.
- [81] D.M.M. dos Santos, Síntese e caracterização de *scaffolds* do compósito vidro bioativo/policaprolactona obtidos por processo *freeze-casting*, Universidade Federal de Minas Gerais, 2019. <http://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf>.
- [82] K. Lebreton, J.M. Rodríguez-Parra, R. Moreno, M.I. Nieto, Effect of additives on

- porosity of alumina materials obtained by freeze casting, *Adv. Appl. Ceram.* 114 (2015) 296–302. doi:10.1179/1743676115Y.0000000006.
- [83] A.M. Deliormanli, Preparation, in vitro mineralization and osteoblast cell response of electrospun 13-93 bioactive glass nanofibers, *Mater. Sci. Eng. C.* 53 (2015) 262–271. doi:10.1016/j.msec.2015.04.037.
- [84] S. Deville, E. Saiz, A.P. Tomsia, Freeze casting of hydroxyapatite *scaffolds* for bone tissue engineering, *Biomaterials.* 27 (2006) 5480–5489. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.06.028.
- [85] M. Cyr, A. Tagnit-Hamou, Particle size distribution of fine powders by LASER diffraction spectrometry. Case of cementitious materials, *Mater. Struct. Constr.* 34 (2001) 342–350. doi:10.1007/bf02486485.
- [86] U. Stange, M. Scherf-Clavel, H. Gieseler, Application of gas pycnometry for the density measurement of freeze-dried products, *J. Pharm. Sci.* 102 (2013) 4087–4099. doi:10.1002/jps.23723.
- [87] F.J. Semel, D.A. Lados, Porosity analysis of PM materials by helium pycnometry, *Powder Metall.* 49 (2006) 173–182. doi:10.1179/174329006X95347.
- [88] H. Elsayed, P. Colombo, M.C. Crovace, E.D. Zanotto, E. Bernardo, Suitability of Biosilicate® glass-ceramic powder for additive manufacturing of highly porous *scaffolds*, *Ceram. Int.* (2020). doi:10.1016/j.ceramint.2020.11.179.
- [89] P. Sepulveda, J.R. Jones, L.L. Hench, Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses, *J. Biomed. Mater. Res.* 61 (2002) 301–311. doi:10.1002/jbm.10207.
- [90] C. Xu, Y. Bai, S. Yang, H. Yang, D.A. Stout, P.A. Tran, L. Yang, A versatile three-dimensional foam fabrication strategy for soft and hard tissue engineering, *Biomed. Mater.* 13 (2018). doi:10.1088/1748-605X/aaa1f6.
- [91] M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J.P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report),

- Pure Appl. Chem. 87 (2015) 1051–1069. doi:10.1515/pac-2014-1117.
- [92] K. Heister, The measurement of the specific surface area of soils by gas and polar liquid adsorption methods-limitations and potentials, *Geoderma*. 216 (2014) 75–87. doi:10.1016/j.geoderma.2013.10.015.
- [93] J. Epp, X-Ray Diffraction (XRD) Techniques for Materials Characterization, in: *Mater. Charact. Using Nondestruct. Eval. Methods*, Elsevier Ltd, 2016: pp. 81–124. doi:10.1016/B978-0-08-100040-3.00004-3.
- [94] G.C. Pimentel, Infrared spectroscopy: A chemist's tool, *J. Chem. Educ.* 37 (1960) 651. doi:10.1021/ed037p651.
- [95] Eric Dufour, Fundamentals and Principles of Infrared Spectroscopy, in: *Fundam. Princ. Infrared Spectrosc.*, Elsevier Inc., 2009: pp. 3–27. doi:10.1016/B978-0-12-374136-3.00001-8.
- [96] S.T. Ho, D.W. Hutmacher, A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of *scaffolds*, *Biomaterials*. 27 (2006) 1362–1376. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.08.035.
- [97] D. Fernando, N. Attik, M. Cresswell, I. Mokbel, N. Pradelle-Plasse, P. Jackson, B. Grosogeat, P. Colon, Influence of network modifiers in an acetate based sol-gel bioactive glass system, *Microporous Mesoporous Mater.* 257 (2018) 99–109. doi:10.1016/j.micromeso.2017.08.029.
- [98] C. Bossard, H. Granel, É. Jallot, V. Montouillout, F. Fayon, J. Soulié, C. Drouet, Y. Wittrant, J. Lao, Mechanism of Calcium Incorporation Inside Sol-Gel Silicate Bioactive Glass and the Advantage of Using Ca(OH)₂ over Other Calcium Sources, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 5 (2019) 5906–5915. doi:10.1021/acsbmaterials.9b01245.
- [99] E.M. Valliant, C.A. Turdean-Ionescu, J. V. Hanna, M.E. Smith, J.R. Jones, Role of pH and temperature on silica network formation and calcium incorporation into sol-gel derived bioactive glasses, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 1613–1619. doi:10.1039/c1jm13225c.
- [100] Q. Nawaz, A. de Pablos-Martín, J. Martins de Souza e Silva, K. Hurle, A.T.C.

