

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

Ingrid Elen Pinto e Souza

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE VIDRO BIOATIVO CONTENDO ÍONS  
CÉRIO E COBALTO COM AÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE  
CONJUGADO COM HIDROGEL BICAMADA DE PVA/PAA PARA POTENCIAL  
TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS**

Belo Horizonte

2023

Ingrid Elen Pinto e Souza

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE VIDRO BIOATIVO CONTENDO ÍONS  
CÉRIO E COBALTO COM AÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE  
CONJUGADO COM HIDROGEL BICAMADA DE PVA/PAA PARA POTENCIAL  
TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS**

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

Orientador: Prof. Eduardo Henrique Martins  
Nunes

Coorientador: Breno Rocha Barrioni

Belo Horizonte

2023

S729s

Souza, Ingrid Elen Pinto e.

Síntese e caracterização de vidro bioativo contendo íons cério e cobalto com ação antimicrobiana e antioxidante conjugado com hidrogel bicamada de PVA/PAA para potencial tratamento de lesões cutâneas [recurso eletrônico] / Ingrid Elen Pinto e Souza. – 2023.

1 recurso online (141 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Eduardo Henrique Martins Nunes.

Coorientador: Breno Rocha Barrioni.

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

Bibliografia: f. 127-141.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Materiais – Teses. 2. Ciência dos materiais – Teses. 3. Biomateriais – Teses. 4. Nanocompósitos – Teses. 5. Processo sol-gel – Teses. 6. Cobalto – Teses. 7. Óxidos de cério – Teses. 8. Hidrogéis – Teses. 9. Polímeros de vinil – Teses. 10. Ácido acrílico – Teses. 11. Vidros bioativos – Teses. 12. Cicatrização de feridas – Teses. I. Nunes, Eduardo Henrique Martins. II. Barrioni, Breno Rocha. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 620(043)



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



A tese intitulada "**Síntese e Caracterização de Vidro Bioativo Contendo Íons Cério e Cobalto com Ação Antimicrobiana e Antioxidante Conjugado com Hidrogel Bicamada de PVA/PAA para Potencial Tratamento de Lesões Cutâneas**", área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais, apresentada pela candidata **Ingrid Elen Pinto e Souza**, para obtenção do grau de Doutora em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, foi aprovada pela comissão examinadora constituída pelos seguintes membros:

  
Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes  
Orientador (UFMG)

Documento assinado digitalmente

 **BRENO ROCHA BARRIONI**  
Data: 05/10/2023 13:56:05-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Breno Rocha Barrioni  
Coorientador (UFLA)

  
Dr. Daniel Cristian Ferreira Soares  
(UNIFEI)

Documento assinado digitalmente

 **ELIANE AYRES**  
Data: 04/10/2023 14:35:39-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Eliane Ayres  
(UEMG)

  
Dr. Marcello Rosa Dumont  
(CEFET/MG)

  
Dra. Priscilla Mol Queiroz  
(Nordika)

Documento assinado digitalmente

 **DANIEL MAJUSTE**  
Data: 05/02/2024 08:41:51-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

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

Belo Horizonte, 03 de outubro de 2023

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente e sempre, agradeço a Deus. Meus caminhos são entregues a Ele e minha vida é baseada no que Ele quer.

À minha mãe, Salete, que em primeiro plano prezou e se sacrificou por mim e pelos meus estudos.

Ao Thiago, que é meu companheiro e amigo, quem se dispôs a traçar esse caminho comigo nos dias bons e, sobretudo, nos dias ruins, me incentivando e deixando o fardo mais leve.

Ao professor Eduardo que teve imensa paciência comigo. Um professor que foi (é) amigo, permitiu e abriu portas para que todas as experiências que eu julgasse importantes dentro de um doutorado fossem concretizadas. Neste momento, estendo este agradecimento à Patrícia, que me acolheu e se dispôs a ajudar nos piores momentos destes anos.

Ao Breno Barrioni, que, com sua expertise, foi o melhor coorientador, o primeiro crítico e conselheiro que eu poderia ter durante este processo.

Não poderia deixar de agradecer à professora Marivalda que possibilitou a minha entrada no programa. Ela foi essencial para a idealização deste projeto e para toda a minha trajetória, desde o mestrado, no PPGEM.

Aos meus amigos que torceram e intercederam por mim. Amigos que foram alento, luz, ouvidos e vozes. Pessoas que acreditaram em mim, mesmo quando o vento soprou contra. Aninha, Iracy, Marina, Cássia, Jéssica, Gláucia, Maria e Pedro. Aqui incluo meus tios, tias, primos e primas.

À Shelly e à Miau que são apoio, amizade e diversão durante todos os dias.

À Contagem III. Com certeza vocês fizeram parte dos melhores meses desse doutorado.

Obrigada por toda a força 🍊.

Aos meus colegas de laboratório que, como poucos, compreendem toda a dificuldade do processo acadêmico. Em especial, agradeço à Priscilla Mol e ao Diogo Maia por todo apoio, companheirismo e amizade desde o mestrado, passando pela pandemia e por outras N dificuldades comigo.

Às alunas Mariana e Lara por terem confiado a mim seus projetos e terem permitido que eu entrasse na vida acadêmica delas, mesmo que por breves meses. Agradeço por elas terem feito parte deste trabalho deixando os ensaios finais mais produtivos e divertidos.

À minha querida “Patrícia do MEV” com todos os seus abraços e desejos de força. A sala do MEV torna-se uma grata experiência com a sua presença, auxílio, ouvidos e, sobretudo, amizade.

Ao Felipe e à Hellen que foram mais que solícitos durante essa pesquisa, seja emprestando reagentes, realizando análises químicas, ou me ouvindo. Aproveito para agradecer à Cláudia pelas análises de ICP-OES realizadas no Laboratório de Análises Químicas (LAQ – DEMET - UFMG) e pela disponibilidade de infraestrutura.

À professora Andreia Bicalho Henriques pelo auxílio nas análises de DRX.

À Professora Eliane (UEMG) por ter sido extremamente paciente, atenciosa e disponível em momentos chave da execução da seção polimérica deste trabalho.

Aos professores Daniel Soares e Daniela Sachs pelos ensaios biológicos *in vitro* e pela disponibilização da infraestrutura na UniFei.

À Cida, rainha do PPGEM, que sempre está do lado dos alunos, nos auxiliando em todos os detalhes burocráticos.

Aos porteiros, que gentilmente permitiam que eu entrasse no laboratório durante a pandemia, mesmo quando eu esquecia a autorização. Com certeza, sem eles parte deste trabalho não teria sido realizada.

Ao Professor Rodrigo Orefice, ao Ricardo e ao meu colega Phillipe pelas análises realizadas no Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos – LEPCOM – DEMET- UFMG e por serem tão solícitos.

Ao professor Herman e à Dra. Alexandra Mansur pelas análises de XPS realizadas no Centro Multidisciplinar de Caracterização de Superfícies e Interfaces - CEMUCASI/EEUFMG.

A todo o Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), professores e profissionais, e ao PPGEM agradeço pela oportunidade e suporte ao desenvolvimento do trabalho.

Ao CNPq, a CAPES e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A formação de feridas crônicas é um problema de saúde pública devido aos elevados números de casos e as complexas interações entre a pele e os tecidos subjacentes, enquanto a engenharia de tecidos é um campo que busca materiais que possam auxiliar na restauração e progressão da cicatrização de tecidos lesados, utilizando, por exemplo, curativos bioativos inteligentes capazes de promover a cicatrização de feridas de maneira ordenada, rápida, eficaz e com capacidade bioativa. O vidro bioativo (VB) é um material que estimula a formação de colágeno em tecidos moles por meio da liberação de íons presentes em sua estrutura, e sua composição pode ser modificada pela inserção de diferentes íons com funções terapêuticas, como ação antioxidante pelo elemento químico cério (Ce) e antimicrobiana pelo elemento químico cobalto (Co), sendo muito utilizado na obtenção de curativos quando associados a materiais poliméricos, especialmente em materiais que possam ser responsivos ao meio fisiológico de acordo com o pH. Neste estudo, objetivou-se desenvolver novas composições de nanopartículas de VB incorporando íons Ce e Co, por meio da rota sol-gel com impregnação desses íons após a síntese de sílica, bem como a caracterização desses materiais por técnicas de microscopia, de análises química e estrutural. Os resultados indicam que houve incorporação desses íons na estrutura do VB como modificadores e formadores de rede. Os VBs apresentaram morfologia esférica, mesoporosidade e tamanho nanométrico, e as suas atividades antioxidante, atividade antimicrobiana e biocompatibilidade dos VBs foram comprovadas. Em seguida, o VB foi incorporado em um sistema hidrogel de dupla camada de poli(álcool vinílico) e poli(ácido acrílico) (PVA-PAA) para obtenção de curativos com alta capacidade de absorção. Em pH básico (ferida infectada), os nanocompósitos demonstraram liberação controlada dos íons terapêuticos e maior capacidade de absorção de exsudato simulado de ferida (SEF), além de boa capacidade de movimentação de fluidos e transmissão de vapor d'água em comparação com produtos de mercado. Ensaio biológicos *in vitro* indicaram compatibilidade celular de todas as composições desenvolvidas e maiores concentrações de VB no nanocompósito resultaram em maior atividade antibacteriana. O nanocompósito demonstrou ser responsivo ao pH do meio, mostrando capacidade para identificar e tratar adequadamente lesões crônicas, acelerando o processo de cicatrização. Portanto, a proposta de aplicação dos VBs empregados em curativos bicamada PVA/PAA mostram potencial para aplicação como curativo para restauração de tecidos cutâneos devido à sua capacidade de controle inteligente e responsivo ao pH, permitindo a liberação de íons terapêuticos.

**Palavras-chave:** vidro bioativo; cério; cobalto; sol-gel; pva-paa; curativos inteligentes

## ABSTRACT

The formation of chronic wounds is a public health concern due to the high number of cases and complex interactions between the skin and underlying tissues. Tissue engineering is a field that seeks materials to aid in the restoration and progression of tissue healing. For example, smart bioactive dressings capable of promoting wound healing in an organized, rapid, effective, and bioactive manner are being explored. Bioactive glass (BG) is a material that stimulates collagen formation in soft tissues through the release of ions present in its structure. Its composition can be modified by incorporating different ions with therapeutic functions, such as cerium (Ce) for antioxidant action and cobalt (Co) for antimicrobial activity. BG is commonly used in the development of dressings when combined with polymeric materials, especially those responsive to physiological conditions, such as pH. This study aimed to develop new compositions of BG nanoparticles incorporating Ce and Co ions through the sol-gel route with ion impregnation after silica synthesis. The materials were characterized using microscopy, chemical analysis, and structural analysis techniques. Results indicate successful incorporation of these ions into the BG structure as modifiers and network formers. The BGs exhibited spherical morphology, mesoporosity, and nanoscale size. Antioxidant, antimicrobial activity, and biocompatibility of the BGs were confirmed. Subsequently, BG was incorporated into a double-layer hydrogel system of poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) (PVA-PAA) to create dressings with high absorption capacity. Under basic pH conditions (infected wound), the nanocomposites demonstrated controlled release of therapeutic ions and higher absorption capacity for simulated wound exudate compared to market products. Additionally, they exhibited good fluid movement and water vapor transmission. In vitro biological assays indicated cellular compatibility for all developed compositions, and higher concentrations of BG in the nanocomposite resulted in increased antibacterial activity. The nanocomposite was responsive to the pH of the environment, demonstrating the ability to identify and appropriately treat chronic injuries, thereby accelerating the healing process. Therefore, the proposed application of the employed BGs in PVA/PAA double-layer dressings shows potential for restoring cutaneous tissues due to their intelligent and pH-responsive control, allowing for the release of therapeutic ions.

**Keywords:** bioactive glass; cerium; cobalt; sol-gel; pva-paa; smart dressings

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3. 1:</b> Imagem esquemática da estrutura da pele. (Fonte: [16]).....	21
<b>Figura 3. 2:</b> Imagem esquemática (a) da estrutura do mero do PVA completamente hidrolisado; (b) estrutura do álcool vinílico; (c) Estrutura do PVA; (d) Estrutura do PVA parcialmente hidrolisado. Fonte: [37].....	29
<b>Figura 3. 3:</b> Fórmula estrutural do PAA. (Fonte : (Fonte: Própria autora).....	29
<b>Figura 3. 4:</b> Representação das reações de reticulação do ácido acrílico pelo EGDMA (Fonte: Própria autora) .....	30
<b>Figura 3. 5:</b> Reações gerais de TEOS que levam à formação de partículas de sílica no processo sol-gel (Fonte: Adaptado de [63]).....	34
<b>Figura 3. 6:</b> Reações no processo sol-gel para formação de sílica tetraédrica e nanopartículas a temperatura ambiente (Fonte: Adaptado de [8]). .....	35
<b>Figura 3. 7:</b> Visão geral das respostas biológicas aos produtos de dissolução iônica de vidros bioativos (Fonte: Adaptado de [7]). .....	36
<b>Figura 3. 8:</b> Estruturas cristalinas dos principais óxidos de cério. (a) Estrutura cúbica do tipo fluorita do $\text{CeO}_2$ ; (b) Estrutura hexagonal do $\text{Ce}_2\text{O}_3$ . (Fonte: Adaptado de [74]).....	38
<b>Figura 4. 1:</b> Representação esquemática da síntese de nanopartículas de sílica. (Fonte: Própria autora) .....	49
<b>Figura 4. 2:</b> Representação esquemática da metodologia de incorporação de íons nas partículas de sílica. (Fonte: Própria autora) .....	50
<b>Figura 4. 3:</b> Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das amostras de vidro bioativo.....	62
<b>Figura 4. 4:</b> Micrografias de Microscopia Eletrônica de Transmissão das amostras de vidro bioativo. O padrão de transformada rápida de Fourier (FFT) atribuído às micrografias obtidas paralelamente ao longo da direção do eixo do poro também é mostrado.....	64
<b>Figura 4. 5:</b> Micrografia da região da amostra VB-1CeCo onde foram identificados planos cristalinos e ampliação dos planos cristalinos identificados na amostra. ....	65
<b>Figura 4. 6:</b> Espectros de Uv-vis das amostras de vidro bioativo .....	68
<b>Figura 4. 8:</b> Espectro FTIR dos vidros bioativos produzidos ( $1400-400\text{ cm}^{-1}$ ).....	69
<b>Figura 4. 9:</b> Padrões de DRX das amostras de vidro bioativo.....	71
<b>Figura 4. 10:</b> Espectros de varredura de XPS para as amostras. ....	73
<b>Figura 4. 11:</b> Espectros de XPS de alta resolução de Si 2p para as amostras. ....	76
<b>Figura 4. 12:</b> Espectros de XPS de alta resolução de O 1s para as amostras. ....	78
<b>Figura 4. 13:</b> Espectros de XPS de alta resolução de Ce 3d para as amostras. ....	79
<b>Figura 4. 14:</b> Espectros de XPS de alta resolução de Co 2p para as amostras.....	80
<b>Figura 4. 15:</b> Imagem esquemática da estrutura do volume interno das amostras de VB contendo íons Ce e Co.....	81
<b>Figura 4. 16:</b> Imagem esquemática da estrutura da superfície das amostras de VB contendo íons Ce e Co.....	82
<b>Figura 4. 17:</b> Isotermas de sorção de nitrogênio e distribuições de tamanho de poro (gráfico inserido) .....	84
<b>Figura 4. 18:</b> Decomposição do $\text{H}_2\text{O}_2$ , a $37^\circ\text{C}$ , após 0h ( $t_0$ ), 24h, 96h e 168h de imersão das amostras em diferentes tempos de imersão. ....	88
<b>Figura 4. 19:</b> Perfil de liberação de íons (a) Si, (b) Ce, (c) Co para amostras após imersão em SEF. ....	91

<b>Figura 4. 20:</b> Avaliação in vitro da biocompatibilidade em células HEK-293 por citometria de fluxo. Gráfico de SSC em função de FSC .....	94
<b>Figura 4. 21:</b> Avaliação in vitro da biocompatibilidade em células 4T1 por citometria de fluxo.....	95
<b>Figura 4. 22:</b> Avaliação in vitro da biocompatibilidade em células MDA-MB-231 por citometria de fluxo .....	96
<b>Figura 4. 23:</b> No painel A pode-se observar a média do diâmetro dos halos de inibição (mm) de VB-SiO <sub>2</sub> , VB-1Co, VB-1Ce e VB-CeCo (1 a 0,001) no teste disco-difusão em ágar para Staphylococcus aureus. Os valores são expressos pela em média ± erro padrão da média com n =4. *P<0,001 quando comparado com o grupo VB-1Co. #P<0,001 quando comparado com o grupo VB-1CeCo. No painel B observa-se os halos de inibição na placa de petri em ágar Mueller Hinton frente a Staphylococcus aureus. ....	99
<b>Figura 5. 1:</b> Desenho esquemático das etapas de preparação do hidrogel bicamada de PVA/PAA. ....	106
<b>Figura 5. 2:</b> Esquema do dispositivo utilizado para a determinação da Transmissão do vapor d'água. ....	110
<b>Figura 5.3:</b> Esquema do dispositivo utilizado para a determinação da capacidade de movimentação de fluidos.....	111
<b>Figura 5. 4:</b> Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das amostras produzidas (superfície PVA e superfície PAA) e seus respectivos espectros de EDS: (a) Pol-0VB; (b) Pol-2.5VB; c) Pol-5VB e d) Pol-10VB. ....	115
<b>Figura 5. 5:</b> Termogramas de DSC dos nanocompósitos .....	116
<b>Figura 5. 6:</b> a) TGA e b) DTG das amostras produzidas.....	117
<b>Figura 5. 7:</b> Espectro FTIR dos filmes e nanocompósitos produzidos (4000- 500 cm <sup>-1</sup> ).....	119
<b>Figura 5. 8:</b> Espectros de DRX para as amostras de filmes nanocompósitos .....	121
<b>Figura 5. 9:</b> Representação esquemática (a) das interações física e química entre o PVA e o PAA; (b) do ancoramento mecânico do VB no PVA. ....	122
<b>Figura 5. 10:</b> Curvas representativas dos ensaios de tração para as amostras .....	123
<b>Figura 5. 11:</b> Imagens ópticas de gotas de água nas superfícies de PVA e PAA dos nanocompósitos .....	125
<b>Figura 5. 12:</b> Taxa de absorção de água em pHs 4, pH 7 e pH 9 para as amostras .....	126
<b>Figura 5. 13:</b> Imagens de MEV das superfícies das amostras de PVA-PAA em diferentes valores de pH (4; 7 e 9). ....	128
<b>Figura 5. 14:</b> Permeabilidade ao vapor de água das amostras secas .....	129
<b>Figura 5. 15:</b> Capacidade de movimentação de fluidos das amostras .....	131
<b>Figura 5. 16:</b> Perfil de liberação de íons (a) Si, (b) Ce e (c) Co para amostras sintetizadas após imersão de SEF. ....	133
<b>Figura 5. 17:</b> Avaliação in vitro da biocompatibilidade em células HEK-293 por citometria de fluxo. ....	135
<b>Figura 5. 18:</b> Halo de inibição medido para diferentes amostras utilizadas nos testes de difusão em disco de ágar Bauer-Kirby contra a bactéria (a) Staphylococcus aureus (ATCC 25923); (b) Escherichia coli (ATCC 25922). Inserção: fotografias das placas de ágar utilizadas neste teste, onde são observadas as zonas de difusão. ....	137

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4. 3:</b> Raios dos íons dos elementos Cério e Cobalto.....	58
<b>Tabela 4. 4:</b> Diâmetro médio de nanopartícula das amostras de acordo com análises de MET e DLS, índice de polidispersividade e potencial Zeta. ....	66
<b>Tabela 4. 5:</b> Principais bandas vibracionais associadas aos vidros bioativos.....	70
<b>Tabela 4. 6:</b> Valores de energia de ligação obtidos através dos espectros de alta resolução de Si 2p, O 1s, Ce 3d e Co 2p para respectivas amostras de VB. ....	74
<b>Tabela 4. 7:</b> Propriedades texturais obtidas pelos métodos BET e BJH para as amostras VB-SiO <sub>2</sub> , VB-1Ce, VB-1Co, VB-1CeCo, VB-0.5CeCo, VB-0.25CeCo, VB-0.1CeCo, VB-0.05CeCo e VB-0.01CeCo. ....	86
<b>Tabela 4. 10:</b> Porcentagem de células viáveis (LL).....	97
<b>Tabela 5. 1:</b> Composição (m/m %) dos filmes de PVA	107
<b>Tabela 5. 2:</b> Principais bandas vibracionais associadas aos nanocompósitos .....	119
<b>Tabela 5. 3:</b> Propriedades mecânicas dos nanocompósitos. ....	123
<b>Tabela 5. 4:</b> Ângulos de contato obtidos para as superfícies de PVA ou PAA dos nanocompósitos: a) Pol-0VB; (b) Pol-2.5VB; (c) Pol-10VB; e (d) Pol-10VB. ....	125
<b>Tabela 5. 5:</b> Tamanho médio de poros para as amostras em pH 4, pH 7 e pH 9.....	127
<b>Tabela 5. 6:</b> Porcentagem de células viáveis para cada um dos nanocompósitos produzidos. ....	136

## LISTA DE NOTAÇÕES

AA - Ácido Acrílico

ATR - Reflectância Total Atenuada

ATR - Refletância Total Atenuada

B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - Trióxido De Boro

BE - Energia De Ligação

BET - Brunauer-Emmett-Teller

BG - Bioactive Glass

BJH - Barrett, Joyner e Halenda

BO - *Bridging Oxygen*

Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O - Nitrato de cério (III)

CeO<sub>2</sub> - Óxido De Cério

CMF - Capacidade de Movimentação de Fluidos

Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> - Nitrato De Cobalto

CTAB - Brometo De Centrimonio

DFT - *Density Functional Theory*

DLS - Espalhamento Dinâmico De Luz

DMEM - *Eagle Modificado Por Dulbecco*

DMOG - Dimetiloxalilglicina

DRX - Difração De Raio X

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

E - Módulo De Elasticidade

EDS - Espectrômetro por Dispersão de Energia

EGDMA - Dimetacrilato De Etilenoglicol

ERO - Espécies Reativas De Oxigênio

FFT - Transformada Rápida De Fourier

FSC - Espalhamento Do Feixe De Laser Ao Longo De Seu Caminho

FTIR - Infravermelho com Transformada de Fourier

Ga - Capacidade De Absorção De Fluidos

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido De Hidrogênio

HA - Hidroxiapatita Sintética

HEK293 - Células Embrionárias De Rim Humano

HIF - Fator Indutor Por Hipóxia

hMSCs - Células Tronco Mesenquimais Humanas  
HNO<sub>3</sub> - Ácido Nítrico  
ICP- OES Espectrometria De Emissão Atômica Com Plasma Acoplado Indutivamente  
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry  
LL - Viabilidade Celular  
LR - Apoptose Precoce  
MAS NMR - Espectroscopia De Ressonância Magnética Nuclear De Alta Resolução Com Giro No Ângulo Mágico  
MDA-MB-231 - Adenocarcinoma Mamário  
MEC - Matriz Extracelular  
MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão  
MEV - Microscopia eletrônica de varredura NaOH - Hidróxido De Sódio  
NaHSO<sub>3</sub>- Bissulfito De Sódio  
NBO - *Non-Bridging Oxygen*  
NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> - Persulfato De Amônio  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - Superóxido  
OH<sup>-</sup> - Radicais Hidroxil  
ONL – Oxigenio Não Ligante  
P.A.- Grau Analítico  
P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - Pentóxido De Fósforo  
PAA - Poli(ácido acrílico)  
PAAm - Poli(Acrilamida)  
PCL - Policaprolactona  
PDEAEMA - poli(metacrilato de dietilaminoetil)  
PDI - Índice De Polidispersibilidade  
PHDs - Hidroxilado Por Prolilhidroxilases  
PLGA - poli(ácido lático co-ácido glicólico)  
PMAA - Poli(Ácido Metacrílico)  
PVA - Poli(álcool vinílico)  
PZ - Potencial Zeta  
ROO<sup>-</sup> - Radicais Peroxil  
SBF - *Simulated Body Fluid*  
SEF - Exsudato Simulado De Ferida  
SiO<sub>2</sub> - Sílica

SSC - Espalhamento Lateral

TEOS -  $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$  - Tetraetil Ortosilicato

TGA - Termogravimetria

$T_m$  - Temperatura De Fusão

TVA - Transmissão Do Vapor D'água

UL - Morte Por Necrose

UR - Apoptose Tardia

UV-vis - Ultravioleta-visível

VB - Vidro Bioativo

VB-CeCo - VB contendo Ce e Co

XPS - Espectroscopia De Fotoelétrons Excitados Por Raios X

$\epsilon_r$  - Deformação Na Ruptura

$\sigma_{\text{máx}}$  - Tensão Máxima De Ruptura

4T1 - Carcinoma Mamário Murino

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
2.1    Objetivo Geral.....	20
2.2    Objetivos Específicos .....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
3.1 A Pele.....	21
3.1.1 O processo de cicatrização e tipos de feridas na pele .....	22
3.1.2 Engenharia de tecidos no processo cicatricial.....	24
3.1.3 Curativos de dupla camada polimérica .....	25
3.1.4 Hidrogéis sensíveis: Poli(álcool vinílico) (PVA) e Poli(ácido acrílico) (PAA).....	26
3.2 O Vidro Bioativo .....	32
3.2.1 Síntese de vidros bioativos via rota sol-gel.....	33
3.2.2 A estrutura dos vidros bioativos.....	35
3.2.3 Incorporação de íons terapêuticos ao vidro bioativo.....	36
3.2.3.1 O Cério no Vidro Bioativo .....	37
3.2.3.2 O Cobalto no Vidro Bioativo .....	41
4. ESTUDO DE NANOPARTÍCULAS MESOPOROSAS DE VIDRO BIOATIVO CONTENDO CÉRIO E COBALTO.....	45
4.1 Introdução .....	46
4.2 Materiais .....	47
4.3 Síntese das nanopartículas de vidro bioativo .....	48
4.3.1 Síntese das nanopartículas de sílica .....	48
4.3.2 Incorporação de íons terapêuticos às nanopartículas de vidro bioativo .....	49
4.4 Caracterização das nanopartículas de vidro bioativo.....	50
4.4.1 Análise da composição química.....	50
4.4.2 Análise da morfologia e distribuição do tamanho das partículas.....	51
4.4.3 Análise das características estruturais .....	52
4.4.4 Capacidade antioxidante das partículas.....	54
4.4.5 Análise da liberação de íons em Solução de Exsudato de Feridas (SEF) .....	54
4.4.6 Estudo biológico <i>in vitro</i> .....	55
4.5 Resultados e discussão.....	56
4.5.1 Análises da composição química dos Vidros Bioativos por ICP-OES .....	57
4.5.2 Caracterização física dos vidros bioativos .....	58
4.5.3 Análises das características estruturais das partículas.....	67
4.5.4 Análises das características texturais das partículas .....	82

4.5.5	Análise da ação antioxidante das nanopartículas de vidro bioativo.....	87
4.5.6	Análise da liberação de íons em Solução de Exsudato de Feridas (SEF) .....	89
4.5.7	Estudo biológico <i>in vitro</i> .....	92
4.6	Conclusão da sessão.....	100
5.	ESTUDO DE CURATIVOS DE DUPLA CAMADA INTELIGENTE A BASE DE PVA/PAA E VIDRO BIOATIVO.....	102
5.1	INTRODUÇÃO .....	103
5.2	Materiais .....	104
5.3	Preparo dos nanocompósitos .....	105
5.3.1	Síntese do hidrogel bicamada de PVA/PAA.....	105
5.3.2	Preparo dos nanocompósitos.....	106
5.4	Caracterização dos nanocompósitos .....	107
5.4.1	Análise da morfologia .....	107
5.4.2	Análise térmica.....	107
5.4.3	Análise das características estruturais .....	108
5.4.4	Análise das propriedades mecânicas .....	109
5.4.5	Características do curativo .....	109
5.4.6	Estudo da sensibilidade ao pH dos nanocompósitos.....	111
5.4.7	Liberação de íons em SEF.....	112
5.4.8	Estudo biológico <i>in vitro</i> .....	112
5.5	Resultados e discussão.....	113
5.5.1	Análise da morfologia .....	114
5.5.2	Análise térmica.....	116
5.5.3	Análise das características estruturais .....	118
5.5.4	Análise das propriedades mecânicas dos nanocompósitos .....	122
5.5.5	Características dos nanocompósitos enquanto curativos .....	124
5.5.6	Estudo da sensibilidade dos nanocompósitos em pH alcalino .....	131
5.5.7	Estudo biológico <i>in vitro</i> .....	134
5.6	Conclusões da sessão .....	138
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	140
6.1	Conclusões gerais .....	140
6.2	Sugestões para trabalhos futuros.....	141
7.	REFERÊNCIAS.....	142

## 1. INTRODUÇÃO

A pele íntegra é uma barreira eficaz contra a entrada de agentes patogênicos no corpo humano. Porém, quando esta barreira é rompida, o corpo fica vulnerável à permanência e proliferação de microrganismos nocivos que podem causar infecções. De acordo com Malheiro e colaboradores (2017), as infecções de pele estão entre as condições mais comuns em pacientes que comparecem a um pronto-socorro. Por vezes, estas infecções são suficientemente graves para levar a choque séptico (infecção generalizada) e justificar a admissão do paciente em unidade de terapia intensiva. Em 2017, as infecções de pele e tecido mole graves eram responsáveis por 4,3 % a 10,5 % dos episódios sépticos, tendo um nível de fatalidade variando entre 1,3 % e 7,2% [1].

A incorporação de antibióticos em materiais é usada para eliminar bactérias, mas a resistência bacteriana pode comprometer a eficácia desses materiais. Alternativamente, o uso clínico de materiais sintéticos com atividades antibacterianas intrínsecas em curativos pode evitar o risco de infecções sem o problema de resistência bacteriana. Desta forma, o desenvolvimento de curativos que incorporem múltiplos componentes benéficos e explorem as vantagens de cada componente individual, mas que ainda possam trabalhar em sinergia, torna-se uma solução atraente [2].

Os hidrogéis atendem a vários critérios para serem empregados como curativos. Eles são formados pela retenção de água em uma rede tridimensional de polímeros, o que é benéfico para a hidratação de uma ferida (efeito “doador de umidade”) e também podem aliviar a formação de escara (tecido morto) ou ajudar em feridas difíceis de desbridar [3]. Além disso, curativos de hidrogel geralmente são fáceis de remover e substituir, pois não possuem fibras que permaneçam no leito da ferida ou que a ela sejam aderentes; e permitem a passagem de metabólitos e trocas gasosas entre a ferida e o meio [4].

Os hidrogéis podem mostrar alterações em seu comportamento de inchamento, estrutura, permeabilidade ou propriedades mecânicas em resposta a vários estímulos internos e externos, podendo agir como um sistema de administração de fármacos sincronizado com o status fisiológico do paciente e fornecendo liberação do medicamento em resposta a mudanças físicas ou químicas do ambiente, chamados de materiais responsivos [3,5]. Eles também são chamados

de polímeros “sensíveis ao meio” ou “inteligentes”, e se usados na área médica são chamados "biomateriais inteligentes" [5].

A formulação de hidrogéis com dupla camada para aplicação como curativo tem sido estudada como “biomaterial inteligente”. Uma das possibilidades de produção destes biomateriais é a partir da combinação de PVA (poli(álcool vinílico)) e PAA (poli(ácido acrílico)) para fabricar filmes híbridos que associem a sensibilidade ao pH do meio do PAA e as excelentes propriedades mecânicas do PVA [6]. Assim, um curativo sensível de PVA-PAA modularia a liberação de agentes terapêuticos incorporados no PVA como proteínas, carboidratos ou materiais inorgânicos, tal qual o vidro bioativo [5] para a ferida de acordo com o pH do meio identificado pelo PAA.

O vidro bioativo (VB) foi desenvolvido por Larry Hench em 1969 e teve ampla visibilidade pela sua capacidade de integração óssea atribuída à capacidade de formação de hidroxiapatita carbonatada. Porém, o seu uso não se limita ao tecido ósseo, abrangendo também tecidos macios, como a pele, a partir da sua interação com o colágeno [7]. Ao VB podem ser associados íons que desempenham papéis terapêuticos, tais como o cério (Ce), que age como antioxidante e antimicrobiano; e o cobalto (Co), que atua como fator indutor de hipóxia e angiogênico [8,9]. Composições de VB contendo Co em sua rede têm sido estudadas para o tratamento de lesões cutâneas [10], assim como fibras de VB contendo íons Ce [11], mostrando-se como potenciais íons para tratamento dessas lesões.

Duas são as principais rotas de obtenção dos VBs: fusão; que envolve altas temperaturas; e sol-gel [12]. A rota sol-gel ocorre à temperatura ambiente e envolve uma série de reações de hidrólises e condensações dos precursores do material em solução aquosa. Além do menor gasto energético durante a síntese, o processo sol-gel permite a obtenção de VBs com maiores área superficial e porosidade, morfologia esférica, partículas com tamanhos reduzidos e com melhor capacidade de dispersão - quando comparados aos VBs produzidos pela rota de fusão. Estas características aumentam a taxa de liberação de íons do material em meio biológico e, conseqüentemente, podem diminuir o tempo e estimular a cicatrização de uma ferida crônica [13].

Estudos mostram que é possível a obtenção de VB contendo Ce e Co (VB-CeCo) em sua estrutura através da rota sol-gel, principalmente por metodologia de incorporação de íons pós-

síntese, que tem se mostrado vantajosa por reter a forma, o tamanho e a dispersão das nanopartículas sintetizadas [14]. Porém, estes estudos não tratam da incorporação concomitante dos íons terapêuticos Ce e Co como proposta ao tratamento de lesões cutâneas em estado crônico. Através de estudo bibliográfico, foi observada ausência de estudos sistemáticos voltados para a angiogênese e para o efeito bactericida concomitantemente, através do uso de vidros bioativos obtidos pelo processo sol-gel com Cobalto e Cério incorporados concomitantemente em sua estrutura. Assim como a utilização dessas novas composições de VB em sistema polimérico sintético de camada dupla com atuação responsiva ao pH para o tratamento de lesões cutâneas. Neste trabalho foram produzidas e estudadas nanopartículas esféricas de vidro bioativo com incorporação de íons cério e cobalto, concomitantemente, através de rota sol-gel e, em seguida, caracterizar os materiais obtidos. O VB foi incorporado ao hidrogel bicamada de PVA-PAA a fim de se obter um curativo polimérico que fosse sensível ao pH, de simples fabricação e que possuísse propriedades antimicrobiana e antioxidante, assim formando nanocompósitos inteligentes e bioativos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral foi desenvolver e caracterizar nanocompósitos constituídos por dupla camada polimérica de PVA/PAA como agente carreador de nanopartículas de vidro bioativo contendo íons terapêuticos cério e cobalto para uso potencial como curativo no tratamento de lesões cutâneas.

### 2.2 Objetivos Específicos

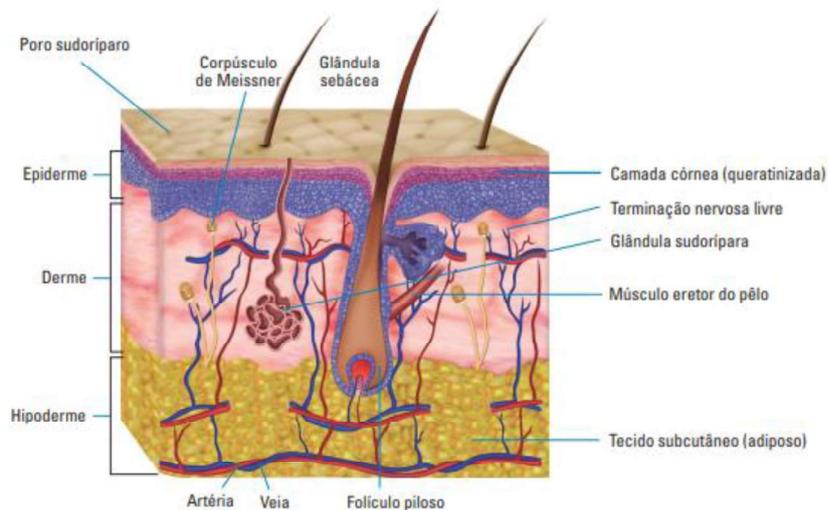
- Sintetizar nanopartículas esféricas e mesoporosas de diferentes composições de vidro bioativo contendo íons cério e cobalto via rota sol-gel;
- Caracterizar os vidros bioativos por meio de técnicas de análise química, morfológica, de tamanho de partícula, estrutural e texturais;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos vidros bioativos;
- Realizar estudo de liberação iônica do material em solução simulada de exsudato de feridas (SEF);
- Avaliar a viabilidade celular e a atividade antimicrobiana *in vitro* dos vidros bioativos;
- Preparar e caracterizar nanocompósitos de dupla camada de PVA/PAA e vidro bioativo;
- Caracterizar os nanocompósitos obtidos quanto a sua morfologia, estrutura, resistência mecânica, capacidade de absorção de fluidos, transmissão de vapor d'água, capacidade de movimentação de fluidos, ângulo de contato e variação de pH;
- Estudar o perfil de liberação dos íons terapêuticos Ce e Co presentes no nanocompósito via imersão em SEF;
- Avaliar a viabilidade celular e a atividade antimicrobiana *in vitro* dos nanocompósitos;

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A Pele

A pele é o maior e mais externo órgão do corpo humano, sendo a sua principal função a de proteção dos músculos, ossos, ligamentos e órgãos internos contra agentes biológicos, químicos, mecânicos e físicos externos [2]. Como tal, a pele fornece uma barreira robusta e flexível a substâncias tóxicas indesejadas e microrganismos patogênicos, à perda de água e nutrientes, e responde a forças mecânicas internas e externas (elasticidade e amortecimento). Dentre as funções da pele, também se incluem a sensibilidade ao toque, sensações de dor e calor, proteção ultravioleta, metabolismo cutâneo, atividade imunológica, produção de vitamina D e regulação térmica [15].

A pele é um órgão heterogêneo que contém várias camadas celulares divididas em regiões distintas, como esquematizado na Figura 3.1 [15]. Anatomicamente, a pele é dividida em três camadas: epiderme, derme e hipoderme.



**Figura 3. 1:** Imagem esquemática da estrutura da pele. (Fonte: [16])

A epiderme é a região externa que cobre o tecido conjuntivo e é a principal barreira à penetração na pele, tendo 10  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$  de espessura. A epiderme contém água (5 % a 20 %) e a maioria de seu conteúdo celular é queratina, uma proteína resistente e impermeável [17]. Uma membrana basal fina separa a epiderme da derme [15].

A derme é o tecido de sustentação da epiderme e é o local onde estão localizados vasos sanguíneos, nervos sensoriais (pressão, temperatura e dor) e linfáticos. Os principais componentes da derme incluem o colágeno, que confere a resistência; a elastina, que dá a elasticidade; e os proteoglicanos, além de fibras proteicas, fibras de reticulina, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, órgãos sensoriais, folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas [16]. Suas principais funções são fornecer suporte nutricional para a epiderme (avascular) e ser um órgão de armazenamento de água [15].

Abaixo da derme há uma camada de tecido conjuntivo frouxo, comumente conhecido como hipoderme (tecido celular subcutâneo ou panículo adiposo) [15,16]. A hipoderme é constituída por adipócitos, células especializadas no armazenamento de gordura, fazendo com que ela atue como reserva energética. A hipoderme também possui funções de proteção contra choques mecânicos e isolante térmico. Esta estrutura é organizada em lóbulos de gordura divididos por septos fibrosos compostos de colágeno, por onde correm vasos sanguíneos, linfáticos e nervos [16].

A perda da integridade da pele expõe o tecido subcutâneo e favorece a colonização e proliferação microbiana, pois esta região dispõe de condições adequadas de umidade, temperatura e nutrientes para proliferação de fungos e bactérias [18]. Então, para que a barreira cutânea seja reerguida, a pele passa por uma sequência de processos de reparação, ou cicatrização.

### **3.1.1 O processo de cicatrização e tipos de feridas na pele**

O processo de cicatrização da pele é baseado no reparo, e não na regeneração completa como acontece em outros órgãos do corpo humano. O reparo da pele é um processo complexo que consiste em várias fases que devem ser executadas sem perturbações para restaurar o tecido perdido [4]. Este processo de reparo acontece em quatro fases que são descritas a seguir:

- 1) Homeostasia e coagulação: um coágulo de fibrina é formado para evitar a perda de sangue por vasoconstrição, bem como para evitar contaminação microbiana [2];
- 2) Inflamação: A fase inflamatória começa quase simultaneamente com a hemostasia e envolve o recrutamento de neutrófilos, monócitos / macrófagos e linfócitos que exercem uma resposta específica contra micróbios [2]. Esta fase se inicia com a liberação de

substâncias vasoconstritoras, então o endotélio lesado e as plaquetas estimulam a cascata da coagulação com o aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia [19];

- 3) Proliferação: é constituída por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa, e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares, sendo essencial para a cicatrização adequada [19]. A fase proliferativa começa com a migração de fibroblastos para o local da ferida e a diferenciação em miofibroblastos para produzir componentes da matriz extracelular como fibronectina, ácido hialurônico, colágeno e proteoglicano - envolvidos na produção da matriz extracelular (MEC), deposição de colágeno, novos vasos sanguíneos e reepitelização [2]. A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação [19];
- 4) Remodelação: ou maturação, é o último estágio do processo de cicatrização de feridas e nesta fase todos os processos que foram ativados após a lesão são cessados [2]. A característica mais importante desta fase é a deposição de colágeno de maneira organizada, pois o colágeno produzido inicialmente é mais fino do que o colágeno presente na pele normal. Com o tempo, o colágeno inicial é reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão, o que fará com que haja aumento da resistência mecânica da cicatriz [19].

Diz-se que o processo de cicatrização foi bem sucedido quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz de colágeno e a reabsorção da matriz antiga. Entretanto, diversos fatores sistêmicos podem afetar negativamente o tempo de cicatrização de feridas, como: diabetes melito, deficiências vitamínicas, hipotireoidismo, doenças hereditárias, alterações da coagulação, idade, trauma grave, queimaduras, sepse, insuficiência hepática e renal, insuficiência respiratória, tabagismo, radioterapia, desnutrição e o uso de alguns fármacos [19].

A duração e a natureza do processo de cicatrização definem se as feridas na pele são classificadas como agudas ou crônicas. Uma ferida aguda ocorre repentinamente, como consequência de abrasões, avulsões, queimaduras, incisões, lacerações e perfurações, e detém um tempo de cicatrização dependente do tamanho e do número de camadas de pele afetadas. Sob condições fisiológicas normais, a restauração da estrutura epidérmica causada por feridas agudas é altamente eficiente. Porém, quando o processo de cicatrização é defeituoso, isto é, não

permite que a pele seja reparada de maneira ordenada e oportuna, ocorre uma ferida crônica [2].

Quando a ferida está em um estado perpétuo de inflamação, ou reparo, e falha em obter a cura dentro de um período de tempo razoável, é chamada de ferida crônica. Isso ocorre através, por exemplo, de infecção, inflamação prolongada, falta de suprimento sanguíneo, câncer ou fatores físicos. As feridas crônicas são caracterizadas por várias deficiências celulares e moleculares, como níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ERO), hipóxia, infecção persistente, influxo contínuo de neutrófilos e um desequilíbrio de fatores de crescimento, citocinas e proteases [4].

Feridas crônicas não cicatrizam em curto espaço de tempo e geralmente ocorrem em pacientes que sofrem de uma condição que prejudica sua capacidade de cura. Essas feridas levam a uma diminuição na qualidade de vida do paciente e uma quantidade significativa de recursos são gastos em seu tratamento. Uma condição subjacente que pode levar a feridas crônicas é o diabetes, e foi demonstrado que as células de pacientes diabéticos têm uma resposta enfraquecida à hipóxia. A hipóxia pode desencadear a produção de várias proteínas através do caminho do fator indutor por hipóxia (HIF), e um efeito semelhante pode ser observado ao usar metais de transição como cobre e cobalto em ambientes normais de oxigênio [10].

Outro importante fator relacionado a problemas de cicatrização de feridas é a infecção. Enquanto a pele está ferida, a barreira física contra patógenos diminui, permitindo que os microrganismos se infiltrem mais facilmente. Uma infecção local pode ser tratada com agentes antimicrobianos com ação tópica, como é o caso do uso de materiais que contém cério. Portanto, o tratamento de feridas cutâneas visa atingir dois objetivos: (1) a interrupção do sangramento e a prevenção da exsanguinação (processo fatal de perda total de sangue - hipovolemia); e (2) a prevenção de infecção, danos permanentes e perda de função [4]. Neste contexto, a engenharia de tecidos busca coberturas tópicas eficazes a partir do desenvolvimento de curativos poliméricos.

### **3.1.2 Engenharia de tecidos no processo cicatricial**

Os curativos tradicionais, como gaze ou ataduras adesivas, formam uma barreira física e absorvem o exsudato, mas fornecem pouco benefício ao processo de cicatrização. Esses curativos podem até ser prejudiciais para a ferida, por exemplo, quando fibras ou fragmentos

se entrelaçam com o tecido da ferida e afetam a resposta imune, podendo levar também a lesões e dor ao remover o curativo. Assim, são necessários produtos avançados para tratamento que interajam de maneira mais inteligente com a ferida e melhorem o processo de cicatrização [4].

Para um curativo ser considerado ideal, vários critérios são estipulados. Logo, o curativo deve: (1) ser capaz de absorver exsudato, (2) manter o ambiente úmido, (3) permitir a troca gasosa entre os meios interno e externo, (4) ser isolante térmico, (5) proteger a ferida contra bactérias, (6) ser apropriado ao hospedeiro, e (7) ser facilmente removido. Critérios adicionais incluem o material possuir boa (8) maneabilidade, (9) robustez / resistência ao desgaste, (10) conformabilidade e (11) ser facilmente esterilizável [4].

Com relação à função de curativo, dois requisitos principais podem ser identificados: (1) o material deve lidar com as forças que podem ser esperadas durante o tratamento e (2) os parâmetros não devem prejudicar a função normal da pele e, de preferência, deve promover a cura. Projetar o material para se parecer com a função e o comportamento da pele o mais próximo possível parece a abordagem mais recomendável no tratamento de lesões cutâneas [4].

Atualmente, a maioria dos curativos é de camada simples, como hidrogéis e nanofibras, que podem auxiliar o processo de cicatrização. No entanto, quando os microrganismos infectam feridas cobertas pelo curativo, podem resultar em danos secundários na troca do curativo. Portanto, é importante minimizar a invasão bacteriana no local da ferida. No passado, os revestimentos ou germicidas conjugados foram aplicados em curativos, porém as deficiências desse método incluem: diminuição da biocompatibilidade e da atividade antimicrobiana com a degradação do curativo. Para superar essas limitações, pesquisas estão demonstrando crescente interesse em curativos de dupla camada [20].

### **3.1.3 Curativos de dupla camada polimérica**

As feridas crônicas geralmente afetam diferentes camadas dérmicas e subdérmicas da pele. Devido à sua estrutura, a regeneração dérmica é menos eficiente e mais complicada que a regeneração epitelial. Por essas razões, pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de curativos de duas camadas que combinem materiais com propriedades similares as camadas epitelial e dérmica da pele [21], consistindo tipicamente de uma camada superior densa e elástica com uma camada inferior porosa e macia. A camada superior atua como uma barreira

para proteger as feridas de infecções bacterianas e manter um microambiente úmido. A camada inferior é usada como um arcabouço celular (*scaffold*) para ajudar a promover a migração celular e a regeneração de tecidos [20] ou como agente controlador de liberação de fármacos [6].

Vários estudos foram realizados com o intuito de se obter curativos de dupla camada polimérica utilizando polímeros naturais e/ou sintéticos em sua composição. Yang e colaboradores (2020) utilizaram membrana amniótica bovina descelularizada, por fornecer fatores de crescimento que podem acelerar a cicatrização da ferida, e esponja de quitosana, para melhorar a capacidade de absorção de fluido, preencher a cavidade da ferida acelerar a coagulação sanguínea, em um curativo de camada dupla. O estudo mostrou que a junção dos dois materiais propicia um ambiente para a redução do tempo da fase inflamatória no processo de cicatrização [22]. Choi e colaboradores (2014) estudaram a associação de um polímero natural, alginato de sódio, a um polímero sintético, o PVA. Os autores mostraram que o material desenvolvido é mais elástico e mais resistente mecanicamente do que os curativos de camada única compostos pelos mesmos polímeros. O material, ainda, teria um nível adequado de umidade e acúmulo de exsudatos na região da ferida [23].

Outras combinações de polímeros para formação de uma dupla camada polimérica são: quitosana de baixa e alta massa molecular [24]; alginato/carboximetilcelulose e alginato/gelatina [25]; alginato de baixa e alta massa molecular [26]; Polivinilpirrolidona (PVP) e ácido hialurônico [27]; e poliuretano e policaprolactona/gelatina [28]. Neste contexto, a maior parte dos curativos de dupla camada desenvolvidos envolvem a utilização de polímeros naturais. Porém, a utilização de polímeros naturais pode ser questionada devido a potenciais reações imunogênicas, possibilidade de transmissão de doenças e, principalmente, na dificuldade do controle das propriedades físico-químicas das matérias-primas. Portanto, este trabalho propõe a utilização de polímeros sintéticos, PVA e PAA, como a base para curativos bioativos.

### **3.1.4 Hidrogéis sensíveis: Poli(álcool vinílico) (PVA) e Poli(ácido acrílico) (PAA)**

Os hidrogéis são uma rede polimérica hidrofílica de estruturas tridimensionais reticuladas obtidos a partir de materiais poliméricos naturais ou sintéticos que absorvem uma quantidade substancial de água. Os hidrogéis derivados de polímeros sintéticos exibem inúmeras

vantagens, como altas capacidades de absorção de água e resistência mecânica e custo razoável do gel, quando comparados aos hidrogéis naturais. Os hidrogéis sintéticos diferem, ainda, em suas características devido a suas possibilidades de obtenção de várias estruturas químicas, técnicas de síntese e teor de água ou reticulação. Ainda, é possível projetar um hidrogel que cumpra funções específicas para necessidades específicas, a partir de uma mudança na composição química ou mesmo em um dos fatores de síntese, como condições das técnicas de síntese, métodos de reticulação e géis, podendo levar a novos biomateriais inteligentes. Os polímeros sintéticos geralmente contêm estruturas de rede bem definidas que podem ser modificadas para gerar degradabilidade e funcionalidade adaptáveis, que são características interessantes para o desenvolvimento de biomateriais [29]. Polímeros solúveis em água, como poli(ácido acrílico), poli(álcool vinílico), poli(vinilpirrolidona), poli(etileno glicol) e poliacrilamida são os sistemas mais comuns usados para se formar hidrogéis. Esses polímeros são atóxicos e amplamente utilizados em várias aplicações farmacêuticas e biomédicas [3], como para o uso em curativos inteligentes.

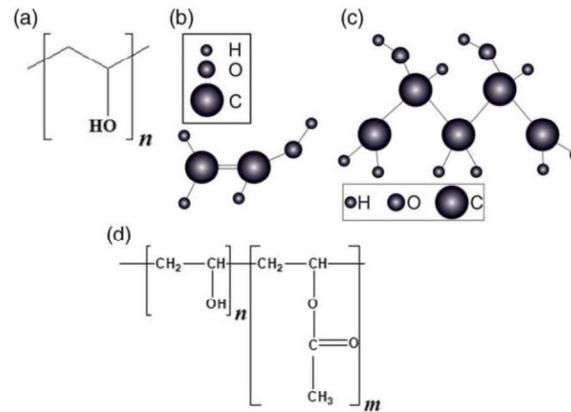
Os curativos inteligentes ou responsivos a estímulos melhoram o tratamento da lesão, detectando autonomamente o status da ferida e reagindo de acordo. Um exemplo são curativos inteligentes que podem detectar passivamente a infecção da ferida através da variação do pH do ambiente. Em feridas crônicas, os níveis de pH aumentam de ácido (pH 4,0) para básico (pH 9,0) numa infecção bacteriana e, assim, a variação do meio pode desencadear a liberação de fármacos e íons antibacterianos carregados pelo inchamento de um polímero sensível ao pH [4]. Os hidrogéis sensíveis ao pH podem ser divididos em neutros e iônicos (catiônicos e aniônicos). Os hidrogéis aniônicos contêm fragmentos carregados negativamente na rede de polímeros; os catiônicos têm fragmentos com carga positiva, enquanto os hidrogéis neutros contêm fragmentos de cadeia polimérica com cargas positiva e negativa [30].

Os polímeros iônicos mais comumente estudados para o comportamento responsivo ao pH incluem poli(acrilamida) (PAAm), poli(ácido acrílico) (PAA), poli(ácido metacrílico) (PMAA) e poli(metacrilato de dietilaminoetil) (PDEAEMA). Em meios aquosos de pH e força iônica apropriados, os grupos laterais das cadeias poliméricas ionizam-se e desenvolvem cargas fixas na rede de polímeros, gerando forças repulsivas eletrostáticas responsáveis pelo inchaço dependente de pH do hidrogel. Pequenas mudanças no pH podem resultar em mudanças significativas no tamanho do emaranhado das redes poliméricas. Grupos laterais de hidrogéis aniônicos são ionizados acima do valor de pKa da rede polimérica, levando ao inchaço do

hidrogel a um pH acima do pKa do polímero devido a uma grande força de inchamento osmótica pela presença de íons. O inverso é o caso dos hidrogéis catiônicos, que incham em pH mais baixos. Os principais fatores que influenciam o grau de intumescimento dos polímeros iônicos incluem as propriedades do polímero (carga, concentração e pKa do grupo ionizável, grau de ionização, densidade de reticulação e hidrofiliicidade ou hidrofobicidade) e propriedades do meio de intumescimento (pH, força iônica e o contra-íon e sua valência) [31].