- Jaimes, D.S. Brauer, A.R. Boccaccini, New insights into the crystallization process of sol-gel-derived 45S5 bioactive glass, *J. Am. Ceram. Soc.* 103 (2020) 4234–4247. doi:10.1111/jace.17124.
- [101] J.J. Donovan, J.M. Allaz, A. Von Der Handt, G.G.E. Seward, O. Neill, K. Goemann, J. Chouinard, P.K. Carpenter, Quantitative WDS compositional mapping using the electron microprobe, *Am. Mineral.* 106 (2021) 1717–1735. doi:10.2138/am-2021-7739.
- [102] A. Mohammadkhah, D.E. Day, Mechanical properties of bioactive glass/polymer composite *scaffolds* for repairing load bearing bones, *Int. J. Appl. Glas. Sci.* 9 (2018) 188–197. doi:10.1111/ijag.12339.
- [103] S. Eqtesadi, A. Motealleh, A. Pajares, F. Guiberteau, P. Miranda, Improving mechanical properties of 13-93 bioactive glass robocast *scaffold* by poly (lactic acid) and poly (ϵ -caprolactone) melt infiltration, *J. Non. Cryst. Solids.* 432 (2016) 111–119. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2015.02.025.
- [104] G. Luo, Y. Ma, X. Cui, L. Jiang, M. Wu, Y. Hu, Y. Luo, H. Pan, C. Ruan, 13-93 bioactive glass/alginate composite *scaffolds* 3D printed under mild conditions for bone regeneration, *RSC Adv.* 7 (2017) 11880–11889. doi:10.1039/c6ra27669e.
- [105] Q. Fu, M.N. Rahaman, B.S. Bal, W. Huang, D.E. Day, Preparation and bioactive characteristics of a porous 13–93 glass, and fabrication into the articulating surface of a proximal tibia, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 82A (2007) 222–229. doi:10.1002/jbm.a.31156.
- [106] N.D. Doiphode, T. Huang, M.C. Leu, M.N. Rahaman, D.E. Day, Freeze extrusion fabrication of 13-93 bioactive glass *scaffolds* for bone repair, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (2011) 515–523. doi:10.1007/s10856-011-4236-4.
- [107] E. Fiume, C. Migneco, E. Verné, F. Baino, Comparison between bioactive sol-gel and melt-derived glasses/glass-ceramics based on the multicomponent SiO₂–P₂O₅–CaO–MgO–Na₂O–K₂O system, *Materials (Basel).* 13 (2020) 540. doi:10.3390/ma13030540.
- [108] H. Pirayesh, J.A. Nychka, Sol-gel synthesis of bioactive glass-ceramic 45S5 and

- its in vitro dissolution and mineralization behavior, *J. Am. Ceram. Soc.* 96 (2013) 1643–1650. doi:10.1111/jace.12190.
- [109] J. Serra, P. González, S. Liste, C. Serra, S. Chiussi, B. León, M. Pérez-Amor, H.O. Ylänen, M. Hupa, FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses, *J. Non. Cryst. Solids.* 332 (2003) 20–27. doi:10.1016/j.jnoncrsol.2003.09.013.
- [110] T.L. Rodrigues Mota, A.P. Marques de Oliveira, E.H.M. Nunes, M. Houmard, Simple process for preparing mesoporous sol-gel silica adsorbents with high water adsorption capacities, *Microporous Mesoporous Mater.* 253 (2017) 177–182. doi:10.1016/j.micromeso.2017.07.010.
- [111] K. Maji, S. Dasgupta, Bioactive Glass and Biopolymer Based Composite *Scaffold* for Bone Regeneration, *Trans. Indian Ceram. Soc.* 74 (2015) 195–201. doi:10.1080/0371750X.2015.1092396.
- [112] B.A.E. Ben-Arfa, H.R. Fernandes, I.M.M. Salvado, J.M.F. Ferreira, R.C. Pullar, Effects of catalysts on polymerization and microstructure of sol-gel derived bioglasses, *J. Am. Ceram. Soc.* 101 (2018) 2831–2839. doi:10.1111/jace.15450.
- [113] G. Kaur, V. Kumar, F. Baino, J.C. Mauro, G. Pickrell, I. Evans, O. Bretcanu, Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: State-of-the-art review and future challenges, *Mater. Sci. Eng. C.* 104 (2019) 109895. doi:10.1016/j.msec.2019.109895.
- [114] A.M.A. Silva, E.H.M. Nunes, D.F. Souza, D.L. Martens, J.C. Diniz Da Costa, M. Houmard, W.L. Vasconcelos, The influence of Fe₂O₃ doping on the pore structure and mechanical strength of TiO₂-containing alumina obtained by *freeze-casting*, *Ceram. Int.* 41 (2015) 14049–14056. doi:10.1016/j.ceramint.2015.07.021.
- [115] E. Rezabeigi, P.M. Wood-Adams, R.A.L. Drew, Synthesis of 45S5 Bioglass® via a straightforward organic, nitrate-free sol-gel process, *Mater. Sci. Eng. C.* 40 (2014) 248–252. doi:10.1016/j.msec.2014.03.042.
- [116] T.H. Dang, T.H. Bui, E. V. Guseva, A.T. Ta, A.T. Nguyen, T.T.H. Hoang, X.V. Bui, Characterization of bioactive glass synthesized by sol-gel process in hot

- water, Crystals. 10 (2020) 1–10. doi:10.3390/cryst10060529.
- [117] X.V. Bui, T.H. Dang, Bioactive glass 58S prepared using an innovation sol-gel process, Process. Appl. Ceram. 13 (2019) 98–103. doi:10.2298/PAC1901098B.
- [118] A.L.B. Maçon, T.B. Kim, E.M. Valliant, K. Goetschius, R.K. Brow, D.E. Day, A. Hoppe, A.R. Boccaccini, I.Y. Kim, C. Ohtsuki, T. Kokubo, A. Osaka, M. Vallet-Regí, D. Arcos, L. Fraile, A.J. Salinas, A. V. Teixeira, Y. Vueva, R.M. Almeida, M. Miola, C. Vitale-Brovarone, E. Verné, W. Höland, J.R. Jones, A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses and their variants, J. Mater. Sci. Mater. Med. 26 (2015) 1–10. doi:10.1007/s10856-015-5403-9.
- [119] J. Faure, R. Drevet, A. Lemelle, N. Ben Jaber, A. Tara, H. El Btaouri, H. Benhayoune, A new sol-gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst, Mater. Sci. Eng. C. 47 (2015) 407–412. doi:10.1016/j.msec.2014.11.045.
- [120] T. Ghassemi, A. Shahroodi, M.H. Ebrahimzadeh, A. Mousavian, J. Movaffagh, A. Moradi, Current concepts in *scaffolding* for bone tissue engineering, Arch. Bone Jt. Surg. 6 (2018) 90–99. doi:10.22038/abjs.2018.26340.1713.
- [121] V. Raeisdasteh Hokmabad, S. Davaran, A. Ramazani, R. Salehi, Design and fabrication of porous biodegradable *scaffolds*: a strategy for tissue engineering, J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 28 (2017) 1797–1825. doi:10.1080/09205063.2017.1354674.
- [122] A. Nommeots-Nomm, C. Ligorio, A.J. Bodey, B. Cai, J.R. Jones, P.D. Lee, G. Poologasundarampillai, Four-dimensional imaging and quantification of viscous flow sintering within a 3D printed bioactive glass *scaffold* using synchrotron X-ray tomography, Mater. Today Adv. 2 (2019) 100011. doi:10.1016/j.mtadv.2019.100011.
- [123] J.L.O. Sunho Oh, Namsik Oh, Mark Appleford, Bioceramics for Tissue Engineering Applications – A Review, Am. J. Biochem. Biotechnol. 2 (2006) 49–56. doi:10.3844/ajbbbsp.2006.49.56.