Hidrogéis de PVA/PAA foram estudados com fins de absorção de cobre (Cu (II)) das águas residuais da galvanização industrial [32], em lentes de engenharia (microscópios, câmeras, displays, etc) [33], recobrimento para melhorar a interface eletrodo-tecido neural [34] e, ligantes para ânodos de silício em baterias de íon de lítio [35]. Na área biomédica, quando estes dois polímeros são utilizados em conjunto há a possibilidade de formação de hidrogéis sensíveis ao pH com resistência mecânica adequada para uso em curativos.

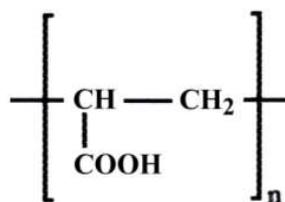
O poli(álcool vinílico) (PVA), representado esquematicamente na Figura 3.2, é um polímero sintético solúvel em água que possui cadeia linear principal composta apenas por átomos de carbono e um grupo lateral -OH [36]. Na última década, muita atenção foi dada ao PVA na pesquisa biomédica por ser um polímero biocompatível e com baixa citotoxicidade [37]. O uso do PVA completamente hidrolisado (grau de hidrólise entre 98 % e 99,8 %), em detrimento do PVA parcialmente hidrolisado, é um ponto importante na produção e para aplicações biomédicas. A solubilidade do PVA completamente hidrolisado acontece em temperaturas acima de 80 °C, enquanto a solubilidade do PVA parcialmente hidrolisado pode ser feita em temperaturas baixas, em torno de 40 °C, o que iria de encontro à temperatura corporal e poderia causar eventuais efeitos indesejados durante o uso do biomaterial que estará em contato com exsudatos [38].



**Figura 3. 2:** Imagem esquemática (a) da estrutura do mero do PVA completamente hidrolisado; (b) estrutura do álcool vinílico; (c) Estrutura do PVA; (d) Estrutura do PVA parcialmente hidrolisado. Fonte: [37]

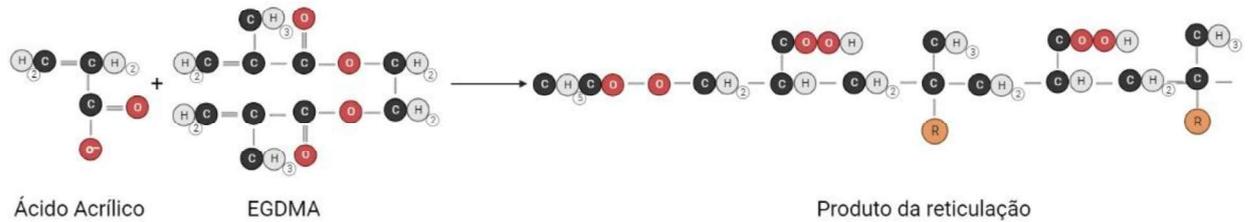
Um dos principais motivos para a alta aplicabilidade do PVA é pela sua capacidade de formação de hidrogéis de PVA para usos biomédicos. Assim, os hidrogéis de PVA podem ser empregados como administradores de fármacos, para encapsulamento celular, meniscos artificiais, como biossensores e como curativos, graças à sua alta retenção de umidade, alta permeabilidade ao oxigênio e transparência [29,36]. Além disso, por possuir propriedade não adesiva, os curativos de hidrogel de PVA podem ser facilmente removidos da ferida no processo de troca por um novo curativos sem ocasionar nova lesão na ferida [39]. Ainda, PVA com alta massa molecular tende a ter maior resistência à esforços de tração, o que também auxilia na troca de curativo, visto que o material não se romperia ou deixaria resíduos no leito da ferida[40].

O poli(ácido acrílico) (PAA) é um polímero que consiste em unidades repetidas de um grupo vinil com um ácido carboxílico anexado, Figura 3.3 [41]. O (PAA) é um polímero hidrofílico sintético, superabsorvente e ionizável usado para liberação de fármacos e no aprimoramento da hidroflicidade da superfície dos materiais [42]. Portanto, a sua capacidade de formação de hidrogéis e sua biocompatibilidade, tornam o PAA um bom candidato à pesquisa de dispositivos médicos. Estudos mostram também a sua ampla variedade de aplicações médicas no campo tratamento de lesões cutâneas a partir da elaboração de curativos [41].



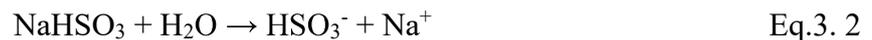
**Figura 3. 3:** Fórmula estrutural do PAA. (Fonte : (Fonte: Própria autora)

O hidrogel de PAA é obtido a partir da polimerização via radicais livres do monômero ácido acrílico (AA) na presença de um reticulante que vise reforçar a estrutura do gel formado, de modo a evitar a solubilização do polímero durante o processo de absorção de água [43]. O dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) é um dos agentes reticulantes mais utilizados na polimerização em solução do ácido acrílico (Figura 3.4).

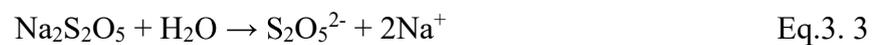


**Figura 3. 4:** Representação das reações de reticulação do ácido acrílico pelo EGDMA (Fonte: Própria autora)

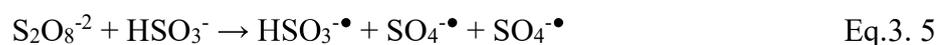
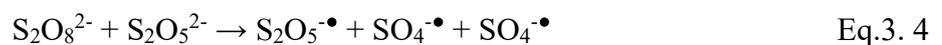
O processo de polimerização do AA é iniciado por intermédio de iniciadores com a formação de radicais livres por temperatura ou por reações redox [44]. Um dos pares redox empregados para a obtenção do PAA é o persulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) e o bissulfito de sódio (NaHSO<sub>3</sub>) [45–48]. O processo com o par redox envolve reações de formação de radicais livres do persulfato de amônio (Eq.3.1) e bissulfito de sódio (Eq. 3.2 e Eq.3.3):



Como o bissulfito é uma mistura de bissulfito de sódio e metabissulfito de sódio, a reação radicalar de metabissulfito de sódio deve ser considerada (Eq.3.3). Portanto,



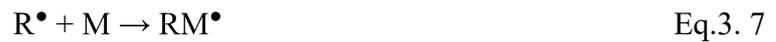
Assim, a reação redox ocorre com ambas espécies S<sub>2</sub>O<sub>5</sub><sup>2-</sup> (Eq.3.4) e HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Eq.3.5).



Ao mesmo tempo em que as Eq.3.4 e Eq.3.5 ocorrem, e como a polimerização (neste caso) acontece na presença do oxigênio do meio, o metabissulfito também irá reagir com o oxigênio (Eq.3.6). Assim,



A formação dos radicais supracitados ( $\text{R}^\bullet$ ) dará início à polimerização no monômero (Eq.3.7), M:



Seguida da propagação da cadeia (Eq.3.8):



O final da polimerização envolve processos de terminação por combinação de pontas de cadeia e/ou por desproporcionamento [45–48].

A reticulação do PAA na interface do PVA tem sido frequentemente descrita, principalmente na produção de fibras e aplicações onde a superabsorção são requeridas. A eficácia da reticulação e o comportamento de intumescimento PAA/PVA dependem de vários fatores, incluindo tempo e temperatura de síntese, massa molar dos polímeros e a proporção da mistura PVA/PAA [42]. Liu e colaboradores (2018) relataram a produção de um tipo de hidrogel de PVA/PAA super-resistente obtido através de ligações de hidrogênio entre os polímeros. O processo utilizado foi a imersão de hidrogéis de PVA preparados em soluções aquosas de PAA. O processo de imersão, então, teria introduzido cadeias de PAA nos hidrogéis de PVA, o que teria aumentado a densidade de reticulações por ligação de hidrogênio e, portanto, aprimorado as propriedades mecânicas do PAA [49]. Neste trabalho, o processo de polimerização de PAA sobre um filme de PVA, previamente formado e seco, foi utilizado.

Uma maneira de aumentar a aplicabilidade dos hidrogéis de PVA/PAA em aplicações avançadas (etnológicas e médicas) é a partir da introdução de materiais inorgânicos ao hidrogel. Uma abordagem interessante se concentra na incorporação de nanopartículas dentro dos hidrogéis poliméricos, como nanomateriais à base de carbono, polímeros, cerâmicos e metálicos. Assim, é possível obter, por exemplo, nanocompósitos com propriedades superiores e funcionalidade personalizada [29]. Um exemplo é o material desenvolvido por Zhu e

colaboradores (2018) que visaram uma aplicação ecológica, onde membranas de PVA/PAA (produzidas por eletrofiacção) e nanopartículas de sílica contendo íons prata (produzidas via rota sol-gel) atuariam como filtro e purificador de ar, além de deter propriedades antibacterianas e antivirais [50]. Os curativos também podem ser modificados pela adição de agentes antibacterianos e/ou fatores de crescimento para melhorar os efeitos terapêuticos [22], como é o caso do uso de vidro bioativo contendo íons cério e cobalto.

### 3.2 O Vidro Bioativo

Os materiais cerâmicos são uma classe de materiais com características inorgânicas, não metálicas e de caráter misto iônico-covalente, extensamente estudados para uso em aplicações biomédicas, na área de engenharia de tecidos, como substitutos de tecidos danificados e/ou com a função de estimular a regeneração tecidual [51]. Dentre os materiais cerâmicos estudados encontram-se a hidroxiapatita sintética (HA), fosfatos de cálcio e os vidros bioativos [12,52].

O VB (vidro bioativo) foi desenvolvido por Larry Hench no final dos anos de 1960 e ganhou visibilidade por sua alta capacidade de ligação com o tecido ósseo a partir da liberação dos íons presentes na estrutura do material e formação de hidroxiapatita carbonatada [53,54]. Neste contexto, Hench criou um material com a mesma composição do tecido ósseo, contendo 46,1% mol de SiO<sub>2</sub>, 24,4 % mol de Na<sub>2</sub>O, 26,9 % mol de CaO e 2,6 % mol de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, o chamado 45S5- o Bioglass® [7]. Porém, o uso do VB não se limita apenas ao tecido ósseo, podendo também ser usado em tecido macio, como a pele, geralmente envolvendo a associação do VB com polímeros para uso como curativo. Experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraram que VBs aplicados na pele estimulam fibroblastos a expressar alguns fatores de crescimento e proteínas importantes que levam a uma melhoria na capacidade de migração celular, aumento na formação de vasos sanguíneos e na diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos no local da ferida, resultando em uma aceleração do seu processo de cicatrização [55]. Exemplos de curativo contendo VB são os desenvolvidos por Martins e colaboradores (2016) e Martins e colaboradores (2018), que produziram espumas de quitosana contendo VB para tratamento de lesões cutâneas causadas por queimaduras [56,57].

Diversas texturas e formas podem ser produzidas e empregadas com os VBs, como pó, *scaffolds*, na produção de compósitos e/ ou híbridos, como agentes de carga para materiais poliméricos, em revestimento de biomateriais metálicos, em sistemas de liberação controlada

de fármacos, como carreadores de íons e/ou em escala nano [58]. Ao serem produzidos em nanoescala, os VBs se tornam materiais particularmente atraentes em aplicações biomédicas. Dentre as texturas de nanopartículas de VB, o vidro bioativo mesoporoso atrai cada vez mais a atenção para ser empregado como carga bioativa no transporte de medicamentos, ou na liberação de íons terapêuticos devido ao seu tamanho ajustável, estrutura de poros e alta área superficial específica [14]. Ainda, VBs em escala nano e com morfologia esférica podem melhorar a adesão celular no material, aumentar a proliferação celular e promover a diferenciação em meio fisiológico [59].

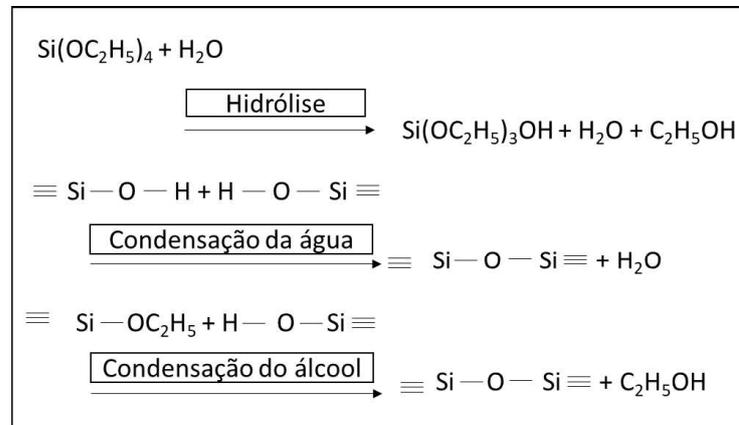
Os VBs podem ser sintetizados por rota de fusão ou rota sol-gel. A metodologia de fusão apresenta algumas desvantagens, como a dificuldade em se obter partículas em escala nano, a possibilidade de haver dissolução de impurezas indesejadas no VB durante o processo, a fusão dos óxidos demanda alto gasto energético e as partículas formadas tendem a ser pontiagudas, o que pode causar microlesões no tecido [8,12]. Desta forma, a principal via de síntese de VB a temperatura ambiente, alternativa ao processo de fusão, é o processo sol-gel.

### **3.2.1 Síntese de vidros bioativos via rota sol-gel**

A rota de formação de VB via sol-gel tem inúmeras vantagens. Além de menor gasto energético, ela oferece vantagem para as aplicações biomédicas, uma vez que proporciona a formação de partículas homogêneas, com elevadas áreas superficiais e elevada porosidade que facilitam a adesão celular [60]. Além disto, os VBs sintetizados por esta rota apresentam maiores concentrações de grupos Si-OH, o que aumenta a capacidade de funcionalização destes materiais, pois aumenta a quantidade de sítios ativos, aumentando, também, a sua taxa de degradação quando em contato com fluido corpóreo [54,58]. Outras vantagens relacionadas a este método são a facilidade de associação de moléculas orgânicas poliméricas e biomoléculas, células, fármacos e íons ao material sintetizado [61].

No processo sol-gel o tetraetil ortosilicato (TEOS-  $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$ ) é o precursor de silicato mais empregado para obtenção de VB. O TEOS interage com a água hidrolisando-se (sol), tanto em meio ácido como em meio básico, formando uma suspensão contendo nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  (sol) e condensando, de modo a formar uma rede tridimensional de  $\text{SiO}_2$  (gel) [61,62]. A hidrólise do TEOS forma grupos silanol ( $\text{SiH}_4\text{O}$ ), enquanto a condensação destes grupos

silanóis e de grupos etóxi (R-O) cria ligações de siloxano, gerando a estrutura da sílica (Si-O-Si) [63,64]. As reações de hidrólise e condensação estão apresentadas na Figura 3.5.



**Figura 3. 5:** Reações gerais de TEOS que levam à formação de partículas de sílica no processo sol-gel (Fonte: Adaptado de [63])

As reações de condensação liberam água e etanol, o que gera um excesso de água na rede do vidro. Assim, faz-se necessária a secagem do material para estabilizar o gel e produzir um corpo nanoporoso de rede interconectada. Os poros são os interstícios ou espaços pré-ocupados pela água e solventes na rede das nanopartículas aglutinadas [8]. Após o processo de secagem é iniciado o processo de calcinação, ou tratamento térmico, empregado para eliminar subprodutos de materiais não alcóxicos nas partículas, dar resistência mecânica, realizar o crescimento de grão e densificar o material. Temperaturas acima de 400 °C devem ser empregadas no processo de calcinação para que ocorra a incorporação de íons adicionais na rede do vidro [8,61,65].

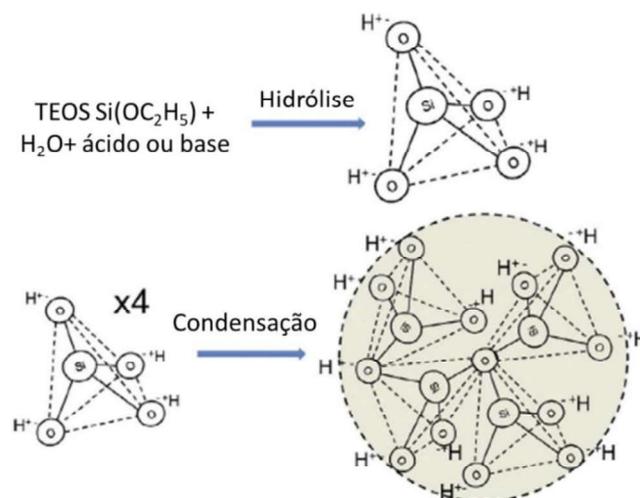
A escolha do pH da síntese influencia nas características finais do material, como a distribuição de tamanho das partículas, morfologia, volume e tamanho de poros [60]. Uma vez acontecendo em condições básicas, o processo é chamado de processo Stöber. Originalmente desenvolvido por Werner Stöber em 1967, este método consiste na adição de hidróxido de amônia como catalisador à síntese e permite a produção de partículas esféricas e monodispersas [66]. A dispersão acontece porque as partículas em suspensão no meio sofrem repulsão devido às forças repulsivas geradas pela presença de íons OH<sup>-</sup>. Por vezes, é adicionada à síntese surfactantes orgânicos catiônicos para melhorar a dispersão das partículas e agir adicionalmente como *templates*. A introdução destas moléculas facilita a formação de morfologias complexas e de materiais com estruturas mesoporosas (diâmetro de poros entre 2 nm e 50 nm). Exemplos de

*templates* e surfactantes para catálises básicas são o brometo de centrímonio (CTAB) e a dodecilamina [58,61].

### 3.2.2 A estrutura dos vidros bioativos

Os VBs possuem característica amorfa e são estruturalmente formados por óxidos formadores de rede, modificadores de rede e óxidos intermediários. Os óxidos formadores de rede são aqueles que não precisam de componentes adicionais para que o vidro seja criado, exemplo destes são a sílica ( $\text{SiO}_2$ ), o pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) e o trióxido de boro ( $\text{B}_2\text{O}_3$ ). Já os modificadores de rede são aqueles que afetam a estrutura do vidro, porque ligam-se a átomos de oxigênio não- ligantes ( $\text{Si}-\text{O}-\text{M}^+$ , onde M é um cátion modificador de rede), enquanto que os óxidos intermediários podem tanto agir como formadores quanto como modificadores [58].

A unidade básica de construção dos vidros de silicato é o tetraedro de  $\text{SiO}_4^{4-}$ , que pode se ligar ao vizinho através de átomos de oxigênio ligantes, formando ligações de Si-O-Si, como mostrado na Figura 3.6. Esses tetraedros são comumente chamados de unidades  $\text{Q}^n$ , onde n descreve o número de átomos de oxigênio ligados ao tetraedro. Por exemplo, um tetraedro ligado a outro tetraedro em cada um dos seus quatro vértices corresponde a quatro átomos de oxigênio ligantes por tetraedro ( $\text{Q}^4$ ) [67].



**Figura 3. 6:** Reações no processo sol-gel para formação de sílica tetraédrica e nanopartículas a temperatura ambiente (Fonte: Adaptado de [8]).

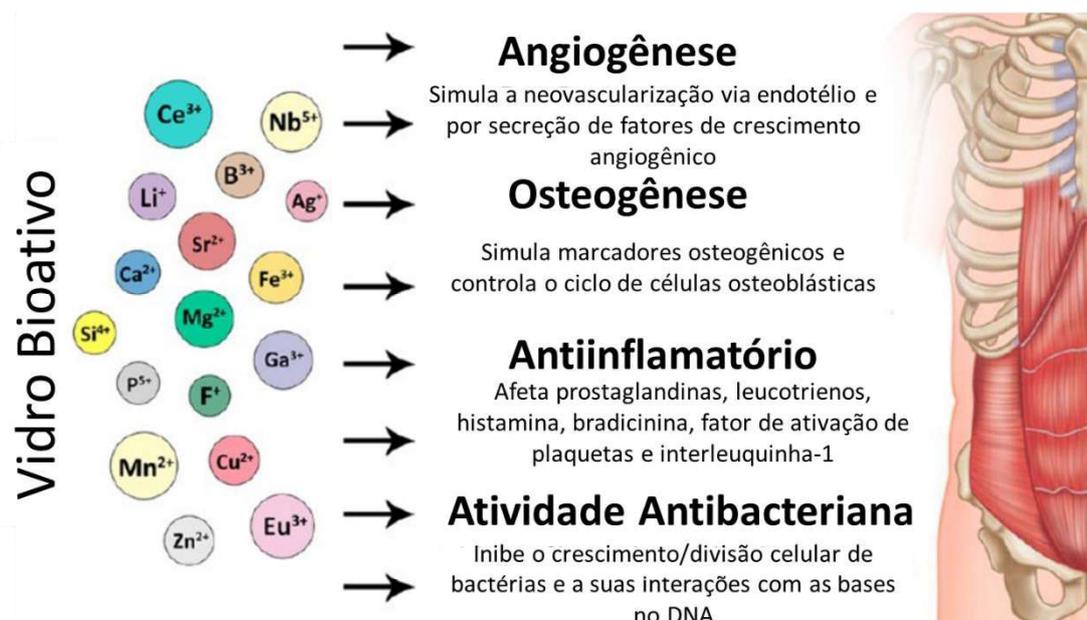
A terceira categoria de componentes é a de íons intermediários. Os íons intermediários têm forças de campo cristalino situadas numa faixa entre os formadores de rede e os modificadores

de rede. Como resultado, a incorporação de íons intermediários em vidros bioativos pode ajudar a melhorar certas propriedades do vidro, como a redução da tendência de cristalização [67].

Uma das formas de alterar a estrutura do VB e incrementar propriedades terapêuticas é a partir da adição de íons que desempenham funções químicas e/ou biológicas no meio ao qual estão inseridos [68,69].

### 3.2.3 Incorporação de íons terapêuticos ao vidro bioativo

À estrutura dos vidros bioativos podem ser inseridos alguns componentes, como moléculas biológicas, fármacos e íons metálicos que exercem funções terapêuticas. Os íons metálicos adicionais desempenham funções específicas, como ação antimicrobiana, antioxidante, angiogênica, dentre outras. Exemplos destes íons e das funções que desempenham são a prata, o gálio e cério, com efeito bactericida; estrôncio com inibição da atividade osteoclástica e aumento da atividade metabólica de osteoblastos, podendo ser empregado no tratamento da osteoporose; o cálcio que pode favorecer a diferenciação osteoblástica, bem como a precipitação de apatitas do material; e o cobalto que possui ação angiogênica [9,12,70]. A Figura 3.7 traz alguns dos íons empregados e suas ações terapêuticas.



**Figura 3. 7:** Visão geral das respostas biológicas aos produtos de dissolução iônica de vidros bioativos (Fonte: Adaptado de [7]).

Na rota sol-gel existem duas formas de inserção de íons à rede do vidro: 1) a partir da adição de sais metálicos durante a síntese e 2) imergindo o material sintetizado em um banho de sais

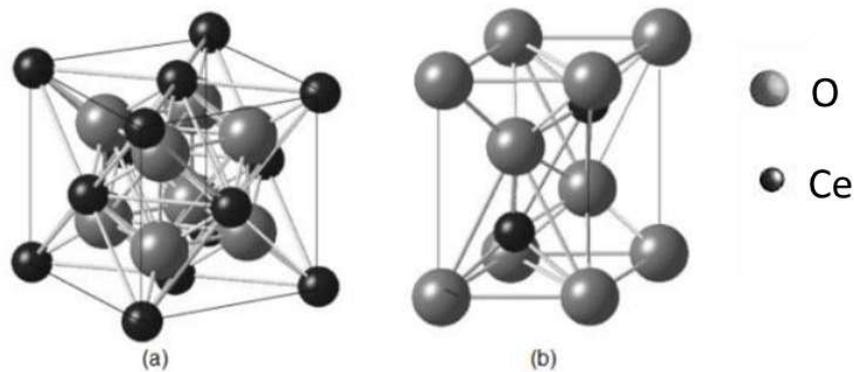
metálicos. A primeira via de inserção de íons à rede do vidro acontece por adição de sais e óxidos durante a formação de rede da sílica, enquanto que a segunda via de inserção de íons à rede do vidro acontece após a obtenção de partículas de sílica, onde essas partículas são mantidas em uma solução de íons que serão adsorvidos na sua superfície; em seguida, o vidro é novamente tratado termicamente para que os íons sejam difundidos para o interior da rede no material [58,71,72] Neste estudo a segunda via de inserção de íons, chamada de método de impregnação pós-síntese, foi utilizada.

### 3.2.3.1 O Cério no Vidro Bioativo

O cério (Ce) é o elemento químico de número atômico 58 na tabela periódica, que possui massa atômica 140 u e faz parte do grupo dos elementos classificados como lantanídeos ou terras raras. O cério é o mais abundante dos elementos terras raras e pode ser encontrado na natureza na forma de óxido de cério ( $\text{CeO}_2$ ) em minerais como bastinasita e monasita [73].

O Ce é um elemento eletropositivo capaz, portanto, de formar ligações iônicas com outros elementos, uma vez que possui baixo potencial de ionização. A distribuição eletrônica do cério,  $[\text{Xe}]4f^1 5d^1 s^2$ , mostra que o estado de oxidação mais estável para este elemento é o (Ce III,  $\text{Ce}^{3+}$ ), entretanto este estado pode facilmente oxidar para (Ce IV,  $\text{Ce}^{4+}$ ) em solução aquosa. No estado tetravalente, o cério é um forte agente oxidante e pode ser reduzido, por exemplo, por peróxido de hidrogênio via reação espontânea. Assim, os sais de  $\text{Ce}^{3+}$  são mais utilizados como precursores de cério para vários compostos [73].

Um dos compostos formados pela espécie  $\text{Ce}^{4+}$  é o óxido de cério ( $\text{CeO}_2$  ou céria). A céria possui estrutura cúbica do tipo fluorita, como mostrado na Figura 3.8 (a). Esta estrutura tipo fluorita confere a céria maior estabilidade que o óxido formado pela espécie  $\text{Ce}^{3+}$ , o sesquióxido ( $\text{Ce}_2\text{O}_3$ ), que possui estrutura do tipo hexagonal, como mostrado na Figura 3.8 (b) [73].



**Figura 3. 8:** Estruturas cristalinas dos principais óxidos de cério. (a) Estrutura cúbica do tipo fluorita do  $\text{CeO}_2$ ; (b) Estrutura hexagonal do  $\text{Ce}_2\text{O}_3$ . (Fonte: Adaptado de [74])

Devido à sua versatilidade oxidativa, o cério pode ser aplicado em diversas situações. Exemplos são compostos de cério empregados em refino metalúrgico, ligas metálicas, anticorrosivos para uso doméstico, células a combustíveis, medicina, dentre outros [73,75]. Nos campos da biologia e medicina, as pesquisas relacionadas ao cério apontam para aplicações da presença deste elemento em compósitos como agente fungicida, anti-inflamatório e antitumoral. A atividade antimicrobiana da céria é associada à sua capacidade de entrar e/ou interagir com a membrana das bactérias. Para explicar esta atividade antimicrobiana dois mecanismos de ação são estudados: 1) bloqueio do transporte de nutrientes para dentro da célula; 2) estresse oxidativo. No primeiro mecanismo, estima-se que as partículas, especialmente as nanopartículas, se associem a locais específicos na célula, como transportadores e poros [75]. Para Kannan e colaboradores (2014), este mecanismo deve-se a inativação de proteínas celulares e desativação de enzimas após a penetração da céria na célula bacteriana [76].

O segundo mecanismo de ação antimicrobiana se baseia na variação do número de oxidação (NOX) do cério, na alternância entre  $\text{Ce}^{3+}$  e  $\text{Ce}^{4+}$  [77]. Estes íons podem combater espécies reativas de oxigênio (ERO) (radicais livres) presentes na célula, como superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), radicais peróxil ( $\text{ROO}^-$ ) e radicais hidroxil ( $\text{OH}^-$ ), ajustar/limitar a concentração de oxigênio no microambiente e induzir atividades anti-inflamatórias, pró-osteogênicas e pró-angiogênese no organismo [78]. O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é o tipo mais abundante de ERO presente em células vivas e também é o responsável pelo dano oxidativo em células. Em quase todos os organismos vivos, a enzima catalase é a responsável pela decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em oxigênio e água, entretanto pode haver um desbalanço entre ERO e essa enzima causando doenças, como aquelas devido à penetração de bactérias no organismo durante uma inflamação. A inflamação frequentemente aumenta a geração de ERO, e isso induz estresse oxidativo. Esse desequilíbrio

propaga a inflamação, o que pode levar tempo em demasia para que seja alcançada a recuperação completa do organismo. Nesse cenário, óxidos redutíveis, como a céria, que são eficazes na conversão de ERO, representam bons candidatos como aditivos para biomateriais por conferir propriedades antioxidantes semelhantes a enzima catalase [79]. Assim, estudos recentes têm utilizado o elemento cério associados ao vidro bioativo para diminuir as respostas inflamatórias e, conseqüentemente, o tempo de cura de uma lesão [78,80].

A adição de íons cério ao vidro bioativo aumenta a ação bactericida do material [81,82]. A maior parte dos estudos relacionados a adição de cério no VB são direcionados para a dopagem do VB com céria, por ser um óxido que age na regulação do estresse oxidativo das células, pois limita a quantidade disponível de radicais livres de oxigênio [77]. Porém a céria é um óxido que tende a reduzir a liberação de íons no VB, pois a céria tende a reagir com o fósforo formando cristais aglomerados de  $CePO_4$  que, por sua vez, são pouco solúveis em meio fisiológico [83].

Vidros bioativos baseados na composição 45S5 Bioglass® contendo diferentes porcentagens de  $CeO_2$  foram produzidos, por Lusvardi e colaboradores (2019), por rota de fusão e foram estudados sem fósforo na composição do material. Os testes *in vitro* mostraram que os vidros não são citotóxicos para as células osteocíticas, e que estimularam a proliferação celular. O estudo demonstra, portanto, que os vidros bioativos contendo céria e isentos de fósforo são bons candidatos para o uso como biomateriais, pois poderia diminuir o tempo de recuperação de um paciente, bem como a quantidade de fármacos utilizados por paciente num pós-operatório [84]. Malavasi e colaboradores (2019) chegaram a conclusões semelhantes que Lusvardi e colaboradores (2019) para o VB 45S5 Bioglass® associado ao cério [85].

Outros trabalhos, como o de Nicolini e colaboradores (2015) e Nicolini e colaboradores (2017) tratam da capacidade dos vidros bioativos contendo Ce, baseados no 45S5 Bioglass®, de inibir o estresse oxidativo em termos de redução do peróxido e superóxido de hidrogênio ( $O_2^-$ ), mimetizando a atividade da enzima catalase e a atividade da enzima superóxido dismutase. Os ensaios para a mimetização da catálise do cério visaram estudar se o material possuía ação antioxidante – tal qual partículas de céria não associadas a VB. Já o teste da atividade enzimática da superóxido dismutase ocorreu para avaliar se o material conseguiria degradar o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (oxigênio). Os autores, então, concluíram que quanto maior é a concentração de cério no VB, mais efetiva é a capacidade antioxidante do material [86,87]. O papel da enzima catalase

na dissociação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela presença céria em VB também foi estudado por Benedetti e colaboradores (2018). Os autores observaram que vidros mesoporosos produzidos por rota sol-gel, em relação aos VBs produzidos por rota de fusão, possuem maior atividade mimética da enzima catalase, uma vez que possuem maiores áreas superficiais, sendo, portanto, mais efetivos no combate a compostos que levariam ao estresse oxidativo de células [79].

Estudo *in vitro* de VB com o intuito de incorporar íons cério e analisar a sua bioatividade e atividade bactericida foi realizado por Goh e colaboradores (2014). Para a produção do VB foi utilizada a rota sol-gel. Os testes para análise da atividade bactericida *in vitro* para espécies do tipo *E. coli* mostram que o vidro é um bom candidato a aplicações onde esta ação terapêutica é requerida [81]. Estudos baseados na composição de VB 80S também foram realizados. A análise da estrutura de VB contendo cério (VB-Ce) feita em estudo de Shuti e colaboradores (2012), deu-se a partir da síntese de micropartículas de VB-Ce via rota sol-gel e pela caracterização do material através de  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR (espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alta resolução com giro no ângulo mágico). Os resultados obtidos pelos autores indicaram que o cério atua na rede do VB como modificador de rede, o que também foi observado por Shruti e colaboradores (2013) [88,89].

Zhang e colaboradores desenvolveram VB multicomponentes ( $\text{SiO}_2 - \text{Na}_2\text{O} - \text{CaO} - \text{ZnO} - \text{CeO}_2$ ), assim combinando as propriedades terapêuticas dos íons cério e zinco para aplicação em regeneração de nervo periférico, quando associado a polímeros biodegradáveis como o PLGA (poli(ácido lático co-ácido glicólico)). O trabalho discute o perfil de liberação de íons de zinco e de cálcio, entretanto a liberação dos íons cério não foi destacada. Porém, com estes resultados, os autores afirmam que a razão Ca:Ce está intimamente relacionada a interconectividade da rede do vidro, uma vez que enquanto a razão Ca:Ce aumenta, a interconectividade da rede de Si-O-Si tende a diminuir [90].

Zheng e colaboradores (2020) sintetizaram nanopartículas de VB-Ce baseadas na composição do vidro 70S via rota sol-gel com metodologia de impregnação após a síntese. O tamanho de partículas por eles obtidos variou entre 100 nm e 300 nm, indicando que se trata de um material submicrométrico. Os autores mostraram a partir das análises de resultados das técnicas de UV-vis e XPS que o cério foi incorporado à rede do VB em diferentes estados de oxidação, porém a concentração de  $\text{Ce}^{4+}$  foi maior em relação a concentração de  $\text{Ce}^{3+}$ . Nos resultados de ensaios biológicos, os autores afirmam que houve redução da expressão de todos os genes pró-

inflamatórios indicando que o material produzido possui ação anti-inflamatória. O material, ainda, reduziu respostas ao estresse oxidativo, neutralizando os efeitos oxidantes induzidos por agentes pró-oxidantes, como as nanopartículas apenas de vidro [78]. A adaptação desta síntese foi empregada neste estudo para a produção de VB contendo íons cério.

Karakoti e colaboradores (2010) desenvolveram scaffolds de VB contendo nanopartículas de céria encapsuladas e estudaram a sua capacidade de estimular a produção de colágeno em células tronco mesenquimais humanas (hMSCs). Após 10 dias, as hMSCs produziram uma quantidade significativa de colágeno, quando comparados a produção de colágeno nos scaffolds sem nanocéria [91]. Estes estudos mostram que a utilização do cério como agente terapêutico pode ser eficaz na produção de colágeno, quando associados ao VB, no tratamento de lesões cutâneas.

Outro estudo para aplicação em tecido dérmico foi realizado por Xie e colaboradores (2022), onde foi investigada a influência do extrato de nanopartículas mesoporosas de VB contendo íons Ce na formação de novos vasos linfáticos *in vitro*. O estudo mostrou que o VB-Ce é capaz de promover a proliferação e migração de células endoteliais linfáticas, além de promover a formação da rede vascular linfática. Portanto, o VB-Ce seria uma estratégia potencial para a utilização na cicatrização de feridas crônicas, uma vez que a cicatrização de feridas está altamente relacionada ao sistema vascular linfático [72].

### 3.2.3.2 O Cobalto no Vidro Bioativo

O cobalto (Co) é o elemento químico de número 27 na tabela periódica, possuindo massa atômica de 59 u e faz parte do grupo de elementos químicos classificados como metais de transição. O cobalto é encontrado em sua forma natural em rochas e minerais ígneos e sedimentares, e seus estados químicos de oxidação variam entre +1 e +5, mas os estados +1, +4 e +5 são raros de serem encontrados, sendo o Co (II) ( $\text{Co}^{2+}$ ) e o Co (III) ( $\text{Co}^{3+}$ ) mais comuns. A formação de sais de Co ocorre a partir do Co (III) em meio ácido, o que não ocorreria com o Co(II) por ser uma espécie menos reativa [92,93].

O cobalto pode ser encontrado no meio ambiente em peixes, água, nas plantas e cereais. Já no ser humano, a presença do cobalto ocorre especialmente no coração, fígado, rins e baço, sendo a pele uma das principais vias de absorção do elemento. Assim, em meio biológico, o Co

empenha funções para o desenvolvimento da vida, como componente da vitamina B12, coenzima para mitose celular, desempenhando papel na geração de neurotransmissores, no funcionamento do sistema imunológico, na regulação da expressão gênica e na prevenção de doenças crônicas [93,94].

As aplicações do Co envolvem inúmeras aplicações industriais, como soldagem, ferramentas diamantadas, retificação, catalisadores químicos, usinas nucleares, indústrias de pigmentação, dentre outras [93,94]. Na medicina, o Co é utilizado no tratamento da menopausa e como biomaterial (principalmente próteses) produzido a partir de suas ligas metálicas [94]. Ainda no campo dos biomateriais, estudos mostram a produção de VB associado ao cobalto (VB-Co) para regeneração óssea, uma vez que o Co é um agente angiogênico e auxilia na regeneração tecidual [95].

Os íons cobalto tem sido indicados como promissores para aplicações biomédicas, pois têm a capacidade de interferir com os sensores de oxigênio no caminho da resposta à hipóxia. Este fenômeno estimula a produção de eritropoietina, levando a um aumento da capacidade de transporte de oxigênio no sangue. Portanto, a ativação do fator induzível por hipóxia (HIF) leva a uma codificação de fatores de crescimento angiogênicos, resultando em crescimento de tecido *in vivo* [96].

A resposta celular à baixa pressão de oxigênio desempenha um papel fundamental na promoção da cicatrização de feridas. O HIF é o principal ativador transcricional que regula a função celular e a expressão gênica em condições hipóxicas. O HIF-1 é um fator de transcrição heterodimérico que consiste em duas subunidades, HIF-1a e HIF-1b. A subunidade HIF-1b é constitutivamente expressa dentro do núcleo da célula, enquanto a presença e atividade mantidas de HIF-1a são reguladas por oxigênio. Durante condições normóxicas, o HIF-1a é continuamente hidroxilado por prolilhidroxilases (PHDs) dependentes de  $\text{Fe}^{2+}$  e oxoglutarato, resultando em ubiquitinação rápida e subsequente degradação. Durante a hipóxia, a atividade dos PHDs é bloqueada, levando à estabilização e acúmulo de HIF-1a, que conseqüentemente se transloca para o núcleo e se liga ao HIF-1b. O complexo HIF-1 combinado inicia a ativação dos genes alvo relacionados à neovascularização e regeneração tecidual. A hipóxia pode ser imitada artificialmente pela estabilização da expressão de HIF-1a, por exemplo, através da adição de dimetiloxalilglicina (DMOG), um inibidor competitivo de PHDs de pequenas moléculas. Foi relatado que curativos fibrosos de policaprolactona (PCL) liberadores de

DMOG poderiam melhorar a angiogênese e o processo de cicatrização em camundongos diabéticos. Os íons cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ) oferecem uma alternativa aos agentes que simulam hipóxia. O  $\text{Co}^{2+}$  pode inibir a atividade dos PHDs, substituindo o  $\text{Fe}^{2+}$  lábil do centro de ferro, o que resulta em HIF-1a artificialmente estabilizado em situações normóxicas. A indução de condições semelhantes à hipóxia e o efeito antimicrobiano de  $\text{Co}^{2+}$  revelaram sua potencial aplicação na cicatrização de feridas [97].

Barrioni e colaboradores (2018) estudaram como dois tipos de sal precursor de cobalto influenciam nas propriedades estruturais e de bioatividade de VB-Co sintetizados via rota sol-gel. Para isso, foram utilizados os sais cloreto de cobalto e nitrato de cobalto. Os resultados de difração de raio X (DRX) mostram que ao utilizar o precursor cloreto de cobalto, ocorre a formação de cristais de óxido de cobalto (II, III), indicando que nem todo cobalto foi incorporado à rede do VB como um modificador de rede. Porém, não foi detectada cristalinidade ao utilizar nitrato de cobalto como precursor [98].

VBs-Co foram associados ao PVA para estudo de regeneração óssea. Laia e colaboradores (2020) desenvolveram scaffolds híbridos de PVA/VB-Co contando com a capacidade terapêutica do VB em promover a osteogênese e a do cobalto em promover angiogênese. O VB foi sintetizado via rota sol-gel e produzido com variação de cobalto entre 5 % e 10 % mol. O estudo mostrou, a partir de uma análise do produto da dissolução do material, que o cobalto é liberado para o meio nas primeiras horas de imersão em *Simulated Body Fluid* (SBF) e que a presença do cobalto não causa citotoxicidade às células endoteliais de veia umbilical humana. Isto indica que o híbrido possui potencial aplicação como biomaterial com liberação de íons cobalto como íon terapêutico associado ao PVA [95].

A produção de VBs multicomponentes contendo íons cobalto foi relatada por Moura e colaboradores (2017). Os autores estudaram a produção e caracterização de um material compósito para aplicações em cicatrização de feridas. Os VBs foram obtidos pelo processo sol-gel contendo em sua composição íons metálicos de prata (Ag) e cobalto. Os íons Ag e Co foram escolhidos devido às suas propriedades antibacterianas e angiogênicas, respectivamente, que seriam benéficas no processo de cicatrização de feridas. Fibras de PCL foram produzidas por eletrofiação. As membranas desenvolvidas a partir das fibras de PCL contendo VB com íons Ag e Co apresentam grande potencial para cicatrização de tecidos moles. A partir dos resultados

obtidos, os autores levantaram a hipótese de que os curativos poderiam ser bons candidatos a para melhorar a cicatrização de feridas em tecidos especiais, como a pele [96].

Diante da revisão bibliográfica realizada, observou-se que o uso concomitante de metais de transição com fins terapêuticos ganhou espaço nas pesquisas acadêmicas envolvendo materiais bioativos. Logo, este trabalho se propôs a utilizar íons de transição Ce e Co para o tratamento de lesões cutâneas como alternativa ao uso de antibióticos sistêmicos.

#### **4. ESTUDO DE NANOPARTÍCULAS MESOPOROSAS DE VIDRO BIOATIVO CONTENDO CÉRIO E COBALTO**

Este capítulo teve como objetivo a produção via rota sol-gel de nanopartículas esféricas e mesoporosas de vidro bioativo com incorporação de íons terapêuticos Ce e Co através de procedimento de modificação pós-síntese. A análise das propriedades estruturais indicou que os íons estariam incorporados na rede do VB tanto como modificadores, quanto como formadores de rede. O perfil de liberação de Si, Ce e Co foi monitorado durante 14 dias usando solução simulada de exsudato de ferida (SEF), o que não havia sido relatado anteriormente na literatura. Os comportamentos biológicos *in vitro* mostraram que Ce e Co tiveram um efeito sinérgico sobre o meio, resultando em amostras com alta viabilidade celular e atividade antibacteriana. Os nanomateriais obtidos mostraram resultados promissores para o tratamento de feridas cutâneas.

**Publicado** em Journal of Non-Crystalline Solids (volume 613, 122391, 2023).

**DOI:** 10.1016/j.jnoncrysol.2023.122391

## 4.1 Introdução

A pele humana é o maior e mais externo órgão do corpo, e sua função primária é protegê-lo de agentes externos [2]. De acordo com Lai-Cheong e McGrath [99], a pele é um tecido epitelial e mesenquimal complexo composto por uma epiderme estratificada em múltiplas camadas, estruturas anexais como folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, uma derme contendo fibras de colágeno e elastina, e uma camada de tecido adiposo subcutâneo subjacente. A perda da integridade da pele expõe o tecido subcutâneo, favorecendo a colonização e proliferação microbiana [18]. A cicatrização da pele é um processo complexo composto por várias etapas, como hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação [100]. Quando uma ferida está em um estado persistente de inflamação, e não pode ser cicatrizada em um tempo razoavelmente curto (menos de 12 semanas), é chamada de ferida crônica [60]. Feridas crônicas são causadas por deficiências celulares e moleculares, incluindo altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e infecção persistente [4]. Outro fator importante a ser considerado em relação à cronicidade das feridas é sua colonização por bactérias patogênicas. A presença de bactérias patogênicas em uma ferida pode atrasar significativamente o processo de cicatrização. Nesses casos, as bactérias podem interferir nos mecanismos naturais de cicatrização de feridas, levando a inflamação prolongada e danos teciduais [101,102]. Nesse contexto, a engenharia de tecidos tem se dedicado ao desenvolvimento de materiais de uso tópico capazes de melhorar a eficácia do tratamento de feridas, ao mesmo tempo que previnem o uso de fármacos sistêmicos e seus efeitos colaterais.

O vidro bioativo (VB), desenvolvido por Larry Hench ao final da década de 1960, se destaca dentre os materiais bioativos utilizados em aplicações biomédicas para tecidos moles [103,104]. Quando aplicado em feridas, o VB induz o crescimento de fibroblastos, melhora a migração celular, promove a formação de vasos sanguíneos e faz com que os fibroblastos se diferenciem em miofibroblastos [7]. Esse comportamento acelera a cicatrização de feridas, reduz o tempo de recuperação e diminui o uso de medicamentos sistêmicos [84,105].

Vários são os processos para se obter VB, mas o processo sol-gel tem recebido atenção significativa pelas suas inúmeras vantagens [106]. O processo sol-gel permite, dentre outras possibilidades, a preparação de VB com elevada área superficial, estrutura mesoporosa, tamanho de partícula nanométrico e morfologia esférica [79,105]. Tais propriedades favorecem a migração, adesão, proliferação e diferenciação celular, estimulando, assim, a reparação

tecidual [107]. A preparação de nanopartículas esféricas e estrutura mesoporosa é de particular interesse, pois confere a esses materiais capacidades de liberação de fármacos/íons e propriedades de fluxo adequadas para o contato direto com fluidos corporais [58].

A fim de aprimorar o caráter terapêutico do VB, íons podem ser adicionados à rede do material. Espécies como Ce [108] e Co [95] têm sido incorporadas ao VB para obter propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes, como é o caso do cério, ou pela capacidade de ativar a hipóxia (baixa pressão de oxigênio) e estimular a angiogênese, como é o caso do cobalto [8,58,109]. Além das propriedades citadas, o Ce pode, ainda, suprimir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), inibindo o estresse oxidativo e reduzindo os níveis de peróxido de hidrogênio e superóxido nas células, evitando a apoptose celular precoce [86]. Diante dessas propriedades, o VB contendo íons Ce e o Co incorporados à sua rede têm potencial de uso no tratamento de feridas crônicas [8,11]. Nanopartículas de VB podem ser obtidas pelo processo sol-gel usando vários métodos de incorporação, incluindo o processo de impregnação pós-síntese que mantém a forma, o tamanho e a dispersão das nanopartículas de VB [72].

Vários são os trabalhos que combinam metais de transição na composição de VBs com potenciais aplicações em tecidos moles [90,96,110–112], entretanto a coaditivação de Co e Ce ainda não havia sido estudada – até onde se tem conhecimento. Portanto, a coaditivação de Co e Ce no vidro bioativo a partir da rota sol-gel representa uma abordagem inovadora para o desenvolvimento de materiais para aplicações em engenharia de tecidos moles.

Neste estudo, o processo sol-gel foi empregado para obter nanopartículas de VB mesoporosas coaditivadas com Ce e Co através do método de impregnação pós-síntese. Os materiais foram caracterizados quanto às suas propriedades químicas e estruturais, capacidade de liberação de íons em meio simulado de exsudato de feridas e através da biocompatibilidade e atividade antimicrobiana *in vitro*. Os avanços aqui encontrados podem elevar a eficácia dos tratamentos de lesões cutâneas para pacientes que sofrem com a situação e, conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida dessa população.

## 4.2 Materiais

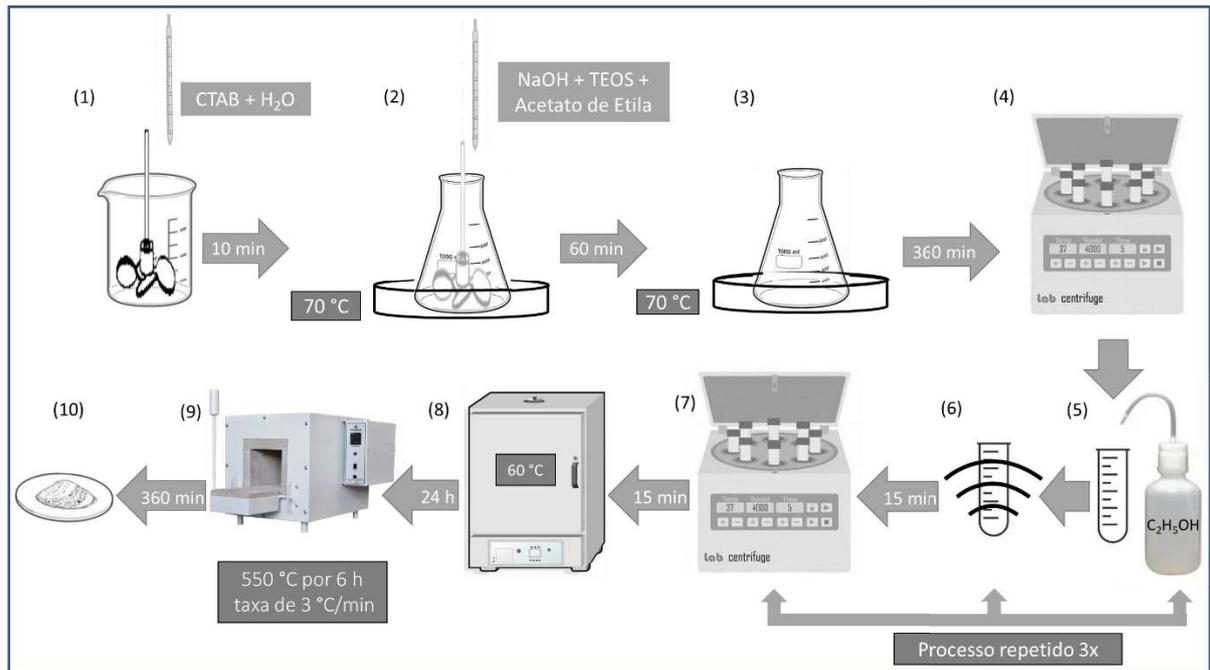
Os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico (P.A.). Para a síntese dos vidros bioativos foram utilizados: Água Milli-Q com resistividade mínima de (18,0 MΩ.cm) a 25 °C;

Tetraetil ortosilicato 98 % (TEOS, Sigma Aldrich); Acetato de Etila (Sinth), Brometo de Cetil Trimetilamônio (CTAB, Sigma Aldrich); solução de hidróxido de sódio 2 M, preparada a partir de hidróxido de sódio (NaOH, Neon); Etanol absoluto (99,8 %, Neon); Nitrato de cério (III) ( $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Neon); Nitrato de cobalto ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Êxodo Científica).

### **4.3 Síntese das nanopartículas de vidro bioativo**

#### **4.3.1 Síntese das nanopartículas de sílica**

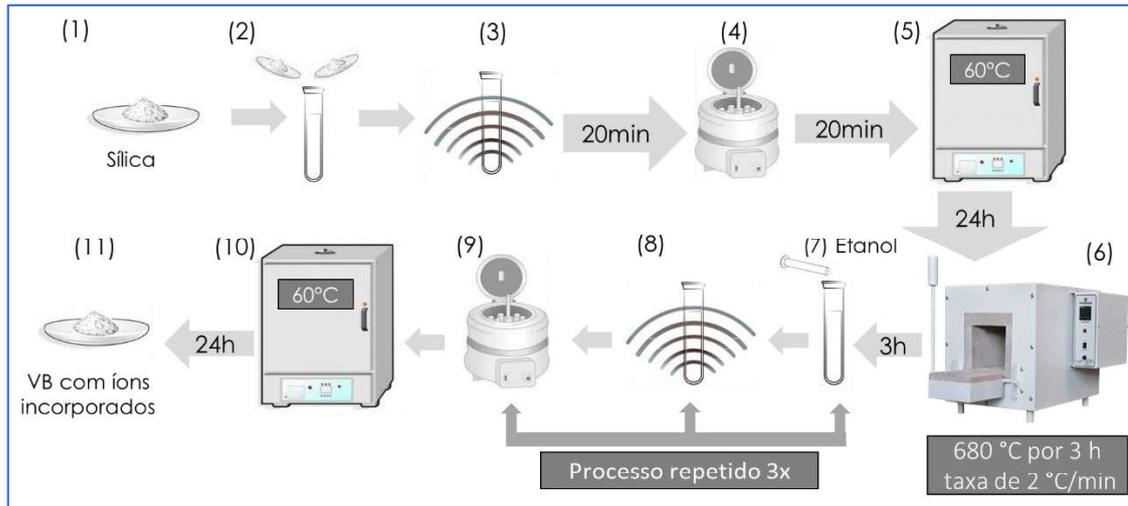
As nanopartículas mesoporosas de vidro bioativo foram sintetizadas a partir da metodologia descrita por Chang e colaboradores [113], como esquematizado e enumerado por etapas na Figura 4.1. No procedimento, uma solução inicial (1) foi produzida a partir da dissolução de 1 g de brometo de cetrimônio (CTAB) em 500 mL de água deionizada que permaneceu sob agitação mecânica a 600 rpm durante 10 min. Após esta primeira etapa, a síntese das nanopartículas ocorreu à temperatura constante de 70 °C mantida por banho maria. Assim, à solução resultante, houve a dissolução de 3 mL de NaOH em concentração 2 M (2), seguida da adição gradual de 5 mL de TEOS e 5 mL de acetato de etila. Após 1 h, o sistema ficou em repouso (sem agitação) sob temperatura de 70 °C por 3 h (3). Em seguida, a suspensão resultante foi centrifugada (4) e o precipitado de partículas de sílica recolhido. Para a etapa de lavagem, o precipitado de sílica foi disperso em 5 mL de etanol absoluto (5) em banho ultrassônico (6) durante 15 min e a suspensão foi centrifugada durante 15 min (7), sendo este processo repetido por três vezes. Após a última lavagem, as partículas foram secas em estufa por 24 h à 60 °C (8). Após tratamento térmico a 550 °C por 6 h, em atmosfera a ar, com taxa de aquecimento de 3 °C/min (9), as nanopartículas de sílica foram obtidas (10).



**Figura 4. 1:** Representação esquemática da síntese de nanopartículas de sílica. (Fonte: Própria autora)

#### 4.3.2 Incorporação de íons terapêuticos às nanopartículas de vidro bioativo

A incorporação dos íons terapêuticos escolhidos (cério e cobalto) foi feita de acordo com a metodologia relatada previamente por Greasley [71]. Para a incorporação dos íons nas partículas de vidro bioativo, o nitrato de cério (III) ( $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) foi utilizado como precursor de Ce e o nitrato de cobalto ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) foi utilizado como precursor de cobalto. O protocolo de incorporação de íons é descrito e enumerado na Figura 4.2: (1) as nanopartículas de sílica obtidas pelo método sol-gel apresentadas foram dispersas em água deionizada, (2) misturadas com uma solução contendo as concentrações em fração molar indicadas na Tabela IV.1 e (3) permaneceram em banho ultrassônico por 20 min. Em seguida, a suspensão foi centrifugada (4) para coletar as partículas, as amostras foram secas a 60 °C por 24 h (5) e depois tratadas termicamente a 680 °C, por 3 h, a uma taxa de aquecimento de 2 °C/min (6). Após o tratamento térmico, as partículas foram lavadas por três vezes com etanol (7) para remover o excesso de íons que não foram incorporados na rede do vidro, sonificadas por 15 min (8) e centrifugadas (9). Em seguida o material foi seco a 60 °C por 24 h (10) e, assim, foram obtidas as amostras de VB (11). A concentração da solução empregada na metodologia de impregnação pós-síntese afeta a incorporação de íons metálicos na estrutura do material [14]. Neste trabalho foram utilizadas uma amostra controle de sílica (VB-SiO<sub>2</sub>), composições binárias (Si-Ce e Si-Co) e composições ternárias (Si-Ce-Co) a fim de estudar as características de incorporação destes íons concomitantemente.



**Figura 4. 2:** Representação esquemática da metodologia de incorporação de íons nas partículas de sílica. (Fonte: Própria autora)

**Tabela 4. 1:** Amostras de vidros bioativos desenvolvidos neste trabalho e as respectivas concentrações (fração molar) das soluções empregadas para incorporação dos íons.

Amostra	Composição por fração molar		
	SiO <sub>2</sub>	CeO <sub>2</sub>	CoO
VB-SiO <sub>2</sub>	1	-	-
VB-1Ce	1	1	-
VB-1Co	1	-	1
VB-1CeCo	1	1	1
VB-0.5CeCo	1	0.5	0.5
VB-0.25CeCo	1	0.25	0.25
VB-0.1CeCo	1	0.1	0.1
VB-0.05CeCo	1	0.05	0.05
VB-0.01CeCo	1	0.01	0.01

#### 4.4 Caracterização das nanopartículas de vidro bioativo

Para todas as composições de vidro bioativo desenvolvidas neste trabalho foram aplicadas as técnicas de caracterização de materiais a seguir.

##### 4.4.1 Análise da composição química

##### Spectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP- OES)

A composição das partículas foi analisada por meio de Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) no equipamento Optima 7300 DV (PerkinElmer, EUA). Para essa análise, 0,1 g das amostras foram transferidas para um cadinho de grafite, contendo 0,7 g de metaborato de lítio. Outra porção de 0,7 g de metaborato de lítio foi adicionada e a mistura levada à mufla ( $950 \pm 25$  °C) por 10 min. O cadinho foi retirado da mufla, a mistura homogeneizada e, em seguida, colocada de volta no equipamento por 10 minutos adicionais ( $950 \pm 25$  °C). Depois disso, a mistura foi transferida para um béquer contendo 100 mL de solução de ácido nítrico (10 % (v/v)) e submetida a agitação até completa dissolução. A solução resultante foi transferida para tubos falcon para armazenamento e posterior análise. As concentrações de Si, Ce e Co foram então analisadas pelo equipamento e as proporções de SiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub> e CoO foram calculadas em triplicata.

#### **4.4.2 Análise da morfologia e distribuição do tamanho das partículas**

##### **Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A morfologia superficial dos materiais foi observada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) FEI-Quanta 200 F, operando a tensão de 15kV. O MEV é equipado com Espectrômetro por Dispersão de Energia (EDS) da EDAX Genesis, utilizado para avaliar qualitativamente a composição química elementar da superfície das amostras. Todas as amostras foram previamente preparadas para a análise a partir da direta pulverização de grafite em fita adesiva e condutiva de carbono.

##### **Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

A morfologia e o tamanho das partículas foram avaliados com o auxílio de um Microscópio Eletrônico de Transmissão (Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI - 120Kv), operado a 120 kV. As partículas de vidro bioativo foram dispersas em etanol na proporção de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. Após 30 minutos em banho ultrassônico uma gota da solução foi dispensada em grade de cobre de 400 mesh e pulverizada com grafite. Para a análise da periodicidade e simetria da estrutura dos poros, as imagens obtidas foram processadas em Image J (versão 2.1.4.7, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) para obtenção do difratograma de Fourier por meio da análise de transformada rápida de Fourier (FFT). Esta análise FFT essencialmente transforma a função de distribuição de escala de cinza de uma imagem em uma função de distribuição de frequência, a

partir da qual é obtido um padrão de difração [114]. Os diâmetros das nanopartículas foram avaliados a partir das micrografias de MET, sendo em média medidas 100 partículas para cada amostra com a utilização do programa ImageJ (*Freeware National Institutes of Health*) para cálculo do diâmetro médio e desvio padrão.

### **Espalhamento dinâmico de luz (DLS)**

A análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi realizada para mensurar o diâmetro hidrodinâmico das partículas após o tratamento térmico. O equipamento utilizado foi o Zetasizer 3000 HS 1256. Este sistema é equipado com um laser de 4 mW de hélio/neon, com comprimento de onda de 633 nm e mede o tamanho de partícula com a tecnologia de retroespalhamento não invasiva com um ângulo de detecção de 173°. As medições de dispersão de luz foram realizadas a  $25 \pm 1$  °C. As medições hidrodinâmicas foram realizadas com ângulo de 90°. Os dados foram analisados de acordo com o método cumulativo para diâmetro médio aparente e índice de polidispersibilidade (PDI), o valor final foi uma média aritmética de 10 medições. Para avaliar o tamanho das partículas, as amostras foram preparadas a partir da dispersão dos VBs em metanol na concentração de  $0,01 \text{ mL}^{-1}$ .

### **Potencial Zeta**

A análise de carga superficial do material por meio da carga superficial das partículas foi mensurada a partir da análise do potencial Zeta. As partículas de vidro foram dispersas em água deionizada ( $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e mantidas em banho de ultrassom por 30 minutos. O potencial Zeta das dispersões foi mensurado a 25 °C usando o equipamento ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, EUA), com um comprimento de onda de luz laser de 660 nm (laser de diodo vermelho de 35 mW) e o valor final foi uma média aritmética de 10 medições.

#### **4.4.3 Análise das características estruturais**

### **Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A caracterização química a partir dos grupos funcionais presentes nas amostras, foi realizada por Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Foi empregada a técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR), com comprimentos de onda entre

400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ , em equipamento Bruker Alpha, no decurso de 128 varreduras com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e com intervalos de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

### **Difração de raio-X (DRX)**

A análise de Difração de Raios X (DRX) foi empregada a fim de verificar as características de fases e organização estrutural das amostras de VB produzidas. Os espectros foram coletados no equipamento Philips PANalytical PW1700 utilizando radiação Cu-K $\alpha$  ( $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$ ) a 40kV/40mA. Os dados coletados estão em  $2\theta$  entre  $3^\circ$  e  $90^\circ$  com passo de  $0,02^\circ$  e tempo de permanência de 1 s.

### **Espectroscopia Ultravioleta-visível (UV-visível)**

A técnica de Ultravioleta-visível (UV-vis) foi empregada nas amostras de VB para avaliar qualitativamente o estado de oxidação dos átomos de cério e cobalto na matriz do VB. Os espectros foram coletados no modo reflectância difusa na faixa de 200 nm a 800 nm do equipamento UV-visível (Shimadzu UV-2600), utilizando o BaSO $_4$  como referência.

### **Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS)**

A Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) identifica os elementos químicos na superfície da amostra, suas concentrações relativas e seus estados de oxidação. Sendo assim, a análise de XPS foi utilizada para definir as ligações químicas formadas pelos componentes da amostra e, a partir desses resultados, propor um modelo que possa explicar a incorporação e/ou interação dos íons cério e cobalto com a rede de sílica. A análise de XPS foi realizada no equipamento Kratos Amicus utilizando radiação Mg- K $\alpha$  e 120 W. O sinal de C 1s (284,6eV) foi utilizado como referência para a calibração das energias de ligação de diferentes elementos para corrigir o efeito de carga. Os espectros de varredura foram realizados para verificar a composição elementar na superfície das amostras e as varreduras em alta resolução foram realizadas para Si 2p, O 1s, Ce 3d e Co 2p para investigar a configuração das ligações químicas. A energia de ligação (BE) devido ao carregamento da amostra foi corrigida usando como referência a linha central C 1s, deslocada para 284,8 eV. Os espectros de alta resolução foram submetidos à deconvolução com ajuste Gaussiano [115].

### **Adsorção de nitrogênio por método BET**

A técnica de adsorção-dessorção de  $N_2$  pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET) foi realizada a fim de se obter valores de área superficial específica, porosidade total e diâmetro médio de poros das partículas de VB. Para tal, foi utilizado equipamento Quantachrome9 com medidas de 33 isotermas de adsorção-dessorção de  $N_2$  a 77 K. A área de superfície específica foi determinada pelo método de BET, que utiliza os pontos dos dados de adsorção na pressão relativa ( $P/P_0$ ) na faixa de 0,01 a 0,30. A distribuição do diâmetro dos poros foi calculada pelo método BJH (Barrett, Joyner e Halenda) aplicada às curvas de dessorção. A dessorção é preferível à adsorção para estes cálculos, porque geralmente ocorre com menor pressão relativa, sendo, portanto, considerada uma melhor aproximação do equilíbrio termodinâmico [9]. Os tipos de isotermas foram avaliados de acordo com a sua forma e tipo de histerese entre os modos de adsorção-dessorção.

#### **4.4.4 Capacidade antioxidante das partículas**

##### **Teste da atividade mimética da enzima catalase**

Para verificar se os VB mostrariam capacidade antioxidante, foram realizados os testes de atividade de mimetização da catalase nas amostras sintetizadas. Os testes foram realizados da seguinte forma: amostras de VB foram imersas em solução de  $H_2O_2$  nas concentrações de 1 M na proporção amostra/solução de  $5 \text{ g.mL}^{-1}$ . As suspensões ficaram a temperatura de  $37^\circ\text{C}$  em estufa, nos tempos de 0, 24, 96 e 168 h. Decorridos os tempos pré-determinados, as amostras foram filtradas e secas a  $60^\circ\text{C}$  durante 12 h. Para avaliar se houve  $H_2O_2$  residual, foram realizadas titulações com  $KMnO_4$  à concentração de 0,1 N [86]. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### **4.4.5 Análise da liberação de íons em Solução de Exsudato de Feridas (SEF)**

O ensaio em *Simulated Exudate Fluid* (SEF) foi empregado para prever a liberação de íons cério e/ ou cobalto presentes na estrutura das amostras de vidro bioativo.

##### **Preparação da Solução de Exsudato de Feridas**

A solução SEF foi preparada de acordo com o protocolo de Khabbaz e colaboradores (2019) [116]. À temperatura ambiente, 0.368 g de  $\text{CaCl}_2$  e 8.298 g de NaCl foram adicionados a 1000 mL de água até a completa dissolução dos sais por homogeneização da solução em balão volumétrico.

### **Procedimento do ensaio de liberação iônica**

Inicialmente, as amostras produzidas foram imersas na concentração  $1,5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em 15 mL de SEF e foram mantidas a  $37^\circ\text{C}$  por 1 h, 3 h, 24 h, 3 d, 7 d e 14 dias. A concentração utilizada foi baseada em estudo *in vitro* que demonstrou viabilidade celular de VB em células promotoras de regeneração tecidual dérmica [72]. A cada período de tempo, alíquotas de 1 mL foram retiradas da solução e mais 1 mL de SEF foram repostos. Essas alíquotas foram diluídas em 8 mL de  $\text{HNO}_3$  2 % p/p para que quaisquer reações fossem encerradas e as soluções estabilizadas. Cada alíquota retirada foi analisada via ICP-OES para determinação quantitativa de Si, Ce, Co liberados em todas as amostras produzidas. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### **4.4.6 Estudo biológico *in vitro***

##### **Citometria de Fluxo**

A cultura celular e a citometria de fluxo foram realizadas de acordo com os critérios de biossegurança recomendados [117]. Estes ensaios foram realizados utilizando duas linhas de tumores de mama humanos, nomeadamente 4T1, MDA-MB-23 e HEK 293. Foi utilizado como meio de cultura o meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/Aldrich) suplementado com soro fetal bovino (10 %) e estreptomicina (1 %). As células foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em incubadora Thermo 311 regulada para  $37^\circ\text{C}$  e com atmosfera controlada (95 %  $\text{O}_2$  e 5 %  $\text{CO}_2$ ) e umidade (95 % UR). Depois que as células atingiram a confluência adequada,  $1 \times 10^6$  células foram transferidas para placas de cultura celular de 12 poços e mantidas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. Os seguintes grupos experimentais foram considerados ( $n = 3$  por grupo): (i) solução estéril de NaCl (0,9 % peso/vol.), como controle negativo; (ii) solução de DMSO (20 %), como controle positivo; (iii) amostras.

A análise por citometria de fluxo foi realizada com o kit Fixable Viability Stain® V450-A (BD Biosciences – São Paulo, Brasil), que foi capaz de discriminar entre células vivas e mortas. A

apoptose e a necrose foram avaliadas com o método de coloração dupla de anexina V-PE/7-amino-actinomicina D(7-AAD) (BD Bioscience, NJ, EUA). Os ensaios foram executados em duplicata e 50.000 eventos foram considerados para cada amostra. Parâmetros como dispersão lateral (SSC), dispersão lateral frontal (FSC) e emissão V450 foram considerados. Todos os materiais utilizados nestes ensaios foram previamente esterilizados e a manipulação celular foi realizada em Biossegurança BIOSEG 12 Classe II tipo A1 (Grupo Veco, São Paulo, Brasil).

## **Análise da capacidade antimicrobiana das composições de Vidro Bioativo**

### **Teste do disco- difusão em ágar**

O teste de disco-difusão em ágar (Método de Kirby Bauer) é um método muito utilizado para avaliar a sensibilidade aos antimicrobianos na prática clínica em laboratórios. Trata-se de um método versátil que permite testar a maioria das bactérias patogênicas [118]. Portanto, esse teste foi empregado para avaliar a capacidade antimicrobiana dos materiais aqui sintetizados. Para a realização dos testes, as normas do BRCast- EUCAST (2021) foram seguidas [119]. A cepa bacteriana utilizada para preparar a suspensão bacteriana foi o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Após o preparo da suspensão, a mesma foi ajustada a escala 0,5 de McFarland, que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, com o auxílio de *swab* estéril, a suspensão foi semeada em placas de ágar Mueller Hinton e, em seguida, os discos de 6 mm<sup>2</sup> das amostras de VB foram gentilmente alocados sobre o meio de cultura. Como controle utilizou-se disco comercial de penicilina, que foi adicionado às placas com *S.aureus*. Então, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a 35 °C por 18 h e, após esse tempo, foram realizadas as medidas do diâmetro dos halos de inibição [119]. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

### **Análise estatística**

Os resultados obtidos foram expressos pela média ± erro padrão da média. Os dados obtidos foram analisados por ANOVA e as diferenças foram avaliadas pelo pós-teste de Tukey, na qual os valores maiores que 0,05 foram considerados significativos.

## **4.5 Resultados e discussão**

#### 4.5.1 Análises da composição química dos Vidros Bioativos por ICP-OES

A composição química (em % mol) dos vidros foi analisada através do método de fusão de metaborato de lítio e análise de ICP-OES. Os resultados são apresentados na Tabela 4.2. Neste trabalho foi utilizado o método de incorporação de íons terapêuticos por impregnação após a síntese das nanopartículas de sílica, que passaram posteriormente por processos de lavagem, processo no qual o excesso de íons não incorporados à rede do vidro é lixiviado, alterando a composição final do material [120]. Para a análise dos resultados foi considerado que todos os elementos encontrados pela técnica formaram óxido contendo uma única fase, de modo a facilitar a interpretação desses resultados.

**Tabela 4. 2:** Composição química determinada pelo método de fusão de metaborato de lítio e ICP-OES (% mol) dos vidros bioativos.

Amostra	Composição mensurada (% mol)		
	SiO <sub>2</sub>	CeO <sub>2</sub>	CoO
VB-SiO <sub>2</sub>	100,0 ± 0,5	0 ± 0	0 ± 0
VB-1Ce	88,4 ± 0,5	11,6 ± 0,1	0 ± 0
VB-1Co	76,4 ± 0,7	0 ± 0	23,6 ± 0,1
VB-1CeCo	72,6 ± 0,2	13,8 ± 0,2	13,6 ± 0,05
VB-0.5CeCo	83,4 ± 0,1	8,3 ± 0	8,3 ± 0,1
VB-0.25CeCo	91,9 ± 0,4	3,9 ± 0,04	4,2 ± 0,1
VB-0.1CeCo	96,0 ± 0,05	2,1 ± 0	1,9 ± 0,03
VB-0.05CeCo	97,7 ± 0,6	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,03
VB-0.01CeCo	99,2 ± 0,1	0,5 ± 0,01	0,3 ± 0,02

Para a amostra de VB-SiO<sub>2</sub>, onde não foram adicionados íons terapêuticos Ce e Co, obteve-se, portanto, composição de 100 % de SiO<sub>2</sub>, conforme esperado. A elaboração de sistemas binários (VB-1Ce e VB-1Co) permitiu observar que a composição contendo 1 molar de Ce teve menor incorporação de íons (11.6 ± 0.1 % mol) que a amostra contendo 1 molar de Co (23.6 ± 0.1 % mol), podendo ser um indicativo de que íons cobalto tendem a incorporar maiores concentrações em % mol do que íons cério. Isso pode ser explicado pelo tamanho dos raios iônicos dos íons Ce e Co, Tabela 4.3. O cobalto apresenta menores raios iônicos que o cério, o que facilitaria a sua incorporação na rede de sílica através do processo de difusão durante a etapa de tratamento térmico [120–123].

**Tabela 4. 1:** Raios dos íons dos elementos Cério e Cobalto

Íon	Ce <sup>3+</sup>	Ce <sup>4+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Co <sup>3+</sup>
<b>Raio Iônico (Å)</b>	1.03	0.87	0.75	0.61

Para os sistemas ternários, contendo SiO<sub>2</sub>, CeO<sub>2</sub> e CoO, a composição química tornou-se equivalente, onde a concentração em % mol de CeO<sub>2</sub> e CoO são similares para todas as amostras. Criando um paralelo entre concentração de Ce e Co presente nas amostras VB-1Ce e VB-1Co, respectivamente, há indícios de que a presença do cério limita a incorporação de cobalto. Kurtuldo e colaboradores (2021) compararam a incorporação de cálcio e cério em nanopartículas mesoporosas de sílica tanto a partir da impregnação desses em solução apenas de cério (o cálcio foi adicionado previamente na síntese), quanto em solução contendo íons cério e cálcio [124]. Os autores mostraram através de análise de ICP-OES que ao adicionar íons cério e cálcio em uma mesma solução precursora, os íons cério limitam a incorporação de íons cálcio [124]. Portanto, aqui, tal qual observado por Kurtuldo e colaboradores (2021), acredita-se que os íons cério estariam concorrendo com os íons cobalto na rede de sílica.

Através da análise química dos materiais é possível inferir que houve incorporação de íons Ce e Co nos VB. Como esperado, a quantidade de Ce e Co incorporados na sílica aumentou com o aumento da concentração de Ce e Co na solução para impregnação, mostrando que a composição final do vidro é ajustável a partir do método de impregnação pós-síntese. A dependência da incorporação de íons a partir da concentração de íons na solução de impregnação também foi observada em outros trabalhos [78,125]. Na literatura, estudos indicam que maiores concentrações de CeO<sub>2</sub> expressam maiores viabilidade e proliferação celular, via contato direto, e maior capacidade de mimetização de enzima catalase - o que indica maior capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigênio que causam danos celulares [79,84,86].

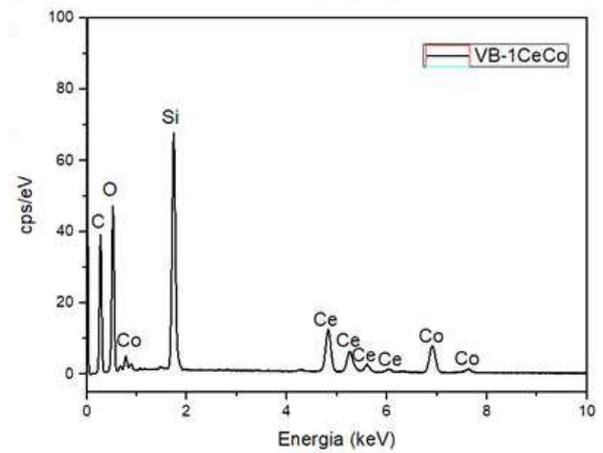
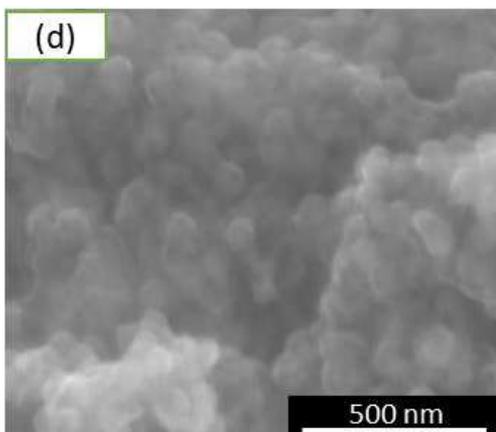
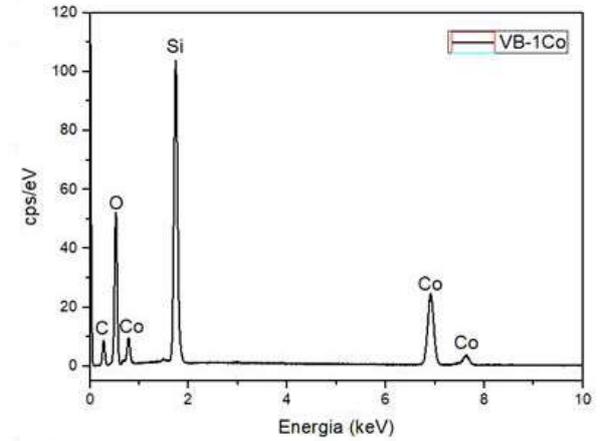
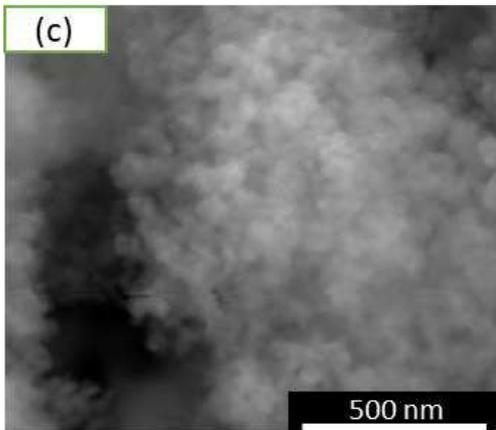
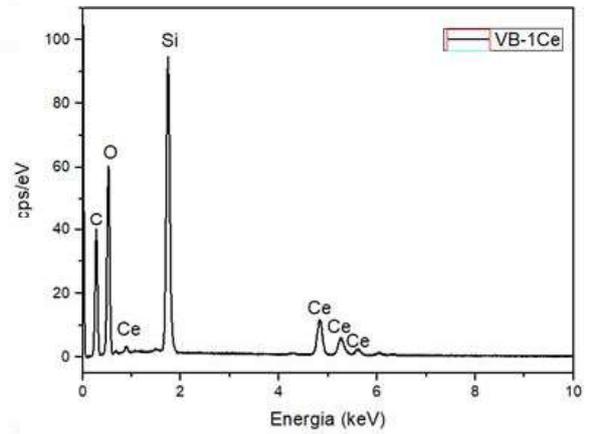
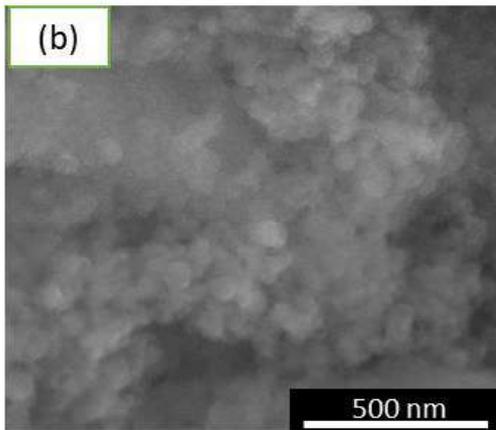
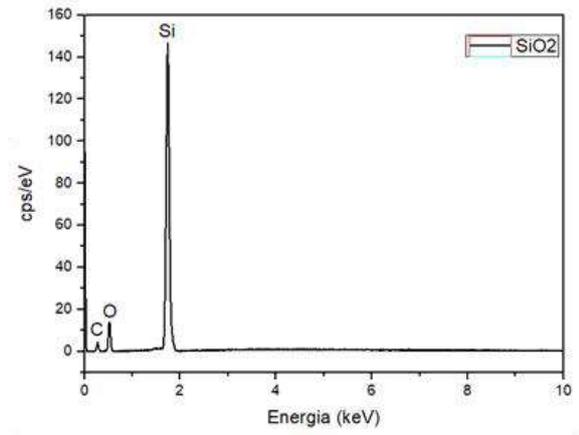
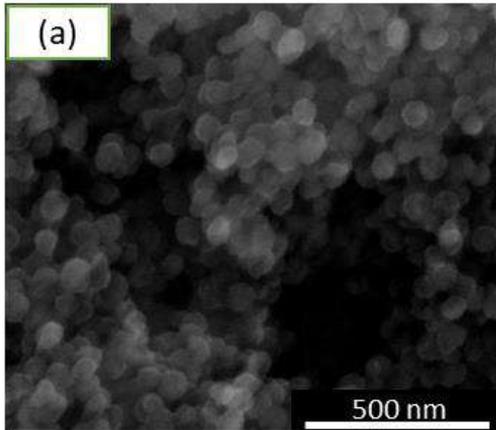
#### 4.5.2 Caracterização física dos vidros bioativos

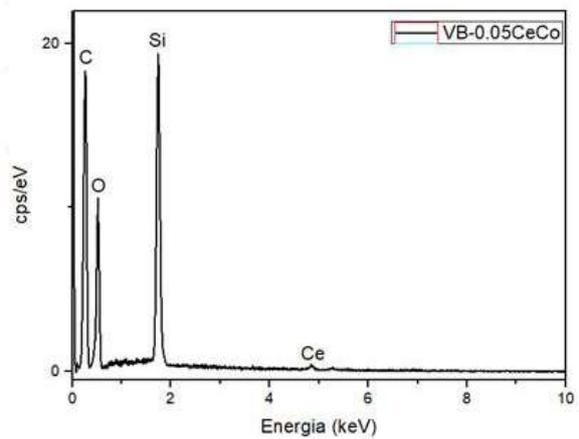
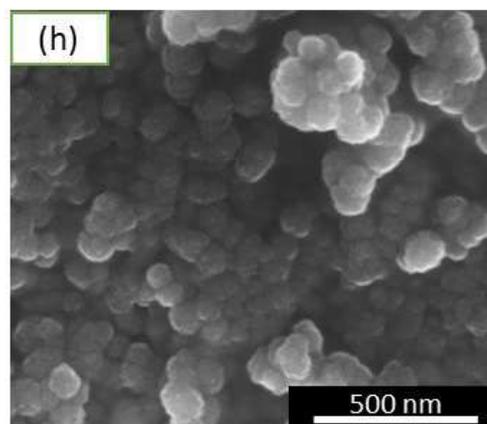
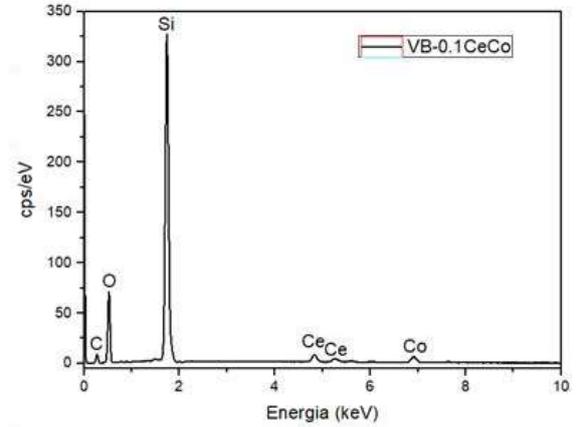
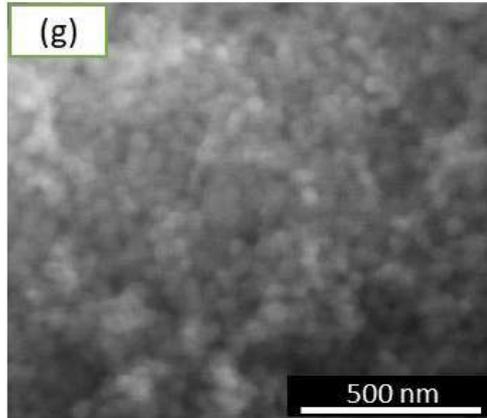
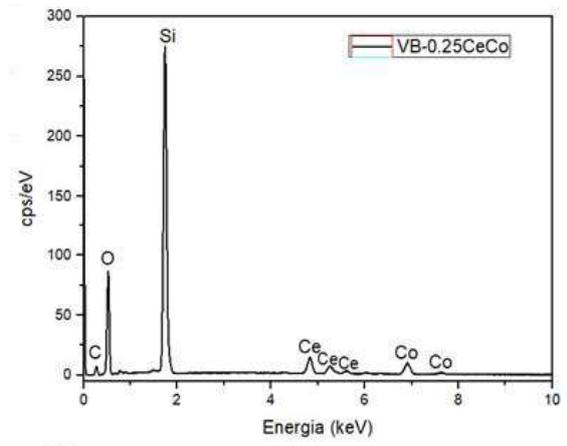
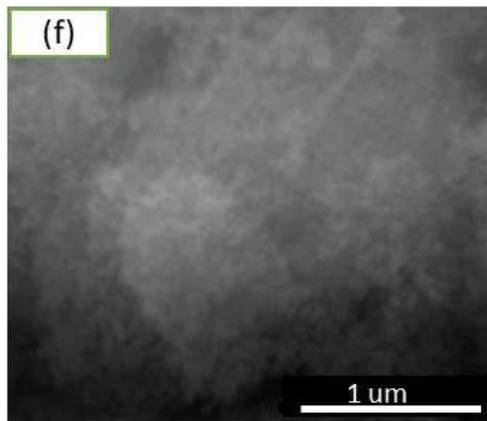
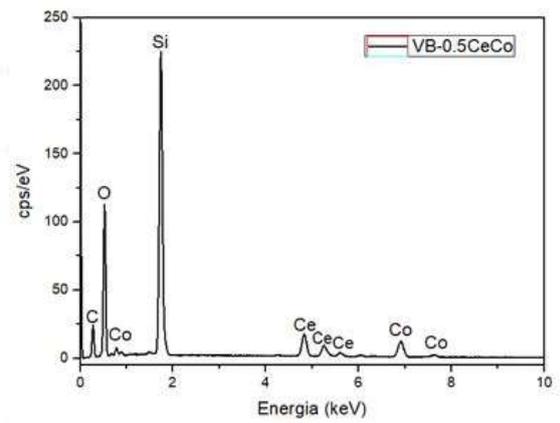
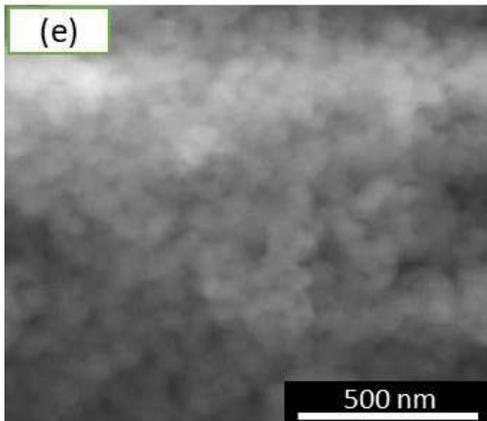
##### **Análises morfológica, de distribuição e dispersão de partículas**

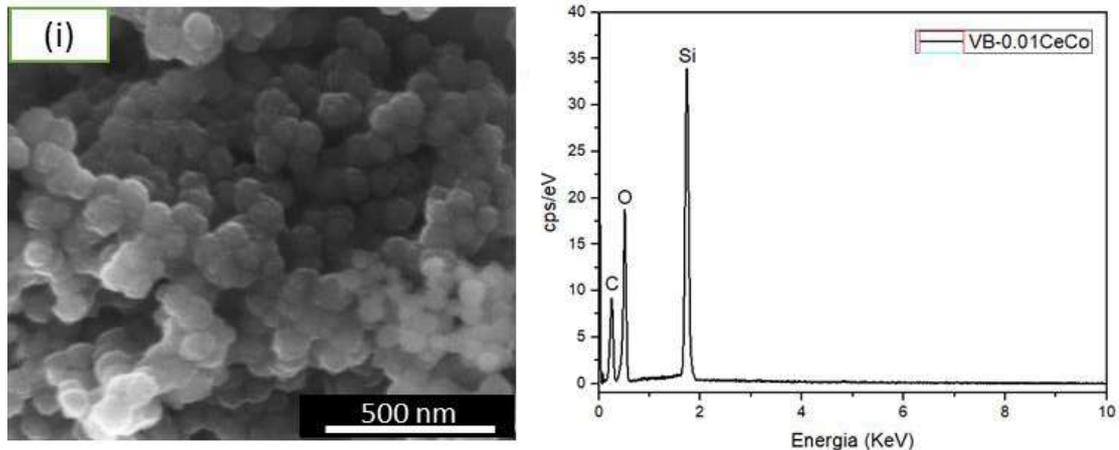
A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada a fim de se fazer uma avaliação preliminar da morfologia das amostras, enquanto a análise de espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) foi utilizada para confirmar a presença dos íons cério e cobalto na

superfície das amostras. A Figura 4.3 apresenta as imagens dos vidros produzidos e seus respectivos espectros de EDS. Nas imagens é possível identificar que todas as amostras apresentam morfologia esférica, interessante para aplicações na engenharia de tecidos por tenderem a exibir baixa citotoxicidade, menor resposta inflamatória, melhorar a adesão celular no material, aumentar a proliferação celular e promover a diferenciação em meio fisiológico, além de ter maior área superficial para a interação material polimérico/cerâmico na produção de nanocompósitos que sejam responsivos ao meio [126,127].

A presença do elemento Si foi observada em todos os espectros de EDS, indicando a formação de sílica. Já os elementos Ce e Co foram observados nos espectros de EDS para as amostras VB-1Ce e VB-1Co, respectivamente, bem como para as amostras VB-1CeCo; VB-0.5CeCo; VB-0.25CeCo e VB-0.1CeCo. Para a amostra VB-0.05CeCo foi identificado apenas o elemento Ce, enquanto para a amostra VB-0.01CeCo não foram identificados os elementos Ce e Co, o que pode ter ocorrido devido ao limite de detecção da técnica, uma vez que as amostras VB-0.05CeCo e VB-0.01CeCo possuem menores concentrações destes elementos, podendo ter atingido o limite de sensibilidade de detecção na técnica.



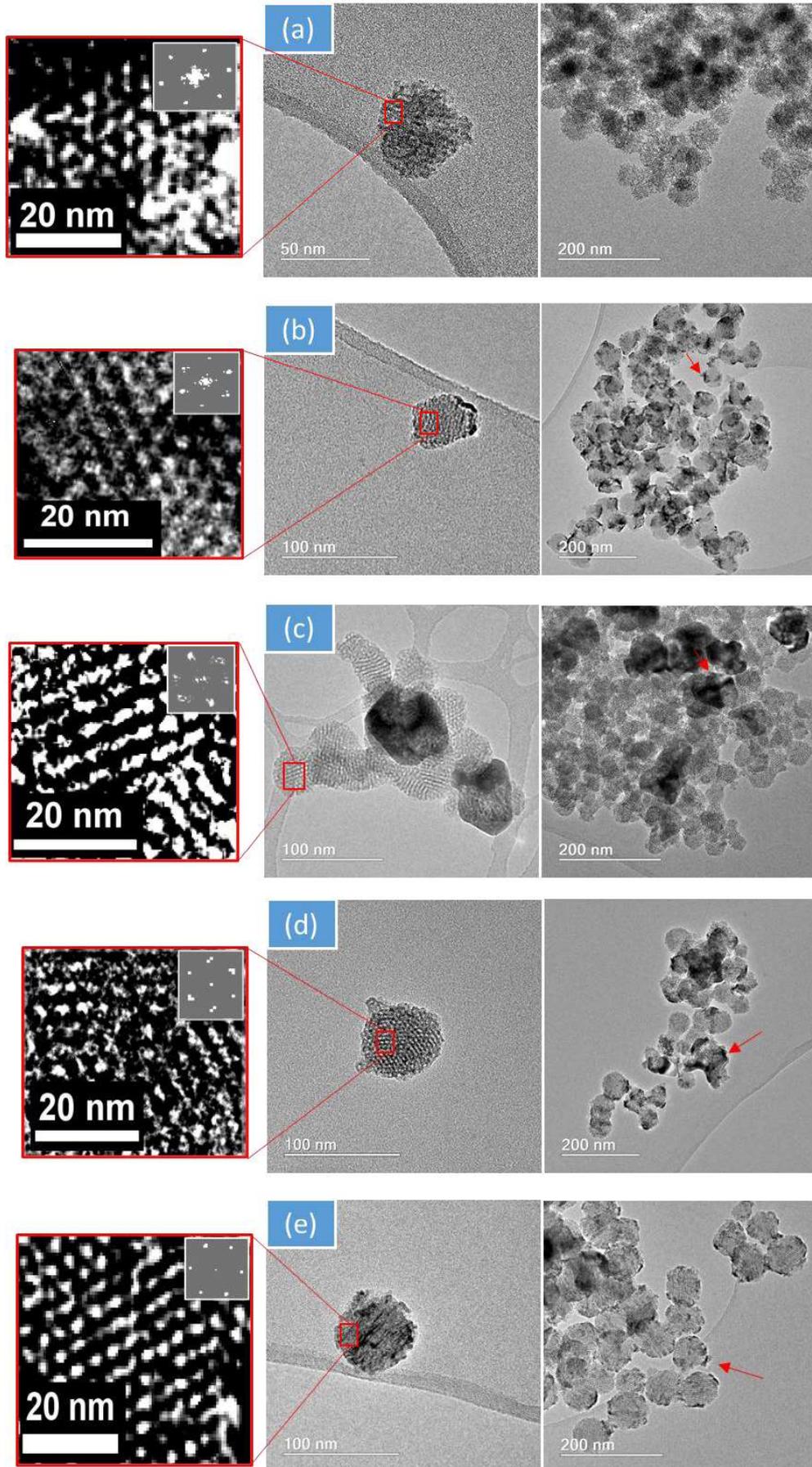


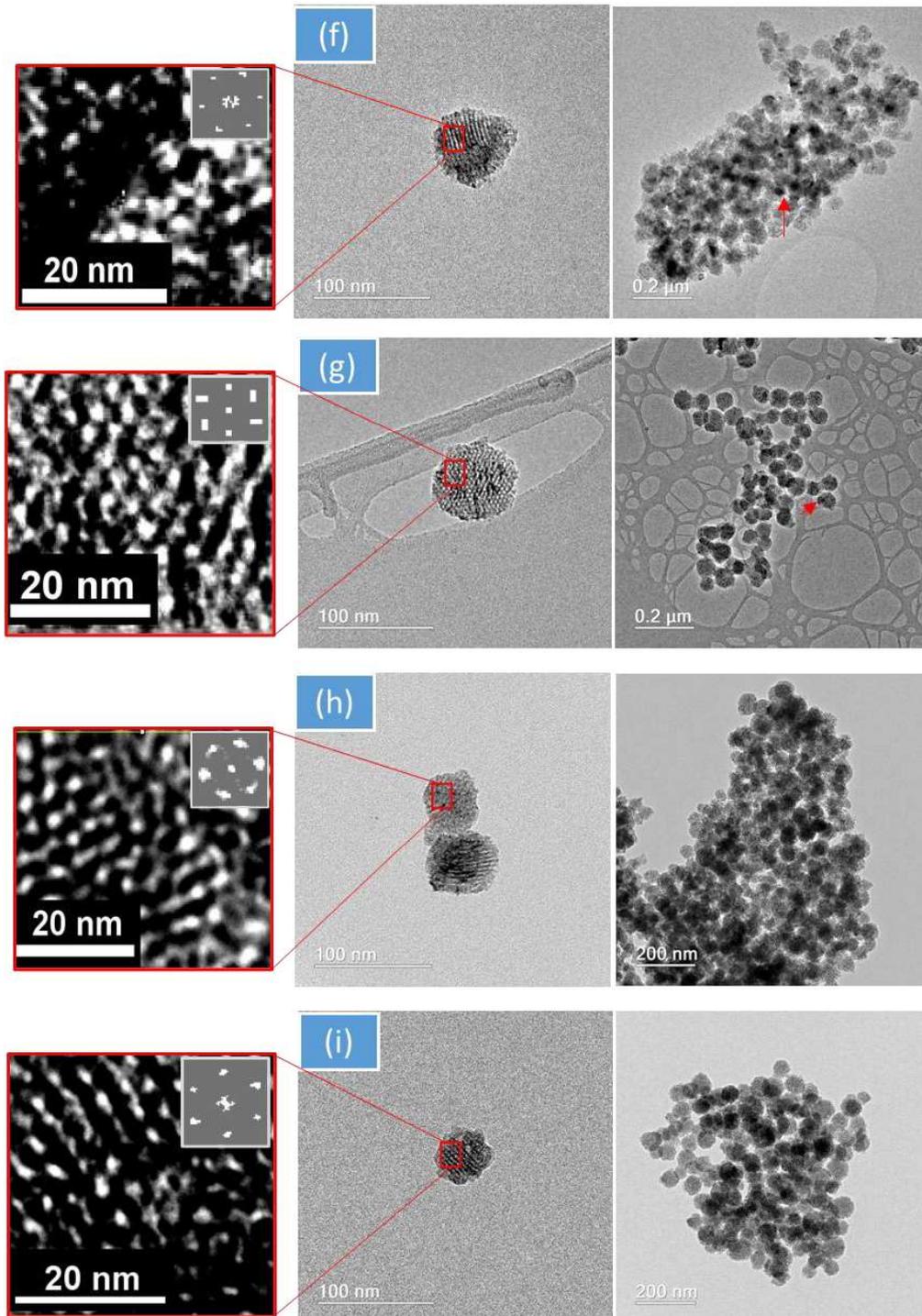


**Figura 4. 3:** Micrografias de microscopia eletrônica de varredura das amostras de vidro bioativo. (a) VB-SiO<sub>2</sub>; (b) VB-1Ce; (c) VB-1Co; (d) VB-1CeCo; (e) VB-0.5CeCo; (f) VB-0.25CeCo; (g) VB-0.1CeCo; (h) VB-0.05CeCo e (i) VB-0.01CeCo. (Fonte: Própria autora)

A morfologia e o tamanho das partículas de vidro bioativo foram também avaliados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), e as micrografias são apresentadas na Figura 4.4, onde foi possível confirmar a formação de nanopartículas com morfologia esférica, tal qual indicado pelas análises de MEV, e a monodispersão das amostras. É possível identificar que há poros ordenados na estrutura do material, formando uma estrutura mesoporosa, devido à utilização do CTAB como surfactante na síntese das nanopartículas de sílica. O CTAB tende a formar mesoporos hexagonais, tal qual identificado pelo padrão obtido através da transformada rápida de Fourier (FFT) (imagens inseridas), com grau moderado de ordenação [114,128–130].

A literatura tem relatado que utilização de CTAB como surfactante para a produção de materiais porosos leva à maiores taxas de degradação do material, o que é interessante para o controle de liberação de íons terapêuticos para o meio fisiológico [114,128,129,131]. Portanto, as características morfológicas (forma de esfera e estrutura mesoporosa), composicionais e potenciais efeitos fisiológicos (biodegradação, ações antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e angiogênica) dos vidros contendo Ce e Co tornam essas nanopartículas promissoras como cargas de compósitos para várias aplicações terapêuticas, incluindo cicatrização de feridas crônicas [72].

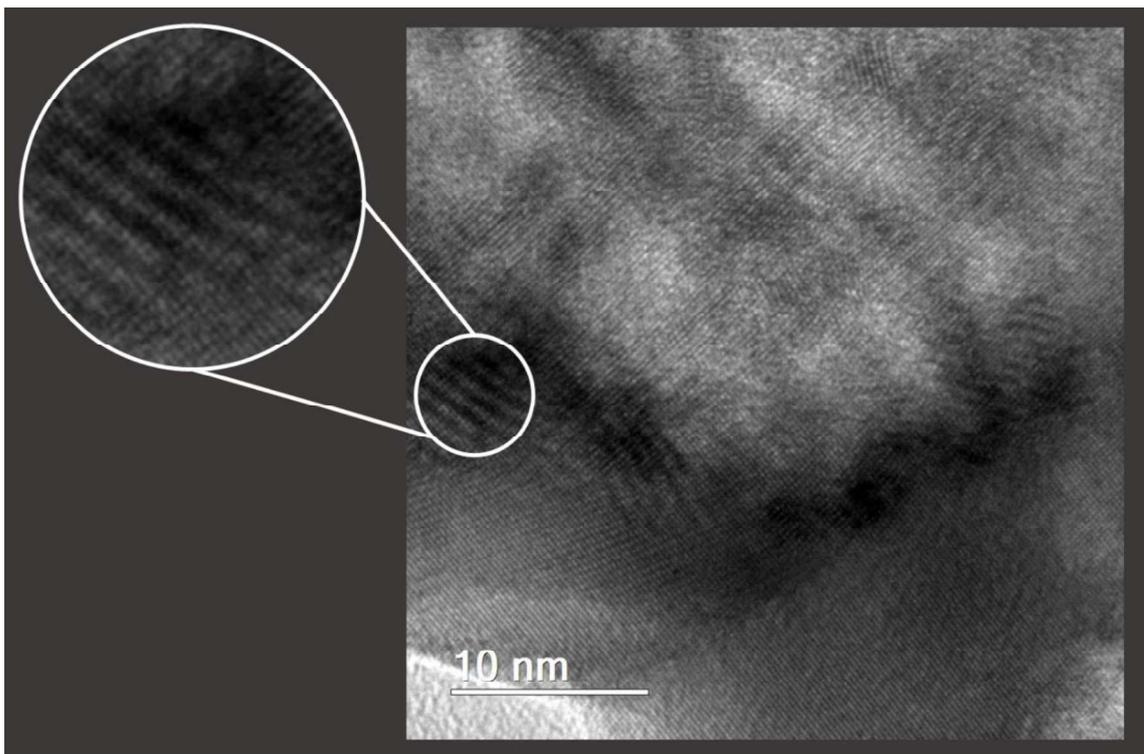




**Figura 4. 4:** Micrografias de Microscopia Eletrônica de Transmissão das amostras de vidro bioativo (a) VB-SiO<sub>2</sub>; (b) VB-1Ce; (c) VB-1Co; (d) VB-1CeCo; (e) VB-0.5CeCo; (f) VB-0.25CeCo; (g) VB-0.1CeCo; (h) VB-0.05CeCo; (i) VB-0.01CeCo. O padrão de transformada rápida de Fourier (FFT) atribuído às micrografias obtidas paralelamente ao longo da direção do eixo do poro também é mostrado. (Fonte: Própria autora)

Foi observada a presença de pontos escuros na superfície do material (indicados com setas vermelhas), à exceção das amostras VB-SiO<sub>2</sub>, VB-0.05CeCo e VB-0.01CeCo. A fim de esclarecer a natureza destas regiões escuras foi feita ampliação nestes locais com a amostra VB-1CeCo (Figura 4.5), na qual foram identificados planos cristalinos nessas regiões, indicando

que se trata de material cristalino – diferentemente da sílica que possui natureza amorfa -, possivelmente devido à formação de óxido de cério e/ou cobalto, depositado na superfície ou nos poros do material [132,133]. Portanto, esses pontos pretos indicam a presença de segunda fase na superfície do material. É possível que o processo de lavagem após o tratamento térmico não tenha sido capaz de remover por completo subprodutos cristalinos do tratamento térmico, uma vez que os óxidos podem estar incrustados à superfície das partículas. A formação de segunda fase na superfície de amostras de vidros bioativos produzidos via rota sol-gel também foi observada por vários autores [78,81,134]. Zheng e colaboradores 2020; e Goh e colaboradores (2014) mostraram que, no caso de VB contendo Ce, a presença de segunda fase pode auxiliar no aumento da ação antimicrobiana do material [78,81]. Já no caso de segunda fase em um material contendo cobalto é associada a degradação do peróxido de hidrogênio, agindo como um mimetizador da enzima catalase [135].



**Figura 4. 5:** Micrografia da região da amostra VB-1CeCo onde foram identificados planos cristalinos e ampliação dos planos cristalinos identificados na amostra.

A análise de DLS foi realizada para a obtenção do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas de vidro bioativo sintetizadas. A Tabela 4.4 apresenta os resultados do diâmetro das partículas por análises de MET e DLS. (Fonte: Própria autora)

**Tabela 4. 2:** Diâmetro médio de nanopartícula das amostras de acordo com análises de MET e DLS, índice de polidispersividade e potencial Zeta.

<b>Amostra</b>	<b>Diâmetro médio MET (nm)</b>	<b>Diâmetro médio DLS (nm)</b>	<b>PDI</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>
VB-SiO <sub>2</sub>	53 ± 2	78 ± 2	0.31 ± 0.02	-18.3 ± 0.2
VB-1Ce	66 ± 2	166 ± 12	0.1 ± 0.01	-28.1 ± 0.4
VB-1Co	46 ± 1	152 ± 9	0.21 ± 0	-31.8 ± 0.3
VB-1Ce1Co	66 ± 2	152 ± 11	0.20 ± 0	-19.2 ± 2.0
VB-0.5Ce0.5Co	77 ± 2	128 ± 11	0.26 ± 0.04	-18.4 ± 0.3
VB-0.25Ce0.25Co	61 ± 2	111 ± 3	0.23 ± 0	-29.0 ± 0.03
VB-0.1Ce0.1Co	65 ± 1	101 ± 16	0.34 ± 0.01	-24.0 ± 0.02
VB-0.05Ce0.05Co	75 ± 2	94 ± 16	0.32 ± 0.1	-28.5 ± 0.4
VB-0.01Ce0.01Co	73 ± 2	87 ± 20	0.33 ± 0.1	-19.2 ± 0.1

Na medição direta do tamanho de partículas por MET, observou-se que as partículas se encontram entre 53 nm e 75 nm, ou seja, menores que 100 nm sendo, portanto, classificadas como nanopartículas. Houve um aumento do diâmetro médio para as partículas em que os íons Ce e Co foram incorporados em relação à amostra contendo apenas SiO<sub>2</sub> (VB-SiO<sub>2</sub>). Efeito similar foi observado na análise do diâmetro hidrodinâmico da partícula por DLS, no qual a amostra VB-SiO<sub>2</sub> apresentou menor diâmetro (78 ± 2 nm), aumentando de acordo com o teor de Ce e Co incorporados nas nanopartículas. Ou seja, o diâmetro hidrodinâmico das partículas tendeu a aumentar da seguinte maneira: VB-SiO<sub>2</sub> (78 ± 2 nm) < VB-0.01CeCo (87 ± 20 nm) < VB-0.05CeCo (94 ± 16 nm) < VB-0.1CeCo (101 ± 16 nm) < VB-0.25CeCo (111 ± 3 nm) < VB-0.5CeCo (128 ± 11 nm) < VB-1CeCo (152 ± 11 nm) = VB-1Co (152 ± 9 nm) < VB-1Ce (166 ± 12 nm).

Valores mais elevados de diâmetro médio das partículas foram obtidos para as análises realizadas por DLS quando comparados com os valores avaliados por MET, conforme esperado, uma vez que essa técnica avalia o raio hidrodinâmico das partículas. No entanto, a formação de agregados de nanopartículas em suspensão pode também estar relacionada com o aumento do diâmetro médio observado por DLS, além da influência da deposição de uma segunda fase na superfície e poros do material [58,136].