- [124] U. -C OH, Y. -S CHUNG, D. -Y KIM, D.N. YOON, Effect of Grain Growth on Pore Coalescence During the Liquid-Phase Sintering of MgO-CaMgSiO₄ Systems, *J. Am. Ceram. Soc.* 71 (1988) 854–857. doi:10.1111/j.1151-2916.1988.tb07535.x.
- [125] J.A. Varela, O.J. Whittemore, E. Longo, Pore size evolution during sintering of ceramic oxides, *Ceram. Int.* 16 (1990) 177–189. doi:10.1016/0272-8842(90)90053-I.
- [126] O.J. Whittemore, J.J. Sipe, Pore growth during the initial stages of sintering ceramics, *Powder Technol.* 9 (1974) 159–164. doi:10.1016/0032-5910(74)80027-6.
- [127] A. Eltom, G. Zhong, A. Muhammad, *Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review*, *Adv. Mater. Sci. Eng.* 2019 (2019). doi:10.1155/2019/3429527.
- [128] X. Liu, M.N. Rahaman, G.E. Hilmas, B.S. Bal, Mechanical properties of bioactive glass (13-93) *scaffolds* fabricated by robotic deposition for structural bone repair, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7025–7034. doi:10.1016/j.actbio.2013.02.026.
- [129] J.Z. Yang, X.Z. Hu, R. Sultana, R. Edward Day, P. Ichim, Structure design and manufacturing of layered bioceramic *scaffolds* for load-bearing bone reconstruction, *Biomed. Mater.* 10 (2015). doi:10.1088/1748-6041/10/4/045006.
- [130] F.J. Martínez-Vázquez, F.H. Perera, P. Miranda, A. Pajares, F. Guiberteau, Improving the compressive strength of bioceramic robocast *scaffolds* by polymer infiltration, *Acta Biomater.* 6 (2010) 4361–4368. doi:10.1016/j.actbio.2010.05.024.
- [131] J. Mesquita-Guimarães, M.A. Leite, J.C.M. Souza, B. Henriques, F.S. Silva, D. Hotza, A.R. Boccaccini, M.C. Fredel, Processing and strengthening of 58S bioactive glass-infiltrated titania *scaffolds*, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 105 (2017) 590–600. doi:10.1002/jbm.a.35937.
- [132] H. Gheisari, E. Karamian, M. Abdollahi, A novel hydroxyapatite -Hardystonite

- nanocomposite ceramic, *Ceram. Int.* 41 (2015) 5967–5975. doi:10.1016/j.ceramint.2015.01.033.
- [133] E.A. Aguilar-Reyes, C.A. León-Patiño, E. Villicaña-Molina, V.I. Macías-Andrés, L.P. Lefebvre, Processing and in vitro bioactivity of high-strength 45S5 glass-ceramic *scaffolds* for bone regeneration, *Ceram. Int.* 43 (2017) 6868–6875. doi:10.1016/j.ceramint.2017.02.107.
- [134] C. Gao, T. Liu, C. Shuai, S. Peng, Enhancement mechanisms of graphene in nano-58S bioactive glass *scaffold*: Mechanical and biological performance, *Sci. Rep.* 4 (2014). doi:10.1038/srep04712.
- [135] Q. Fu, M.N. Rahaman, B. Sonny Bal, R.F. Brown, D.E. Day, Mechanical and in vitro performance of 13–93 bioactive glass *scaffolds* prepared by a polymer foam replication technique, *Acta Biomater.* 4 (2008) 1854–1864. doi:10.1016/j.actbio.2008.04.019.
- [136] A. Moghanian, S. Firoozi, M. Tahriri, Synthesis and in vitro studies of sol-gel derived lithium substituted 58S bioactive glass, *Ceram. Int.* 43 (2017) 12835–12843. doi:10.1016/j.ceramint.2017.06.174.
- [137] D. Bellucci, A. Sola, R. Salvatori, A. Anesi, L. Chiarini, V. Cannillo, Role of magnesium oxide and strontium oxide as modifiers in silicate-based bioactive glasses: Effects on thermal behaviour, mechanical properties and in-vitro bioactivity, *Mater. Sci. Eng. C.* 72 (2017) 566–575. doi:10.1016/j.msec.2016.11.110.