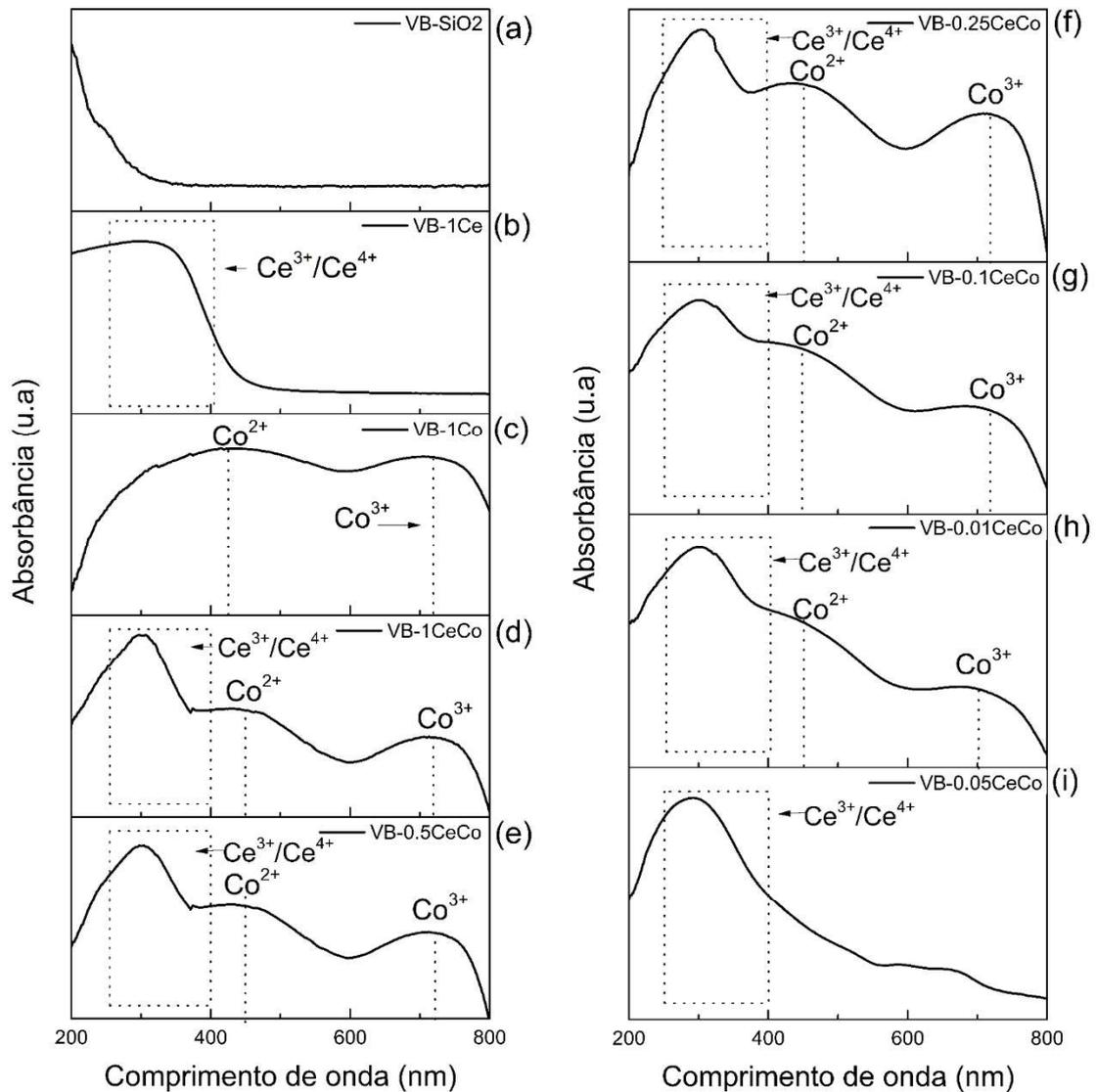
O Índice de Polidispersividade (PDI, em inglês) é definido pela norma ISO 22412:2008 (Particle Size Analysis – Dynamic light scattering (DLS)) como a medida adimensional que varia entre 0 e 1 [137]. Com valores de PDI entre 0 e 0.1 sistemas nanoparticulados são considerados altamente monodispersos [138]. Portanto, como os valores de PDI encontrados

neste estudo variaram entre  $0.1 \pm 0.01$  e  $0.34 \pm 0.01$  pode-se afirmar que os sistemas não se encontram com alta dispersão em meio aquoso. Logo, os valores de diâmetro das partículas obtidos por DLS referem-se a aglomerados, o que justifica o seu aumento em relação aos valores encontrados na medição direta do tamanho de partícula por MET.

Através da análise de potencial Zeta (PZ), a pH 7, observou-se que todas as partículas possuem carga negativa em sua superfície, que variaram entre  $-18.4 \pm 0.2$  mV (VB-SiO<sub>2</sub>) e  $-31.8 \pm 0.3$  mV (VB-1Co), o que desfavorece a aglomeração [139]. A carga negativa presente na superfície do material é justificada pela presença de grupos de Si-OH na superfície externa das nanopartículas, que possuem cargas negativas [140], e auxiliam na adsorção de proteínas na superfície do vidro durante as interações com as membranas celulares [109,141]. Este trabalho não observou periodicidade entre os valores de PZ das amostras, entre si, que justificassem aumento ou diminuição da adsorção dos íons Ce e Co.

#### **4.5.3 Análises das características estruturais das partículas**

A técnica de UV-vis foi empregada com o intuito de identificar os estados de oxidação dos íons cério e cobalto nas amostras de vidro bioativo. A Figura 4.6 apresenta os espectros de UV-visível obtidos para cada uma das amostras avaliadas neste trabalho. A amostra VB-SiO<sub>2</sub> não apresentou banda de adsorção específica no comprimento de onda entre 200 nm a 800 nm, pois o SiO<sub>2</sub> não absorve radiação nesta faixa [142].

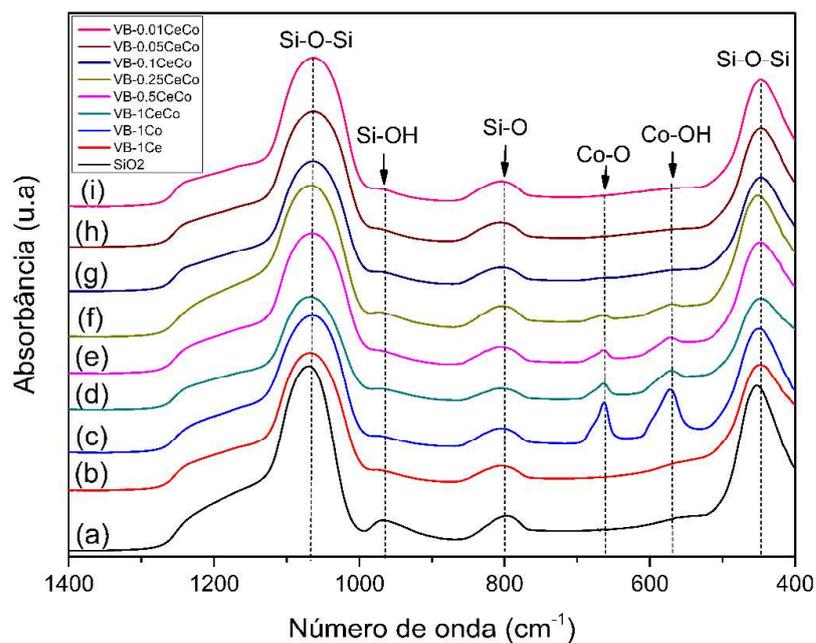


**Figura 4. 6:** Espectros de Uv-vis das amostras de vidro bioativo (a) VB-SiO<sub>2</sub>; (b) VB-1Ce; (c) VB-1Co; (d) VB-1CeCo; (e) VB-0.5CeCo; (f) VB-0.25CeCo; (g) VB-0.1CeCo; (h) VB-0.05CeCo e (i) VB-0.01CeCo. (Fonte: Própria autora)

De acordo com Nicolini e colaboradores (2017), o  $Ce^{3+}$  absorve luz na faixa entre 250 nm e 300 nm, enquanto  $Ce^{4+}$  absorve luz na faixa entre 350 nm e 400 nm [86]. Os espectros após a incorporação de Ce no VB mostram picos amplos entre 250 nm e 400 nm, logo, tanto as espécies  $Ce^{3+}$  quanto  $Ce^{4+}$  devem estar presentes nas amostras, indicando que além dos íons, pode haver a presença de  $Ce_2O_3$  e  $CeO_2$  na superfície do material [87,142]. Os estados de oxidação  $Ce^{3+}$  e  $Ce^{4+}$  são interessantes nas aplicações do VB especialmente devido a sua rápida capacidade de interconversão, conferindo ao VB propriedade de mimetização de enzimas (superóxido oxidase, catalase e oxidase) que possuem capacidade antioxidante para quase todas as espécies nocivas de oxigênio intracelular, consequentemente evitando a morte celular e auxiliando na regeneração do tecido, apresentando um importante papel biológico [86].

Os picos centrados nos comprimentos de onda de 450 nm e 725 nm indicam a presença de cobalto nos estados de oxidação  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Co}^{3+}$ , respectivamente, nas amostras contendo cobalto em diferentes concentrações. A banda de absorção em 450 nm pode ser relacionada à transição de transferência de carga  $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{Co}^{2+}$ , enquanto que a banda de absorção em 725 nm é relatada à transição de transferência de carga  $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{Co}^{3+}$  [143]. Portanto, dois componentes são possíveis em relação ao cobalto: o óxido de cobalto ( $\text{CoO}$ ) e o óxido de cobalto (II, III) ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ ), que possui estrutura espinélica (sítios tetraédricos ( $\text{Co}^{2+}$ ) e octaédricos ( $\text{Co}^{3+}$ ) mistos) [144]. Assim, o  $\text{Co}_3\text{O}_4$  apresenta duas energias de gap correspondentes aos dois estados de oxidação do cobalto,  $\text{Co}^{3+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  [145], o que indica que o composto presente nas amostras pode ser tanto o  $\text{CoO}$ , quanto o  $\text{Co}_3\text{O}_4$ .

Os espectros de FTIR dos vidros sintetizados podem ser observados na Figura 4.8, e as principais bandas de absorção estão listadas na Tabela 4.5. As composições químicas de VB produzidos apresentaram espectros com as bandas típicas de VB. A banda centrada em  $1070 \text{ cm}^{-1}$  pode ser relacionada ao estiramento assimétrico de Si-O-Si, enquanto que a banda centrada em  $966 \text{ cm}^{-1}$  é reportada para o Si-O- (Si-O-ONL) com um oxigênio não ligante (ONL) por tetraedro de  $\text{SiO}_4$  [120,141,146]. A banda de  $800 \text{ cm}^{-1}$  pode ser associada ao estiramento simétrico vibracional de Si-O-Si, e banda centrada em  $450 \text{ cm}^{-1}$  e o ombro em  $1200 \text{ cm}^{-1}$  podem estar relacionados a vibração de Si-O-Si e também ao Si-O de vidro amorfo [120,141,146].



**Figura 4. 7:** Espectro FTIR dos vidros bioativos produzidos ( $1400\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ ): (a) VB-SiO<sub>2</sub>; (b) VB-1Ce; (c) VB-1Co; (d) VB-1CeCo; (e) VB-0.5CeCo; (f) VB-0.25CeCo; (g) VB-0.1CeCo; (h) VB-0.05CeCo e (i) VB-0.01CeCo. (Fonte: Própria autora)

**Tabela 4. 3:** Principais bandas vibracionais associadas aos vidros bioativos

Amostra	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição	Referências
VB-SiO <sub>2</sub>	966	Estiramento Si-OH	[120]
VB-SiO <sub>2</sub>		Estiramento	[120][141]
VB-1Ce	1070	assimétrico de Si-O-Si	
VB-1Co			
VB-0.01CeCo	800	Estiramento	[120][141]
VB-0.05CeCo		simétrico de Si-O	
VB-0.1CeCo			[120][141]
VB-0.25CeCo	450	Vibração de Si-O-Si	
VB-0.5CeCo			
VB-1CeCo			
VB-1Co	663	Vibração (ABO <sub>3</sub> ), O-Co <sup>2+</sup>	[146,147]
VB-0.25CeCo			
VB-0.5CeCo	573	Vibração (OB <sub>3</sub> ), O-Co <sup>3+</sup>	[146,147]
VB-1CeCo			

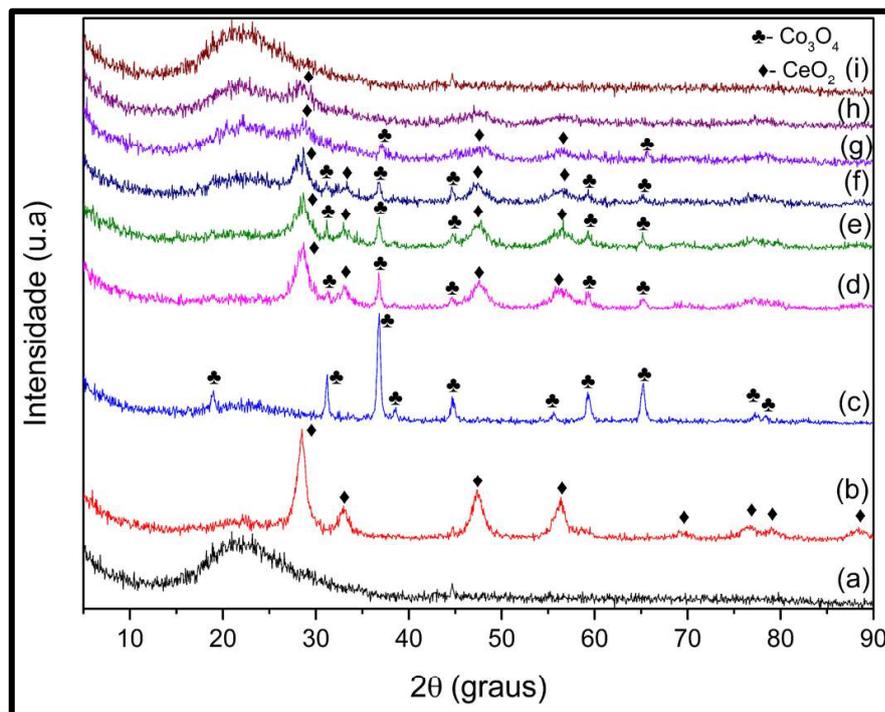
Para as amostras contendo íons terapêuticos Ce e/ou Co houve diminuição da banda centrada em 960 cm<sup>-1</sup>, que pode facilmente ser visualizada na amostra VB-SiO<sub>2</sub>, indicando que ao adicionar íons à sílica, há aumento da conectividade de rede, tornando o material mais denso [120].

As bandas distintas em 663 cm<sup>-1</sup> e 573 cm<sup>-1</sup> são características do estiramento Co-O, presentes no Co<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [146]. A banda centrada em 663 cm<sup>-1</sup> pode ser atribuída à vibração ABO<sub>3</sub>, onde A denota o Co<sup>2+</sup> em um posição tetraédrica, enquanto a banda centrada em 573 cm<sup>-1</sup> pode ser associada com a vibração OB<sub>3</sub> na rede espinela, onde B denota Co<sup>3+</sup> em posição octaédrica [146,147]. Porém, essas bandas não foram perceptíveis para as amostras VB-0.1CeCo, possivelmente por essa amostra ter baixa concentração de Co. Não foi possível identificar a formação do Co<sub>3</sub>O<sub>2</sub> pela análise de FTIR nas amostras VB-0.05CeCo e VB-0.01CeCo.

Além das bandas relacionadas ao estiramento Co-O e da banda centrada em 960 cm<sup>-1</sup> no VB-SiO<sub>2</sub>, não foram identificadas outras diferenças entre os espectros das amostras de VB obtidas. Como isso, observa-se que as amostras VB-SiO<sub>2</sub> parecem possuir uma maior concentração de ligações Si-OH, logo, uma rede de sílica mais aberta.

Os padrões de difração de raio X (DRX) obtidos para as amostras são apresentados na Figura 4.9. Através dos padrões encontrados é possível confirmar a natureza amorfa do vidro, com

formação de um halo disperso em  $2\theta$  entre  $15^\circ$  e  $30^\circ$  para cada uma das amostras, característico dessas estruturas [89]. Para as amostras VB-1Ce, VB-1Co, VB-1CeCo, VB-0.5CeCo, VB-0.25CeCo e VB-0.1CeCo é possível visualizar fases cristalinas nos padrões de DRX. Na amostra VB-1Ce, picos de difração com valores em  $2\theta$  próximos a  $28^\circ$ ,  $33^\circ$ ,  $47^\circ$ ,  $56^\circ$ ,  $69^\circ$ ,  $76^\circ$ ,  $79^\circ$  e  $88^\circ$  foram observados, sendo característicos do óxido de cério (IV) ( $\text{CeO}_2$ ), ICDD 00-043-1002 (JCPDS card n° 43-1002) [148], enquanto para a amostra VB-1Co os valores em  $2\theta$  próximos a  $19^\circ$ ,  $31^\circ$ ,  $36^\circ$ ,  $38^\circ$ ,  $45^\circ$ ,  $55^\circ$ ,  $59^\circ$ ,  $65^\circ$ ,  $77^\circ$  e  $78^\circ$  são característicos do óxido de cobalto (II, III) ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ ), ICDD 01-071-0816 (JCPDS card n° 71-0816) [148]. Esses picos de cristalinidade, referentes ao Ce e ao Co, corroboram os resultados apresentados na análise de UV-visível, confirmando a presença de  $\text{CeO}_2$  e  $\text{Co}_3\text{O}_4$  nas amostras contendo íons cério e/ou cobalto. Na análise de DRX não foram identificados picos referentes ao óxido de cobalto II ( $\text{CoO}$ ), ICDD 00-048-1719 (JCPDS card no. 43-1004) [149].



**Figura 4. 8:** Padrões de DRX das amostras de vidro bioativo (a) VB-SiO<sub>2</sub>; (b) VB-1Ce; (c) VB-1Co; (d) VB-1CeCo; (e) VB-0.5CeCo; (f) VB-0.25CeCo; (g) VB-0.1CeCo; (h) VB-0.05CeCo e (i) VB-0.01CeCo. (Fonte: Própria autora)

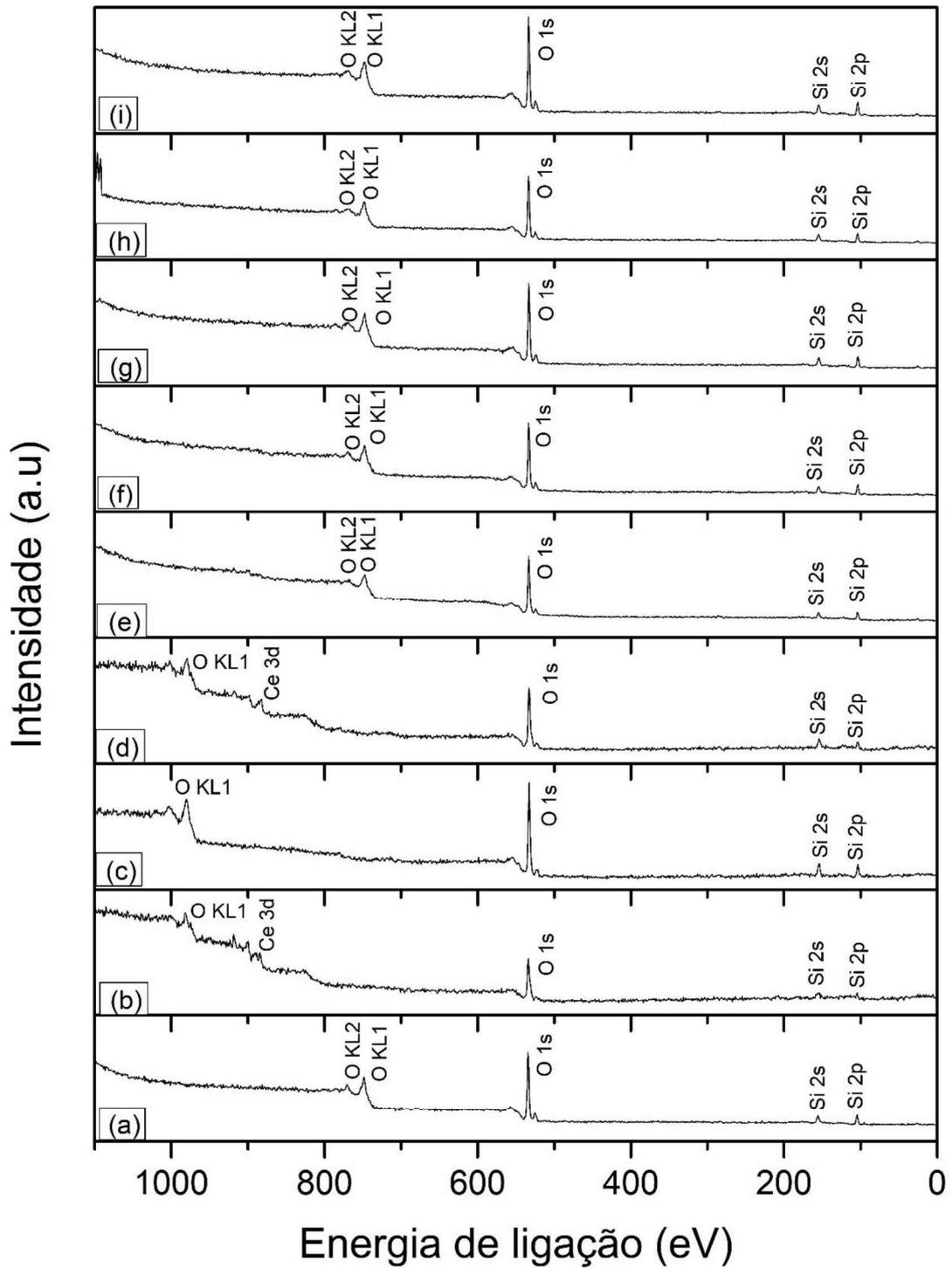
O óxido de cério (IV) apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, o que poderia dificultar a liberação de íons  $\text{Ce}^{4+}$  para o meio. Porém, estudos mostram que o  $\text{CeO}_2$  auxilia no aumento da atividade de cicatrização de feridas devido ao seu estado de oxidação dupla ( $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ ), além de eliminar espécies reativas de oxigênio (ERO) do local da lesão e auxiliar na produção de

colágeno e hidroxiprolina, que são marcadores para cicatrização eficaz de feridas [150,151]. Além disso, a céria pode reduzir a inflamação crônica e promover angiogênese [152].

De acordo com Tang (2018) e colaboradores, a fase cristalina  $\text{Co}_3\text{O}_4$  também é pouco solúvel em meio aquoso, o que poderia dificultar a liberação de íons cobalto para o meio [98]. Porém, a fase  $\text{Co}_3\text{O}_4$  é associada a degradação do peróxido de hidrogênio, agindo como um mimetizador da enzima catalase [135]. Entretanto, para fins de estabilização do HIF-1 $\alpha$  e neoformação de vasos sanguíneos, o estado de oxidação  $\text{Co}^{2+}$  ( $\text{CoO}$ ) tem sido preferido, em detrimento de espécies de  $\text{Co}^{3+}$  (ambos presentes no  $\text{Co}_3\text{O}_4$ ) [97]. Estudo realizado por Mendoza e colaboradores (2001) explica a precipitação de óxido de cobalto na superfície da sílica produzida via rota sol-gel. De acordo com os autores, parte dos íons cobalto (precursor nitrato de cobalto) adicionados à síntese difundem do volume para a superfície do material formando uma camada superior rica em cobalto que é oxidada pelo oxigênio presente no meio e, assim, a oxidação do cobalto levaria à formação de  $\text{Co}_3\text{O}_4$  na superfície do material [153].

Indícios da presença dos óxidos de cério (IV) e cobalto (II, III) puderam ser identificados nas micrografias de MET como precipitados nas superfícies das amostras VB-1Ce, VB-1Co, VB-1CeCo, VB-0.5CeCo, VB-0.25CeCo e VB-0.1CeCo, o que indica que os íons adicionados às sínteses não foram completamente incorporados como modificadores ou formadores de rede na estrutura do vidro ou lixiviados em etanol durante o processo de lavagem. No entanto, na amostra VB-0.05CeCo, foram identificados apenas picos referentes ao  $\text{CeO}_2$ , e para a amostra VB-0.01CeCo, apenas o halo amorfo foi observado. Portanto, ao diminuir a concentração de íons presentes na solução precursora há diminuição da precipitação de material cristalino (óxidos) na superfície do vidro, o que pode ser um indicativo da incorporação dos cátions  $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  na amostra VB-0.01CeCo [98,141].

A estrutura das amostras de VB também foi analisada por meio de XPS, e o espectro de varredura é apresentado na Figura 4.10. Linhas Auger e de fotoemissão características de Si 2p, O 1s, Ce 3d e Co 2p, constituintes das amostras sintetizadas dos vidros bioativos, foram identificadas. Devido ao carregamento elétrico das amostras e a fim de calibrar a energia de ligação (BE), a banda correspondente a C 1s, observada no espectro de alta resolução de todas as amostras foi empregada para o ajuste e seu valor foi regulado para 284,8 eV [154,155], uma vez que o carbono é tido como um contaminante naturalmente presente na superfície de amostras [156].



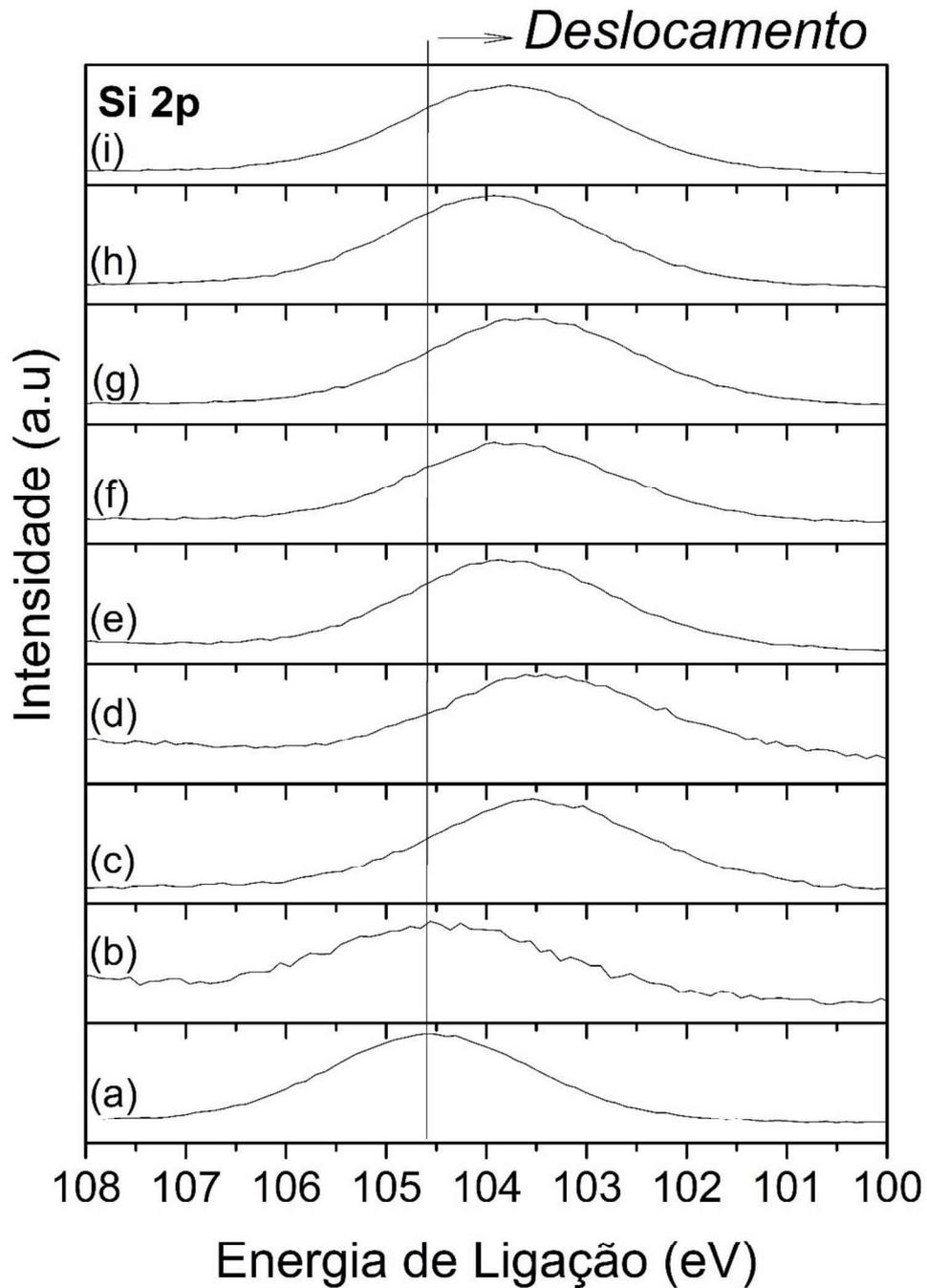
**Figura 4. 9:** Espectros de varredura de XPS para as amostras. (a) VB-SiO<sub>2</sub>; (b) VB-1Ce; (c) VB-1Co; (d) VB-1CeCo; (e) VB-0.5CeCo; (f) VB-0.25CeCo; (g) VB-0.1CeCo; (h) VB-0.05CeCo e (i) VB-0.01CeCo. (Fonte: Própria autora)

Os resultados de energias de ligação para cada amostra e seus respectivos componentes estão apresentados na Tabela 4.6.

**Tabela 4. 4:** Valores de energia de ligação obtidos através dos espectros de alta resolução de Si 2p, O 1s, Ce 3d e Co 2p para respectivas amostras de VB.

Amostra	Energia de Ligação (eV)												
	Si 2p	O 1s	Ce 3d						Co 2p				
			u	u''	u'''	v	v''	v'''	Co <sup>2+</sup>	Co <sup>3+</sup>	Satélites		
SiO <sub>2</sub>	104,6	533,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
VB-1Ce	104,6	533,8/530,7	902,6	907,3	917,7	883,6	888,7	899,5	-	-	-	-	
VB-1Co	103,5	532,7	-	-	-	-	-	-	796,2/781,0	794,6/779,6	-	-	
VB-1CeCo	103,4	532,7/529,7	904,1	911,1	920,7	886,4	891,7	901,8	795,6/781,8	794,2/779,6	-	-	
VB-0.5CeCo	103,9	533,2	901,4	906,7	917,4	883,0	887,3	898,5	795,5/780,6	795,5/780,6	790,6/785,3	-	
VB-0.25CeCo	103,9	533,0	901,2	905,6	916,9	883,0	888,6	898,5	795,7/780,6	795,7/780,6	789,2/784,6	-	
VB-0.1CeCo	103,6	533,0	-	-	-	-	-	-	796,2/780,5	796,2/780,5	789,7/784,5	-	
VB-0.05CeCo	103,9	533,2	-	-	-	-	-	-	-	-	790,1/784,92	-	
VB-0.01CeCo	103,8	533,2	-	-	-	-	-	-	-	-	790,3/784,9	-	

A Figura 4.11 apresenta o espectro de alta resolução Si 2p para as amostras de VB obtidas, sendo observadas bandas centradas entre 103.4 eV e 104.6 eV referentes ao óxido de silício - SiO<sub>2</sub> [156,157]. Um valor mais elevado de BE foi encontrado para a amostra VB-SiO<sub>2</sub> (104,6 eV) quando comparado a amostras contendo íons terapêuticos Ce e Co. Esse valor foi reportado na literatura [134] e associado a ausência de cátions metálicos modificadores de rede. Além disso, o VB mesoporoso possui em sua superfície um elevado número de grupos hidroxilas (Si-OH), que é um grupo retirador de elétrons (mais eletronegativo), fazendo com que a BE seja deslocada para valores mais altos quando comparados à sílica produzida por fusão (103,9 eV) [158].



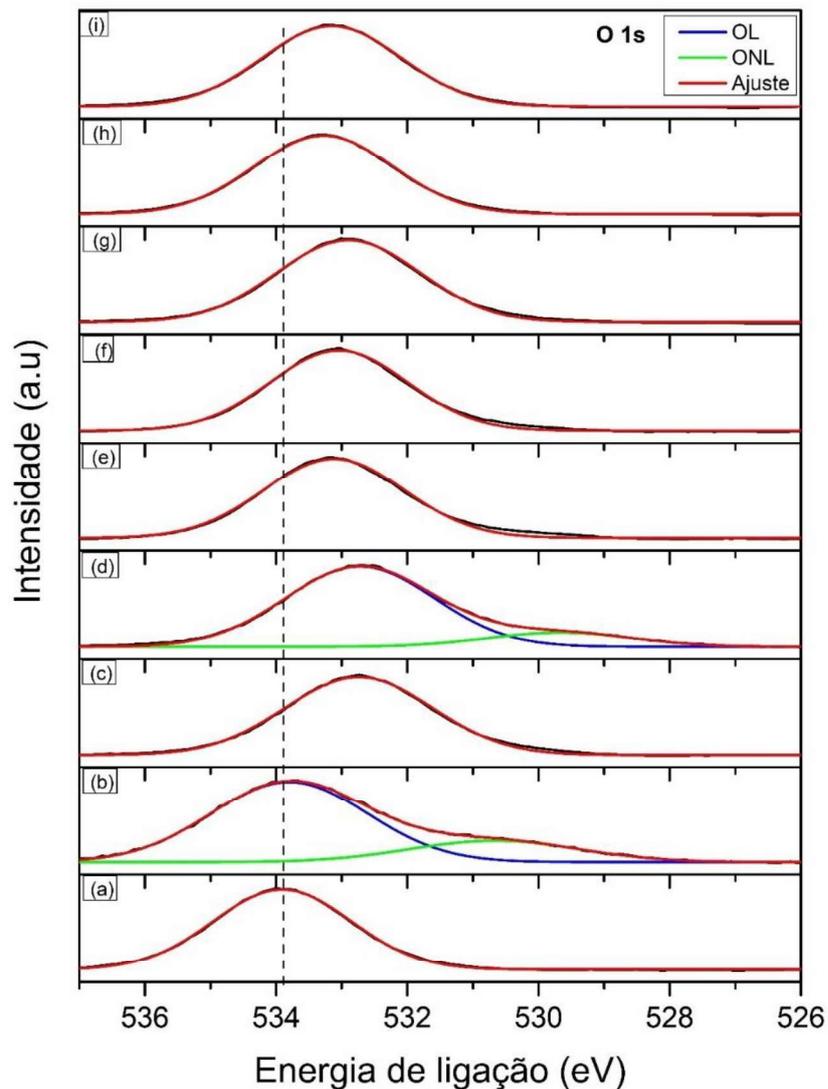
**Figura 4. 10:** Espectros de XPS de alta resolução de Si 2p para as amostras. (a) VB-SiO<sub>2</sub>; (b) VB-1Ce; (c) VB-1Co; (d) VB-1CeCo; (e) VB-0.5CeCo; (f) VB-0.25CeCo; (g) VB-0.1CeCo; (h) VB-0.05CeCo e (i) VB-0.01CeCo. (Fonte: Própria autora)

Os valores máximos da banda de Si 2p foram deslocados para valores mais baixos após a incorporação de cobalto para todas as amostras contendo este íon, porém o mesmo não foi observado com a adição de cério (VB-1Ce, 104,6 eV). A literatura indica que o deslocamento de BE para valores mais baixos está associado à presença de grupos com baixas eletronegatividades, o que indica cátions metálicos ( $M^+$ ) atuando como modificadores de rede

na superfície do material [134,159]. Esses íons rompem a estrutura da sílica, quebrando a ligação Si-O-Si, que apresenta oxigênio ligante (*bridging oxygen* - BO), formando uma ligação iônica Si-O-M<sup>+</sup>, que apresenta oxigênio não-ligante (*non-bridging oxygen* - NBO) [141]. Esse mesmo comportamento (deslocamento de banda) foi observado por Mekki e colaboradores (1997) em estudo voltado para a análise da estrutura de vidros de silicato de sódio contendo cobalto [160]. Mekki e colaboradores (1997) apenas sugerem que quanto maior a concentração de cobalto nas amostras, maior o deslocamento da curva, não apresentando mais explicações sobre o fenômeno [160]. Assim, os espectros de Si 2p apresentam deslocamentos que podem ser atribuídos à modificação da rede do VB pelo Co.

Os espectros de alta resolução O 1s obtidos para os VBs são apresentados na Figura 4.12. Todas as amostras apresentaram uma banda principal bem definida com máximo entre 532,7 eV e 533,9 eV, associada ao oxigênio ligante, e uma banda menor foi observada nas amostras VB-1Ce e VB-1CeCo em energia de ligações mais baixas (529,7 eV a 530,7 eV), associada a contribuições de oxigênios não-ligantes [161]. Também é possível observar que a presença do cobalto afetou os espectros das amostras VB-1Co, VB-1CeCo, VB-0.5CeCo, VB-0.25CeCo, VB-0.1CeCo, VB-0.05CeCo e VB-0.01CeCo deslocando as curvas para menores BE em relação ao VB-SiO<sub>2</sub> e ao VB-1Ce.

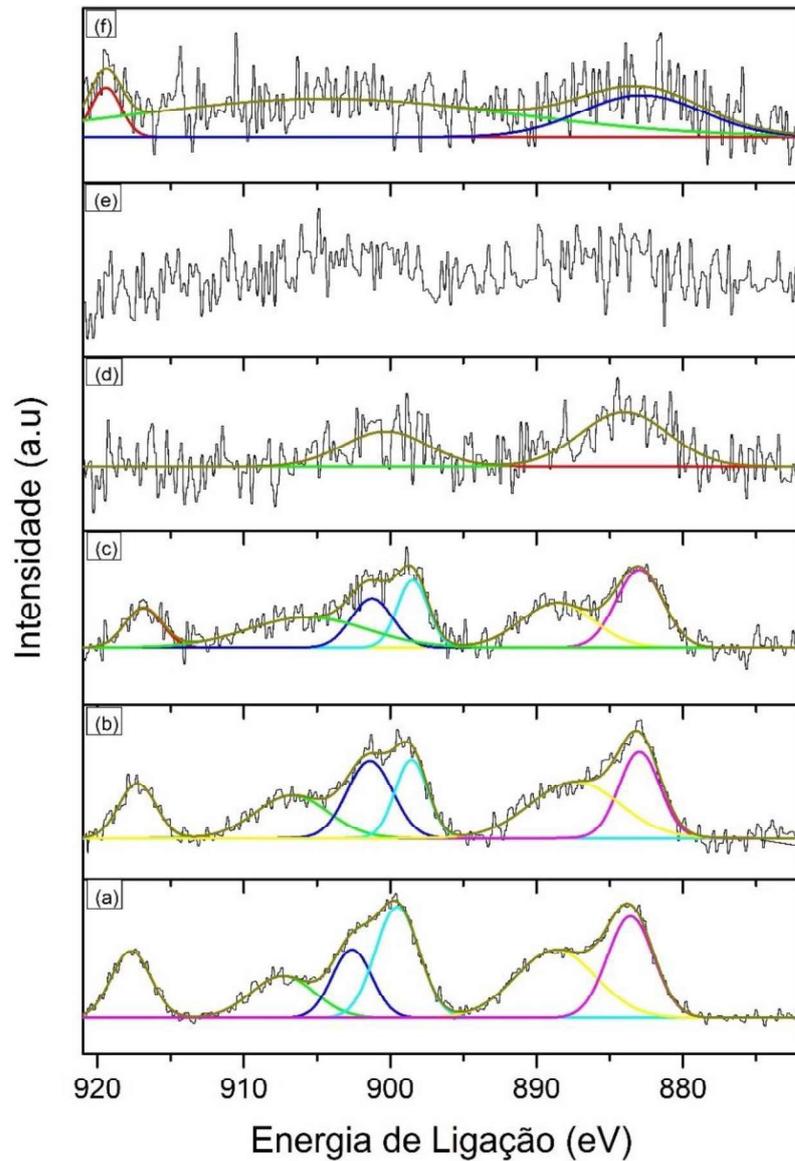
A presença acentuada de bandas relacionadas a contribuições NBO em VB-1Ce e VB-1CeCo indica que os íons Ce estariam agindo como modificadores de rede nas nanopartículas mesoporosas de sílica, gerando a ruptura da rede e consequente maior formação de ligações Si-O<sup>-</sup> [88]. No entanto, a prevalência de BO na amostra VB-1Co indica que o Co pode também atuar como íon formador de rede no VB [145].



**Figura 4. 11:** Espectros de XPS de alta resolução de O 1s para as amostras. (a) VB-SiO<sub>2</sub>; (b) VB-1Ce; (c) VB-1Co; (d) VB-1CeCo; (e) VB-0.5CeCo; (f) VB-0.25CeCo; (g) VB-0.1CeCo; (h) VB-0.05CeCo e (i) VB-0.01CeCo.. (Fonte: Própria autora)

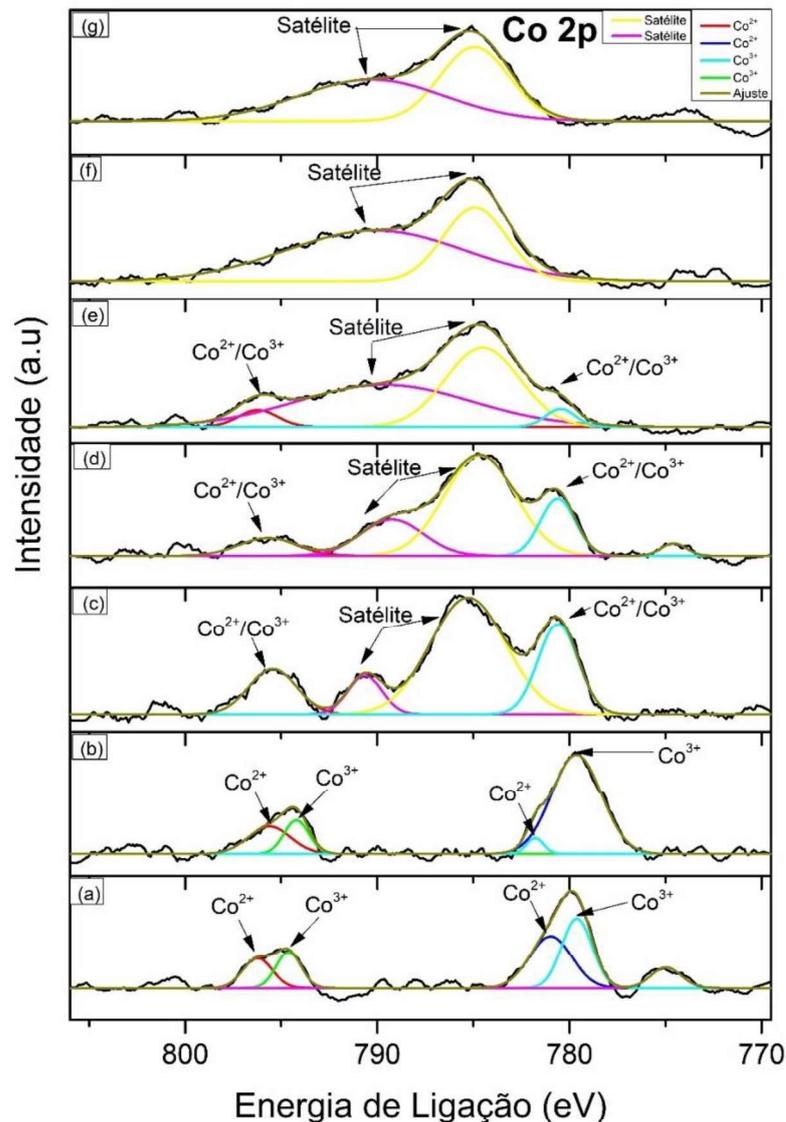
Os espectros de alta resolução Ce 3d para as diferentes amostras contendo esse elemento são apresentados na Figura 4.13. As três bandas da faixa de energia de ligação de 920,7 eV a 901,2 eV das amostras contendo Ce correspondem ao estado de acoplamento da órbita de spin Ce 3d<sub>3/2</sub>, enquanto os outros três picos com energias de ligação de 901,8 eV a 883 eV estão associados ao estado Ce 3d<sub>5/2</sub> [162]. Os picos próximos a 918 eV (920,7 eV; 917,4 eV e 916,9 eV) são relacionados ao estado de oxidação do Ce (IV), já as bandas próximos a 884 eV (886,4 eV e 883,0 eV) são relatados para o Ce (III) [162]. A análise de XPS para as amostras contendo íons Ce elucidada a presença tanto de CeO<sub>2</sub>, quanto de Ce<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Com relação aos espectros de ampla resolução de Ce das amostras VB-0.1CeCo, VB-0.05CeCo e VB-0.01CeCo, não foi possível obter a definição dos picos referentes ao cério, possivelmente devido a menor

quantidade de íons Ce presentes na amostra, podendo a técnica ter atingido o seu limite de detecção (aproximadamente 10 nm).



**Figura 4. 12:** Espectros de XPS de alta resolução de Ce 3d para as amostras. (a) VB-1Ce; (b) VB-1CeCo; (c) VB-0.5CeCo; (d) VB-0.25CeCo; (e) VB-0.1CeCo; (f) VB-0.05CeCo e (g) VB-0.01CeCo. (Fonte: Própria autora)

Os espectros de alta resolução Co 2p para as diferentes amostras contendo esse elemento são apresentados na Figura 4.14, sendo formado por duas bandas características do desdobramento dos multipletos Co 2p<sub>3/2</sub> e Co 2p<sub>1/2</sub>, identificados em aproximadamente 780 eV e 796 eV, compatíveis com valores de compostos de cobalto relatados na literatura [160,163].

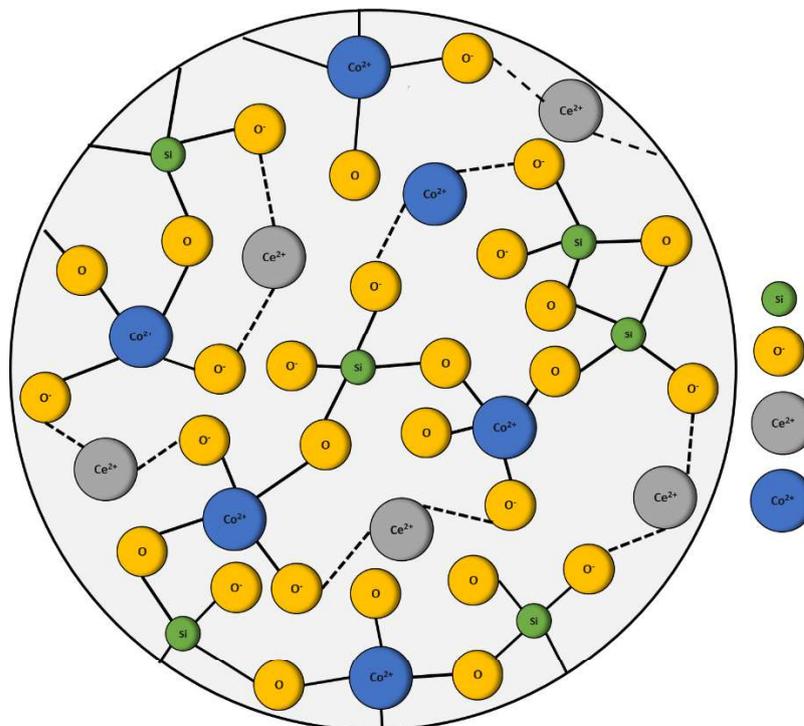


**Figura 4. 13:** Espectros de XPS de alta resolução de Co 2p para as amostras. (a) VB-1Co; (b) VB-1CeCo; (c) VB-0.5CeCo; (d) VB-0.25CeCo; (e) VB-0.1CeCo; (f) VB-0.05CeCo e (g) VB-0.01CeCo. (Fonte: Própria autora)

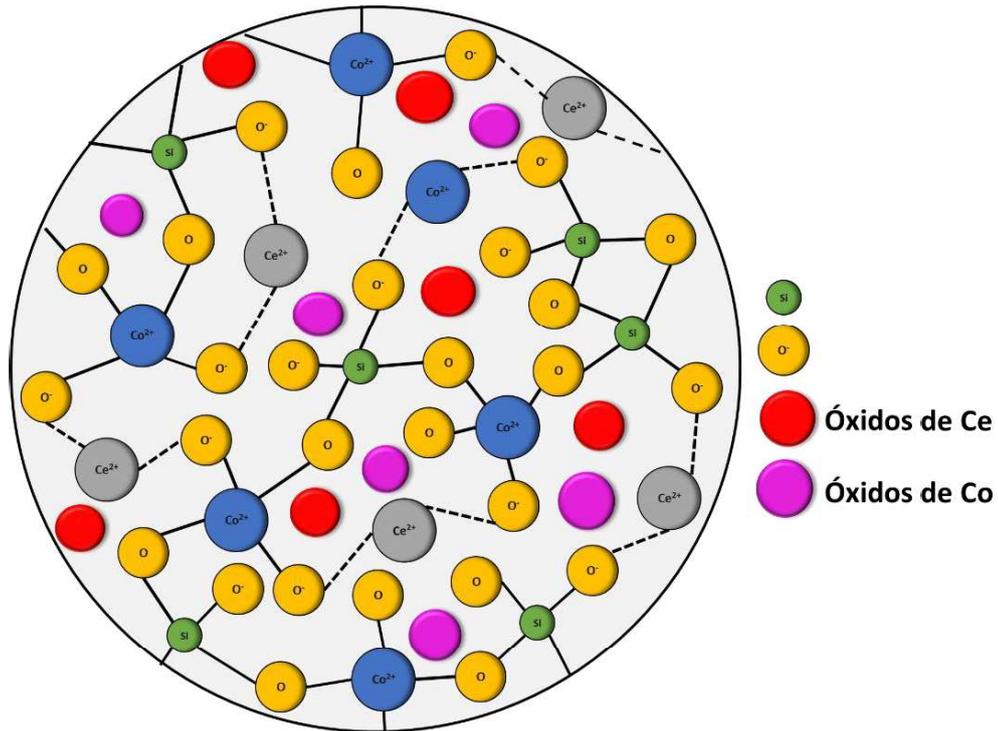
De acordo com os valores de BE, os estados de oxidação são referentes ao  $\text{Co}^{2+}$  e ao  $\text{Co}^{3+}$  [155], juntamente com características de *shake-up* de satélites observados ao lado da maior BE (aproximadamente 790 eV) [98,155]. De acordo com Nare e colaboradores (2022), especificamente o pico de baixa intensidade em 796 eV é atribuída a fase  $\text{Co}_3\text{O}_4$ , enquanto que Moteki e colaboradores (2011), citam o fato de pico entre 780 eV e 780,7 eV ser atribuído a fase  $\text{CoO}$  [164]. Portanto, as características relativas aos picos são amplas, o que sugere que há uma mistura de diferentes compostos de cobalto ( $\text{CoO}$  e  $\text{Co}_3\text{O}_4$ ) nos VB contendo Co [165,166]. Apesar da segunda fase  $\text{CoO}$  não ter sido identificada via DRX, indicativos da sua presença foram obtidos através da análise de XPS.

Trabalhos anteriores afirmam que o deslocamento de bandas para menores BE está associada a ligação de átomos metálicos aos átomos de oxigênio não-ligante, tornando a superfície do VB mais conectada, o que pôde ser visualizado a partir da adição de Co à composição dos VB [167,168]. Portanto, é possível que: 1) parte do cobalto e do cério adicionados as amostras de VB precipitaram como óxidos, tal qual indicado pelas análises de MET, DRX, UV-vis e FTIR; 2) parte dos íons Co foi incorporada à rede dos VB como formador de rede, como indica os espectros de Si 2p e O 1s [159,169,170]; e 3) parte dos íons Co e Ce está presente no material como modificador de rede, tal qual indica o espectro de O 1s.

A partir das análises estruturais empregadas neste trabalho, são sugeridas as estruturas internas – “bulk” do material (Figura 4.15) – e a superfície dos materiais (Figura 4.16) para as amostras de VB produzidas neste trabalho. Nas figuras, os íons Si agem como formadores de rede, os íons Ce agem como modificadores de rede e os íons Co agem tanto como formadores, quanto como modificadores de rede - tal qual pôde ser verificado neste trabalho a partir das análises realizadas. Além disso, a partir das imagens de MET notou-se que a formação de óxido nas amostras seria superficial, portanto, assim foram consideradas na representação esquemática.



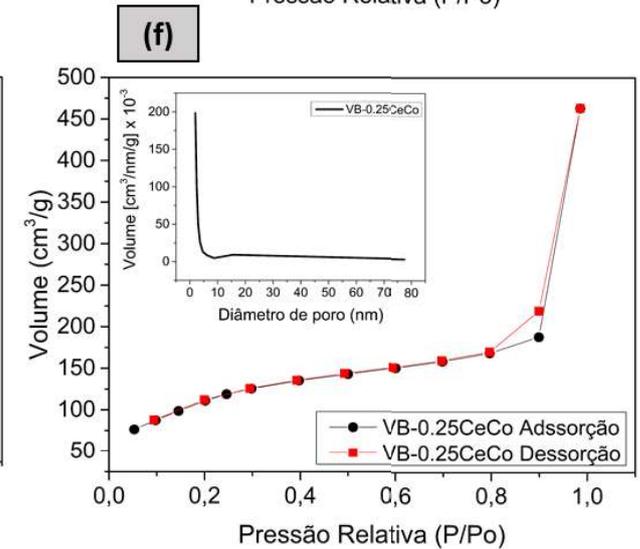
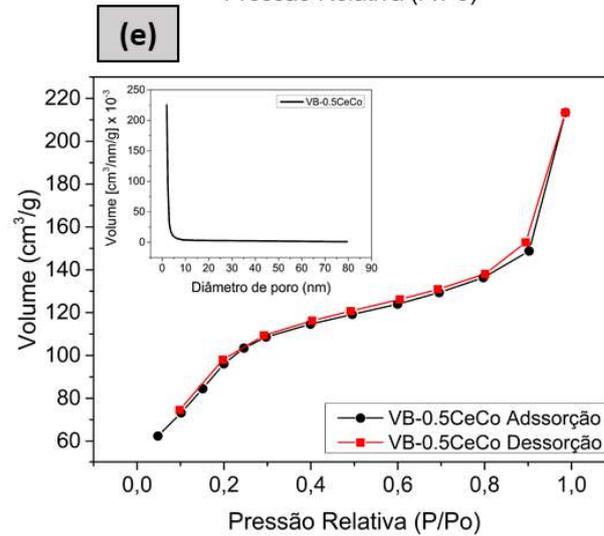
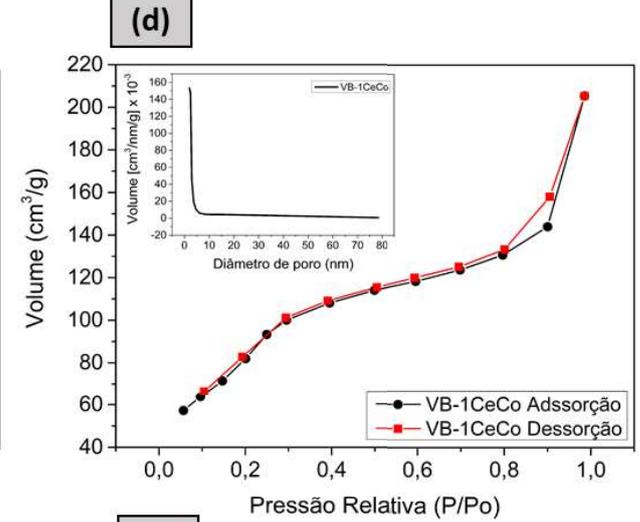
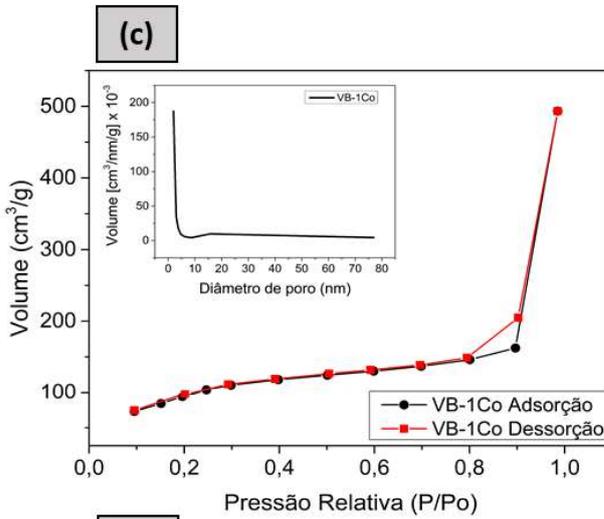
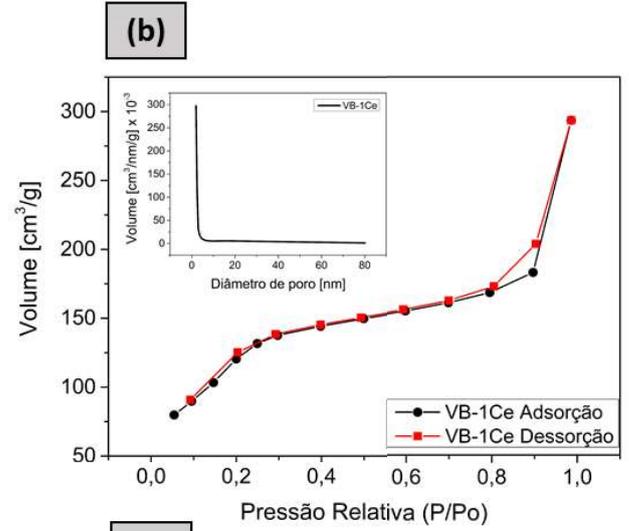
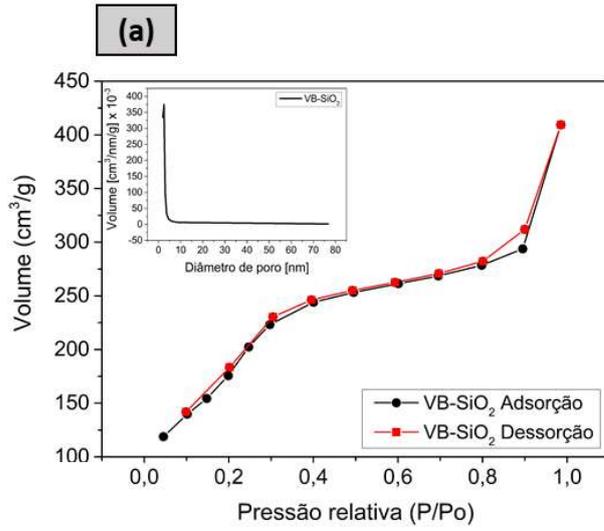
**Figura 4. 14:** Imagem esquemática da estrutura do volume interno das amostras de VB contendo íons Ce e Co. (Fonte: Própria autora)

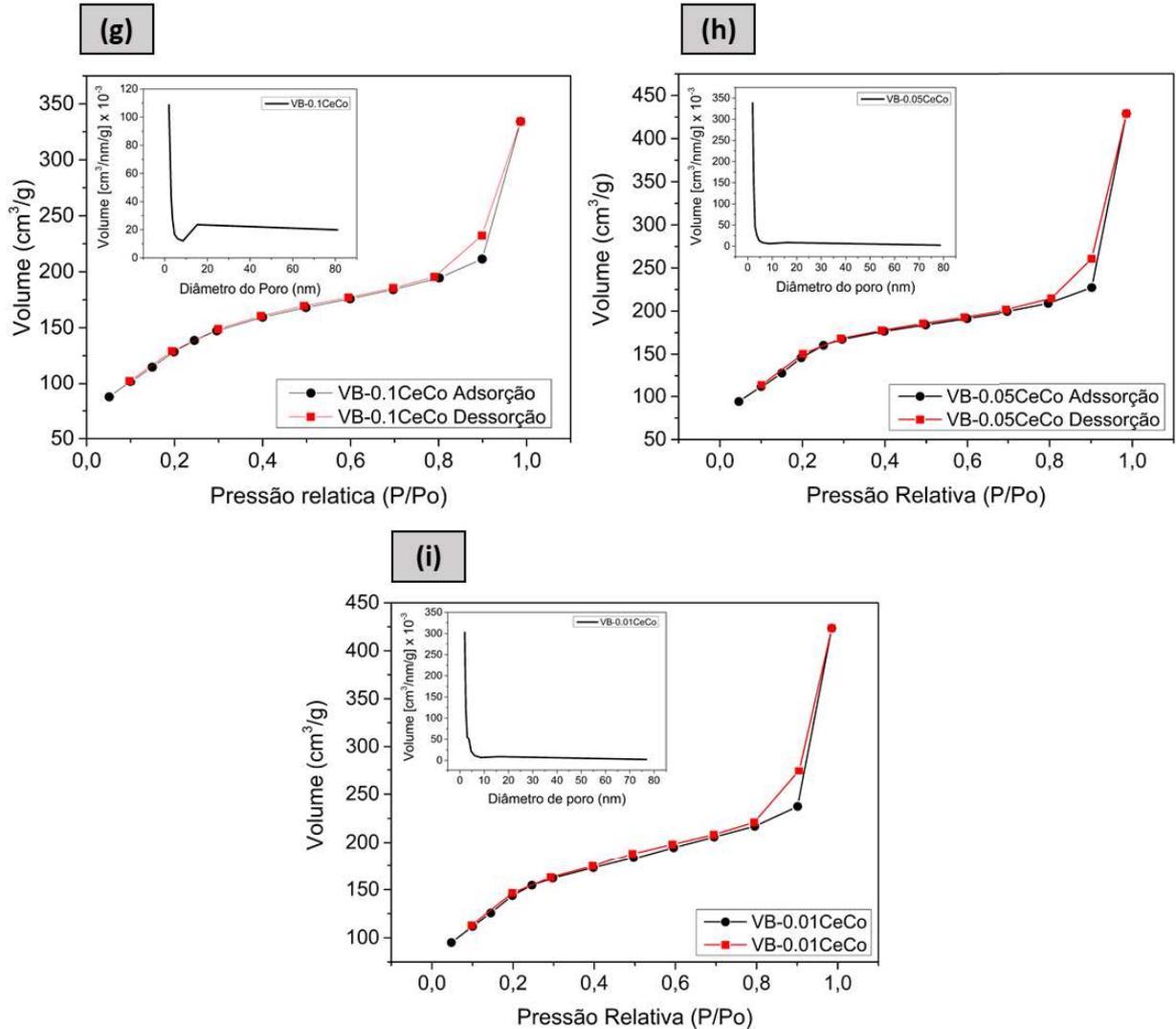


**Figura 4. 15:** Imagem esquemática da estrutura da superfície das amostras de VB contendo íons Ce e Co.  
(Fonte: Própria autora)

#### 4.5.4 Análises das características texturais das partículas

A área superficial, o tamanho dos poros e a distribuição dos poros em função da análise de adsorção de nitrogênio pelos métodos BET e BJH, respectivamente, confirmam informações importantes da sílica mesoporosa sintetizada para a potencial aplicação como biomaterial. A Figura 4.17 mostra as isotermas de adsorção-dessorção e o perfil de distribuição de tamanho de poros (gráfico inserido) obtidos através das análises.





**Figura 4. 16:** Isothermas de sorção de nitrogênio e distribuições de tamanho de poro (gráfico inserido) para (a) VB-SiO<sub>2</sub>, (b) VB-1Ce, (c) VB-1Co, (d) VB-1CeCo; (e) VB-0.5CeCo, (f) VB-0.25CeCo, (g) VB-0.1CeCo, (h) VB-0.05CeCo e (i) VB-0.01CeCo. (Fonte: Própria autora)

As isothermas de adsorção-dessorção de todas as amostras foram identificadas como do tipo IV, de acordo com os critérios estabelecidos pela IUPAC, que são próprias de materiais com característica mesoporosa, típicos de materiais sintetizados na presença de CTAB, nos quais os poros encontram-se na faixa de 2 nm a 50 nm [139,142,171]. A mesoporosidade em VB possui vários atributos únicos que os tornam excelentes candidatos para uma ampla gama de aplicações farmacológicas e biomédicas, pois podem ter a sua capacidade de carga de fármacos e íons terapêuticos aumentada devido à alta área superficial e aos grandes poros uniformes – o que pode auxiliar na efetividade do tratamento de feridas [172]. Além disso, estudos mostram que a utilização de nanopartículas mesoporosas de sílica para o tratamento de feridas diminui o tempo de cicatrização, elimina a necessidade de suturas e ainda há a eliminação do material no

organismo de forma síncrona a formação de novo tecido [173]. Os loops de histerese das isotermas são do tipo H1, o que indica que os poros estão em formato de canais cilíndricos [89].

A área superficial específica obtida pelo método BET, o volume de poros e o diâmetro médio de poros estão apresentados na Tabela 4.7 e estão de acordo com as áreas superficiais de sílica mesoporosa encontradas na literatura, entre  $200 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  e  $800 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  [174]. A partir da Tabela 4.7, infere-se que a área superficial dos VBs produzidos apresentaram diminuição da área superficial em relação à sílica pura (amostra VB-SiO<sub>2</sub>), possivelmente pela obstrução de parte dos mesoporos durante a impregnação de íons Ce e Co [142,162,175]. Essa tendência de diminuição de área superficial também foi observada por Zheng e colaboradores (2020) quando incorporaram íons Ce à SiO<sub>2</sub> num processo de impregnação pós-síntese [78]. Fouad e colaboradores (2011) observaram que a área superficial de VBs sintetizados com diferentes concentrações de Co diminuiu com o aumento da adição de Co ao VB, de acordo com os autores, isso pode estar relacionado à ocupação da rede de SiO<sub>2</sub> por espécies de cobalto [176]. Em comparação a amostra VB-SiO<sub>2</sub> ( $720 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ), é possível observar que a formulação de sistema binário a partir da inserção de íons Ce (VB-1Ce,  $453 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ) diminui a área superficial do material, mas não tanto quanto a inserção de íons Co (VB-1Co,  $359 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ), possivelmente pela maior concentração em % mol de óxido (23,6 % mol CoO e 11,6 % mol CeO<sub>2</sub>, respectivamente) presentes nas amostras. A partir da constituição do sistema ternário (VB-xCeCo, onde x indica a concentração em % mol dos íons terapêuticos), concentrações mais altas de íons (VB-1CeCo, VB-0.5CeCo, VB-0.25CeCo e VB-0.1CeCo) levaram a menores áreas superficiais ( $327 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ,  $355 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ,  $403 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  e  $476 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ , respectivamente), enquanto que as concentrações mais baixas de íons (VB-0.05CeCo e VB-0.01CeCo) obtiveram áreas superficiais mais elevadas ( $547 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$  e  $525 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ , respectivamente). Ainda que o ordenamento apresentado seja a título de comparação entre as amostras, todos os VB aqui sintetizados possuem alta área superficial. Pinna e colaboradores (2020) observaram que a área superficial de partículas mesoporosas de SiO<sub>2</sub> diminuiu após a impregnação pós síntese e justificaram através de uma possível obstrução dos poros pela presença de óxidos nos mesmos [162]. O mesmo foi observado por Zheng et al (2020) [142]. A presença óxidos na superfície do material tende a não afetar a aplicação dos VB em meio fisiológico, uma vez que durante a dissolução do vidro esses óxidos são liberados e apresentam características favoráveis no meio como ação antiinflamatória, antioxidante e angiogênica [142].

**Tabela 4. 5:** Propriedades texturais obtidas pelos métodos BET e BJH para as amostras VB-SiO<sub>2</sub>, VB-1Ce, VB-1Co, VB-1CeCo, VB-0.5CeCo, VB-0.25CeCo, VB-0.1CeCo, VB-0.05CeCo e VB-0.01CeCo.

<b>Amostra</b>	<b>Área Superficial (m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volume Total de Poros (cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Diâmetro Médio do Poro (nm)</b>
SiO <sub>2</sub>	720	0,6	4
VB-1Ce	453	0,5	4
VB-1Co	359	0,8	9
VB-1CeCo	327	0,3	4
VB-0.5CeCo	355	0,3	4
VB-0.25CeCo	403	0,7	7
VB-0.1CeCo	476	0,5	4
VB-0.05CeCo	547	0,7	5
VB-0.01CeCo	525	0,7	5

O volume total de poros obtido pelo método BJH foi pouco afetado para as amostras VB-0.25CeCo (0,71 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>), VB-0.1CeCo (0,52 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>), VB-0.05CeCo (0,66 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>) e VB-0.01CeCo (0,65 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>), em relação a amostra VB-SiO<sub>2</sub> (0,63 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>). Porém, o volume total de poros foi amplamente afetado para as amostras VB-1Ce (0,45 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>), VB-1Co (0,76 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>), VB-1CeCo (0,32 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>) e VB-0.5CeCo (0,33 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup>). Observa-se que após a impregnação de Ce na sílica (VB-1Ce) houve a diminuição do volume total de poros do material, enquanto que a impregnação de Co na sílica (VB-1Co) levou a um aumento do volume total de poros do material. Isso se justifica, como pode ser visto nas micrografias de MET, pelo fato de que nas partículas de VB-1Ce há formação de óxido nanoestruturado cobrindo a superfície das partículas, o que pode ter afetado o volume total de poros do material, enquanto que nas partículas de VB-1Co são formadas partículas de óxido que se assemelham em tamanho às nanopartículas de vidro bioativo e que parecem estar dispersas na amostra. Logo, as partículas de VB-1Ce tenderiam a ser mais densas, com menor volume total de poros, que as partículas de VB-1Co. Com relação aos sistemas ternários VB-1CeCo e VB-0.5CeCo, por serem VB com maiores concentrações de íons terapêuticos, Ce e Co, elas possuem tanto óxidos cobrindo as partículas, quanto nanopartículas de óxidos (mais conectadas que as nanopartículas de VB-SiO<sub>2</sub>), assim como pôde ser visto nas análises de MET, o que reduziria o volume total de poros quando comparadas às partículas dos sistemas binários. Portanto, a presença de óxidos nas partículas influenciou diretamente nos valores de área superficial e volume total de poros das amostras, ou seja, quanto maior a quantidade de óxidos, menores as medidas de área superficial e volume total de poros dos VBs.

O diâmetro de poros obtido pelo método BJH, mostrou que as amostras VB-1Ce (4,0 nm), VB-1CeCo (3,9 nm), VB-0.5CeCo (3,7 nm), VB-0.1CeCo (4,3 nm), VB-0.05CeCo (4,8 nm) e VB-0.01CeCo (5,0 nm) possuem uma distribuição homogênea de tamanho de poros. A amostra VB-SiO<sub>2</sub> (3,5 nm) apresentou menor tamanho de poros dentre todas as amostras, possivelmente devido à ausência dos íons terapêuticos Ce e Co em sua estrutura, que agem como modificadores de rede e causam rupturas na conectividade da sílica [88,89,177,178]. Maiores valores de diâmetro médio de poro foram encontrados para as amostras VB-1Co (8,5 nm) e VB-0.25CeCo (7,1 nm), o que pode ser relacionado à junção de poros menores para formação de poros maiores [70].

Os resultados obtidos indicam que, após a modificação da superfície, as nanopartículas mantiveram sua forma e estrutura mesoporosa e ainda exibiram elevada área superficial e volume de poros, que são atraentes para uma variedade de aplicações biomédicas, como liberação de íons terapêuticos [175]. Partículas mesoporosas ainda exibem maior bioatividade do que partículas densas, e podem incorporar mais facilmente espécies de importância biológica, como proteínas específicas e fármacos, que podem ser liberadas de maneira controlada, agindo assim como um sistema de liberação de drogas [174,175]. A elevada área superficial permite maior/rápida interação com o meio no qual estiver inserido, ou seja, sua superfície possui alta biorreatividade [179]. Além disso, são materiais atrativos para a produção de biocompósitos, já que tendem a interagir com maior facilidade com a superfície do polímero, auxiliando na formação de um sistema de liberação controlada de íons terapêuticos [180].

#### **4.5.5 Análise da ação antioxidante das nanopartículas de vidro bioativo**

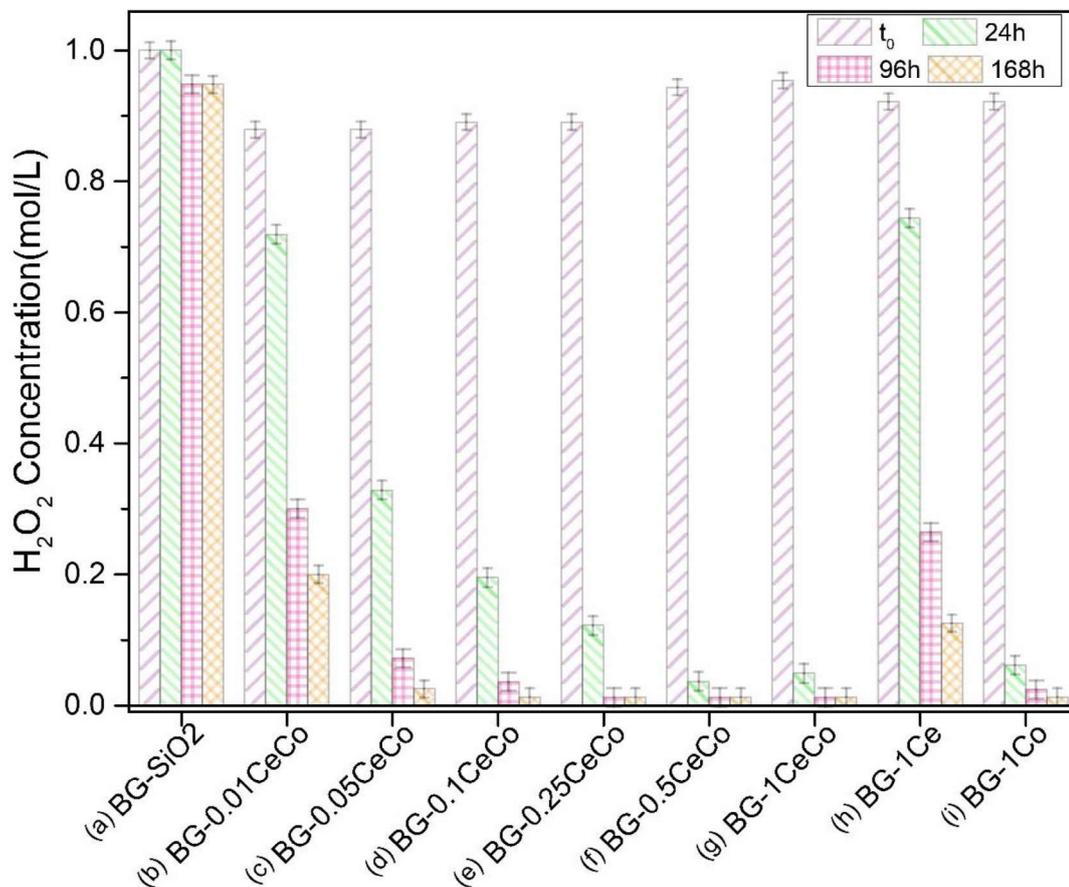
A enzima catalase é o catalisador mais eficiente para converter peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O e proteger as células contra o efeito tóxico causado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [181]. A conversão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em espécies menos reativas é vital para abrandar o processo inflamatório em feridas crônicas, levando à recuperação do tecido lesionado [79]. O mecanismo de ação dessa enzima catalisadora é a partir da diminuição da barreira de energia que deve ser superada antes que a reação de decomposição ocorra, portanto, a energia de ativação da reação catalisada pela enzima é menor do que a não catalisada pelas enzimas [135]. Materiais que contenham elementos como o Ce e o Co tendem a ser capazes de mimetizar essa catálise, simulando a atividade da enzima catalase [79,182]. Portanto, o ensaio de atividade mimética da enzima catalase foi empregado neste estudo para avaliar a capacidade de degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas

amostras, de acordo com a Eq. 4.1., de modo a demonstrar que a presença de Ce e Co nos materiais é capaz de auxiliar a prevenção do estresse oxidativo produzido pelo  $H_2O_2$  [183].



Eq.4. 1

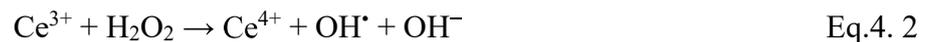
A Figura 4.18 relata os resultados das titulações das soluções após a imersão das amostras em solução 1M de  $H_2O_2$  por diferentes tempos, onde é possível observar que as amostras produzidas exibiram níveis diferentes de atividade catalítica - decomposição do  $H_2O_2$ .



**Figura 4. 17:** Decomposição do  $H_2O_2$ , a  $37^\circ C$ , após 0h ( $t_0$ ), 24h, 96h e 168h de imersão das amostras (a) VB-SiO<sub>2</sub>; (b) VB-1Ce; (c) VB-1Co; (d) VB-1CeCo; (e) VB-0.5CeCo; (f) VB-0.25CeCo; (g) VB-0.1CeCo; (h) VB-0.05CeCo e (i) VB-0.01CeCo em diferentes tempos de imersão. (Fonte: Própria autora)

É possível observar que a amostra VB-SiO<sub>2</sub> praticamente não degradou o  $H_2O_2$  e a diferença observada nos tempos de 96h e 168h pode ser relativa à instabilidade da solução [86]. Em relação ao mesmo período de teste, a amostra VB-1Co degradou mais rapidamente o  $H_2O_2$  do que a VB-1Ce, o que indica que o Co seria responsável por maior parte da degradação do  $H_2O_2$  nas demais amostras contendo estes íons. Já a amostra VB-0.01CeCo possui perfil de degradação próximo ao perfil de degradação da amostra VB-1Ce, indicando que uma

concentração de Co inferior a 0.3 % mol é menos efetiva para a degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, portanto a espécie responsável pela maior parte da degradação apresentada pela amostra VB-0.01CeCo seria o cério. Também é possível observar que a degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é dependente da concentração dos íons, isto é, quanto maior a concentração de íons, maior a degradação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o mesmo tempo de teste. Nicolini e colaboradores (2017) observaram que há uma dependência da concentração de Ce no VB com a degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os autores mostraram que quanto maior a concentração de Ce no VB, maior a atividade catalítica do material [86]. Essa tendência também foi observada por Varini e colaboradores (2019) [184]. Em relação ao cobalto, Malavasi e colaboradores (2020) mostraram que a presença deste íon no VB tende a degradar completamente o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em poucas horas de imersão do material numa solução 1M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [182]. As equações a seguir indicam possíveis mecanismos de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas espécies de Ce (Eq. 4.2 e Eq.4.3) e Co (Eq.4.4, Eq. 4.5, Eq. 4.6, Eq.4.7 e Eq.4.8) [135,182].



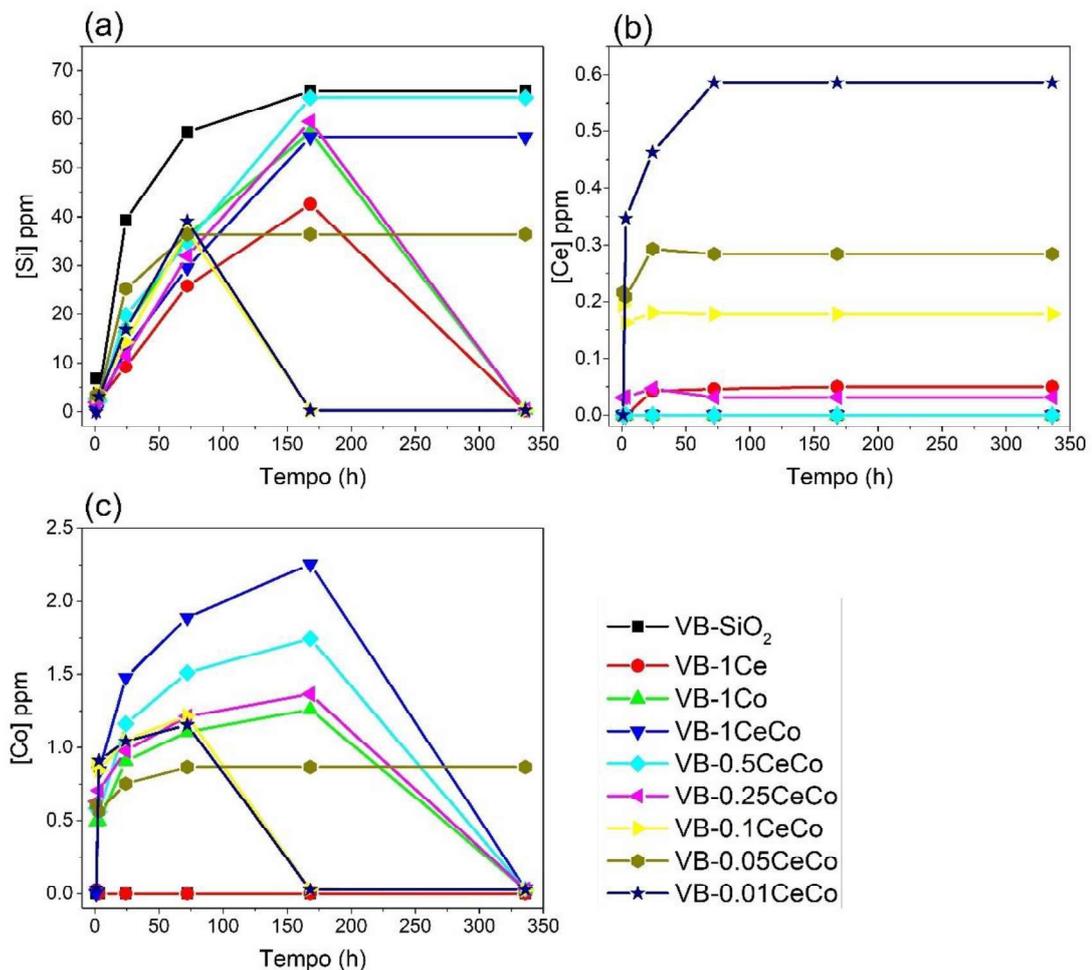
Portanto, o ensaio de atividade mimética da enzima catalase mostrou que todas as composições de VB reduziram a barreira de energia para a decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo capazes de mimetizar a atividade desta enzima com sucesso.

#### 4.5.6 Análise da liberação de íons em Solução de Exsudato de Feridas (SEF)

O ensaio de liberação iônica é amplamente utilizado para avaliar a capacidade de dissolução de uma dada composição de VB em diferentes meios, por exemplo *Simulated Body Fluid*, *Modified Eagle Medium* [177] e *Phosphate Buffered Saline* [185], além de avaliar – quando necessário - a formação de hidroxiapatita carbonatada na superfície do material. A maioria desses meios, entretanto, não simula a composição química da secreção extra corpórea de exudato de feridas (SEF). A SEF pode ser facilmente produzida a partir da dissolução de

cloretos de sódio e cálcio em água e é usualmente utilizada para simulação da absorção de exsudato por curativos [116]. Portanto, aqui, pela primeira vez reportado na literatura, até onde se tem conhecimento, o ensaio de liberação de íons do VB foi feito em uma solução simulada de exsudato de feridas, uma vez que não é do interesse do estudo da cicatrização feridas a capacidade do VB em formar hidroxiapatita.

A Figura 4.19-a mostra o perfil de liberação de Si para as amostras de VB sintetizadas neste estudo. O valor máximo de liberação de Si ocorre para a amostra VB-SiO<sub>2</sub> no tempo de 168 h com 66 ppm, seguido de liberação constante dos íons. Esse perfil pode ser observado também para as amostras VB-1CeCo, VB-0.5CeCo e VB-0.05CeCo, o que estaria indicando que a partir de determinado tempo em contato com a SEF, a liberação de Si atingiria um patamar e ficaria constante. Já pra as amostras VB-1Ce, VB-1Co, VB-0.25, VB-0.1 e VB-0.01, ao contrário das demais amostras, após o pico de liberação houve queda abrupta da liberação de Si chegando próximo a 0 (aproximadamente 0,3 ppm) indicando que as amostras liberariam maior quantidade de Si nas primeiras horas do ensaio. A literatura afirma que a liberação de Si em biomateriais na faixa de 0,1 ppm a 100 ppm pode favorecer a citocompatibilidade, pois, nesta faixa, o Si pode causar estímulos que levam à proliferação celular, consequentemente auxiliando na regeneração tecidual [186]. Para a regeneração dérmica, especialmente, o silício tem papel estrutural importante, pois auxilia nas síntese de colágeno e ativa enzimas, melhorando a resistência e a elasticidade da pele [187].



**Figura 4. 18:** Perfil de liberação de íons (a) Si, (b) Ce, (c) Co para amostras após imersão em SEF. (Fonte: Própria autora)

Os perfis de liberação de Ce para as amostras de VB produzidas neste estudo são apresentados na Figura 4.19-b. A amostra com maior liberação de íons Ce foi a VB-0.01CeCo, alcançando 0,59 ppm após 72 h, e mantendo-se constante após esse período de tempo. As demais amostras apresentaram pico de liberação de Ce em 24 h de ensaio: VB-1Ce (0,04 ppm), VB-0.1CeCo (0,18 ppm), VB-0.25CeCo (0,05 ppm). As amostras VB-1CeCo e VB-0.5CeCo não apresentaram liberação significativa de Ce que pudesse ser detectada pela técnica utilizada. Tal qual esperado, não houve identificação de íons Ce nas amostras VB-SiO<sub>2</sub> e VB-1Co. Estudo realizado por Salinas e colaboradores (2011) mostra que a liberação do cério para o meio é dependente da solução simulada utilizada no teste de liberação, uma vez que ao utilizar de SBF o cério liberado reage com o fósforo, formando um precipitado, e assim diminuindo a sua disponibilidade em solução (máximo 0,04 ppm) [188]. Isso mostra que, para fins de

regeneração dérmica, o uso de SEF é uma opção mais interessante para analisar o comportamento de liberação do Ce para o meio.

A Figura 4.19-c mostra os perfis referentes à liberação de Co. É possível observar que a maior liberação de Co ocorreu no tempo de 168 h (7 dias) para as amostras VB-1CeCo (2,25 ppm), VB-0.5CeCo (1,75 ppm), VB-0.25CeCo (1,36 ppm) e VB-1Co (1,26 ppm), enquanto que para as amostras VB-0.1CeCo, VB-0.05CeCo e VB-0.01CeCo a liberação máxima de cobalto foi após 24 h de contato com a solução de SEF. Tal qual era esperado, não houve identificação de íons Co nas amostras VB-1SiO<sub>2</sub> e VB-1Ce. Estudos mostram que a toxicidade do cobalto por estresse oxidativo está intimamente relacionada com a faixa de concentração do íon no meio (10 ppm a 14 ppm) e com o tempo (acima de 1 semana) em que esse íon está em contato com as células [189–192]. De acordo com Azevedo e colaboradores (2010), a faixa de concentração fisiologicamente ativa do Co no meio é de 3 ppm a 15 ppm [159]. Portanto, amostras de VB contendo cobalto podem ser empregadas em concentrações acima de 1,5 g/L em meio simulado de exsudato de feridas para maior liberação de Co, seja o VB utilizado isoladamente ou empregado para obtenção de um compósito de matriz polimérica no tratamento de feridas crônicas.

Os resultados para o ensaio de liberação de íons em SEF mostraram que as amostras com maiores concentrações concomitantes de Ce e Co (VB-1CeCo e VB-0.5CeCo) tendem a ter menor liberação (detectável) de Ce, enquanto a liberação de Co é maior. Por se tratarem de amostras com precipitados cristalinos insolúveis em meio aquoso (tal qual identificados via UV-visível e DRX), é possível que a maior parte do Ce adicionado esteja precipitado nas amostras, portanto, os óxidos ficaram retidos no filtro (malha 0,22 µm) após a filtragem das soluções utilizadas no ensaio.

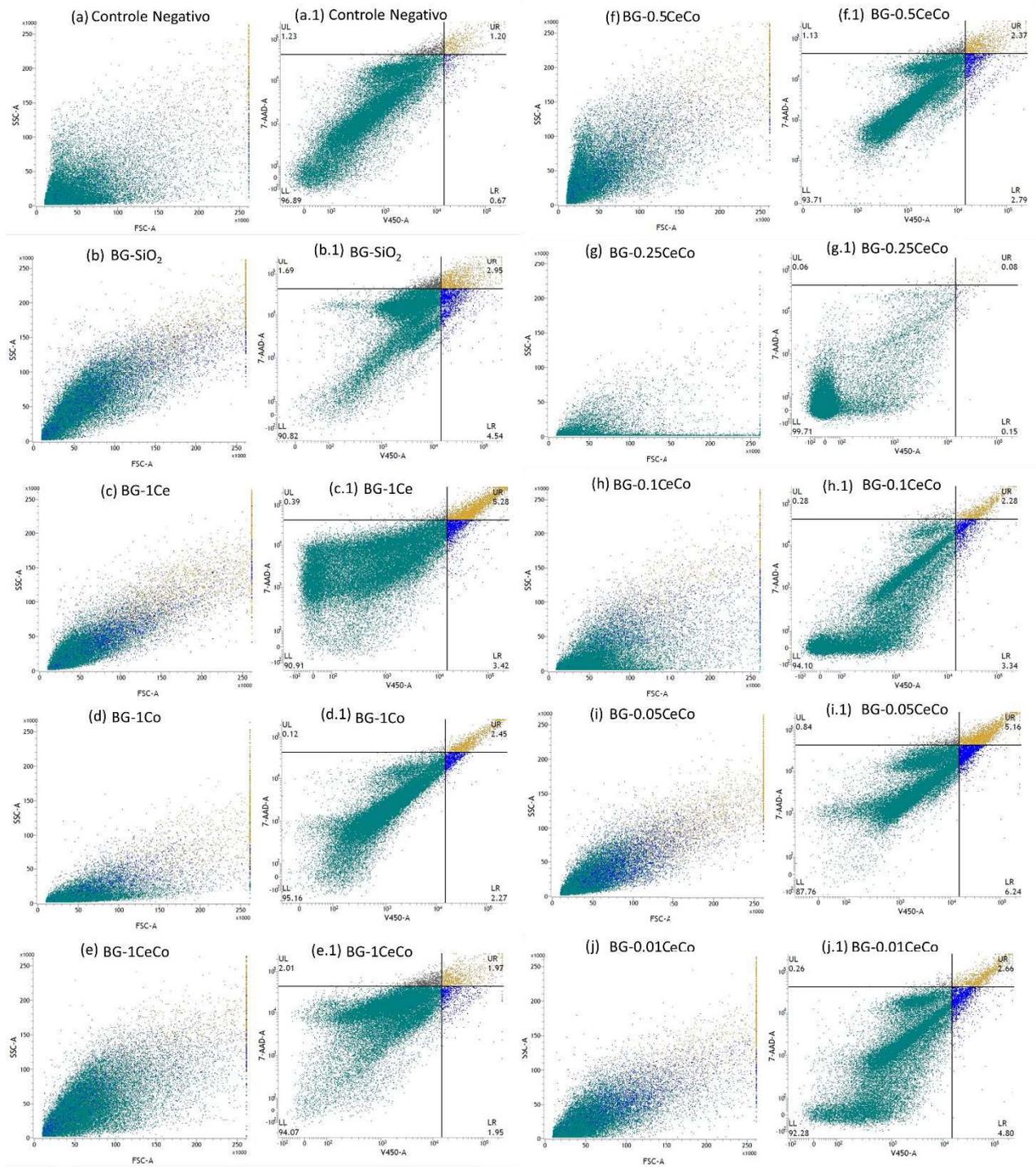
Estudos em modelos animais mostraram que, ao utilizar óxido de cério (céria) para tratamento de feridas, a deposição de colágeno e a taxa de fechamento da ferida foram maiores, pois a céria auxilia na elevada produção de colágeno e hidroxiprolina que são marcadores para cicatrização eficaz de feridas [150,151]. Desta forma, a céria terá papel fundamental na associação com o VB para evitar a má formação de cicatrizes em feridas crônicas.

#### **4.5.7 Estudo biológico in vitro**

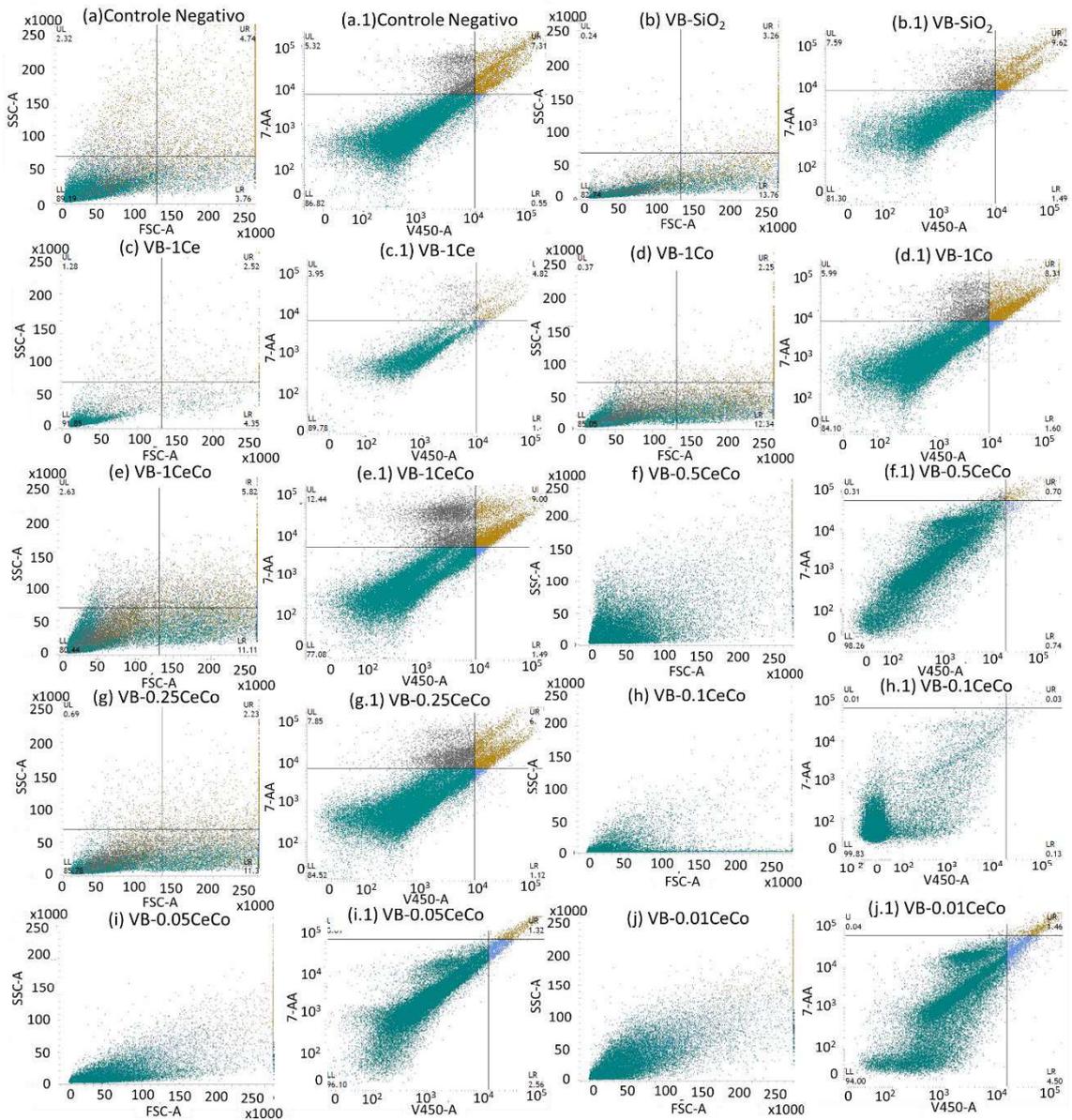
### **Análise da viabilidade celular**

A técnica de citometria de fluxo foi empregada neste trabalho a fim de analisar a viabilidade celular e citotoxicidade dos vidros bioativos a partir da integridade da membrana celular de células embrionárias de rim humano (HEK293), carcinoma mamário murino (4T1) e adenocarcinoma mamário (MDA-MB-231). Além disto, esta análise também visou obter informações importantes sobre o mecanismo das células mortas.

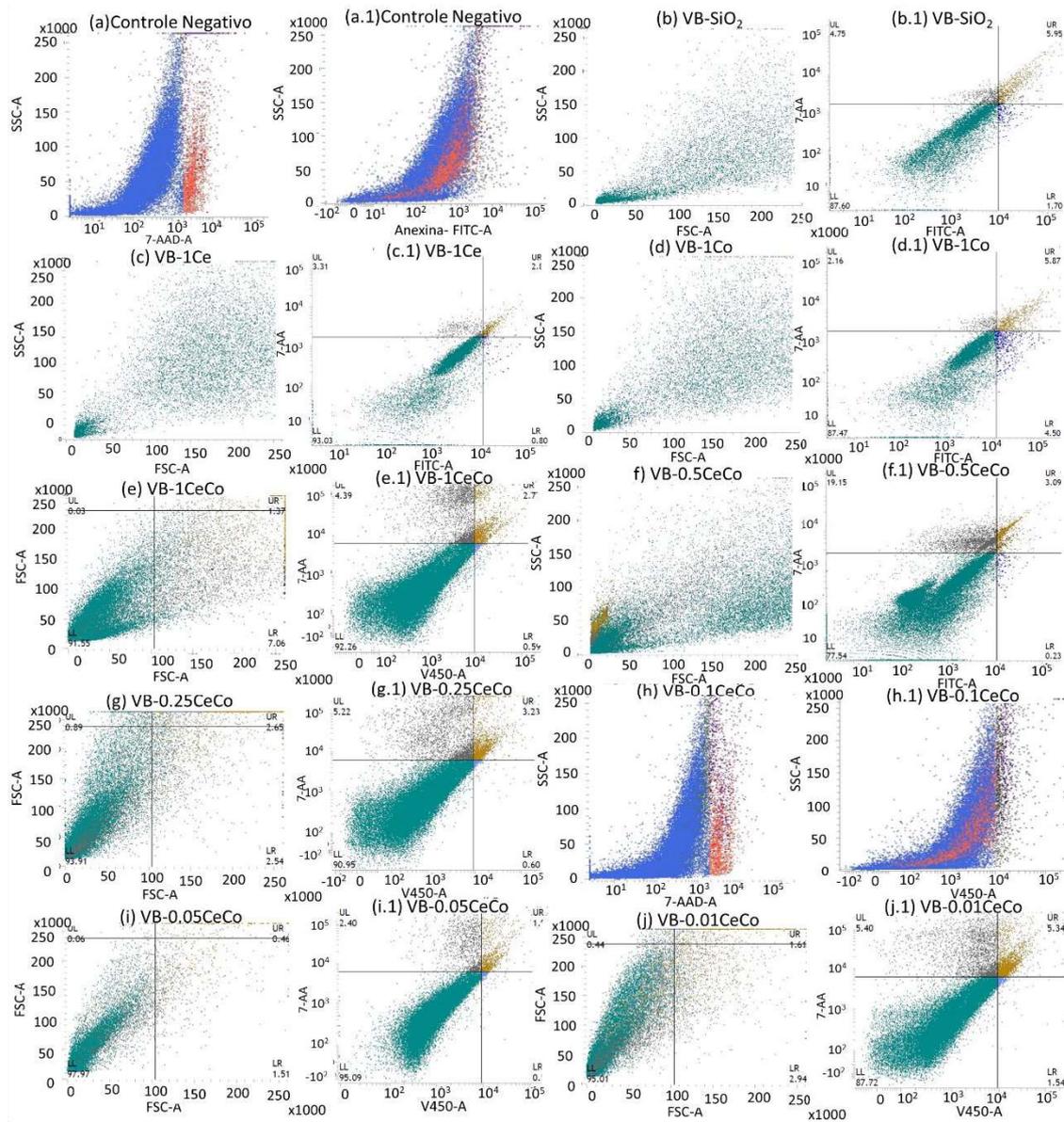
O espalhamento do feixe de laser ao longo de seu caminho (FSC) como função do seu espalhamento lateral (SSC) medido em um ângulo de noventa graus são apresentados nas Figuras 4.20-a a 4.20-j, 4.21-a a 4.21-j e 4.22-a a 4.22-j. Assim, FSC é proporcional ao diâmetro da célula e é principalmente devido à difração de luz na superfície da célula. Estes gráficos revelam um perfil de baixa citotoxicidade dos VBs, onde se observam populações significativas de células vivas (pontos verdes). Por outro lado, o SSC está associado à luz refratada ou refletida na interface entre o laser e as estruturas intracelulares, fornecendo informações sobre a granularidade das células examinadas [193].



**Figura 4.19:** Avaliação in vitro da biocompatibilidade em células HEK-293 por citometria de fluxo. Gráfico de SSC em função de FSC (a) Controle negativo; (b) VB-SiO<sub>2</sub>; (c) VB-1Ce; (d); VB-1CO; (e) VB-1CeCo; (f) VB-0.5CeCo; (g) VB-0.25CeCo; (h) VB-0.1CeCo; (i) VB-0.05CeCo; (j) VB-0.01CeCo. Análise de viabilidade celular (a.1) Controle negativo; (b.1) VB-SiO<sub>2</sub>; (c.1) VB-1Ce; (d.1); VB-1CO; (e.1) VB-1CeCo; (f.1) VB-0.5CeCo; (g.1) VB-0.25CeCo; (h.1) VB-0.1CeCo; (i.1) VB-0.05CeCo; (j.1) VB-0.01CeCo. (Fonte: Própria autora)



**Figura 4. 20:** Avaliação in vitro da biocompatibilidade em células 4T1 por citometria de fluxo. Gráfico de SSC em função de FSC (a) Controle negativo; (b) VB-SiO<sub>2</sub>; (c) VB-1Ce; (d); VB-1Co; (e) VB-1CeCo; (f) VB-0.5CeCo; (g) VB-0.25CeCo; (h) VB-0.1CeCo; (i) VB-0.05CeCo; (j) VB-0.01CeCo. Análise de viabilidade celular (a.1) Controle negativo; (b.1) VB-SiO<sub>2</sub>; (c.1) VB-1Ce; (d.1); VB-1Co; (e.1) VB-1CeCo; (f.1) VB-0.5CeCo; (g.1) VB-0.25CeCo; (h.1) VB-0.1CeCo; (i.1) VB-0.05CeCo; (j.1) VB-0.01CeCo. (Fonte: Própria autora)



**Figura 4.21:** Avaliação in vitro da biocompatibilidade em células MDA-MB-231 por citometria de fluxo. Gráfico de SSC em função de FSC (a) Controle negativo; (b) VB-SiO<sub>2</sub>; (c) VB-1Ce; (d) VB-1CO; (e) VB-1CeCo; (f) VB-0.5CeCo; (g) VB-0.25CeCo; (h) VB-0.1CeCo; (i) VB-0.05CeCo; (j) VB-0.01CeCo. Análise de viabilidade celular (a.1) Controle negativo; (b.1) VB-SiO<sub>2</sub>; (c.1) VB-1Ce; (d.1) VB-1CO; (e.1) VB-1CeCo; (f.1) VB-0.5CeCo; (g.1) VB-0.25CeCo; (h.1) VB-0.1CeCo; (i.1) VB-0.05CeCo; (j.1) VB-0.01CeCo. (Fonte: Própria autora)

As taxas de necrose e apoptose das amostras foram determinadas com kit de detecção de apoptose PE Anexina V e 7-amino-actinomicina-D (7AAD) I (BD Bioscience, NJ, EUA), sendo apoptose precoce (LR), apoptose tardia (UR) e morte por necrose (UL). A Tabela 4.10 resume os dados de viabilidade celular (LL) para cada uma das linhagens celulares empregadas neste estudo. Os dados revelam que todas as amostras apresentaram uma população de células viáveis acima de 70 %, indicando que os VBs sintetizados são biocompatíveis. Não foram encontradas

relações no aumento ou diminuição de viabilidade celular diretamente relacionadas à incorporação de íons terapêuticos nas amostras de VBs.

Ensaio adicionais devem ser realizados para a completa compreensão do comportamento biológico das amostras de VBs sintetizadas, bem como estudos que envolvam outros tipos celulares e modelos *in vivo*. Os resultados preliminares mostram que os VB são citocompatíveis para células HEK293, 4T1 e MDA-MB-231 reforçando seu uso promissor como biomaterial.

**Tabela 4. 6:** Porcentagem de células viáveis (LL).

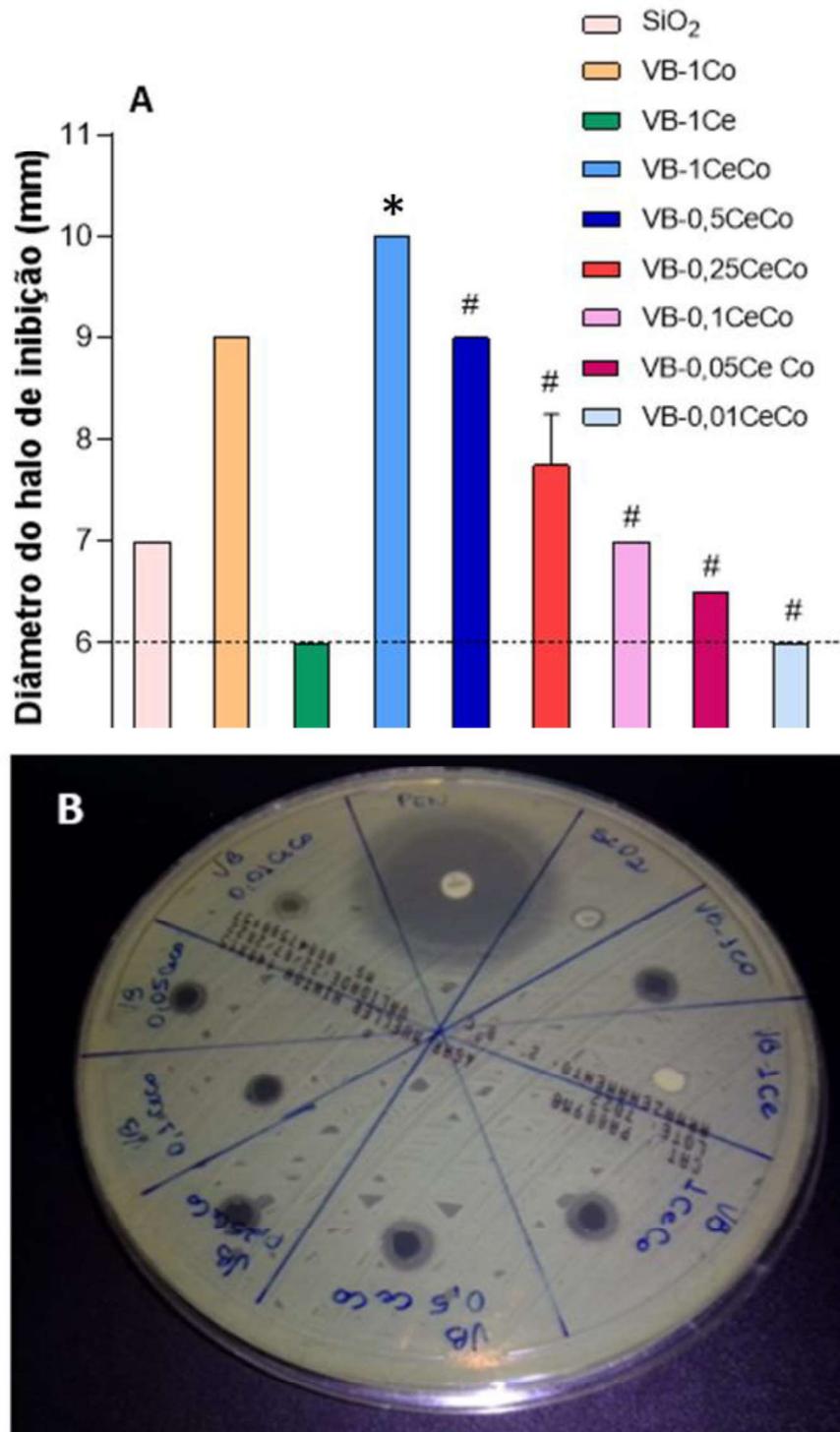
Amostra	% Viabilidade Celular (LL)		
	HEK-293	4T1	MDA-MDB231
Controle Negativo	98 ± 9	91 ± 10	95 ± 5
VB- SiO <sub>2</sub>	91 ± 5	87 ± 7	91 ± 6
VB- 1Ce	90 ± 6	91 ± 8	94 ± 8
VB-1Co	96 ± 8	85 ± 7	90 ± 9
VB- 1CeCo	95 ± 9	79 ± 10	92 ± 8
VB- 0.5CeCo	94 ± 5	98 ± 0.1	80 ± 6
VB-0.25CeCo	98 ± 7	85 ± 0.1	91 ± 6
VB- 0.1CeCo	95 ± 8	99 ± 0.1	93 ± 4
VB-0.05CeCo	89 ± 0.1	96 ± 0.1	94 ± 8
VB- 0.01CeCo	92 ± 0.1	94 ± 0.1	87 ± 7

#### **Análise da capacidade antimicrobiana das composições dos Vidros Bioativos**

A propriedade antibacteriana das partículas obtidas foi investigada empregando o Método de Kirby Bauer, e os resultados estão apresentados na Figura 4.23. As bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* foram utilizadas neste trabalho por serem bactérias multirresistentes à antibióticos e causadoras de infecções em feridas cutâneas [194,195]. A Figura 4.23-a mostra o gráfico do diâmetro absoluto do halo de inibição de crescimento de bactérias, enquanto a Figura 4.23-b traz as amostras de VB com diâmetro de 6 mm imersas na placa de ágar após a realização do teste. É possível observar que o halo de inibição para as amostras de VB é crescente da seguinte maneira:

VB-1Ce = VB-0.01CeCo < VB-0.05CeCo < VB-0.1CeCo = SiO<sub>2</sub> < VB-0.25CeCo < VB-0.5CeCo = VB-1Co < VB-1CeCo.

VB-1CeCo apresentou maior halo de inibição de bactérias enquanto que as amostras VB-1Ce e VB-0.01CeCo apresentaram menor halo de inibição. Portanto, para os sistemas ternários, é possível inferir que quanto maior a concentração de íons Ce e Co incorporados ao VB, maior a sua capacidade antimicrobiana. Para os sistemas binários, os resultados mostram que a composição VB-1Co possui maior diâmetro de halo de inibição do que a composição VB-1Ce. Portanto, a ação antibacteriana vista nos sistemas ternários (VB-xCeCo) deve estar ligada à presença do Co, ao invés de estar ligada à presença do Ce – como era esperado. Ao observar a análise de liberação de íons (Tópico 4.5.6) no tempo de 24h, pode-se constatar que as amostras contendo menores concentrações de Ce e Co foram as que detiveram maiores liberações de Ce. Portanto, apesar de haver íons Ce sendo liberados para o meio durante o ensaio antimicrobiano, possivelmente eles não estariam atuando como agentes antimicrobianos. Isso pode estar relacionado as concentrações de Ce liberadas para o meio, que deveriam ser mais altas para terem efeito antibacteriano significativo [81,196]. Estudo realizado por Deliormanlı e colaboradores (2016) também não observou halo de inibição para amostras contendo cério utilizando bactérias *S. aureus* e *E. coli*, sugerindo que outras bactérias devem ser investigadas e testes complementares deveriam ser feitos para o melhor entendimento do que ocorreu [118,191].



**Figura 4. 22:** No painel A pode-se observar a média do diâmetro dos halos de inibição (mm) de VB-SiO<sub>2</sub>, VB-1Co, VB-1Ce e VB-CeCo (1 a 0,001) no teste disco-difusão em ágar para *Staphylococcus aureus*. Os valores são expressos pela em média  $\pm$  erro padrão da média com  $n=4$ . \* $P<0,001$  quando comparado com o grupo VB-1Co. # $P<0,001$  quando comparado com o grupo VB-1CeCo. No painel B observa-se os halos de inibição na placa de petri em ágar Mueller Hinton frente a *Staphylococcus aureus*. (Fonte: Própria autora)

Raja e colaboradores (2022) mostraram o efeito sinérgico antibacteriano entre diferentes composições de VB contendo íons Co, Cu e Zn. Neste trabalho, os autores mostraram que o efeito antimicrobiano dos VB aumenta quando há combinação entre dois dos íons citados,

comparativamente, ao uso do VB contendo apenas um dos íons [197]. Em outro trabalho, Raja e colaboradores (2019) observaram que quanto maior a concentração de cobalto em % mol no VB produzido por metodologia de fusão, menor o tempo gasto para o efeito antibacteriano [191]. Porém, os autores não deixam claro como ocorre o mecanismo bactericida dado pelo cobalto liberado pelo VB.

A relação entre atividade antibacteriana de bactérias gram-positivas e o Co está relacionada à presença ou do cobalto metálico, ou do óxido de cobalto (III) [194]. Na literatura, há discordâncias entre autores quanto ao mecanismo antibacteriano do óxido de cobalto (III) ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ ) [198]. Para Arsalan e colegas (2020), o mecanismo pode estar ligado tanto à produção de espécies reativas de oxigênio induzida pela liberação dos íons, ou a danos associados à membrana celular da bactéria [199]; enquanto que para Gupta e colaboradores (2022), é certo de que o mecanismo é a ruptura da membrana bacteriana [195]. O óxido de cobalto (II) estaria ligado à ação antibacteriana para bactérias gram-negativas [200,201], por isso testes complementares com outras bactérias devem ser realizados para afirmar a ação do CoO como agente antibacteriano nas amostras de VB aqui sintetizadas.

Assim, com o teste do disco-difusão em ágar foi possível observar que há um efeito sinérgico na presença de Ce e Co no VB quando se trata de efeito antibacteriano, pois a presença do Ce na amostra VB-1CeCo aumentou este efeito, quando comparado apenas a amostra VB-1Co. Além disso, o efeito antibacteriano das amostras de VB se mostrou intrinsecamente ligado à presença de Co. Portanto, o uso de VB contendo Ce e Co, especialmente as amostras VB-0.5CeCo e VB-1CeCo, é promissor para o tratamento de feridas crônicas, podendo diminuir o uso de antibióticos de uso sistêmico e seus efeitos colaterais nos pacientes.

#### **4.6 Conclusão da sessão**

Neste estudo partículas de vidro bioativo contendo íons terapêuticos cério e cobalto foram sintetizadas com sucesso através de rota sol-gel e impregnação de íons pós-síntese. O MET mostrou que as partículas são esféricas e possuem poros ordenados. A análise estrutural das partículas via UV-visível, FTIR, DRX e XPS confirmaram que o cério e cobalto foram incorporados à sílica modificando e/ou formando a rede do vidro bioativo, respectivamente. O teste de BET mostrou que as amostras são mesoporosas e possuem alta área superficial. Porém, o tamanho médio de poro das partículas tende a diminuir com o aumento da concentração de

íons presentes no material. Pela primeira vez foi estudada a liberação de íons do vidro bioativo na solução de exsudato simulado de feridas. O ICP-OES indicou que há liberação de íons Ce e Co para o meio estudado, portanto, é possível a utilização dos VBs como biomateriais com liberação controlada de íons terapêuticos para o meio. O teste de atividade mimética da enzima catalase mostrou que as composições de VBs contendo Ce e Co são altamente eficientes no combate a ROS produzida por peróxido de hidrogênio. As amostras dopadas com Ce e Co mostraram eficiência na atividade bactericida contra a bactéria *S. aureus*, principalmente ao aumentar a concentração de íons terapêuticos na composição do VB. O ensaio de citotoxicidade em células HEK293, 4T1, MDA-MB-23 indicou que todas as amostras são biocompatíveis e possuem potencial no uso de biomateriais no tratamento de lesões cutâneas crônicas.

O desenvolvimento de sistemas poliméricos inteligentes desempenha um papel importante na aplicação eficaz de vidro bioativo no tratamento de lesões cutâneas. Esses sistemas oferecem uma plataforma segura e controlada para carrear o VB, uma vez que a sua aplicação direta à pele pode ser desafiadora. A integração estratégica de PVA/PAA como um sistema que desempenha papel responsivo ao pH possibilita uma liberação controlada do vidro bioativo, otimizando assim sua eficácia terapêutica e contribuindo para avanços na regeneração da pele.

## 5. ESTUDO DE CURATIVOS DE DUPLA CAMADA INTELIGENTE A BASE DE PVA/PAA E VIDRO BIOATIVO

Este capítulo teve como objetivo a elaboração de curativos de dupla camada polimérica de PVA/PAA carregados com as nanopartículas de vidro bioativo contendo 1 molar de íons cério (Ce) e cobalto (Co) (VB-1CeCo) incorporados em sua estrutura. A escolha do VB-1CeCo para a camada de PVA foi baseada em suas propriedades de liberação de íons terapêuticos, mimetização da enzima catalase, viabilidade celular e atividade antimicrobiana. O estudo ao qual este capítulo se baseou, intitulado *Cost-Effective Double-Layer Hydrogel Composites for Wound Dressing Applications* [6], indica ser a camada de PVA ideal para a carreamento de fármacos e bioativos. As análises das propriedades térmicas e estruturais revelaram interações por ligação de hidrogênio entre os polímeros na interface da dupla camada, enquanto o VB estaria interagindo química e mecanicamente com o PVA. Os curativos demonstraram sensibilidade à mudança de pH, absorvendo maiores quantidades de solução simulada de exsudato de ferida (SEF) em pH básico (ferida infectada), o que auxiliaria a liberação dos íons terapêuticos. Os testes biológicos *in vitro* mostraram altas viabilidade celular e atividade antibacteriana para amostra contendo 10 % m/m de VB. Este estudo contribui para o desenvolvimento de biomateriais, uma vez que os nanomateriais demonstraram resultados para aplicações clínicas futuras, fornecendo um ambiente favorável à cicatrização e controle de infecções em feridas cutâneas.

**Publicado** em *Materials Today Communications* 38 (2024) 107981

**DOI:** <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.107981>

## 5.1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, lesões cutâneas crônicas representam um grande desafio para pacientes e profissionais de saúde, uma vez que são feridas cujo processo de cicatrização é prejudicado por diversos fatores como idade avançada, doenças crônicas, doenças metabólicas, hipóxia do tecido e diminuição da vascularização [202,203]. O tratamento adequado dessas lesões requer uma abordagem cuidadosa e sistemática, o que inclui o uso de curativos eficazes que protejam o leito da ferida, promovam ambiente adequado e previnam de complicações, como infecções [3,4]. As feridas crônicas dominaram o mercado de curativos em 2022, levando a uma participação de 59,8 % neste mercado, o que endossa a importância do desenvolvimento de curativos eficientes e eficazes [202,204]. Portanto, lesões crônicas tornam-se um grave problema de saúde pública, dado que elas são responsáveis por custos significativos de saúde e pelo impacto na qualidade de vida dos pacientes que sofrem com dores e debilitações [203,205].

A engenharia de tecidos busca desenvolver biomateriais que atendam aos requisitos de utilização dos curativos, auxiliando na restauração e na progressão da cicatrização. Dentre as alternativas, os hidrogéis são uma opção promissora, pois eles são capazes de absorver exsudato, manter o ambiente úmido, permitir a troca gasosa entre os meios interno e externo, e podem ser facilmente removidos [4,206]. Além disso, hidrogéis podem apresentar comportamentos adicionais, como serem responsivos à temperatura, ações mecânicas ou ao pH do meio em que estão inseridos [3].

Uma das possibilidades de produção destes biomateriais é a partir da combinação de PVA (poli(álcool vinílico)) e PAA (poli(ácido acrílico)) [6]. O PVA é um polímero sintético altamente empregado para pesquisas de curativos, pois suas propriedades físico-químicas são favoráveis a este uso [207], dentre as quais encontram-se a capacidade de transmissão de gases entre o curativo e a ferida; a elasticidade que proporciona conforto e adaptabilidade do curativo ao corpo; e a biocompatibilidade do material [207,208]. Porém, o PVA é um material que não apresenta alta capacidade de absorção de fluidos e/ou comportamento responsivo ao meio.

O PAA é um polímero sintético obtido através da polimerização do ácido acrílico [6], altamente hidrofílico e que pode absorver e reter grandes quantidades de água. Essa característica é benéfica em curativos, pois ajuda a manter a umidade na ferida, auxiliando na manutenção da limpeza da área e minimizando a maceração da pele ao redor, auxiliando na remoção de tecido

necrótico e criando um ambiente propício para a cicatrização [209]. Além disso, o PAA detém comportamento responsivo ao pH, onde em meio básico sua capacidade de intumescimento é maior que em meio ácido, o que pode auxiliar no controle da liberação de fármacos e partículas inorgânicas - como o vidro bioativo (VB) [6,31,210]. Entretanto, o PAA é um material que apresenta baixa resistência mecânica.

Materiais bioativos, como os VB, podem ser utilizados no tratamento de lesões cutâneas devido à sua capacidade de estimular respostas biológicas específicas em tecidos moles, como o estímulo à formação de colágeno [7,211]. Outras respostas biológicas relevantes, como atividades antimicrobiana, angiogênica e/ou antioxidante, podem ser obtidas através da incorporação de íons com ação terapêutica à rede do VB, que serão liberados no meio através da dissolução do material [8,212]. Dentre os íons estudados em tecidos moles para o tratamento de lesões cutâneas, destacam-se o cério e o cobalto (VB-CeCo) que apresentam as ações terapêuticas supracitadas [78,109,124,182,186,213]. Paralelamente ao desenvolvimento de composições de VB, e a fim de auxiliar no controle da liberação de íons terapêuticos para o meio, bem como facilitar sua aplicação evitando demasiados traumas, os VB são incorporados à polímeros para aplicações como curativo [96,214].

Nesse contexto, o presente estudo visou produzir curativos compostos por filmes híbridos de PVA-PAA com dupla camada a fim de potencializar as vantagens de ambos os materiais e minimizar as suas desvantagens [6], bem como incorporar VB-CeCo em diferentes concentrações, para avaliar a capacidade de liberação de íons cério e cobalto. As propriedades físico-químicas dos compósitos desenvolvidos, a capacidade de liberação de íons, a bioatividade e a capacidade antimicrobiana dos materiais foram avaliadas.

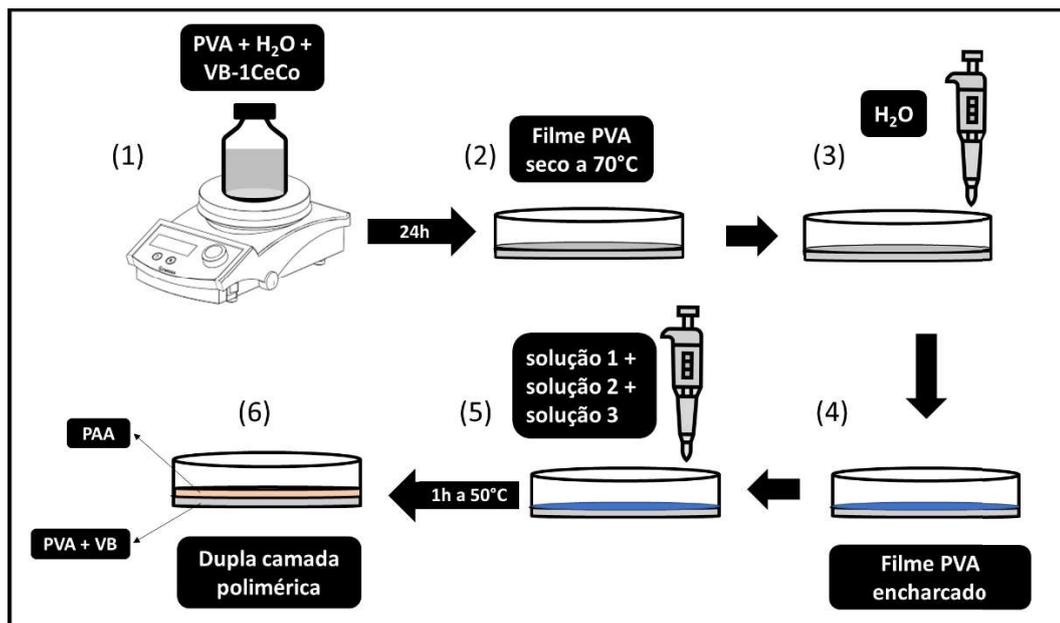
## 5.2 Materiais

Para a preparação dos filmes poliméricos de dupla camada foram utilizados os seguintes reagentes: Água Milli-Q com resistividade mínima de (18,0 MΩ.cm) a 25 °C, Poli(álcool vinílico) (PVA, Mw =145,000; Grau de hidrólise 99.9 %, Sigma-Aldrich); reticulante Dimetacrilato de Etilenoglicol (EGDMA, C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich) e Persulfato de amônio (PA, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, Sigma-Aldrich); Bissulfito de sódio (BS, NaHSO<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich).

## 5.3 Preparo dos nanocompósitos

### 5.3.1 Síntese do hidrogel bicamada de PVA/PAA

Os filmes de PVA/PAA foram preparados pela metodologia desenvolvida por Tavakoli e colaboradores (2018) e o procedimento está esquematizado e enumerado na Figura 5.1 [6]. Uma solução contendo 5 % p/p de PVA e água destilada foi preparada a 90 °C sob agitação constante (1000 rpm) durante 12 h em um recipiente fechado (1). Em seguida, a solução de PVA foi vertida em uma placa de Petri e seca em estufa à 70 °C por 24 h (2). Então, uma quantidade de água deionizada referente a 10 % em peso do PVA foi vertida uniformemente sobre o filme seco de PVA, que foi mantido vedado por 30 min (3). Após os 30 min, a água destilada foi absorvida pela camada superficial do filme de PVA e uma camada intumescida distinta e fina foi observada (4). Para a formação de uma segunda camada polimérica contendo poli(ácido acrílico), quatro outras soluções foram preparadas. A primeira solução (solução 1) foi feita a partir de 0,1 mol de monômero de ácido acrílico (AA), 3,5 mL de água destilada e 4,8 µmL de dimetacrilato de etileno glicol (EGDMA) que agiu como reticulante na reação. A segunda solução (solução 2) continha 0,07 g de persulfato de amônio (PA) e 0,5 mL de água destilada. E na terceira solução (solução 3) foi diluído 0,026 g de bissulfito de sódio em 0,5 mL de água destilada. Em seguida, as quatro soluções foram misturadas e a solução final foi vertida uniformemente sobre a camada de PVA intumescido (5). As reações de reticulação e polimerização da mistura de AA ocorreram a 50 °C em estufa por 1 h. Então, as amostras de filme com dupla camada contendo interface entre o PVA e o PAA foram obtidas (6).



**Figura 5. 1:** Desenho esquemático das etapas de preparação do hidrogel bicamada de PVA/PAA. (Fonte: Própria autora)

### 5.3.2 Preparo dos nanocompósitos

Quantidades pré-definidas de VB contendo íons cério e cobalto foram pesadas e adicionadas a solução aquosa de PVA- preparada conforme procedimento descrito no item 5.3.1. A amostra VB-1CeCo ( $72,6 \pm 0,2$  SiO<sub>2</sub> -  $13,8 \pm 0,2$  CeO<sub>2</sub> -  $13,6 \pm 0,05$  CeO % molar) foi empregada para a produção dos nanocompósitos e escolhida devido às suas capacidades antioxidante e antimicrobiana comprovada pelo Método de Kirby Bauer e pela biocompatibilidade *in vitro* apresentada pelo material e demonstrada no Capítulo 4. Os filmes foram preparados com PVA combinado com VB-1CeCo na proporção m/m % apresentada na Tabela V.1, essas proporções se mostraram eficazes na dispersão do VB-1CeCo no PVA sem alterar a capacidade de formação do filme. O procedimento consistiu na homogeneização da solução de PVA com a dispersão do VB sob agitação magnética por 4 h. Então, o material foi vertido em placa de Petri e os passos subsequentes de secagem do filme, intumescimento e formação da camada de PAA ocorreram como descrito no item 5.3.1. Foram obtidas quatro amostras de nanocompósitos, variando entre 0 % e 10 % m/m de VB.

**Tabela 5. 1:** Composição (m/m %) dos filmes de PVA

Amostra	Composição compósito (m/m%)	
	Polímero	Vidro bioativo (VB-1CeCo)
PVA-Sigma	100	-
PAA-sintetizado	100	-
Pol-0VB	100	0
Pol-2.5VB	97,5	2,5
Pol-5VB	95	5
Pol-10VB	90	10

#### 5.4 Caracterização dos nanocompósitos

Para todas as composições de nanocompósitos desenvolvidas neste trabalho foram aplicadas as técnicas de caracterização a seguir. Além disso, amostras do PVA do laboratório Sigma Aldrich (PVA-Sigma) e amostras de PAA sintetizadas (PAA-sintetizado) foram utilizadas como padrão de comparação para as caracterizações térmicas e estruturais dos nanocompósitos a fim de comprovar a presença do PAA nas amostras.

##### 5.4.1 Análise da morfologia

A morfologia superficial dos materiais foi observada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) FEI-INSPECT S50, operando a tensão de 15 kV. O MEV é equipado com Espectrômetro por Dispersão de Energia (EDS) da EDAX Genesis, utilizado para avaliar qualitativamente a composição química elementar da superfície das amostras. As amostras foram previamente preparadas para a análise a partir da secagem em estufa a 50 °C por 12 h, seguida da pulverização de ouro em fita adesiva e condutiva de carbono.

##### 5.4.2 Análise térmica

##### Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As propriedades térmicas de decomposição e estabilidade térmica dos nanocompósitos foram avaliadas através do uso do equipamento SEIKO EXSTAR 7020. O equipamento foi calibrado utilizando recipiente vazio de platina como referência. Após a calibração, foram pesadas 15 mg de cada amostra em recipiente de platina sem tampas. Os hidrogéis foram aquecidos partindo de 30 °C até a temperatura de 250 °C a taxa de 10 °C/min. A célula DSC ficou sob atmosfera de fluxo de nitrogênio a taxa de 100 mL/min para manter a atmosfera inerte.

### **Termogravimetria (TGA)**

A variação de massa dos nanocompósitos foi avaliada por Termogravimetria (TGA). A análise termogravimétrica foi realizada usando equipamento SEIKO, modelo EXSTAR 7200. As amostras com cerca de 15 mg foram pesadas num cadinho de platina e os experimentos foram conduzidos de 30 °C a 500 °C com taxa de aquecimento de 10 °C/min e fluxo de gás nitrogênio de 100 mL/min.

### **5.4.3 Análise das características estruturais**

#### **Espectroscopia do Infravermelho**

A caracterização química qualitativa, a partir dos grupos funcionais presentes nas amostras, foi realizada por Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Foi empregado o equipamento Bruker Alpha usando um acessório de refletância total atenuada (ATR) e um cristal de diamante como elemento reflexivo. Os espectros ATR-FTIR foram obtidos com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e 128 varreduras.

#### **Difração de raios X**

A análise de Difração de Raios X (DRX) foi empregada a fim de verificar as características de fases e organização estrutural das amostras de nanocompósitos produzidas. Os espectros foram coletados no equipamento Philips PW1700 utilizando radiação Cu-K $\alpha$  ( $\lambda=1,5418$  Å) a 40 kV/40mA. Os dados coletados estão em 2 $\theta$  entre 4,05° e 89,95° com passo de 0,06° e tempo de permanência de 1,5 s.

#### 5.4.4 Análise das propriedades mecânicas

Os ensaios de tração foram realizados em máquina universal de ensaios EMIC DL3000, utilizando-se uma célula de carga 500 N. As propriedades de tração dos materiais foram obtidas conforme descrito na norma ASTM D882-02: *Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*. Foi aplicada uma velocidade de deformação constante de 10mm/min, à temperatura ambiente. Através dos dados de tensão e deformação obtidos durante o ensaio, a curva tensão x deformação foi plotada e foram calculados os valores da resistência máxima à tração e do módulo de elasticidade em tração através das formulas indicadas pela norma.

#### 5.4.5 Características do curativo

##### Análise da capacidade hidrofílica dos nanocompósitos

A hidrofílicidade dos nanocompósitos foi analisada por ângulo de contato com a água. Para isso, uma gota de 3  $\mu\text{L}$  de água deionizada foi depositada na superfície do material em temperatura ambiente. Para o cálculo do ângulo de contato formado entre a gota do material e a superfície dos polímeros foram realizadas três medidas do ângulo interno da gota. O valor final do ângulo de contato foi estabelecido a partir da média aritmética das três medidas (n=3).

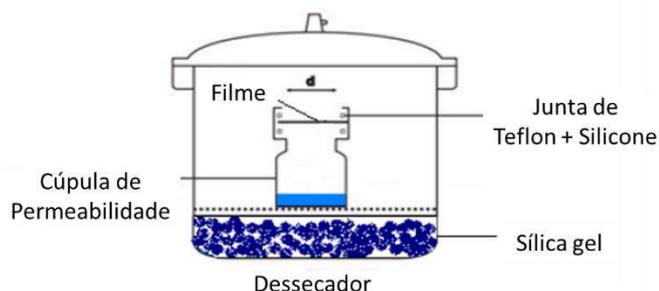
##### Medida da capacidade de absorção de fluidos (Ga)

Para a determinação do grau de absorção de fluidos (Ga), os nanocompósitos foram pesados antes de serem imersos em 20 mL de soluções tampão com três valores de pH (4, 7 e 9) a 37 °C. Após imersão por períodos de 30 min, 60 min, 90 min e 120 min, as amostras foram retiradas do meio e, após retirar levemente o excesso de água na superfície com papel de filtro, foram pesadas para a determinação do peso úmido [56]. Cada experimento de absorção das soluções tampão foi realizado em triplicata e a média de valores foi tomada para validar os resultados. O grau de absorção (Ga) foi calculado a partir da variação da massa inicial ( $M_0$ ) e da massa final ( $M_f$ ) (n=3), como demonstra a equação 5.1:

$$\text{Ga} = \frac{M_f - M_0}{M_0} \times 100 \quad \text{Eq.5. 1}$$

##### Medida da transmissão do vapor d'água (TVA)

A utilização da taxa de transmissão de vapor d'água (TVA) foi empregada para avaliar a capacidade do material seco em permitir a penetração e transposição da água. A medida da transmissão do vapor d'água (TVA) dos nanocompósitos produzidos foi conduzida de acordo com o método “B” da ASTM E96/10, em triplicata. Amostras de nanocompósitos secas, com o lado do PVA demarcado como “I” e o lado do PAA demarcado como “II”, foram afixadas em cúpulas de permeabilidade adaptadas, onde parte das cúpulas é destinada a deposição de água e a outra parte contém o orifício destinado a permitir a permeação do vapor pelo nanocompósito. A cada cúpula foram adicionados 10 mL de solução simulada de exsudato de feridas (SEF – NaCl 142 mM + CaCl<sub>2</sub> 3,35 mM) e posteriormente foram fixados os nanocompósitos. Os conjuntos formados foram pesados e colocados em dessecador contendo sílica gel (desidratada) em temperatura ambiente. Foram realizadas novas pesagens nos intervalos de tempo 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h (n=3). A Figura 4.5 apresenta o esquema do dispositivo utilizado para as análises de TVA.



**Figura 5. 2:** Esquema do dispositivo utilizado para a determinação da Transmissão do vapor d'água (Adaptado: [215]).

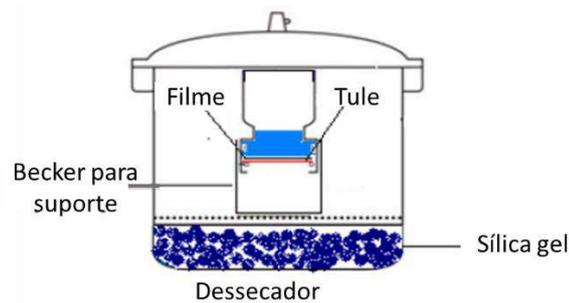
Em cada intervalo, a sílica gel utilizada foi substituída por sílica desidratada em estufa. As leituras das massas nos respectivos intervalos de tempo foram registradas e aplicadas à Equação 5.2. A equação padroniza a TVA para o período de 24 h, onde “g” é o peso transmitido, “t” o tempo em horas no qual foi realizada a leitura e “a” representa a área do filme polimérico.

$$TVA = \frac{g \times 24}{t \times a} \quad \text{Eq.5. 2}$$

### Determinação da Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF)

A Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF) de um curativo refere-se à sua capacidade de drenar o exsudato, que é o líquido produzido por uma ferida, por meio de capacidade de absorção (CA) ou permeação na forma transmissão de vapor úmido (TVPU) [260]. A determinação da CMF

foi realizada utilizando uma solução simulada de exsudato de feridas (SEF) e conduzida de acordo com a norma britânica BS EN 13726-1 para hidrocolóides e curativos. Amostras secas foram afixadas em cúpulas de permeabilidade adaptadas, onde uma porção das cúpulas é destinada a deposição de fluido e a outra porção com orifício é destinada a permitir a permeação do fluido pelo hidrogel. A cada cúpula foram adicionados 20 mL de SEF e posteriormente foram fixados os hidrogéis. Os conjuntos formados foram pesados e colocados na posição invertida em dessecador contendo sílica gel (desidratada) à temperatura de 37 °C (n=3). A Figura 5.3 esquematiza o dispositivo utilizado para a análise de CMF [215].



**Figura 5.3:** Esquema do dispositivo utilizado para a determinação da capacidade de movimentação de fluidos (Adaptado: [215])

Após 24 h do teste, nova pesagem foi realizada. Para a determinação de CMF foram aplicadas as Equações 5.3, 5.4 e 5.5.

$$TVPU = \frac{x-y}{\text{Tempo de estocagem} \times \text{área}} \quad \text{Eq.5. 3}$$

$$CA = \frac{b-a}{\text{Tempo de estocagem} \times \text{área}} \quad \text{Eq.5. 4}$$

$$CMF = TVPU + CA \quad \text{Eq.5. 5}$$

Onde “x” é o valor da massa inicial do sistema completo, “y” é a massa do sistema completo após 24 h de exposição, “b” é a massa inicial do nanocompósito, “a” é a massa do nanocompósito após 24 h. A Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF) é a soma da Capacidade de Absorção (CA) à Taxa de Permeação de Vapor Úmido (TPVU).

#### 5.4.6 Estudo da sensibilidade ao pH dos nanocompósitos

A sensibilidade dos nanocompósitos à mudança de pH do meio foi mensurada em diferentes pHs de solução simulada de exsudato de feridas. Os pHs foram ajustados utilizando solução 2 M de NaOH para valores de 5, 7 e 9, respectivamente. Para todas as amostras de nanocompósitos, a mudança na proporção de intumescimento foi calculada em tempos de 30 min, 60 min, 90 min e 120 min empregando a Equação 5.3. As amostras pós intumecidas em diferentes pHs foram liofilizadas por 24 h e analisadas morfologicamente via MEV [6].

#### **5.4.7 Liberação de íons em SEF**

O ensaio em *Simulated Exudate Fluid* (SEF) foi empregado para prever a liberação de íons cério e/ ou cobalto presentes na estrutura das amostras de nanocompósitos.

#### **Preparação da Solução Simulada de Exsudato de Feridas**

A solução Simulada de Exsudato de Feridas (SEF) foi preparada de acordo com o protocolo de Khabbaz e colaboradores (2019) [116]. À temperatura ambiente, 0,368 g de  $\text{CaCl}_2$  e 8,298 g de NaCl foram adicionados a 1000 mL de água até a completa dissolução dos sais por homogeneização da solução em balão volumétrico.

#### **Procedimento do ensaio de liberação iônica**

Inicialmente, as amostras produzidas foram cortadas com dimensão de 10 mm<sup>2</sup>, imersas em 15 mL de SEF e mantidas a 37 °C por 1 h, 3 h, 24 h, 3 d, 7 d e 14 dias [96]. A cada período de tempo, alíquotas de 1 mL foram retiradas da solução e mais 1 mL de SEF foi repostado. Essas alíquotas foram diluídas em 1 mL de  $\text{HNO}_3$  2 % p/p para que quaisquer reações fossem encerradas e as soluções estabilizadas. A cada alíquota retirada foi analisada via ICP-OES para determinação da liberação de Si, Ce, Co em todas as amostras produzidas.

#### **5.4.8 Estudo biológico *in vitro***

##### **Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo**

A cultura celular e a citometria de fluxo foram realizadas de acordo com os critérios de biossegurança recomendados [117]. Estes ensaios foram realizados utilizando células embrionárias de rim humano (HEK 293). Foi utilizado o meio de cultura Eagle modificado por

Dulbecco (DMEM/Aldrich) suplementado com soro fetal bovino (10 %) e estreptomicina (1 %). As células foram incubadas a 37 °C em incubadora Thermo 311 regulada para 37 °C e com atmosfera controlada (95 % O<sub>2</sub> e 5 % CO<sub>2</sub>) e umidade (95 % UR). Depois que as células atingiram a confluência adequada,  $1 \times 10^6$  células foram transferidas para placas de cultura celular de 12 poços e mantidas a 37 °C por 24 h. Os seguintes grupos experimentais foram considerados (n = 3 por grupo): (i) solução estéril de NaCl (0,9 % peso/vol.), como controle negativo; (ii) solução de DMSO (20 %), como controle positivo; (iii) amostras. A análise por citometria de fluxo foi realizada com o kit Fixable Viability Stain® V450-A (BD Biosciences – São Paulo, Brasil), que foi capaz de discriminar entre células vivas e mortas. A apoptose e a necrose foram avaliadas com o método de coloração dupla de anexina V-PE/7-amino-actinomicina D(7-AAD) (BD Bioscience, NJ, EUA). Os ensaios foram executados em duplicata e 50.000 eventos foram considerados para cada amostra. Parâmetros como dispersão lateral (SSC), dispersão lateral frontal (FSC) e emissão V450 foram considerados. Todos os materiais utilizados nestes ensaios foram previamente esterilizados e a manipulação celular foi realizada em Biossegurança BIOSEG 12 Classe II tipo A1 (Grupo Veco, São Paulo, Brasil).

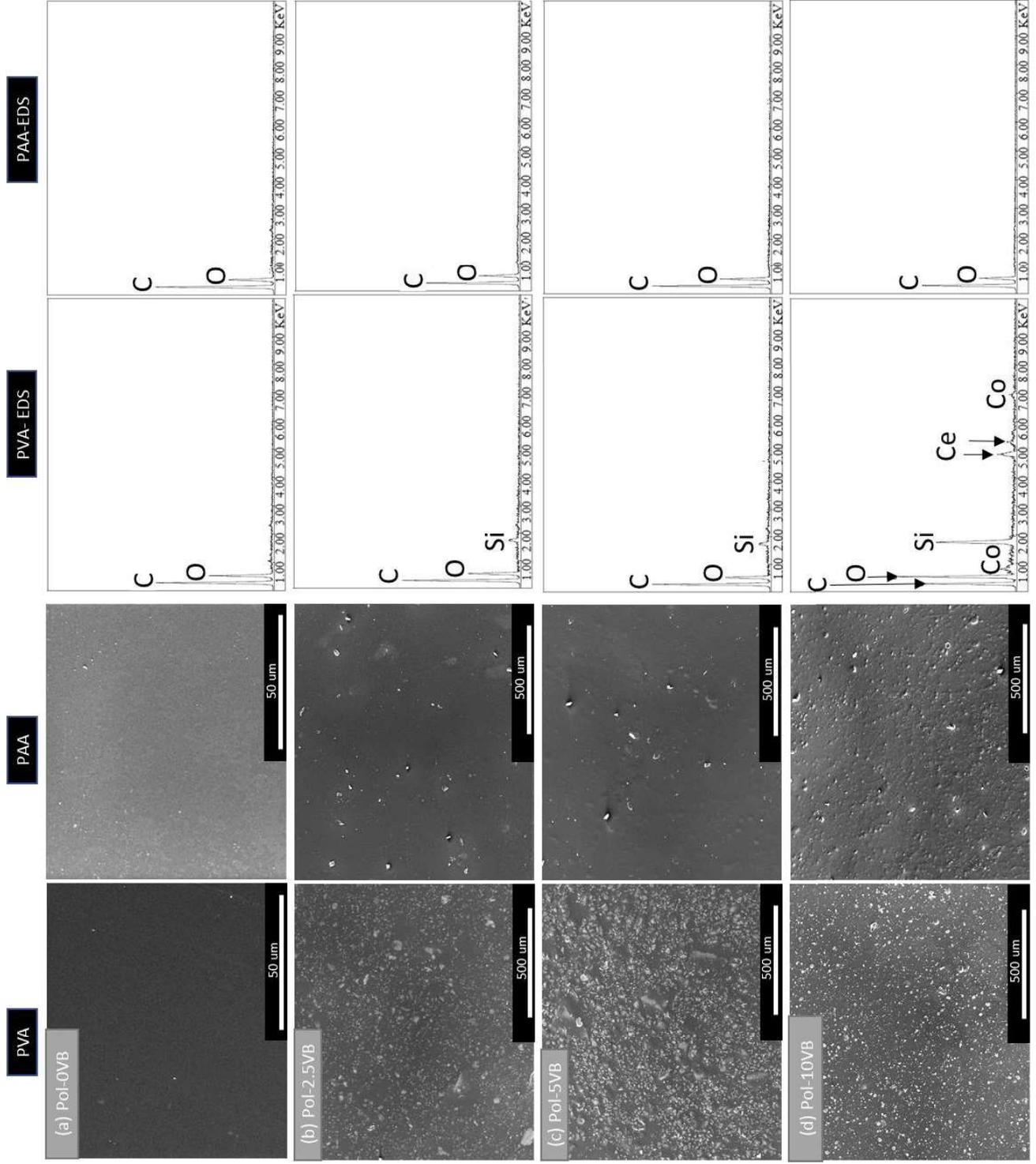
### **Análise da capacidade antimicrobiana do material**

O teste de difusão em disco de ágar Bauer-Kirby é um método amplamente utilizado para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana de patógenos a vários materiais [118]. Este teste foi empregado neste trabalho para avaliar a capacidade antimicrobiana das amostras aqui preparadas. Nestes ensaios foram seguidas as recomendações do Comitê Brasileiro de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (BrCAST) [216]. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foram usados para preparar a suspensão bacteriana. Após o preparo dessa suspensão, ela foi ajustada à turbidez da escala McFarland 0,5, correspondente a  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, a suspensão foi semeada em placas de ágar Mueller Hinton e, em seguida, discos de 6 mm de diâmetro das amostras preparadas foram colocados no meio de cultura. Um disco de penicilina foi usado como controle. As placas foram então incubadas a 35 °C por 18 h, e os halos de inibição foram medidos. Estes ensaios foram realizados em quadruplicata.

### **5.5 Resultados e discussão**

### 5.5.1 Análise da morfologia

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada a fim de se fazer a avaliação da morfologia superficial e da dispersão do VB nos nanocompósitos, enquanto a análise de espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) foi utilizada para avaliar se o excesso de iniciadores empregados na polimerização do PAA foi removido. As micrografias dos nanocompósitos produzidos (superfícies PVA e superfícies PAA) e seus respectivos espectros de EDS são apresentadas na Figura 5.4. Nas imagens do filme Pol-0VB é possível identificar que houve modificação na superfície lisa do PVA após a polimerização do AA, indicando que houve sucesso na deposição do PAA na superfície do PVA. Nas imagens das amostras Pol-2.5VB, Pol-5VB e Pol-10VB é possível visualizar que o VB está bem disperso por toda a superfície do PVA, sendo mais homogênea para a amostra Pol-2.5VB. Ainda, observa-se que à medida que aumenta o teor de nanopartículas na matriz polimérica, a dispersão homogênea diminui e as nanopartículas tendem a se aglomerar. Os espectros de EDS para as superfícies do PVA mostram a presença dos elementos Si (Pol-2.5VB e Pol-5VB) e Ce e Co (Pol-10VB) indicando a presença do VB na matriz, além dos elementos C e O referentes aos polímeros PVA e PAA. Nas superfícies do PAA não foram identificadas a presença de VB (tal qual indica os espectros de EDS), entretanto o VB aumentou a rugosidade da superfície do PAA da amostra Pol-10VB. Os resultados aqui obtidos estão em acordo com os resultados encontrados na literatura para filmes de dupla camada de PVA/PAA e para filmes de PVA com incorporação de nanopartículas [6,217–220].

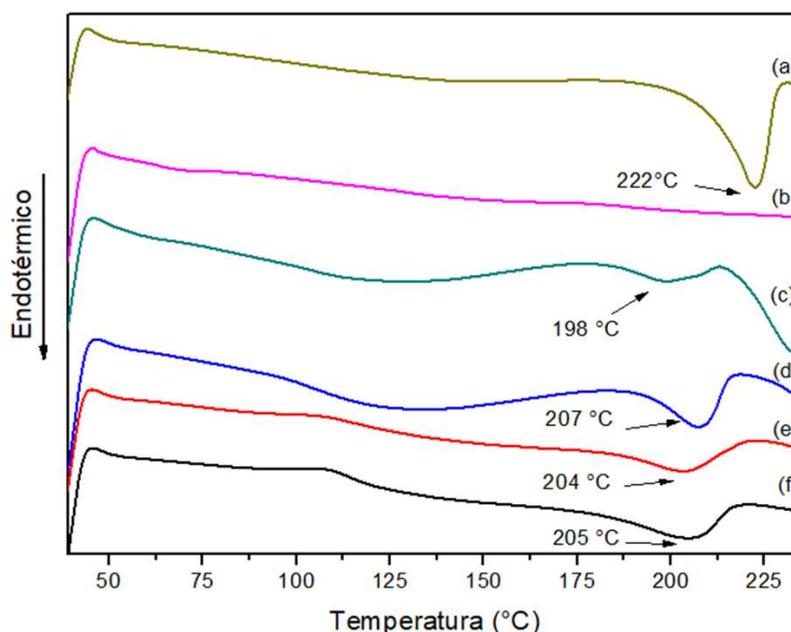


**Figura 5. 4:** Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das amostras produzidas (superfície PVA e superfície PAA) e seus respectivos espectros de EDS: (a) Pol-0VB; (b) Pol-2.5VB; (c) Pol-5VB e d) Pol-10VB. (Fonte: Própria autora)

Nos espectros de EDS não foram observados elementos químicos que pudessem indicar contaminação pelos iniciadores empregados na polimerização do AA, tais quais Na e S provenientes do bissulfito de sódio  $\text{NaHSO}_3$  e do persulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ . Isto indica que o excesso de iniciadores adicionados à síntese do PAA foi removido durante a lavagem dos nanocompósitos.

### 5.5.2 Análise térmica

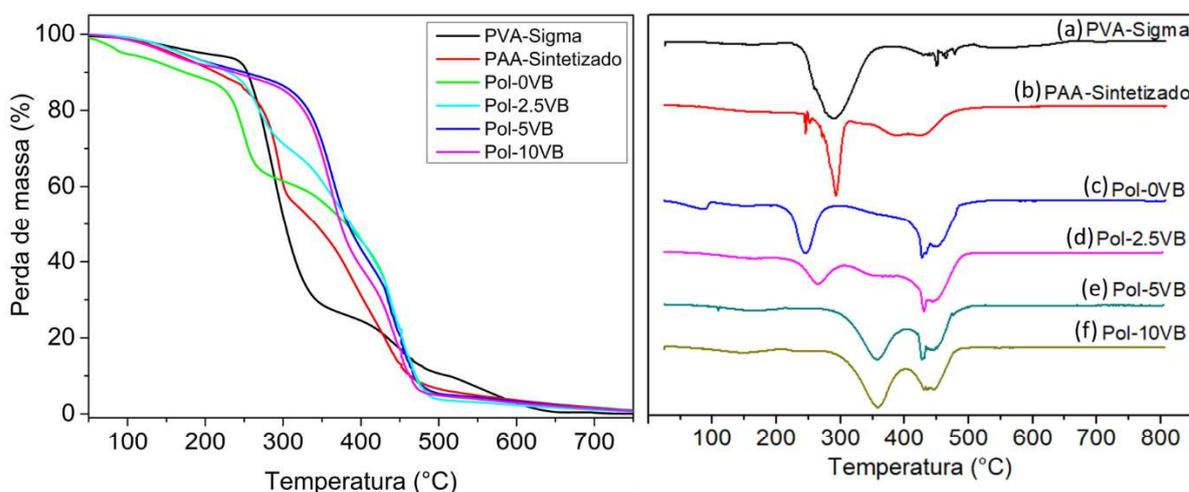
A análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foi empregada para avaliar nos filmes sintetizados as temperaturas de transição dos polímeros PVA e PAA, bem como as suas possíveis interações com o VB. Os termogramas de DSC para os nanocompósitos de PVA/PAA/VB são apresentados na Figura 5.5. Através da amostra PVA-Sigma é possível observar que o filme de PVA isolado possui temperatura de fusão ( $T_m$ ) em  $222\text{ }^\circ\text{C}$  [221]. Já a amostra de PAA-sintetizado não apresentou  $T_m$ , pois o PAA é um polímero amorfo, portanto não apresenta temperatura de fusão cristalina. Após a polimerização do PAA sobre o PVA, a  $T_m$  da dupla camada polimérica se deslocou para  $198\text{ }^\circ\text{C}$ , evento observado por vários autores na literatura [222–224]. Além disso, a área do pico de fusão diminuiu após a adição de PAA, isso indica que há menor fração de fase cristalina (PVA) e maior fração de fase amorfa – característica do PAA [222]. Para a amostra Pol-0VB foi possível identificar um segundo decaimento em  $230\text{ }^\circ\text{C}$  que ainda estaria relacionado à  $T_m$  do PVA.



**Figura 5. 5:** Termogramas de DSC dos nanocompósitos: a) PVA-Sigma; (b) PAA-sintetizado; (c) Pol-0VB; (d) Pol-2.5VB; (e) Pol-5VB; e f) Pol-10VB. (Fonte: Própria autora)

Ao incorporar VB à dupla camada polimérica (Pol-2.5, Pol-5VB e Pol-10VB), a  $T_m$  dos nanocompósitos aumenta (204°C a 207 °C) e torna-se intermediária à temperatura de fusão do PVA-Sigma e da dupla camada polimérica (Pol-0VB). Na literatura, a alteração da  $T_m$  para nanocompósitos estaria relacionada à redução da fase cristalina do PVA a partir da adição de carga cerâmica no sistema, pois as nanopartículas impediriam a interação entre a cadeia principal do polímero e a formação de ligações secundárias de hidrogênio [225]. Portanto, o ensaio de DSC mostra que o VB estaria, a princípio, ancorado mecanicamente na rede do PVA. Considerando que a temperatura de aplicação dos nanocompósitos é a temperatura corporal próxima a 37 °C, não foram identificadas transições relevantes neste valor.

A estabilidade térmica dos nanocompósitos foi estudada através da análise termogravimétrica dos materiais. Os termogramas das amostras são apresentados na Figura 5.6. As curvas TGA mostram três regiões distintas principais de perda de peso. A primeira perda de peso ocorreu na faixa de temperatura entre 25 °C e 200 °C, e foi associada à perda de água absorvida nos materiais [222,223].



**Figura 5. 6:** a) TGA e b) DTG das amostras produzidas. (Fonte: Própria autora)

A degradação térmica da amostra de PVA-Sigma começou em 220 °C e a perda de peso do material teve dois picos máximos distintos em 285 °C e 450 °C. Um possível mecanismo de degradação térmica do PVA seria explicado a partir da sua desidratação, iniciada em 200 °C, com produção predominante de macromoléculas com uma estrutura de polieno [226,227]. Em temperaturas elevadas, esta estrutura é destruída e carbono, bem como hidrocarbonetos, seriam formados [226,227]. Para a amostra de PAA-Sintetizado, o início de perda de massa deu-se a partir de 200 °C. Existem também dois picos de degradação térmica na amostra de PAA-

sintetizado, um e 385 °C e outro em 430 °C que estão incompletamente separados. O mecanismo de degradação do PAA em CO<sub>2</sub> envolve três etapas: desidratação, descarboxilação e quebra das cadeias. A desidratação ocorre em temperaturas acima de 200 °C a partir da formação e decomposição de anidridos. Na descarboxilação, temperaturas acima de 250 °C são requeridas para que haja a decomposição do anidrido em dióxido de carbono – que será liberado até temperaturas próximas a 500 °C com consequente perda de massa do material. Por último, e com menor expressão na perda mássica, em aproximadamente 350 °C, a quebra de cadeias acontece eliminando fragmentos de cadeia curta derivados de duas ou mais unidades de repetição [228].

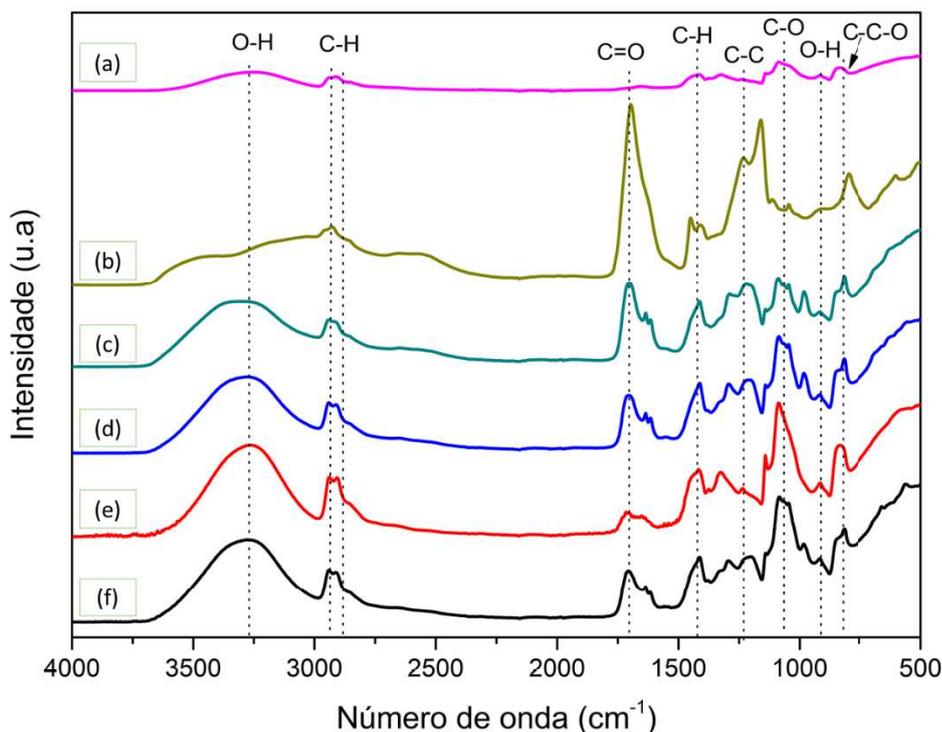
A amostra Pol-0VB teve seu início de degradação em 200 °C com máximo em 250 °C, outros picos de bandas incompletas foram encontrados em 425 °C e 450 °C. Portanto, observa-se que, com a polimerização do PAA, a estabilidade térmica do material diminuiu - a curva da amostra Pol-0VB está deslocada para a direita. Porém, ao crescer VB no sistema a estabilidade térmica dos nanocompósitos tendeu a aumentar gradualmente (pico de degradação em 260 °C, 355 °C e 360 °C, Pol-2.5VB, Pol-5VB e Pol-10VB, respectivamente).

A inserção de VB ao sistema alterou a estabilidade térmica dos nanocompósitos. A explicação proposta está relacionada às restrições na mobilidade da cadeia polimérica e à redução da difusividade dos agentes de ataque dentro da matriz polimérica, ambas devido às interações polímero-carga. Assim, as nanopartículas podem atuar como uma barreira de aquecimento [227].

### 5.5.3 Análise das características estruturais

As análises de FTIR foram realizadas com a finalidade de avaliar os grupos funcionais dos nanocompósitos a partir da identificação das suas bandas de absorção. Os espectros de FTIR dos nanocompósitos produzidos podem ser observados na Figura 5.7, e as principais bandas de absorção estão listadas na Tabela 5.2. Os filmes nanocompósitos produzidos apresentaram espectros com as bandas típicas de PVA e PAA. A banda centrada em 3288 cm<sup>-1</sup> pode ser relacionada a vibração de estiramento dos grupos hidroxila (-OH). A banda centrada em 1141 cm<sup>-1</sup> está relacionada ao estiramento C-O presente na região cristalina do PVA, indicando, portanto, a presença deste polímero [229]. Quando há interação entre polímeros, mudanças no espectro podem ser observadas – como é o caso do deslocamento da banda centrada em

1697  $\text{cm}^{-1}$  no PAA-sintetizado para comprimentos de onda maiores (1703  $\text{cm}^{-1}$ ). Isso é um indicativo de que pode ter ocorrido interação por ligações de H entre o PVA e o PAA [229].



**Figura 5. 7:** Espectro FTIR dos filmes e nanocompósitos produzidos (4000- 500  $\text{cm}^{-1}$ ): a) PVA-Sigma; (b) PAA-sintetizado; (c) Pol-0VB; (d) Pol-2.5VB; (e) Pol-5VB; e f) Pol-10VB. (Fonte: Própria autora)

**Tabela 5. 2:** Principais bandas vibracionais associadas aos nanocompósitos

Amostra	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição	Referências
PAA-sintetizado	3288	O-H vibração de estiramento	[220,230,231]
PVA-Sigma	2942	C-H estiramento	[231-233]
Pol-0VB	1094	C-O estiramento	[230]
Pol-5VB	913	O-H	[234]
Pol-10VB	822	C-C-O estiramento	[234,235]
PAA-sintetizado	1697	C=O estiramento	[232,233]
Pol-2.5VB	1237	C-C estiramento	[218]
Pol-5VB			
Pol-10VB			

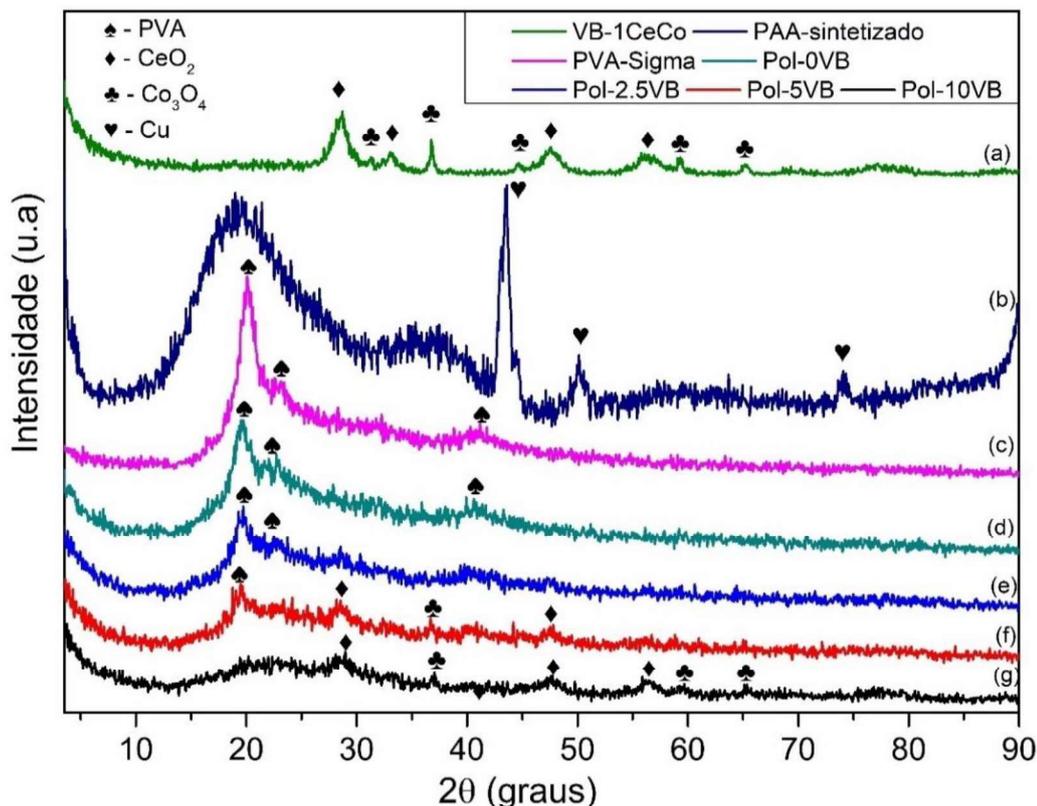
As bandas centradas em 2942  $\text{cm}^{-1}$  e 1094  $\text{cm}^{-1}$  indicam os estiramentos dos grupos C-H e C-O-C do PAA-sintetizado respectivamente [220,231]. Já a banda centrada em 1237  $\text{cm}^{-1}$  refere-se ao alongamento do C-C [218] que foi deslocada para valores maiores após a interação com

o PVA-Sigma. A banda centrada em  $1712\text{ cm}^{-1}$  indica o grupo carbonila C=O presente no PAA-sintetizado [232,233] e a banda em  $913\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao grupo carboxila (O-H) deste mesmo composto [234]. A banda centrada em  $822\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao C-C-O [234,235].

A partir da interação do PVA-Sigma e do PAA-sintetizado, observou-se a formação de bandas entre  $1602\text{ cm}^{-1}$  e  $1639\text{ cm}^{-1}$  que estariam relacionadas ao grupo carbonila [236]. Park e colaboradores (2017) associam a presença dessas bandas a interação entre metal de transição e oxigênio carbonílico ( $-\text{C}^+=\text{O}^-$ ), portanto, poderia haver interação entre os polímeros e os metais de transição Ce e Co presentes na superfície do VB [234].

A análise de FTIR mostra que ao polimerizar o PAA sobre o PVA houve interação entre os dois polímeros através de ligação de hidrogênio. Há poucos indicativos nos espectros que mostrem alguma interação química do PVA e do PAA com o VB, pois trata-se de uma análise superficial e o VB está disperso no volume do material.

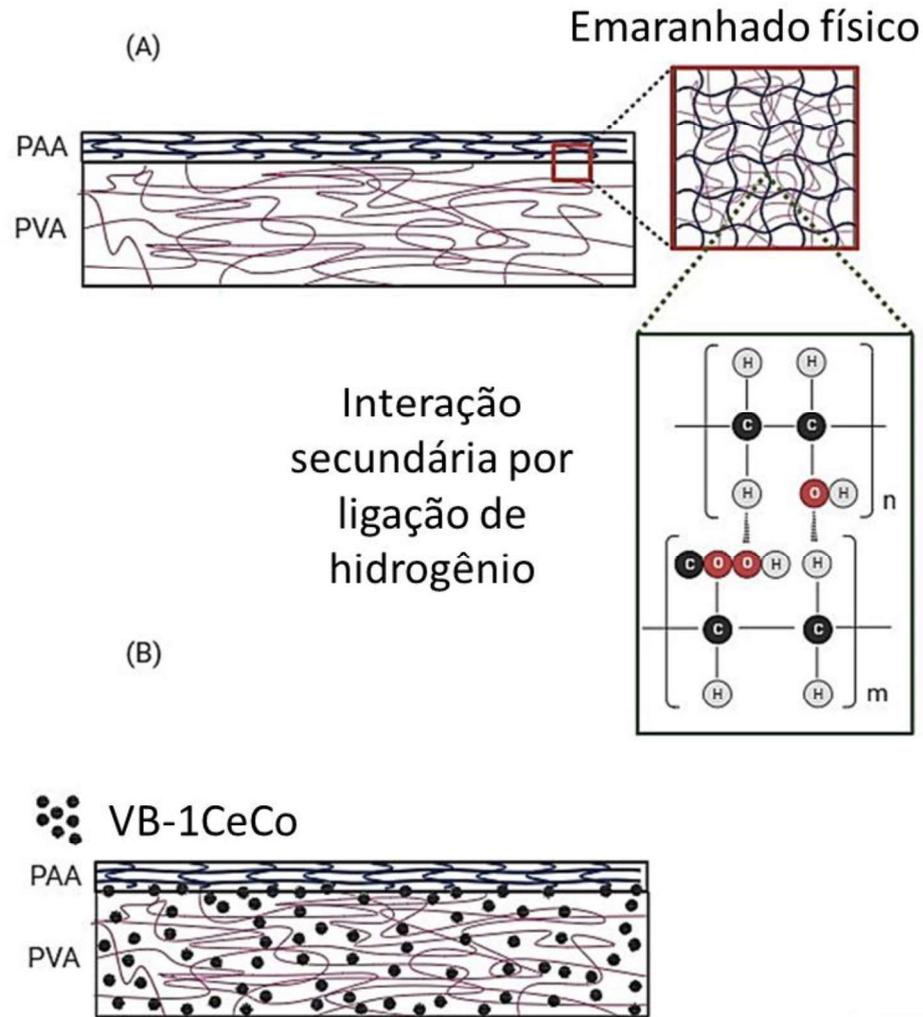
A estrutura dos nanocompósitos também foi avaliada através de difração de raio X (Figura 5.8). Através destes espectros é possível confirmar a natureza semicristalina do PVA, uma vez que são encontrados picos em  $2\Theta = 19,5^\circ$ ,  $23^\circ$  e  $41^\circ$  [237]. A cristalinidade do PVA é devido à interação intermolecular por ligações de hidrogênio entre as suas cadeias [237]. O PAA é um polímero amorfo com halo entre  $10^\circ$  e  $30^\circ$  [238], mas na Figura 5.8 é possível observar picos de cristalinidade em  $2\Theta = 43,4^\circ$ ,  $52,2^\circ$  e  $74,2^\circ$  correspondentes ao cobre metálico (ICDD card 01-085-1326) proveniente de contaminação durante algum processo de manipulação da amostra, , uma vez que durante a síntese não foi empregado nenhum reagente de cobre.



**Figura 5. 8:** Espectros de DRX para as amostras de filmes nanocompósitos de: a) VB-1CeCo; b) PAA-sintetizado; c) PVA-Sigma; d) Pol-0VB; e) Pol-2.5VB; f) Pol-5VB; e g) Pol-10 VB. (Fonte: Própria autora)

Nos nanocompósitos, a intensidade do pico principal do PVA diminuiu após a polimerização do PAA, indicando uma diminuição na cristalinidade do material a partir de uma restrição na formação de cristais [222,239,240]. Além disso, nas amostras de Pol-5VB e Pol-10 VB apareceram picos localizados em  $2\theta = 28,7^\circ$ ;  $47,6^\circ$  e  $56,3^\circ$ , indicando a presença do  $\text{CeO}_2$  - ICDD 00-043-1002 (JCPDS card n° 43-1002) [148]; e picos em  $2\theta = 37^\circ$ ;  $59,5^\circ$  e  $65,3^\circ$  - ICDD 01-071-0816 (JCPDS card n° 71-0816) [148]- que indicariam a presença do  $\text{Co}_3\text{O}_4$  - ambos óxidos presentes no VB. Esta diminuição da cristalinidade do PVA possivelmente está ligada ao aumento na dificuldade de empacotamento das suas cadeias devido a presença do VB [241]. O aumento da característica amorfa da matriz polimérica dos nanocompósitos pode aumentar a liberação do VB, consequentemente dos íons terapêuticos nele presentes, para o meio fisiológico, em vista de um material semicristalino, uma vez que há aumento da flexibilidade do movimento segmentar das cadeias na matriz polimérica [222].

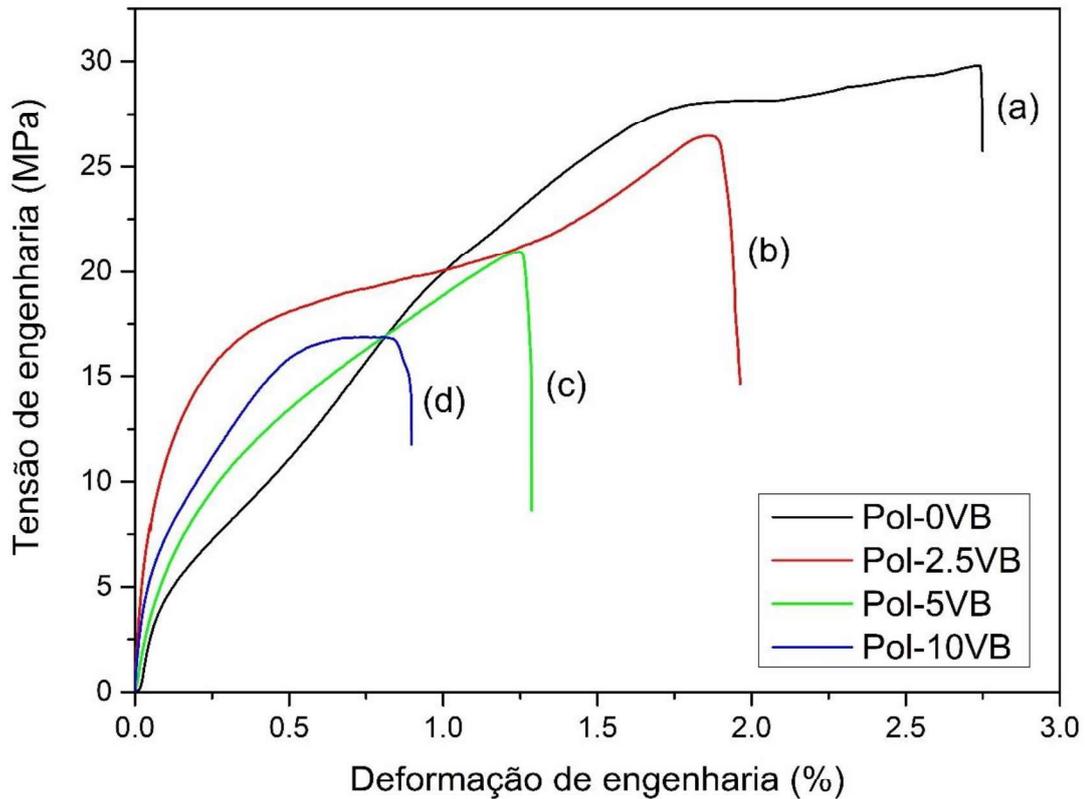
Diante dos resultados das características térmica e estrutural dos materiais, propõe-se que a interação na interface entre os polímeros PVA e PAA seja representada tal qual a Figura 5.9-a, enquanto a interação entre o PVA-VB seja representada de acordo com a Figura 5.9-b.



**Figura 5. 9:** Representação esquemática (a) das interações física e química entre o PVA e o PAA; (b) do ancoramento mecânico do VB no PVA. (Fonte: Própria autora)

#### 5.5.4 Análise das propriedades mecânicas dos nanocompósitos

As propriedades mecânicas dos filmes nanocompósitos foram avaliadas através do ensaio de tração, e as curvas de Tensão x Deformação são apresentadas na Figura 5.10. A tensão de ruptura e a deformação da amostra Pol-0VB foram de  $30,0 \pm 6,0$  MPa e  $2,7 \pm 0,5$  mm, respectivamente. De acordo com a literatura, filmes brancos de PVA podem chegar à resistência à tração de, aproximadamente, 40 MPa [242], além disso a formação de redes interpenetrantes entre PVA/PAA tende a não alterar a resistência mecânica à tração do material – prevalecendo a resistência referente ao PVA [243], bem como indicado por Tavakoli e colaboradores (2018) [6]. Portanto, no presente estudo, a carga cerâmica foi diretamente responsável pelas alterações nas características mecânicas dos nanocompósitos, sendo o PAA pouco, ou nada, influente.



**Figura 5. 10:** Curvas representativas dos ensaios de tração para as amostras Pol-0VB, Pol-2.5VB, Pol-5VB e Pol-10VB. (Fonte: Própria autora)

Para as amostras contendo VB-1CeCo, tanto a tensão de ruptura, quanto a deformação de engenharia diminuíram com o aumento da % m/m de VB nos nanocompósitos. Portanto, os nanocompósitos se tornaram menos dúcteis e menos resistentes, além de mais rígidos (maiores módulos de elasticidade), como resultado da incorporação de carga cerâmica. A Tabela V.3 resume os dados de deformação na ruptura ( $\epsilon_r$ ), tensão máxima de ruptura ( $\sigma_{m\acute{a}x}$ ) e módulo de elasticidade (E) encontrados para os nanocompósitos.

**Tabela 5. 3:** Propriedades mecânicas dos nanocompósitos.

Amostra	E (MPa)	$\sigma_{m\acute{a}x}$ (MPa)	$\epsilon_r$ (mm/mm)
Pol-0VB	11,0 ± 1	30 ± 6	3 ± 1
Pol-2.5VB	14 ± 3	27 ± 1	2 ± 0
Pol-5VB	18 ± 7	21 ± 0	1 ± 0
Pol-10VB	21 ± 1	17 ± 1	1 ± 0.1

É importante destacar que as amostras Pol-0VB e Pol-2.5VB apresentaram comportamento típico de polímeros semicristalinos, uma vez que entre os regimes elástico e plástico houve

redução da tensão das amostras. Isto é, durante o ensaio, houve alinhamento das cadeias poliméricas do PVA, conseqüentemente, aumento da cristalinidade do polímero e aumento da resistência mecânica à tração do material, para, então, haver ruptura. Já para as amostras Pol-5VB e Pol-10VB é observado caráter mais frágil nas curvas de tensão x deformação, onde a deformação de engenharia é menor e sem variação na tensão que indique aumento da cristalinidade do material – o que pode ser observado pelo aumento do módulo de elasticidade dos nanocompósitos [244]. Ou seja, o a adição contínua de VB ao polímero estaria causando segregação de fases devido à aglomeração de partículas, logo, criando pontos de descontinuidade e/ou concentradores de tensão que diminuiriam a mobilidade das cadeias poliméricas, logo sua resistência à tração [245,246].

Diante dos resultados apresentados, todos os filmes poliméricos podem ser usados para cobertura de feridas, pois espera-se que curativos possam suportar tensões de tração durante as atividades do dia-a-dia e possuam resistência à tração compatível com o tecido dérmico ( $21.6 \pm 8.4$  MPa [247]). Portanto, se houver algum estresse de atrito acidental, os nanocompósitos absorverão a energia sem romper e, assim, fornecerão seu efeito protetor contra perda de nutrientes e infecções sobre a ferida.

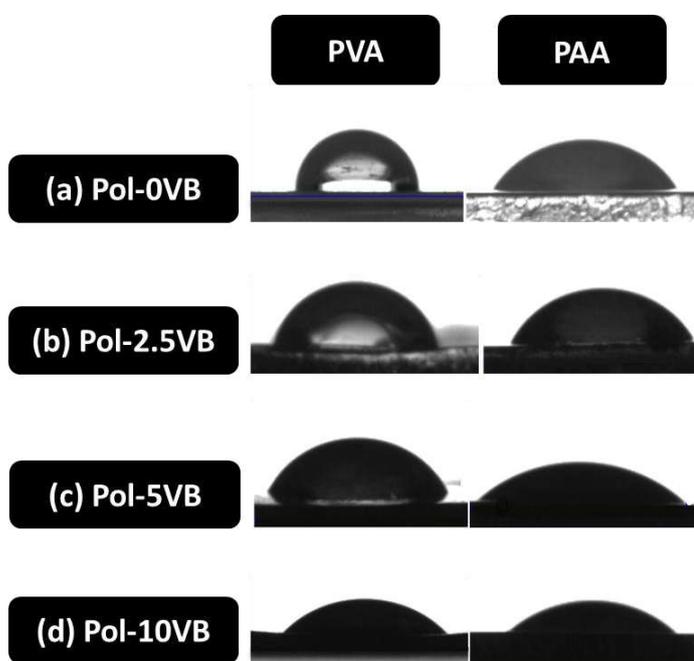
### **5.5.5 Características dos nanocompósitos enquanto curativos**

O teste de ângulo de contato ( $\theta$ ) de uma superfície com a água é um ensaio que indica a molhabilidade dos materiais, onde altos ângulos de contato ( $\theta \geq 90^\circ$ ) indicam que o material possui baixa molhabilidade, portanto, seria um material hidrofóbico; por outro lado, materiais com baixos ângulos de contato ( $\theta < 90^\circ$ ) indicam que o material possui maior molhabilidade, portanto, seria um material hidrofílico [248]. Este teste é importante para o desenvolvimento de curativos, pois superfícies hidrofílicas são altamente indicadas em biomateriais para essa aplicação por auxiliarem na adesão e proliferação celular [248]. O teste de ângulo de contato foi utilizado neste estudo para avaliar se houve modificação na hidrofiliabilidade da superfície dos nanocompósitos antes e após a polimerização do PAA e da incorporação de VB-1CeCo.

A Figura 5.11 apresenta imagens ópticas de gotas de água nas superfícies de PVA e PAA dos nanocompósitos, enquanto a Tabela 5.4 apresenta os dados de ângulo de contato das respectivas imagens. A análise dos dados da Tabela V.4 indica que a polimerização do PAA promoveu

diminuição dos ângulos de contato dos nanocompósitos, pois ele apresenta grupos hidrofílicos C=O que promovem a molhabilidade [231,249].

Já a incorporação de VB-1CeCo no PVA também influenciou no aumento da hidrofiliabilidade dos materiais, porque os ângulos de contato na superfície do PVA diminuiram com o aumento da inserção de nanopartículas no sistema. Wang e colaboradores (2022) incorporaram nanopartículas de SiO<sub>2</sub> ao PVA e mostraram que a forte hidrofiliabilidade do SiO<sub>2</sub> pode melhorar a adsorção de moléculas de água na superfície da membrana [220]. O aumento da hidrofiliabilidade é uma característica desejável para materiais de curativos para feridas, porque as células epiteliais são mais propensas a fenômenos de adesão e proliferação na presença de substratos hidrofílicos [248,250].

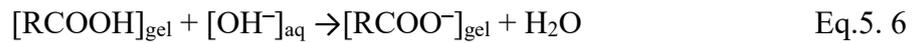


**Figura 5. 11:** Imagens ópticas de gotas de água nas superfícies de PVA e PAA dos nanocompósitos: a) Pol-0VB; (b) Pol-2.5VB; (c) Pol-10VB; e (d) Pol-10VB. (Fonte: Própria autora)

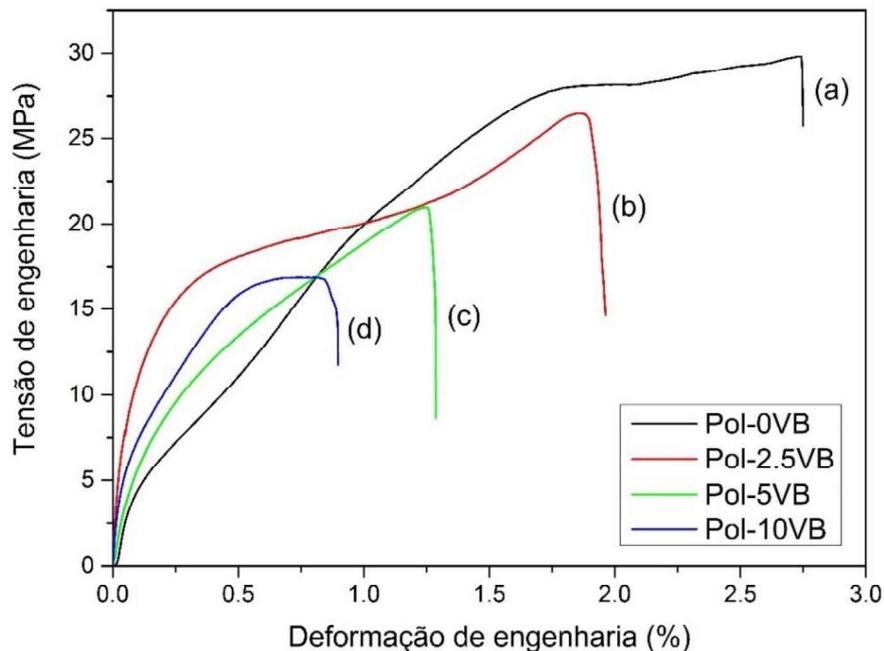
**Tabela 5. 4:** Ângulos de contato obtidos para as superfícies de PVA ou PAA dos nanocompósitos: a) Pol-0VB; (b) Pol-2.5VB; (c) Pol-10VB; e (d) Pol-10VB.

Amostra	Ângulo de Contato/PVA (°)	Ângulo de Contato/PAA (°)
Pol-0VB	87 ± 8	59 ± 4
Pol-2.5VB	71 ± 4	66 ± 0
Pol-5VB	61 ± 0	41 ± 0
Pol-10VB	46 ± 1	38 ± 1

O grau de absorção de fluidos em pHs ácido (4), básico (9) e neutro (7) foi utilizado neste estudo a fim de analisar a capacidade de absorção de fluidos do material em meios que simulam feridas infectadas (básico) e feridas não-infectadas (pH próximo a 5). A Figura 5.12 apresenta a taxa de absorção de solução (%) dos nanocompósitos com diferentes porcentagens de VB em relação ao tempo de exposição à solução. Através das curvas é possível observar que em pH básico houve maior absorção de fluido pelo sistema, enquanto para pH ácido houve menor absorção de fluido. Esse comportamento é devido à presença do PAA. O aumento da capacidade de absorção de fluidos por misturas de PVA/PAA em meio básico têm sido altamente reportado na literatura [6,226,230,249,251,252]. A sensibilidade ao pH dos hidrogéis é devida à presença de grupos funcionais fracamente ácidos (COOH) presentes na cadeia principal do PAA [249]. Assim, as propriedades de absorção de água são atribuídas à ionização desses grupos funcionais em meio básico, sendo a repulsão eletrostática entre os grupos aniônicos a força motriz para o processo de intumescimento [226] – tal qual indicado na equação 5.6.



Com o aumento da % m/m de VB no sistema, houve aumento da absorção de fluido pelos nanocompósitos, possivelmente devido à maior disposição de grupos hidrofílicos -OH no material, o que está de acordo com o observado através da análise de molhabilidade [253,254].

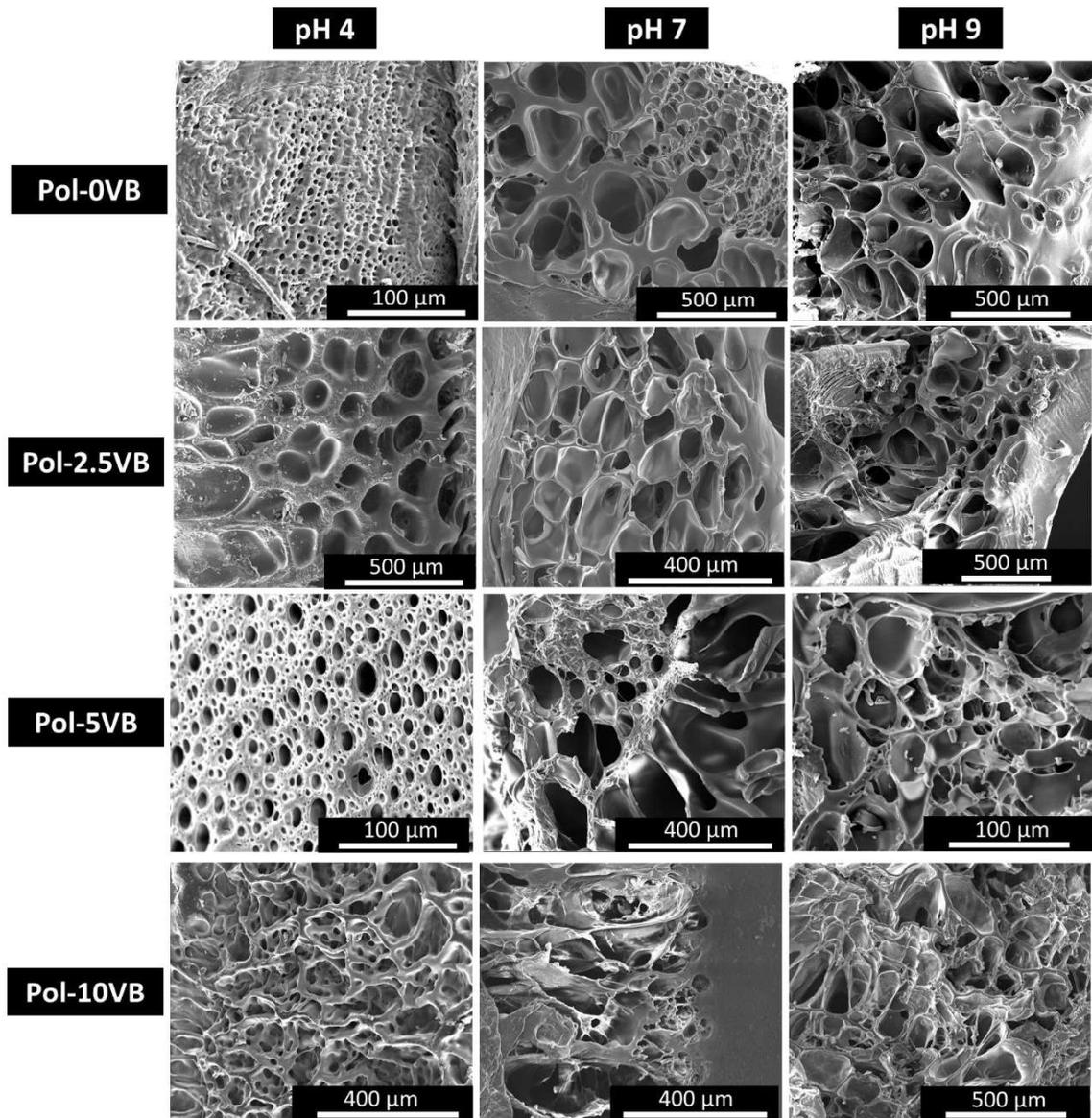


**Figura 5. 12:** Taxa de absorção de água em pHs 4, pH 7 e pH 9 para as amostras (a) Pol-0VB, (b) Pol-2.5VB, (c) Pol-5VB e (d) Pol-10VB. (Fonte: Própria autora)

A Figura 5.13 apresenta micrografias de MEV em que é possível observar a alteração na superfície dos hidrogéis após 2 h de imersão dos nanocompósitos em soluções de diferentes pH. Nas imagens é possível observar o efeito no tamanho de poros do caráter aniônico do PAA, onde em pH ácido (4) há poros pequenos, em relação ao tamanho dos poros do material após imersão em pH básico (9) – o tamanho de poros está indicado na Tabela 5.5. O aumento no valor do pH aumentou a taxa de dissociação do grupo carboxila, resultando em um maior acúmulo de cargas negativas dentro do hidrogel de PAA. Logo, a repulsão entre as cargas negativas fixas aumentou o tamanho dos poros [6]. Não foi observada relação direta entre a presença do VB e o tamanho de poros dos materiais. As micrografias são consistentes com os resultados da análise de absorção de fluidos, onde ocorreu um maior intumescimento em pH = 9.

**Tabela 5. 5:** Tamanho médio de poros para as amostras em pH 4, pH 7 e pH 9.

Amostra	Média do tamanho de poro ( $\mu\text{m}$ )		
	pH 4	pH 7	pH 9
Pol-0VB	5 $\pm$ 1	85 $\pm$ 48	147 $\pm$ 22
Pol-2.5VB	94 $\pm$ 26	121 $\pm$ 19	137 $\pm$ 43
Pol-5VB	8 $\pm$ 3	55 $\pm$ 18	128 $\pm$ 0,3
Pol-10VB	23 $\pm$ 10	48 $\pm$ 11	131 $\pm$ 26



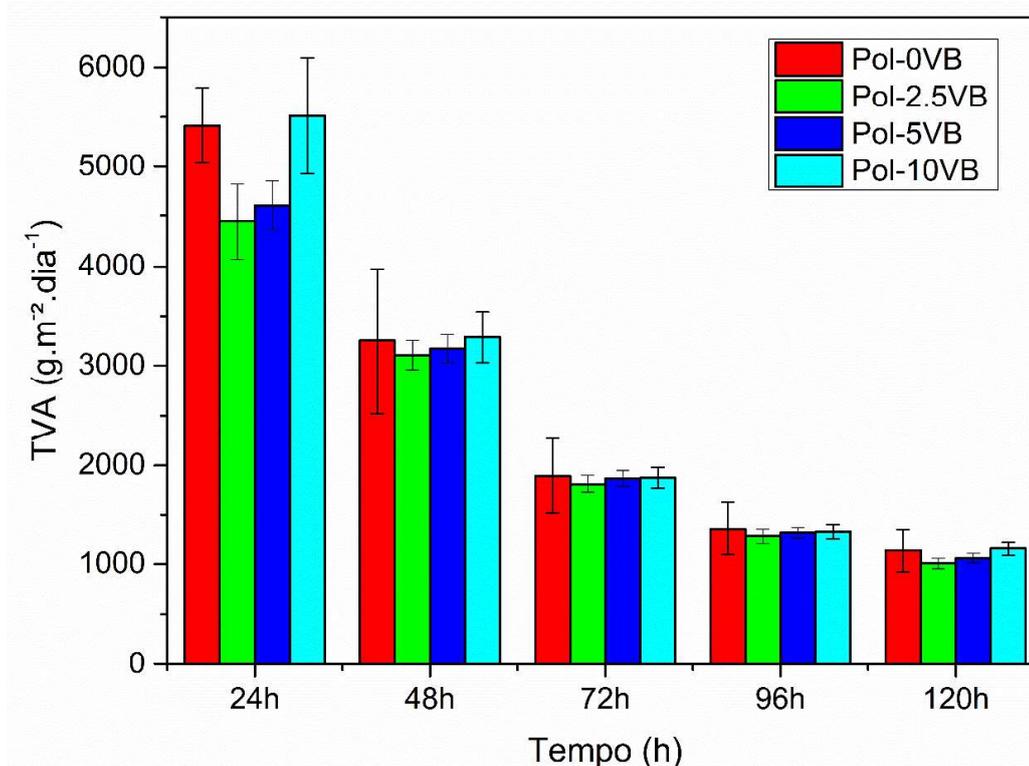
**Figura 5. 13:** Imagens de MEV das superfícies das amostras de PVA-PAA em diferentes valores de pH (4; 7 e 9). (Fonte: Própria autora)

De acordo com protocolos brasileiros para o tratamento de feridas, feridas que tenham de moderada a intensa exsudação devem ser tratadas com curativos feitos a partir de materiais absorventes. O tempo de permanência do curativo na ferida depende da intensidade de exsudato produzido e da presença ou não de infecção. Assim, o tempo de uso do curativo pode chegar à 7 dias – a depender das necessidades do paciente [255,256]. Este trabalho mostrou que os curativos de PVA/PAA são capazes de absorver 200 vezes o seu peso em pH ácido (ferida não infectada) e 600 vezes o seu peso em pH básico (ferida infectada), o que mostra que o material atende à condição de utilização em feridas com elevada produção de exsudato a partir da sua capacidade de retenção de fluidos.

Os resultados da avaliação do comportamento dos nanocompósitos em diferentes pHs indicam que o material é promissor para o uso em curativos inteligentes com alta formação de exsudato e que possam identificar o estado de uma ferida e agir de modo preventivo e/ou corretivo, uma vez que a ocorrência de feridas infectadas está associada com o aumento do valor do pH do meio [6].

A capacidade de transmissão do vapor d'água (TVA) foi empregada para avaliar a habilidade de penetração e transposição da água através do material seco. A permeabilidade a umidade e gases através do filme polimérico utilizado para curativo é importante para manter a ferida confortável e auxiliar no processo de cicatrização. Foi relatado que o filme deve ser permeável na medida em que um exsudato úmido sob o curativo deve ser mantido, evitando a absorção excessiva de fluido e a evaporação, levando à dessecação do leito da ferida [257].

A Figura 5.14 mostra o gráfico de TVA dos nanocompósitos. Através do ensaio foi possível observar que a TVA das amostras foi pouco afetada pela incorporação de VB no sistema. Esse comportamento pode indicar que o VB estaria suficientemente disperso na camada de PVA a ponto de não dificultar ou impedir a passagem de água pelos nanocompósitos [258].



**Figura 5. 14:** Permeabilidade ao vapor de água das amostras secas de Pol-0VB, Pol-2.5VB, Pol-5VB e Pol-10VB. Os dados obtidos não apresentaram variação estatisticamente significativa. (Fonte: Própria autora)

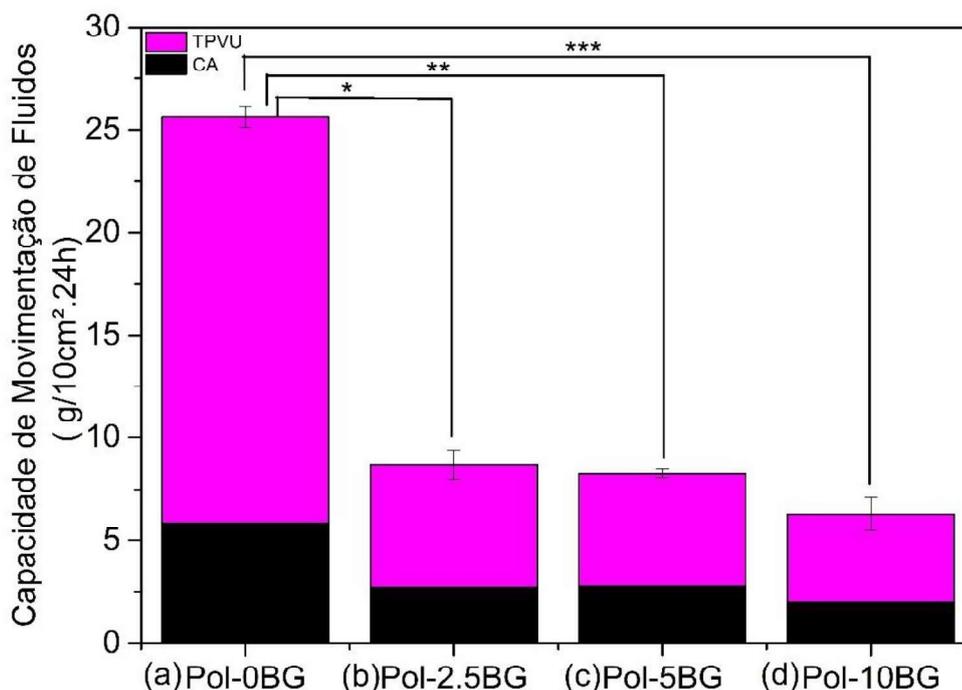
Os valores de transmissão de vapor de água foram altos para todas as amostras e apresentaram uma grande variação na TVA ao longo do tempo, onde as primeiras 24 h representaram o maior TVA com queda gradual nos tempos seguintes. Esses resultados provavelmente representam os momentos de maior absorção de vapor de água pelos materiais, que encontravam-se secos no momento das análises [215].

De acordo com Thomas & Young (2008), injúrias teciduais provocadas por queimaduras de 2º grau, queimadura de 3º grau, tecido de granulação e úlceras de pressão são ferimentos que demandam maiores taxas de TVA (4274,40 m<sup>2</sup>.24h; 3436,80 m<sup>2</sup>.24h; 5138,40 m<sup>2</sup>.24h; 9756,24 g/ m<sup>2</sup>.24h, respectivamente) [259,260]. Portanto, os nanocompósitos altamente permeáveis desenvolvidos neste estudo podem ser empregados em curativos com diversos tipos de ferimentos.

A Capacidade de Movimentação de Fluidos (CMF) de um curativo refere-se à sua capacidade de drenar o exsudato, que é o líquido produzido por uma ferida, por meio de capacidade de absorção (CA) ou permeação na forma de transmissão de vapor úmido (TVPU) [261]. Estudos demonstram que uma ferida na pele pode produzir, em média, 5 g de exsudato por cada 10 cm<sup>2</sup> de área afetada por dia [262]. Portanto, materiais com alta CMF podem absorver uma quantidade excessiva de exsudato, levando à desidratação da ferida, enquanto materiais com baixa CMF podem resultar em acúmulo excessivo de exsudato, o que pode causar problemas no processo de cicatrização, como pressão contrária na ferida, infecção ou vazamento nas bordas do curativo. Esses fatores podem causar desconforto, dor e comprometer a barreira microbiológica fornecida pelo curativo [261,263].

Os valores médios de CMF obtidos para os nanocompósitos Pol-0VB, Pol-2.5VB, Pol-5VB e Pol-10VB foram, respectivamente,  $19,8 \pm 0,5$  g/10 cm<sup>2</sup>/24 h;  $6,0 \pm 0,7$  g/10 cm<sup>2</sup>/24 h;  $5,5 \pm 0,22$  g/10cm<sup>2</sup>/24 h e  $4,3 \pm 0,81$  g/10cm<sup>2</sup>/24 h (Figura 5.15). Os resultados mostram que a amostra Pol-0VB teria uma CMF muito superior àquela sugerida como ideal por dia (5 g/10cm<sup>2</sup>), indicando que essa composição levaria à desidratação de uma ferida. Ao incorporar VB nos nanocompósitos, os resultados indicam que a CA é similar para todas as amostras (2,7 g/10cm<sup>2</sup>; 2,8 g/10cm<sup>2</sup> e 2,0 g/10cm<sup>2</sup>), enquanto a TVPU diminui com a incorporação de VB ao sistema, o que indicaria que a presença do VB dificultou a passagem de moléculas de água entre os meios interno e externo. A título de comparação, os nanomateriais aqui produzidos poderiam ser empregados no tratamento de diversos tipos de feridas (incluindo

queimadura de 3º grau, área doadora e úlcera de perna com nível de exsudato de 4,5 g/10 cm<sup>2</sup>/dia; 3,6 g/10 cm<sup>2</sup>/dia e 5,3 g/10 cm<sup>2</sup>/dia – respectivamente [264]), tal qual curativos comerciais como o ActivHeal® (CMF= 4.6 g/10 cm<sup>2</sup>/24 h) ou o Tegaserb® (CMF= 5.01 g/10 cm<sup>2</sup>/24 h) [262,263]. Assim, os valores de CMF encontrados para as membranas sugerem que elas poderiam ser utilizadas no tratamento de feridas moderadas e graves com altos níveis de produção de exsudato.



**Figura 5.15:** Capacidade de movimentação de fluidos das amostras Pol-0VB, Pol-2.5VB, Pol-5VB e Pol-10VB. Os asteriscos (\*, \*\* e \*\*\*) indicam diferença estatística entre os grupos experimentais (Fonte: Própria autora)

### 5.5.6 Estudo da sensibilidade dos nanocompósitos em pH alcalino

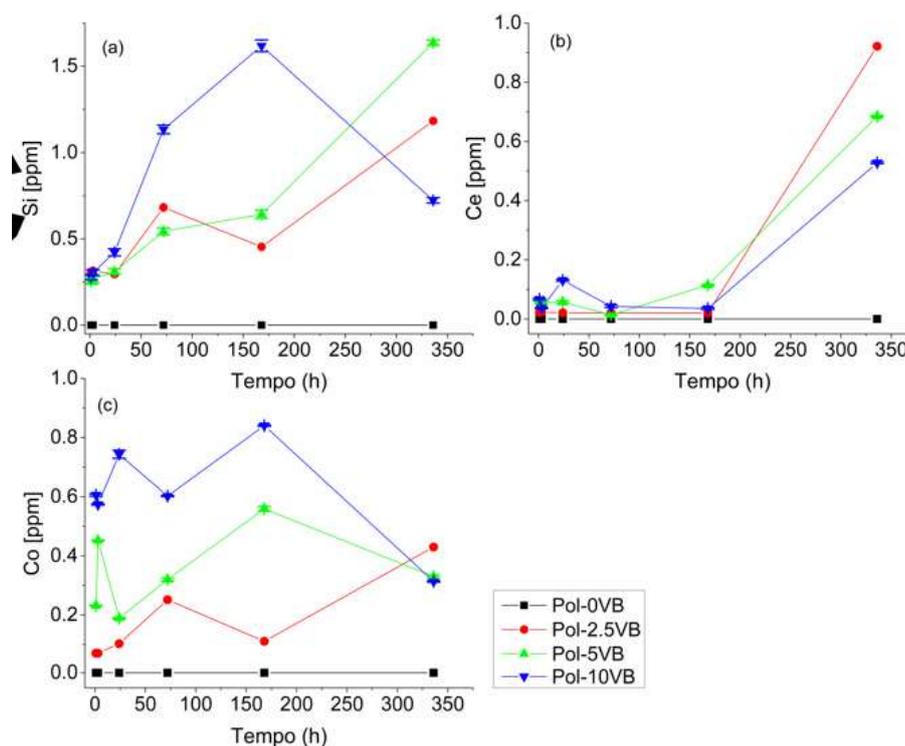
#### Liberação iônica

O ensaio de liberação iônica é amplamente utilizado para avaliar a capacidade de dissolução de uma dada composição de VB em diferentes meios [177,185], além de avaliar – quando necessário - a formação de hidroxiapatita carbonatada na superfície do material. A maioria desses meios, entretanto, não simula a composição química da secreção extra corpórea de exsudato de feridas (SEF). A SEF pode ser facilmente produzida a partir da dissolução de cloretos de sódio e cálcio em água e é usulamente utilizada para simulação da absorção de exsudato por curativos [116]. Portanto, o ensaio de liberação de íons dos nanocompósitos foi

feito em uma solução simulada de exsudato de feridas em pH básico para que simulasse uma ferida infectada.

A liberação de fármacos solúveis em água, aprisionadas numa membrana, ocorre somente depois da penetração de água na rede polimérica que incha e dissolve o fármaco, seguida pela difusão ao longo da via aquosa até a superfície do dispositivo [265]. Espera-se que o comportamento de liberação de íons do VB-1CeCo tenha seguido essa linha de raciocínio.

A Figura 5.16-a apresenta o perfil de liberação de Si para as amostras de nanocompósitos sintetizadas neste estudo. As amostras apresentaram liberação crescente de Si para as primeiras horas (1 h, 3 h e 24 h) do ensaio. A liberação de Si para as amostras Pol-2.5VB, Pol-5VB e Pol-10VB ficaram em torno de 0,30 ppm. O valor máximo de liberação de Si ocorre para a amostra Pol-10VB no tempo de 168 h com 1,62 ppm, seguido de decréscimo da liberação deste elemento (0,72 ppm). Diferentemente da amostra de Pol-10VB, o perfil de liberação observado a amostra Pol-5VB mostra taxa crescente de liberação com liberação máxima em 336 h (1,63 ppm), já para a amostra Pol-2.5VB a liberação máxima de Si ocorre em 336 h (1,18 ppm) de ensaio, sendo que em 72 h a liberação foi 0,68 ppm e em 168 h a liberação foi de 0,45 ppm. Para a regeneração dérmica, especialmente, o silício tem papel estrutural importante, pois auxilia nas síntese de colágeno e ativa enzimas, melhorando a resistência e a elasticidade da pele [187].



**Figura 5. 16:** Perfil de liberação de íons (a) Si, (b) Ce e (c) Co para amostras sintetizadas após imersão de SEF. (Fonte: Própria autora)

A Figura 5.16-b traz os perfis de liberação de Ce para as amostras de nanomateriais produzidas neste estudo. Os perfis de liberação de Ce indicam que a amostra Pol-2.5VB libera, até 168 h de ensaio, aproximadamente 0,021 ppm de Ce para o meio, tendo maior ápice de liberação em 336 h (0,92 ppm) – o que foi uma surpresa neste estudo, visto que era esperado que esta amostra possuísse menor liberação devido à menor concentração de íons, assim, ensaios adicionais precisam ser feitos para elucidar este comportamento. A amostra Pol-5VB libera, aproximadamente, 0,06 ppm de Ce nas primeiras 24 h do ensaio, tendo ápice de liberação em 336 h (0,7 ppm). Já a amostra Pol-10VB possui a maior variação em concentração nos tempos entre as amostras estudadas (0,04 ppm a 0,5 ppm).

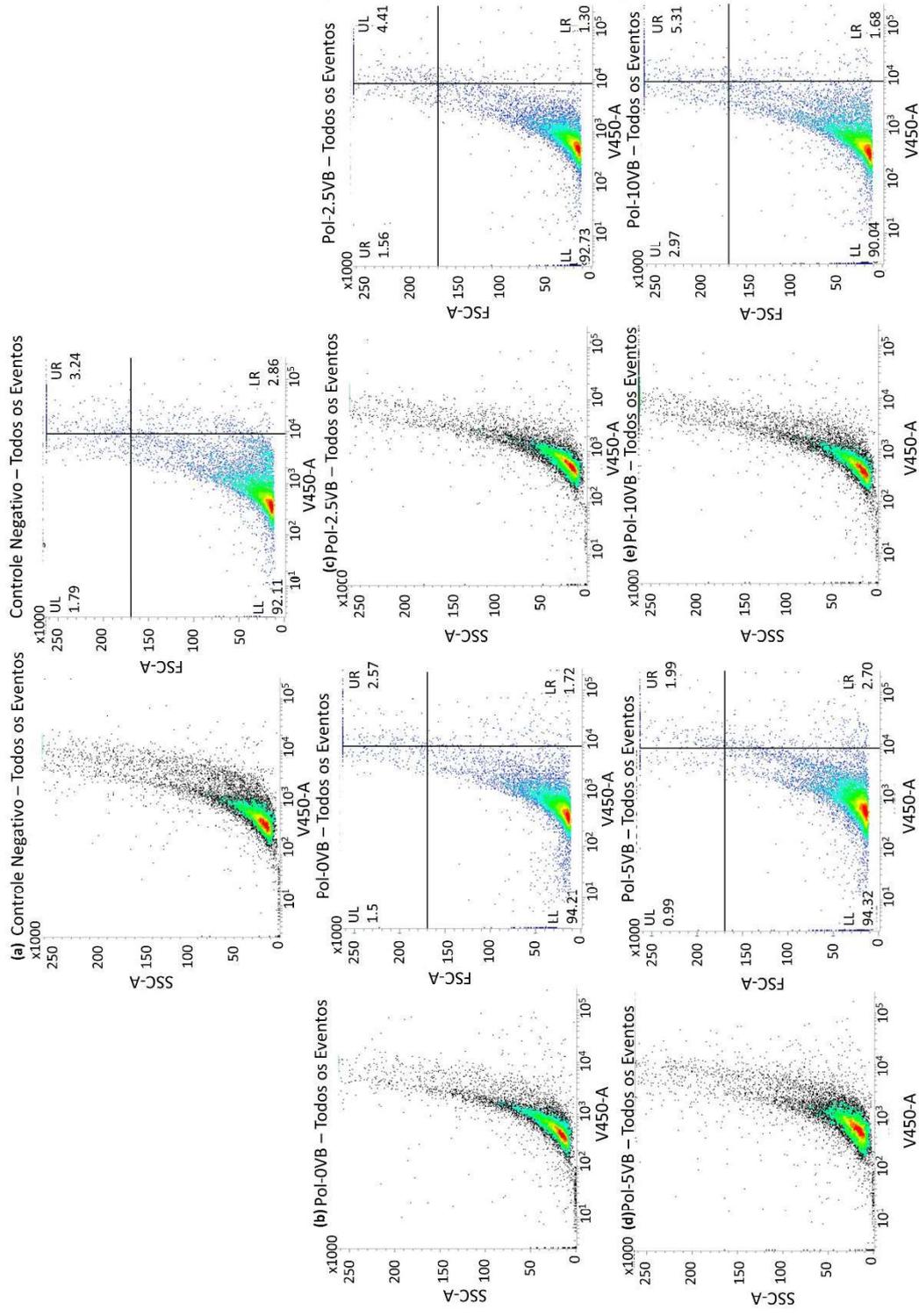
A Figura 5.16-c apresenta os perfis referentes à liberação de Co, sendo possível observar que a amostra Pol-10VB apresenta maior liberação de Co para o meio nas 168 h iniciais do ensaio (0,57 ppm; 0,74 ppm; 0,60 ppm e 0,84 ppm, respectivamente), apresentando decréscimo apenas após este tempo (0,31 ppm). A amostra Pol-5VB apresentou a segunda maior liberação de íons Co, seguida pela amostra Pol-2.5VB. Ambas amostras apresentaram liberação crescente de Co nas primeiras 24 h de ensaio, o que indicaria que uma ferida estaria sendo tratada nas primeiras horas de contato com o curativo.

Tal qual esperado, não houve identificação de íons Si, Ce e Co para a amostra Pol-0VB. Os perfis de dissolução mostram que os nanocompósitos deste estudo foram capazes de liberar, quando incubadas em meio básico, íons terapêuticos. As faixas de liberação consideradas terapêuticas para um íon ser considerado terapêutico, de acordo com a literatura, é de 15 ppm a 30 ppm para o Si; 3 ppm a 12 ppm para o Co estimular a angiogênese [266]; e, com relação ao Ce, não foi encontrada uma faixa definida para sua ação terapêutica, mas estima-se que o óxido de cério aja como antiinflamatório e antioxidante entre ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) o que indica por volta de qual faixa terapêutica poderia ser a dos íons de Ce [267]. Isso indica que maiores % p/p de VB-1CeCo poderiam ser incorporados ao curativo, visto que a liberação de Si, Ce e Co ficaram abaixo da faixa terapêutica destes íons. Diante dos resultados de liberação de íons e das restrições deste estudo, conclui-se que as amostras têm potencial para aplicação como curativo para o tratamento de lesões cutâneas.

### **5.5.7 Estudo biológico *in vitro***

#### **Análise da viabilidade celular**

A técnica de citometria de fluxo foi empregada neste trabalho a fim de analisar a viabilidade celular e biocompatibilidade dos curativos a partir da integridade da membrana celular de células embrionárias de rim humano (HEK293). Trabalhos voltados para o desenvolvimento de curativos realizaram ensaios biológicos empregando células HEK293 que se mostraram uma boa opção para ensaios primários de biocompatibilidade de biomateriais [268,269]. As Figuras 5.17-a a 5.17-e representam o espalhamento do feixe de laser ao longo de seu caminho (FSC) como função do seu espalhamento lateral (SSC) medido em um ângulo de noventa graus. Assim, FSC é proporcional ao diâmetro da célula e é principalmente devido à difração de luz na superfície da célula. Estes gráficos revelam um perfil de baixa citotoxicidade dos nanocompósitos, onde se observam populações significativas de células vivas (pontos azuis). Por outro lado, o SCC está associado à luz refratada ou refletida na interface entre o laser e as estruturas intracelulares, fornecendo informações sobre a granularidade das células examinadas [193]. Os gráficos de citometria de fluxo têm quatro quadrantes, incluindo LL (inferior esquerdo; que denotam células viáveis (vivas)), LR (inferior direito), UR (superior direito) e UL (superior esquerdo) [270].



**Figura 5. 17:** Avaliação in vitro da biocompatibilidade em células HEK-293 por citometria de fluxo. Gráfico de SSC em função de FSC (a) Controle negativo; (b) Pol-0VB; (c) Pol-2.5VB; (d) Pol-5VB e (e) Pol-10VB. (Fonte: Própria autora)

A Tabela V.6 resume os dados de viabilidade celular (LL) obtidos na análise de citometria de fluxo. Os dados revelam que todas as amostras apresentaram uma população de células viáveis acima de 70 %, indicando que os nanocompósitos produzidos são biocompatíveis [271]. Não foram encontradas relações no aumento ou diminuição de viabilidade celular diretamente relacionadas à incorporação de VB nas amostras dos nanocompósitos.

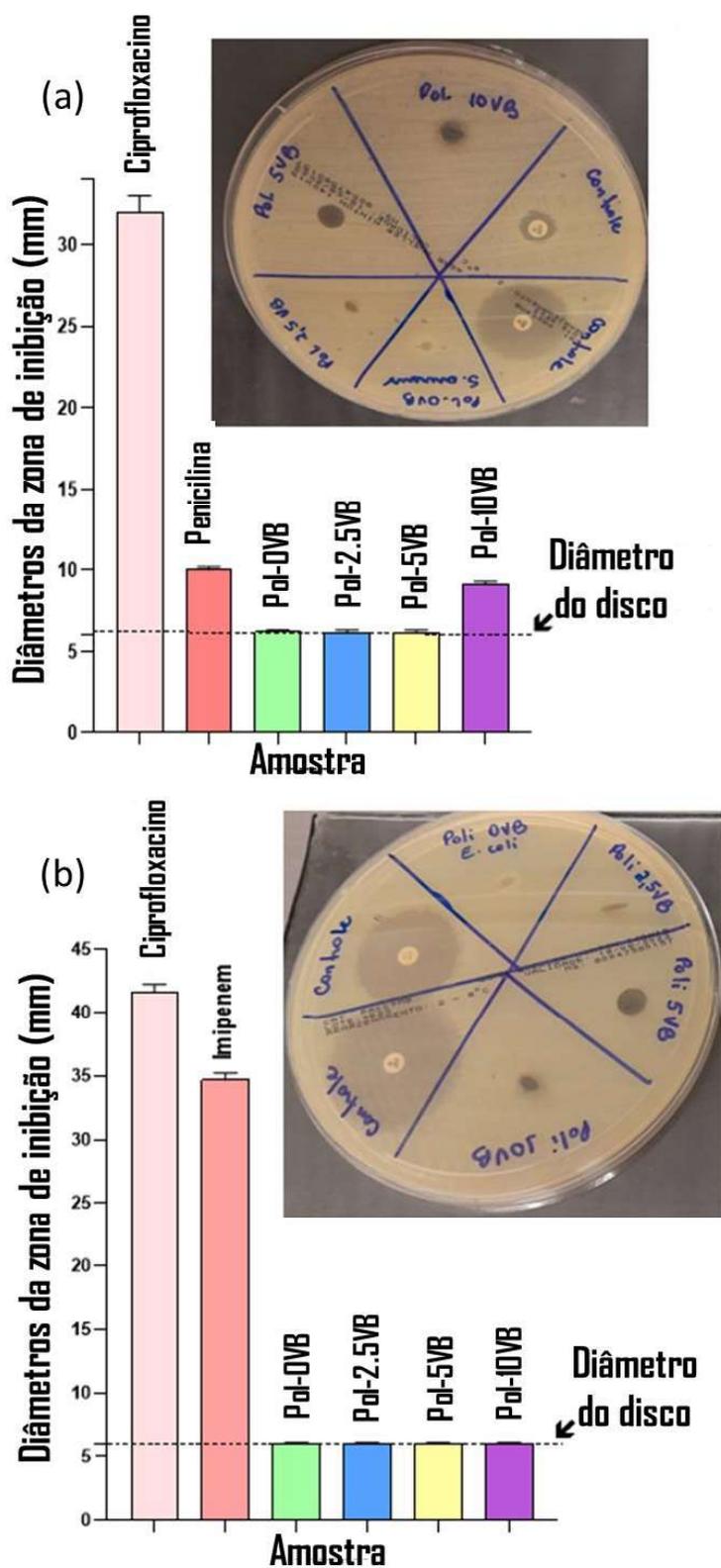
**Tabela 5. 6:** Porcentagem de células viáveis para cada um dos nanocompósitos produzidos.

<b>Amostra</b>	<b>% Viabilidade Celular (LL)</b>
Controle Negativo	92,1
Pol-0VB	94,2
Pol-2.5VB	92,7
Pol-5VB	94,3
Pol-10VB	90,0

Ensaio adicionais devem ser realizados para a completa compreensão do comportamento biológico dos nanocompósitos produzidos, bem como estudos que envolvam diferentes tipos celulares e modelos *in vivo*. Os resultados preliminares mostram que os curativos são citocompatíveis para células HEK293, reforçando seu uso promissor como biomaterial no tratamento de feridas crônicas.

### **Análise da atividade antimicrobiana dos nanocompósitos**

A atividade antimicrobiana dos nanocompósitos foi avaliada pelo método de disco-difusão para *E. coli* e *S. aureus*. A Figura 5.18 traz os diâmetros da zona de inibição obtidos para as amostras de Ciprofloxacino (controle), Penicilina (controle), Imipenem (controle), Pol-0VB, Pol-2.5VB, Pol-5VB e Pol-10VB, bem como imagens digitais dos nanocompósitos imersos nas placas de ágar contendo as referidas bactérias.



**Figura 5. 18:** Halo de inibição medido para diferentes amostras utilizadas nos testes de difusão em disco de ágar Bauer-Kirby contra a bactéria (a) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); (b) *Escherichia coli* (ATCC 25922). Inserção: fotografias das placas de ágar utilizadas neste teste, onde são observadas as zonas de difusão. (Fonte: Própria autora)

Os resultados indicaram uma resposta negativa para os nanocompósitos de PVA/PAA e VB-1CeCo para *E. coli* (Figura 5.18-b). Porém, a amostra Pol-10VB mostrou-se eficiente no combate de *S. aureus* (Figura 5.18-a), o que indicaria que na concentração de 10 % m/m do VB em um curativo de dupla camada polimérica PVA/PAA há combate de infecções por bactérias gram-positivas. Ambas bactérias estão frequentemente associadas à infecções cutâneas e resistência a antibióticos e antissépticos [272], porém estudo realizado por Bessa e colaboradores (2015) mostra que a ocorrência de infecções cutâneas por bactéria *S. aureus* tende a ser maior (37 %) do que a ocorrência de infecções por *E. coli* (6 %) [273].

Assim, com o teste do disco-difusão em ágar foi possível observar que o efeito antibacteriano dos curativos está intrinsecamente associado à sua concentração de VB-1CeCo nos nanocompósitos. Portanto, nanocompósitos com maiores concentrações de VB-1CeCo seriam alternativas promissoras para o tratamento de feridas cutâneas relacionadas às bactérias gram-positivas, podendo diminuir o uso de antibióticos de uso sistêmico e seus efeitos colaterais nos pacientes.

## 5.6 Conclusões da sessão

Neste estudo, foram produzidos hidrogéis de dupla camada de PVA/PAA com propriedades de resposta inteligente, bem como nanocompósitos de PVA/PAA contendo nanopartículas de vidro bioativo com íons de cério (Ce) e cobalto (Co) incorporados. Os hidrogéis foram obtidos por meio da dissolução e secagem do PVA e/ou PVA-VB, seguidas pela polimerização de PAA em sua superfície. Análises térmicas dos nanocompósitos revelaram interações mecânicas entre o PVA e a carga cerâmica do VB. Análises de infravermelho confirmaram interação por ligação de hidrogênio entre o PVA e o PVA. A resistência mecânica do material, avaliada por meio de ensaios de tração, mostrou-se dependente da resistência mecânica do PVA e da quantidade de VB incorporada no polímero, sendo que maior quantidade de VB resultou em maior fragilidade do material. Os curativos produzidos demonstraram alta hidrofiliabilidade, sendo altamente responsivos ao meio (com maior absorção de fluidos em pH mais elevado), apresentaram boa permeabilidade ao vapor de água e capacidade de movimentação de fluidos semelhante a curativos comerciais. Além disso, os curativos mostraram ter viabilidade celular em testes de citometria de fluxo e apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria *S. aureus*. Portanto, o material desenvolvido neste estudo possui potencial promissor como biomaterial

para o tratamento de feridas cutâneas, devido à sua capacidade de controle inteligente e responsivo ao pH, permitindo a liberação de íons terapêuticos.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 6.1 Conclusões gerais

Nanopartículas de vidro bioativo contendo concomitantemente os íons terapêuticos cério e cobalto em diferentes concentrações foram sintetizadas com sucesso a partir da rota sol-gel e metodologia de incorporação de íons por impregnação pós-síntese. As nanopartículas apresentaram morfologia esférica, mesoporosidade com poros ordenados e alta área superficial. As análises químicas e estruturais confirmaram a incorporação dos íons cério e cobalto na rede do vidro bioativo, agindo como modificadores e formadores de rede do material. As amostras de vidro bioativo apresentaram propriedades mesoporosas com tendência à diminuição do tamanho médio dos poros a partir do aumento da concentração de íons presentes no material. A liberação de íons cério e cobalto na solução de exsudato simulado de feridas foi confirmada, indicando o potencial de utilização dos vidros bioativos como biomateriais com liberação terapêutica controlada. Além disso, os vidros bioativos dopados com cério e cobalto mostraram eficiência na atividade bactericida contra a bactéria *S. aureus*, com maior eficácia observada em amostras com concentrações mais elevadas de íons terapêuticos. Os vidros bioativos demonstraram ser biocompatíveis em ensaios de citotoxicidade em diversas linhagens celulares, indicando potencial para uso em biomateriais no tratamento de lesões cutâneas crônicas. Os fatores acima indicam que as propriedades física e químicas do material são diretamente dependentes da concentração de íons imposta à síntese. Por apresentar capacidade antimicrobiana, viabilidade celular condizente e capacidade antioxidante, a amostra VB-1CeCo foi selecionada para ser incorporada em estudo de curativos bicamada de PVA/PAA.

A proposta de aplicação dos VBs empregados em curativos bicamada PVA/PAA e que fossem responsivos ao pH do meio foi estudada. Os curativos produzidos a partir dos nanocompósitos mostraram alta hidrofiliabilidade, boa permeabilidade ao vapor de água e capacidade de movimentação de fluidos, além de serem responsivos ao pH. Isso indica que os materiais possuem boas propriedades para a aplicação como curativos de lesões cutâneas. Além disso, os curativos demonstraram ser biocompatíveis e apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria *S. aureus*, que são bactérias com alta incidência de infecção e causadoras de lesões crônicas. O material desenvolvido neste estudo possui potencial promissor como biomaterial para o tratamento de feridas cutâneas, devido à sua capacidade de controle inteligente e responsivo ao pH, permitindo a liberação de íons terapêuticos.

## 6.2 Sugestões para trabalhos futuros

- Caracterização estrutural dos vidros bioativos por  $^{29}\text{Si}$  NMR para melhor compreensão do papel de Co e Ce na rede do material;
- Avaliar o tamanho de poros dos materiais por Density Functional Theory (DFT);
- Avaliação *in vivo* do potencial de regeneração da pele dos vidros bioativos a partir da exposição do VB em feridas cutâneas por diferentes períodos de tempo;
- Confirmação do potencial angiogênico de vidros bioativos contendo Co pela expressão de VEGF e HIF-1 $\alpha$  *in vitro* e de limites de concentração iônica;
- Associação do VB no sistema polimérico em concentrações acima de 10 % m/m;
- Associação do VB ao PAA e ao PVA da dupla camada polimérica;
- Avaliação *in vivo* do potencial de regeneração da pele, bem como a capacidade de tratamento de infecções dos nanocompósitos em feridas cutâneas por diferentes períodos de tempo;
- Incorporar fármacos, como analgésicos, que possam ter ação tópica e auxiliar na diminuição da dor.

## 7. REFERÊNCIAS

- [1] Malheiro LF, Magano R, Ferreira A, Sarmiento A, Santos L. Infecções da pele e de tecidos moles na unidade de terapia intensiva: estudo retrospectivo em um centro terciário. *Rev Bras Ter Intensiva* 2017. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20170019>.
- [2] Simões D, Miguel SP, Ribeiro MP, Coutinho P, Mendonça AG, Correia IJ. Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *Eur J Pharm Biopharm* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.022>.
- [3] Caló E, Khutoryanskiy V V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur Polym J* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>.
- [4] Op 't Veld RC, Walboomers XF, Jansen JA, Wagener FADTG. Design Considerations for Hydrogel Wound Dressings: Strategic and Molecular Advances. *Tissue Eng Part B Rev* 2020. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0281>.
- [5] Hoffman AS. Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation. *Adv Drug Deliv Rev* 2013. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.11.004>.
- [6] Tavakoli J, Mirzaei S, Tang Y. Cost-effective double-layer hydrogel composites for wound dressing applications. *Polymers (Basel)* 2018;10. <https://doi.org/10.3390/polym10030305>.
- [7] Rahmati M, Mozafari M. Selective Contribution of Bioactive Glasses to Molecular and Cellular Pathways. *ACS Biomater Sci Eng* 2020. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01078>.
- [8] Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater* 2015;23:S53–82. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.019>.
- [9] Mosqueira L, Barrioni BR, Martins T, Ocarino N de M, Serakides R, Pereira M de M. *In vitro* effects of the co-release of icariin and strontium from bioactive glass submicron spheres on the reduced osteogenic potential of rat osteoporotic bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomed Mater* 2020. <https://doi.org/10.1088/1748-605x/ab9095>.
- [10] Solanki AK. Development of cobalt bioactive glasses for wound healing applications Anu Kishor Solanki 2016.
- [11] Łapa A, Cresswell M, Campbell I, Jackson P, Goldmann WH, Detsch R, et al. Ga and Ce ion-doped phosphate glass fibres with antibacterial properties and their composite for wound healing applications. *J Mater Chem B* 2019. <https://doi.org/10.1039/c9tb00820a>.
- [12] Abbasi Z, Bahrololoum ME, Shariat MH, Bagheri R. Bioactive Glasses in Dentistry : A Review. *J Glas Dent A Rev* 2015;2:1–9.
- [13] Côté AS, Cormack AN, Tilocca A. Reactive molecular dynamics: an effective tool for modelling the sol–gel synthesis of bioglasses. *J Mater Sci* 2017;52:9006–13. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1009-6>.
- [14] Zheng K, Balasubramanian P, Paterson TE, Stein R, MacNeil S, Fiorilli S, et al. Ag modified mesoporous bioactive glass nanoparticles for enhanced antibacterial activity in 3D infected skin model. *Mater Sci Eng C* 2019;103:109764. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109764>.
- [15] Tsakovska I, Pajeva I, Al Sharif M, Alov P, Fioravanzo E, Kovarich S, et al. Quantitative structure-skin permeability relationships. *Toxicology* 2017;387:27–42. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.008>.
- [16] Cetari S. noções de anatomia e histologia da pele. *dermatologia Pediatr.*, 2019.
- [17] Vowden K, Vowden P. Wound dressings: principles and practice. *Surg (United Kingdom)* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.005>.
- [18] Bertesteanu S, Triaridis S, Stankovic M, Lazar V, Chifiriuc MC, Vlad M, et al. Polymicrobial wound infections: Pathophysiology and current therapeutic approaches. *Int J Pharm* 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.012>.
- [19] Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *ABCD Arq Bras Cir Dig (São Paulo)* 2007. <https://doi.org/10.1590/s0102-67202007000100010>.
- [20] Wang L, Wang W, Liao J, Wang F, Jiang J, Cao C, et al. Novel bilayer wound dressing composed of SIS membrane with SIS cryogel enhanced wound healing process. *Mater Sci Eng C* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.024>.
- [21] Saghazadeh S, Rinoldi C, Schot M, Kashaf SS, Sharifi F, Jalilian E, et al. Drug delivery systems and materials for wound healing applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2018.

- <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.008>.
- [22] Yang Y, Zhang Y, Yan Y, Dai Y, Jin S, Liu Y, et al. A sponge-like double-layer wound dressing with chitosan and decellularized bovine amniotic membrane for promoting diabetic wound healing. *Polymers (Basel)* 2020. <https://doi.org/10.3390/polym12030535>.
- [23] Choi YK, Din FU, Kim DW, Kim Y Il, Kim JO, Ku SK, et al. Amniotic membrane extract-loaded double-layered wound dressing: Evaluation of gel properties and wound healing. *Drug Dev Ind Pharm* 2014. <https://doi.org/10.3109/03639045.2013.788015>.
- [24] Boucard N, Viton C, Agay D, Mari E, Roger T, Chancerelle Y, et al. The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials* 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.021>.
- [25] Qi P, Zheng YG, Ohta S, Kokudo N, Hasegawa K, Ito T. In Situ Fabrication of Double-Layered Hydrogels via Spray Processes to Prevent Postoperative Peritoneal Adhesion. *ACS Biomater Sci Eng* 2019. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00791>.
- [26] Ohta S, Toda T, Inagaki F, Omichi K, Shimizu A, Kokudo N, et al. The Prevention of Hepatectomy-Induced Adhesions by Bilayer Sponge Composed of Ultrapure Alginate. *J Surg Res* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2019.04.063>.
- [27] Contardi M, Russo D, Suarato G, Heredia-Guerrero JA, Ceseracciu L, Penna I, et al. Polyvinylpyrrolidone/hyaluronic acid-based bilayer constructs for sequential delivery of cutaneous antiseptic and antibiotic. *Chem Eng J* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.048>.
- [28] Eskandarinia A, Kefayat A, Agheb M, Rafienia M, Amini Baghbadorani M, Navid S, et al. A Novel Bilayer Wound Dressing Composed of a Dense Polyurethane/Propolis Membrane and a Biodegradable Polycaprolactone/Gelatin Nanofibrous Scaffold. *Sci Rep* 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59931-2>.
- [29] Varaprasad K, Raghavendra GM, Jayaramudu T, Yallapu MM, Sadiku R. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Mater Sci Eng C* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.096>.
- [30] Samchenko Y, Ulberg Z, Korotych O. Multipurpose smart hydrogel systems. *Adv Colloid Interface Sci* 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.06.005>.
- [31] Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov Today* 2002. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02255-9](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02255-9).
- [32] Park JA, Kang JK, Lee SC, Kim SB. Electrospun poly(acrylic acid)/poly(vinyl alcohol) nanofibrous adsorbents for Cu(II) removal from industrial plating wastewater. *RSC Adv* 2017. <https://doi.org/10.1039/c7ra01362k>.
- [33] Jayaramudu T, Li Y, Ko HU, Shishir IR, Kim J. Poly(acrylic acid)-Poly(vinyl alcohol) hydrogels for reconfigurable lens actuators. *Int J Precis Eng Manuf - Green Technol* 2016. <https://doi.org/10.1007/s40684-016-0047-x>.
- [34] Lu Y, Wang D, Li T, Zhao X, Cao Y, Yang H, et al. Poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) hydrogel coatings for improving electrode-neural tissue interface. *Biomaterials* 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.030>.
- [35] Huang Q, Wan C, Loveridge M, Bhagat R. Partially Neutralized Polyacrylic Acid/Poly(vinyl alcohol) Blends as Effective Binders for High-Performance Silicon Anodes in Lithium-Ion Batteries. *ACS Appl Energy Mater* 2018. <https://doi.org/10.1021/acsaem.8b01277>.
- [36] Ben Halima N. Poly(vinyl alcohol): Review of its promising applications and insights into biodegradation. *RSC Adv* 2016. <https://doi.org/10.1039/c6ra05742j>.
- [37] Aslam M, Kalyar MA, Raza ZA. Polyvinyl alcohol: A review of research status and use of polyvinyl alcohol based nanocomposites. *Polym Eng Sci* 2018. <https://doi.org/10.1002/pen.24855>.
- [38] Yin C, Xu Y, Deng S, Yue W, Zhou N. A Novel Esterase, DacApva, from *Comamonas* sp. Strain NyZ500 with Deacetylation Activity for the Acetylated Polymer Polyvinyl Alcohol. *Appl Environ Microbiol* 2021;87: <https://doi.org/10.1128/AEM.03016-20>.
- [39] Gao T, Jiang M, Liu X, You G, Wang W, Sun Z, et al. Patterned polyvinyl alcohol hydrogel dressings with stem cells seeded for wound healing. *Polymers (Basel)* 2019. <https://doi.org/10.3390/polym11010171>.
- [40] Zanela J, Casagrande M, Reis MO, Grossmann MVE, Yamashita F. Biodegradable Sheets of Starch/Polyvinyl Alcohol (PVA): Effects of PVA Molecular Weight and Hydrolysis Degree.

- Waste and Biomass Valorization 2019;10:319–26. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0051-6>.
- [41] Keller A, Warren H, Panhuis M in het. Development of a facile one-pot synthesis method for an ingestible pH sensitive actuator. *MRS Adv* 2020. <https://doi.org/10.1557/adv.2019.370>.
- [42] Santiago-Morales J, Amariei G, Letón P, Rosal R. Antimicrobial activity of poly(vinyl alcohol)-poly(acrylic acid) electrospun nanofibers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.04.052>.
- [43] Minari RJ, Caceres G, Mandelli P, Yossen MM, Gonzalez-Sierra M, Vega JR, et al. Semibatch Aqueous-Solution Polymerization of Acrylic Acid: Simultaneous Control of Molar Masses and Reaction Temperature. *Macromol React Eng* 2011. <https://doi.org/10.1002/mren.201000059>.
- [44] Saldívar-Guerra E, Vivaldo-Lima E. *Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing*. 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118480793>.
- [45] Sarac AS. Redox polymerization. *Prog Polym Sci* 1999;24:1149–204. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(99\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(99)00026-X).
- [46] Gutierrez CG, Cáceres Montenegro G, Minari RJ, Vega JR, Gugliotta LM. Scale Inhibitor and Dispersant Based on Poly(Acrylic Acid) Obtained by Redox-Initiated Polymerization. *Macromol React Eng* 2019;13:1–8. <https://doi.org/10.1002/mren.201900007>.
- [47] Florit F, Bassam PR, Cesana A, Storti G. Solution polymerization of acrylic acid initiated by redox couple Na-PS/Na-MBS: Kinetic model and transition to continuous process. *Processes* 2020;8. <https://doi.org/10.3390/pr8070850>.
- [48] Omidian H, Zohuriaan-Mehr MJ, Bouhendi H. Aqueous solution polymerization of neutralized acrylic acid using Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> redox pair system under atmospheric conditions. *Int J Polym Mater Polym Biomater* 2003;52:307–21. <https://doi.org/10.1080/00914030304914>.
- [49] Liu T, Jiao C, Peng X, Chen YN, Chen Y, He C, et al. Super-strong and tough poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) hydrogels reinforced by hydrogen bonding. *J Mater Chem B* 2018. <https://doi.org/10.1039/c8tb02556h>.
- [50] Zhu M, Hua D, Pan H, Wang F, Manshian B, Soenen SJ, et al. Green electrospun and crosslinked poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) composite membranes for antibacterial effective air filtration. *J Colloid Interface Sci* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.09.101>.
- [51] Oréfice, Rodrigo Lambert; Pereira, Marivalda de Magalhães; Mansur HS. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. 1st ed. Rio de Janeiro: 2006.
- [52] Hench LL. The story of Bioglass®. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17:967–78. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>.
- [53] Simon S, Cacaina D, Vasilescu M, Ylänen H, Hupa M. MAS-NMR support for Hench model in the case of bioactive glass microspheres. *J Mater Sci* 2017;52:8998–9005. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1058-x>.
- [54] Pereira MM, Clark AE, Hench LL. Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro. *J Biomed Mater Res* 1994;28:693–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.820280606>.
- [55] Kargozar S, Mozafari M, Hamzehlou S, Bairo F. Using bioactive glasses in the management of burns. *Front Bioeng Biotechnol* 2019;7:1–12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00062>.
- [56] Martins T, Oliveira AAR, Oliveira AC, Boaventura TP, Barrioni BR, Costa-Júnior ES, et al. Novel 3D composites with highly flexible behavior based on chitosan and bioactive glass for biomedical applications. *Mater Chem Phys* 2017;189:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2016.12.012>.
- [57] Martins T, Moreira CDF, Costa-Júnior ES, Pereira MM. In vitro degradation of chitosan composite foams for biomedical applications and effect of bioactive glass as a crosslinker. *Biomed Glas* 2018;4:45–56. <https://doi.org/10.1515/bglass-2018-0005>.
- [58] Zheng K, Boccaccini AR. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review. *Adv Colloid Interface Sci* 2017;249:363–73. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.03.008>.
- [59] Ajita J, Saravanan S, Selvamurugan N. Effect of size of bioactive glass nanoparticles on mesenchymal stem cell proliferation for dental and orthopedic applications. *Mater Sci Eng C* 2015;53:142–9. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.04.041>.
- [60] Li H, Wu Z, Zhou Y, Chang J. Bioglass for skin regeneration. *Biomater. Ski. Repair Regen.*, 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102546-8.00008-x>.
- [61] Owens G, Singh RK, Foroutan F, Alqaysi M, Han C-M, Mahapatra C, et al. Sol-gel Based Materials for Biomedical Applications. *Prog Mater Sci* 2016;77:1–79.

- <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.12.001>.
- [62] Hench LL, West JK. The sol-gel process. *Chem Rev* 1990;90:33–72. <https://doi.org/10.1021/cr00099a003>.
- [63] Rahman IA, Padavettan V. Synthesis of Silica nanoparticles by Sol-Gel: Size-dependent properties, surface modification, and applications in silica-polymer nanocomposites- A review. *J Nanomater* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/132424>.
- [64] Green DL, Lin JS, Lam YF, Hu MZC, Schaefer DW, Harris MT. Size, volume fraction, and nucleation of Stober silica nanoparticles. *J Colloid Interface Sci* 2003. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00610-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00610-6).
- [65] Utech S, Boccaccini AR. A review of hydrogel-based composites for biomedical applications: enhancement of hydrogel properties by addition of rigid inorganic fillers. vol. 51. Springer US; 2016. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9382-5>.
- [66] Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interface Sci* 1968. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5).
- [67] Brauer DS. Bioactive glasses - Structure and properties. *Angew Chemie - Int Ed* 2015;54:4160–81. <https://doi.org/10.1002/anie.201405310>.
- [68] Christie JK, de Leeuw NH. Effect of strontium inclusion on the bioactivity of phosphate-based glasses. *J Mater Sci* 2017;52:9014–22. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1155-x>.
- [69] Rabiee SM, Nazparvar N, Azizian M, Vashae D, Tayebi L. Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review. *Ceram Int* 2015;41:7241–51. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.02.140>.
- [70] Barrioni BR, Oliveira AC, de Fátima Leite M, de Magalhães Pereira M. Sol–gel-derived manganese-releasing bioactive glass as a therapeutic approach for bone tissue engineering. *J Mater Sci* 2017;52:8904–27. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0944-6>.
- [71] Greasley SL, Page SJ, Sirovica S, Chen S, Martin RA, Riveiro A, et al. Controlling particle size in the Stöber process and incorporation of calcium. *J Colloid Interface Sci* 2016;469:213–23. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.01.065>.
- [72] Xie H, Sha S, Lu L, Wu G, Jiang H, Boccaccini AR, et al. Cerium-Containing Bioactive Glasses Promote In Vitro Lymphangiogenesis 2022.
- [73] Martins TS, Hwer TLR, Freire RS. Cério: Propriedades catalíticas, aplicações tecnológicas e ambientais. *Quim Nova* 2007;30:2001–6. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422007000800035>.
- [74] Skorodumova N V., Ahuja R, Simak SI, Abrikosov IA, Johansson B, Lundqvist BI. Electronic, bonding, and optical properties of CeO<sub>2</sub> and Ce<sub>2</sub>O<sub>3</sub> from first principles. *Phys Rev B - Condens Matter Mater Phys* 2001;64:1151081–9. <https://doi.org/10.1103/physrevb.64.115108>.
- [75] Acad U, Grande C, Grande C. Atividade Antimicrobiana de Nanopartículas de Óxido de Cério 2018;2:64–95.
- [76] Kannan SK, Sundrarajan M. A green approach for the synthesis of a cerium oxide nanoparticle: Characterization and antibacterial activity. *Int J Nanosci* 2014. <https://doi.org/10.1142/S0219581X14500185>.
- [77] Deliormanlı AM. Synthesis and characterization of cerium- and gallium-containing borate bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2015;26:1–13. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5368-0>.
- [78] Zheng K, Torre E, Bari A, Taccardi N, Cassinelli C, Morra M, et al. Antioxidant mesoporous Ce-doped bioactive glass nanoparticles with anti-inflammatory and pro-osteogenic activities. *Mater Today Bio* 2020;5:100041. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100041>.
- [79] Benedetti F, Amidani L, Pelli Cresi JS, Boscherini F, Valeri S, D’Addato S, et al. Role of cerium oxide in bioactive glasses during catalytic dissociation of hydrogen peroxide. *Phys Chem Chem Phys* 2018;20:23507–14. <https://doi.org/10.1039/c8cp02271b>.
- [80] Lu B, Zhu DY, Yin JH, Xu H, Zhang CQ, Ke QF, et al. Incorporation of cerium oxide in hollow mesoporous bioglass scaffolds for enhanced bone regeneration by activating the ERK signaling pathway. *Biofabrication* 2019;11. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab0676>.
- [81] Goh YF, Alshemary AZ, Akram M, Abdul Kadir MR, Hussain R. In-vitro characterization of antibacterial bioactive glass containing ceria. *Ceram Int* 2014;40:729–37. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.06.062>.
- [82] Łapa A, Cresswell M, Campbell I, Jackson P, Goldmann WH, Detsch R, et al. Gallium- and

- Cerium-Doped Phosphate Glasses with Antibacterial Properties for Medical Applications. *Adv Eng Mater* 2020;1901577. <https://doi.org/10.1002/adem.201901577>.
- [83] Atkinson I, Anghel EM, Petrescu S, Seciu AM, Stefan LM, Mocioiu OC, et al. Cerium-containing mesoporous bioactive glasses: Material characterization, in vitro bioactivity, biocompatibility and cytotoxicity evaluation. *Microporous Mesoporous Mater* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2018.09.029>.
- [84] Lusvardi G, Stabellini FS, Salvatori R. P2O5-free cerium containing glasses: Bioactivity and cytocompatibility evaluation. *Materials (Basel)* 2019. <https://doi.org/10.3390/ma12193267>.
- [85] Malavasi G, Salvatori R, Zambon A, Lusvardi G, Rigamonti L, Chiarini L, et al. Cytocompatibility of potential bioactive cerium-doped glasses based on 45S5. *Materials (Basel)* 2019. <https://doi.org/10.3390/ma12040594>.
- [86] Nicolini V, Malavasi G, Menabue L, Lusvardi G, Benedetti F, Valeri S, et al. Cerium-doped bioactive 45S5 glasses: spectroscopic, redox, bioactivity and biocatalytic properties. *J Mater Sci* 2017;52:8845–57. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0867-2>.
- [87] Nicolini V, Gambuzzi E, Malavasi G, Menabue L, Menziani MC, Lusvardi G, et al. Evidence of catalase mimetic activity in Ce<sup>3+</sup>/Ce<sup>4+</sup> doped bioactive glasses. *J Phys Chem B* 2015;119:4009–19. <https://doi.org/10.1021/jp511737b>.
- [88] Shruti S, Salinas AJ, Malavasi G, Lusvardi G, Menabue L, Ferrara C, et al. Structural and in vitro study of cerium, gallium and zinc containing sol-gel bioactive glasses. *J Mater Chem* 2012;22:13698–706. <https://doi.org/10.1039/c2jm31767b>.
- [89] Shruti S, Salinas AJ, Lusvardi G, Malavasi G, Menabue L, Vallet-Regi M. Mesoporous bioactive scaffolds prepared with cerium-, gallium- and zinc-containing glasses. *Acta Biomater* 2013;9:4836–44. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.09.024>.
- [90] Zhang XF, Kehoe S, Adhi SK, Ajithkumar TG, Moane S, O’Shea H, et al. Composition-structure-property (Zn<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ion release) evaluation of Si-Na-Ca-Zn-Ce glasses: Potential components for nerve guidance conduits. *Mater Sci Eng C* 2011;31:669–76. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.12.016>.
- [91] Karakoti AS, Tsigkou O, Yue S, Lee PD, Stevens MM, Jones JR, et al. Rare earth oxides as nanoadditives in 3-D nanocomposite scaffolds for bone regeneration. *J Mater Chem* 2010;20:8912–9. <https://doi.org/10.1039/c0jm01072c>.
- [92] Degryse P, Bentley RA. *Archeological Geochemistry: A Comprehensive Reference Source on the Chemistry of the Earth. Encycl Geochemistry* 2017:1–11. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39193-9>.
- [93] Czarnek K, Terpilowska S, Siwicki AK. Selected aspects of the action of cobalt ions in the human body. *Cent Eur J Immunol* 2015;40:236–42. <https://doi.org/10.5114/ceji.2015.52837>.
- [94] Leysens L, Vinck B, Van Der Straeten C, Wuyts F, Maes L. Cobalt toxicity in humans—A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology* 2017;387:43–56. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.05.015>.
- [95] de Laia AGS, Barrioni BR, Valverde TM, de Goes AM, de Sá MA, Pereira M de M. Therapeutic cobalt ion incorporated in poly(vinyl alcohol)/bioactive glass scaffolds for tissue engineering. *J Mater Sci* 2020;8710–27. <https://doi.org/10.1007/s10853-020-04644-0>.
- [96] Moura D, Souza MT, Liverani L, Rella G, Luz GM, Mano JF, et al. Development of a bioactive glass-polymer composite for wound healing applications. *Mater Sci Eng C* 2017;76:224–32. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.037>.
- [97] Shi Q, Luo X, Huang Z, Midgley AC, Wang B, Liu R, et al. Cobalt-mediated multi-functional dressings promote bacteria-infected wound healing. *Acta Biomater* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.048>.
- [98] Barrioni BR, Norris E, Jones JR, Pereira M de M. The influence of cobalt incorporation and cobalt precursor selection on the structure and bioactivity of sol-gel-derived bioactive glass. *J Sol-Gel Sci Technol* 2018;88:309–21. <https://doi.org/10.1007/s10971-018-4823-7>.
- [99] Lai-Cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (Baltimore)* 2013;41:317–20. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2013.04.017>.
- [100] Finsson KW, McLean S, Di Guglielmo GM, Philip A. Dynamics of transforming growth factor beta signaling in wound healing and scarring. *Adv Wound Care* 2013;2:195–214. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0429>.

- [101] Rahim K, Saleha S, Zhu X, Huo L, Basit A, Franco OL. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microb Ecol* 2017;73:710–21. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0867-9>.
- [102] Evans E. Nutritional assessment in chronic wound care. *J Wound, Ostomy Cont Nurs* 2005;32:317–20. <https://doi.org/10.1097/00152192-200509000-00009>.
- [103] Shearer A, Montazerian M, Mauro JC. Modern definition of bioactive glasses and glass-ceramics. *J Non Cryst Solids* 2023;608:122228. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2023.122228>.
- [104] Montazerian M, Zanotto ED. A guided walk through Larry Hench's monumental discoveries. *J Mater Sci* 2017;52:8695–732. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0804-4>.
- [105] Omidi R, Alizadeh P, Soltani M. Poly (amido amine) G5 modified mesoporous silica-based pH-responsive drug-delivery system for tetracycline and ibuprofen. *Int J Polym Mater Polym Biomater* 2022;0:1–11. <https://doi.org/10.1080/00914037.2022.2071270>.
- [106] Lucas-Girot A, Mezahi FZ, Mami M, Oudadesse H, Harabi A, Le Floch M. Sol-gel synthesis of a new composition of bioactive glass in the quaternary system SiO<sub>2</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: Comparison with melting method. *J Non Cryst Solids* 2011;357:3322–7. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2011.06.002>.
- [107] Zheng B, Lin X, Zhang X, Wu D, Matyjaszewski K. Emerging functional porous polymeric and carbonaceous materials for environmental treatment and energy storage. *Adv Funct Mater* 2020;30:1907006. <https://doi.org/10.1002/adfm.201907006>.
- [108] Massera J, Vassallo-Breillot M, Törngren B, Glorieux B, Hupa L. Effect of CeO<sub>2</sub> doping on thermal, optical, structural and in vitro properties of a phosphate based bioactive glass. *J Non Cryst Solids* 2014;402:28–35. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2014.05.006>.
- [109] El-Fiqi A, Kim HW. Sol-gel synthesis and characterization of novel cobalt ions-containing mesoporous bioactive glass nanospheres as hypoxia and ferroptosis-inducing nanotherapeutics. *J Non Cryst Solids* 2021;569:120999. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2021.120999>.
- [110] Placek L, Wren AW. Cytocompatibility of Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and CeO<sub>2</sub> containing bioactive glasses to aid spinal cord recovery. 2015 41st Annu Northeast Biomed Eng Conf NEBEC 2015 2015:5–6. <https://doi.org/10.1109/NEBEC.2015.7117122>.
- [111] Placek LM, Keenan TJ, Wren AW. Bioactivity of Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and CeO<sub>2</sub> doped SiO<sub>2</sub>-SrO-Na<sub>2</sub>O glass-ceramics. *J Biomater Appl* 2016;31:165–80. <https://doi.org/10.1177/0885328216651392>.
- [112] Placek L, Wren AW. Characterization and solubility of Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and CeO<sub>2</sub> containing bioactive glasses to aid spinal cord recovery. *Proc IEEE Annu Northeast Bioeng Conf NEBEC 2014;2014-Decem:8–9*. <https://doi.org/10.1109/NEBEC.2014.6972907>.
- [113] Chang B, Chen D, Wang Y, Chen Y, Jiao Y, Sha X, et al. Bioresponsive controlled drug release based on mesoporous silica nanoparticles coated with reductively sheddable polymer shell. *Chem Mater* 2013;25:574–85. <https://doi.org/10.1021/cm3037197>.
- [114] Zeng Y, Liu Z, Wu W, Xu F, Shi J. Combining scanning electron microscopy and fast Fourier transform for characterizing mesopore and defect structures in mesoporous materials. *Microporous Mesoporous Mater* 2016;220:163–7. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.09.001>.
- [115] Lins CEC, Oliveira AAR, Gonzalez I, Macedo WAA, Pereira MM. Structural analysis of fluorine-containing bioactive glass nanoparticles synthesized by sol-gel route assisted by ultrasound energy. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 2018;106:360–6. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33846>.
- [116] Khabbaz B, Solouk A, Mirzadeh H. Polyvinyl alcohol/soy protein isolate nanofibrous patch for wound-healing applications. *Prog Biomater* 2019;8:185–96. <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00120-4>.
- [117] International Standards Organization. Biological evaluation of medical devices. ISO 10993-5:2009 Biol Eval Med Devices - Part 5 Tests Vitro Cytotox 2009:1–34.
- [118] Deliormanlı AM, Seda Vatansever H, Yesil H, Özdal-Kurt F. In vivo evaluation of cerium, gallium and vanadium-doped borate-based bioactive glass scaffolds using rat subcutaneous implantation model. *Ceram Int* 2016;42:11574–83. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.04.033>.
- [119] Eucast V. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Método de disco-difusão BrCAST-EUCAST. 2021.

- [120] Greasley SL. Bioactive glass nanoparticles for therapeutic applications 2015:1–171.
- [121] Yu B, Turdean-Ionescu CA, Martin RA, Newport RJ, Hanna J V., Smith ME, et al. Effect of calcium source on structure and properties of sol-gel derived bioactive glasses. *Langmuir* 2012;28:17465–76. <https://doi.org/10.1021/la303768b>.
- [122] Cheng Z, Landish B, Chi Z, Nannan C, Jingyu D, Sen L, et al. 3D printing hydrogel with graphene oxide is functional in cartilage protection by influencing the signal pathway of Rank/Rankl/OPG. *Mater Sci Eng C* 2018;82:244–52. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.08.069>.
- [123] Lin S, Ionescu C, Pike KJ, Smith ME, Jones JR. Nanostructure evolution and calcium distribution in sol-gel derived bioactive glass. *J Mater Chem* 2009;19:1276–82. <https://doi.org/10.1039/b814292k>.
- [124] Kurtuldu F, Kaňková H, Beltrán AM, Liverani L, Galusek D, Boccaccini AR. Anti-inflammatory and antibacterial activities of cerium-containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for drug-free biomedical applications. *Mater Today Bio* 2021;12. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100150>.
- [125] Kozon D, Zheng K, Boccardi E, Liu Y, Liverani L, Boccaccini AR. Synthesis of monodispersed Ag-doped bioactive glass nanoparticles via surface modification. *Materials (Basel)* 2016;9. <https://doi.org/10.3390/ma9040225>.
- [126] Chen F, Zhu Y. Chitosan enclosed mesoporous silica nanoparticles as drug nano-carriers: Sensitive response to the narrow pH range. *Microporous Mesoporous Mater* 2012;150:83–9. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2011.07.023>.
- [127] Lee S, Kim MS, Lee D, Kwon TK, Khang D, Yun HS, et al. The comparative immunotoxicity of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica nanoparticles in mice. *Int J Nanomedicine* 2013;8:147–58. <https://doi.org/10.2147/IJN.S39534>.
- [128] Downing MA, Jain PK. Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, properties, and biomedical applications. Elsevier Inc.; 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816662-8.00016-3>.
- [129] Arcos D, López-Noriega A, Ruiz-Hernández E, Terasaki O, Vallet-Regí M. Ordered mesoporous microspheres for bone grafting and drug delivery. *Chem Mater* 2009;21:1000–9. <https://doi.org/10.1021/cm801649z>.
- [130] de O. N. Ribeiro J, Nunes EHM, Vasconcelos DCL, Vasconcelos WL, Nascimento JF, Grava WM, et al. Role of the type of grafting solvent and its removal process on APTES functionalization onto SBA-15 silica for CO<sub>2</sub> adsorption. *J Porous Mater* 2019;26:1581–91. <https://doi.org/10.1007/s10934-019-00754-6>.
- [131] M. Vallet-Regí, J.C. Doadrio, A.L. Doadrio, I. Izquierdo-Barba JP´rez-P. Hexagonal ordered mesoporous material as a matrix for the controlled release of amoxicillin. *Solid State Ionics* 2004;172:435–439.
- [132] Yang Y, Mao Z, Huang W, Liu L, Li J, Li J, et al. Redox enzyme-mimicking activities of CeO<sub>2</sub> nanostructures: Intrinsic influence of exposed facets. *Sci Rep* 2016;6:1–7. <https://doi.org/10.1038/srep35344>.
- [133] Syam Sundar L, K. Singh M, M.B. Pereira A, C.M. Sousa A. The Cobalt Oxide-Based Composite Nanomaterial Synthesis and Its Biomedical and Engineering Applications. *Cobalt Compd Appl* 2019:1–19. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88272>.
- [134] Coco AMA, Martins T, Barrioni BR, Pereira M de M. Effect of incorporating silver on the structure and ion release profile of binary SiO<sub>2</sub>–Ag<sub>2</sub>O mesoporous bioactive glass submicron spherical particles. *Ceram Int* 2021;47:26100–8. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.06.016>.
- [135] Mu J, Zhang L, Zhao M, Wang Y. Catalase mimic property of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanomaterials with different morphology and its application as a calcium sensor. *ACS Appl Mater Interfaces* 2014;6:7090–8. <https://doi.org/10.1021/am406033q>.
- [136] Tsamesidis I, Kazeli K, Lymperaki E, Pouroutzidou GK, Oikonomou IM, Komninou P, et al. Effect of Sintering Temperature of Bioactive Glass Nanoceramics on the Hemolytic Activity and Oxidative Stress Biomarkers in Erythrocytes. *Cell Mol Bioeng* 2020;13:201–18. <https://doi.org/10.1007/s12195-020-00614-3>.
- [137] ISO 527-2. International Standard International Standard. 61010-1 © Iec2001 2003;2003:13.
- [138] Hughes JM, Budd PM, Grieve A, Dutta P, Tiede K, Lewis J. Highly monodisperse, lanthanide-containing polystyrene nanoparticles as potential standard reference materials for environmental

- “nano” fate analysis. *J Appl Polym Sci* 2015;132. <https://doi.org/10.1002/app.42061>.
- [139] Vazquez NI, Gonzalez Z, Ferrari B, Castro Y. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles by sol-gel as nanocontainer for future drug delivery applications. *Bol La Soc Esp Ceram y Vidr* 2017;56:139–45. <https://doi.org/10.1016/j.bsecev.2017.03.002>.
- [140] Kyoung-Min Kim, hye Min Kim, Won-Jae lee, chang-Woo lee, Tae-il Kim, Jong-Kwon lee, Jayoung Jeong, Seung-Min Paek J-MO. Surface treatment of silica nanoparticles for stable and charge-controlled colloidal silica. *Int J Nanomedicine* 2014;2014:9(Sup:29—40. <https://doi.org/https://doi.org/10.2147/IJN.S57922>.
- [141] Barrioni BR, de Carvalho SM, Naruphontjirakul P, Norris E, Kelly NL, Hanna J V., et al. Cobalt-containing spherical glass nanoparticles for therapeutic ion release. *J Am Ceram Soc* 2021:1–13. <https://doi.org/10.1111/jace.17916>.
- [142] Zheng K, Torre E, Bari A, Taccardi N, Cassinelli C, Morra M, et al. Antioxidant mesoporous Ce-doped bioactive glass nanoparticles with anti-inflammatory and pro-osteogenic activities. *Mater Today Bio* 2020;5:100041. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100041>.
- [143] Bhargava R, Khan S, Ahmad N, Ansari MMN. Investigation of structural, optical and electrical properties of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *AIP Conf Proc* 2018;1953:1–5. <https://doi.org/10.1063/1.5032369>.
- [144] Xu Y, Zhang F, Sheng T, Ye T, Yi D, Yang Y, et al. Clarifying the controversial catalytic active sites of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> for the oxygen evolution reaction. *J Mater Chem A* 2019. <https://doi.org/10.1039/c9ta08379k>.
- [145] George G, Anandhan S. A comparative study on the physico-chemical properties of sol-gel electrospun cobalt oxide nanofibres from two different polymeric binders. *RSC Adv* 2015;5:81429–37. <https://doi.org/10.1039/c5ra11135h>.
- [146] Tang CW, Wang C Bin, Chien SH. Characterization of cobalt oxides studied by FT-IR, Raman, TPR and TG-MS. *Thermochim Acta* 2008;473:68–73. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2008.04.015>.
- [147] Zhang F, Yuan C, Lu X, Zhang L, Che Q, Zhang X. Facile growth of mesoporous Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanowire arrays on Ni foam for high performance electrochemical capacitors. *J Power Sources* 2012;203:250–6. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2011.12.001>.
- [148] ICDD Database Search–ICDD Powder Diffraction File™ (PDF®) Search. Available Online: n.d. <https://www.icdd.com/pdfsearch/>.
- [149] Lavorato GC, Lima E, Troiani HE, Zysler RD, Winkler EL. Tuning the coercivity and exchange bias by controlling the interface coupling in bimagnetic core/shell nanoparticles. *Nanoscale* 2017;9:10240–7. <https://doi.org/10.1039/c7nr03740f>.
- [150] Davan R, Prasad RGSV, Jakka VS, Aparna RSL, Phani AR, Jacob B, et al. Cerium oxide nanoparticles promotes wound healing activity in in-vivo animal model. *J Bionanoscience* 2012;6:78–83. <https://doi.org/10.1166/jbns.2012.1074>.
- [151] Pesaraklou A, Mahdavi-Shahri N, Hassanzadeh H, Ghasemi M, Kazemi M, Mousavi NS, et al. Use of cerium oxide nanoparticles: A good candidate to improve skin tissue engineering. *Biomed Mater* 2019;14. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab0679>.
- [152] Chigurupati S, Mughal MR, Okun E, Das S, Kumar A, McCaffery M, et al. Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing. *Biomaterials* 2013;34:2194–201. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.11.061>.
- [153] Ramos-Mendoza A, Tototzintle-Huitle H, Mendoza-Galván A, González-Hernández J, Chao BS. Optical and structural properties of sol-gel SiO<sub>2</sub> layers containing cobalt. *J Vac Sci Technol A Vacuum, Surfaces, Film* 2001;19:1600–5. <https://doi.org/10.1116/1.1369787>.
- [154] Atkinson I, Anghel EM, Petrescu S, Seciu AM, Stefan LM, Mocioiu OC, et al. Cerium-containing mesoporous bioactive glasses: Material characterization, in vitro bioactivity, biocompatibility and cytotoxicity evaluation. *Microporous Mesoporous Mater* 2019;276:76–88. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2018.09.029>.
- [155] Alotaibi N, Hammud HH, Al Otaibi N, Hussain SG, Prakasam T. Novel cobalt–carbon@silica adsorbent. *Sci Rep* 2020;10:1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75367-0>.
- [156] Lenshin AS, Kashkarov VM, Domashevskaya EP, Bel'tyukov AN, Gil'mutdinov FZ. Investigations of the composition of macro-, micro- and nanoporous silicon surface by ultrasoft X-ray spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy. *Appl Surf Sci* 2015;359:550–9.

- <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.10.140>.
- [157] V. N. Sivkova, A. A. Lomovb, A. L. Vasil'evc, S. V. Nekipelovd and OVP. X-Ray and Synchrotron Studies of Porous Silicon. Microcryst NANOCRYSTALLINE, POROUS, Compos Semicond 2013;47:1048–1054. <https://doi.org/10.1134/S1063782613080174>.
- [158] Li X, Cao Z, Zhang Z, Dang H. Surface-modification in situ of nano-SiO<sub>2</sub> and its structure and tribological properties. Appl Surf Sci 2006;252:7856–61. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2005.09.068>.
- [159] Azevedo MM, Jell G, O'Donnell MD, Law R V., Hill RG, Stevens MM. Synthesis and characterization of hypoxia-mimicking bioactive glasses for skeletal regeneration. J Mater Chem 2010;20:8854–64. <https://doi.org/10.1039/c0jm01111h>.
- [160] Mekki A, Holland D, Ziq K, McConville CF. XPS and magnetization studies of cobalt sodium silicate glasses. J Non Cryst Solids 1997;220:267–79. [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(97\)00300-1](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(97)00300-1).
- [161] Lucacel Ciceo R, Todea M, Dudric R, Buhai A, Simon V. Structural effect of cobalt ions added to a borophosphate-based glass system. J Non Cryst Solids 2018;481:562–7. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2017.11.050>.
- [162] Pinna A, Torki Baghbaderani M, Vigil Hernández V, Naruphontjirakul P, Li S, McFarlane T, et al. Nanoceria provides antioxidant and osteogenic properties to mesoporous silica nanoparticles for osteoporosis treatment. Acta Biomater 2021;122:365–76. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.12.029>.
- [163] Nare RK, Ramesh S, Basavi PK. Sonication - supported synthesis of cobalt oxide assembled on an N - MWCNT composite for electrochemical supercapacitors via three - electrode configuration. Sci Rep 2022:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05964-8>.
- [164] Moteki T, Murakami Y, Noda S, Maruyama S, Okubo T. Zeolite surface as a catalyst support material for synthesis of single-walled carbon nanotubes. J Phys Chem C 2011;115:24231–7. <https://doi.org/10.1021/jp207930m>.
- [165] Navas H, Maruyama B, Weaver K, Paillet M, Zahab AA, Fossard F, et al. Interplay of interfacial compounds, catalyst thickness and carbon precursor supply in the selectivity of single-walled carbon nanotube growth. Carbon N Y 2014;80:599–609. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.09.003>.
- [166] Coulter KE, Sault AG. Effects of activation on the surface properties of silica-supported cobalt catalysts. J Catal 1995;154:56–64. <https://doi.org/10.1006/jcat.1995.1146>.
- [167] Mekki A, Holland D, McConville CF, Salim M. An XPS study of iron sodium silicate glass surfaces. J Non Cryst Solids 1996;208:267–76. [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(96\)00523-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(96)00523-6).
- [168] Division MS, City K. XPS STUDY OF CaO IN SODIUM SILICATE GLASS 1982;49:309–20.
- [169] Smith JM, Martin RA, Cuello GJ, Newport RJ. Structural characterisation of hypoxia-mimicking bioactive glasses. J Mater Chem B 2013;1:1296–303. <https://doi.org/10.1039/c3tb00408b>.
- [170] Hoppe A, Jokic B, Janackovic D, Fey T, Greil P, Romeis S, et al. Cobalt-releasing 1393 bioactive glass-derived scaffolds for bone tissue engineering applications. ACS Appl Mater Interfaces 2014;6:2865–77. <https://doi.org/10.1021/am405354y>.
- [171] Zhong C, Shi D, Zheng Y, Nelson PJ, Bao Q. Successive Release of Tissue Inhibitors of Metalloproteinase-1 Through Graphene Oxide-Based Delivery System Can Promote Skin Regeneration. Nanoscale Res Lett 2017;12. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2305-4>.
- [172] Fayez Hamam AN. Curcumin-Loaded Mesoporous Silica Particles as Wound-Healing Agent: An In vivo Study. Saudi J Med Med Sci 2019;8:17–24.
- [173] Pan Z, Zhang KR, Gao HL, Zhou Y, Yan BB, Yang C, et al. Activating proper inflammation for wound-healing acceleration via mesoporous silica nanoparticle tissue adhesive. Nano Res 2020;13:373–9. <https://doi.org/10.1007/s12274-020-2619-x>.
- [174] Alfonso Zambon, Gianluca Malavasi, Annalisa Pallini, Francesca Fraulini and GL. Cerium Containing Bioactive Glasses: A Review. ACS Biomater Sci Eng 2021;7(9):4388–4401. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00414>.
- [175] Zheng K, Balasubramanian P, Paterson TE, Stein R, MacNeil S, Fiorilli S, et al. Ag modified mesoporous bioactive glass nanoparticles for enhanced antibacterial activity in 3D infected skin model. Mater Sci Eng C 2019;103:109764. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109764>.

- [176] Fouad OA, Makhlof SA, Ali GAM, El-Sayed AY. Cobalt/silica nanocomposite via thermal calcination-reduction of gel precursors. *Mater Chem Phys* 2011;128:70–6. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.02.072>.
- [177] Solanki AK, Lali F V., Autefage H, Agarwal S, Nommeots-Nomm A, Metcalfe AD, et al. Bioactive glasses and electrospun composites that release cobalt to stimulate the HIF pathway for wound healing applications. *Biomater Res* 2021;25:1–16. <https://doi.org/10.1186/s40824-020-00202-6>.
- [178] L. Mosqueira, B. R. Barrioni, T. Martins, F. G. Melo, N. M. Ocarino RS& MMP. Strontium-releasing sol–gel bioactive glass spheres and their ability to stimulate osteogenic differentiation in osteoporotic bone marrow mesenchymal stem cells. *J Mater Res* 2021;36:459–474. <https://doi.org/https://doi.org/10.1557/s43578-020-00046-9>.
- [179] El-Fiqi A, Kim TH, Kim M, Eltohamy M, Won JE, Lee EJ, et al. Capacity of mesoporous bioactive glass nanoparticles to deliver therapeutic molecules. *Nanoscale* 2012;4:7475–88. <https://doi.org/10.1039/c2nr31775c>.
- [180] Gao Q, Xu Y, Wu D, Sun Y, Li X. pH-responsive drug release from polymer-coated mesoporous silica spheres. *J Phys Chem C* 2009;113:12753–8. <https://doi.org/10.1021/jp9043978>.
- [181] Middleton K, Fish DE. Enhanced Reader1.pdf. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2009:94–104.
- [182] Malavasi G, Lusvardi G. Composition and morphology effects on catalase mimetic activity of potential bioactive glasses. *Ceram Int* 2020;46:25854–64. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.07.067>.
- [183] Tovmasyan A, Maia CGC, Weitner T, Carballeda S, Sampaio RS, Lieb D, et al. A comprehensive evaluation of catalase-like activity of different classes of redox-active therapeutics. *Free Radic Biol Med* 2015;86:308–21. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.018>.
- [184] Varini E, Sánchez-Salcedo S, Malavasi G, Lusvardi G, Vallet-Regí M, Salinas AJ. Cerium (III) and (IV) containing mesoporous glasses/alginate beads for bone regeneration: Bioactivity, biocompatibility and reactive oxygen species activity. *Mater Sci Eng C* 2019;105. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109971>.
- [185] Mantini S, Marcolan T, Rocha B, Miranda A, Goes D, S MA De. Binary SiO<sub>2</sub> – CoO spherical bioactive glass nanoparticles for tissue engineering applications. *Ceram Int* 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.08.078>.
- [186] Barrioni BR, Laia AGS de, Valverde TM, Martins TM da M, Caliarí MV, Sá MA de, et al. Evaluation of in vitro and in vivo biocompatibility and structure of cobalt-releasing sol-gel bioactive glass. *Ceram Int* 2018;44:20337–47. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.08.022>.
- [187] De Araújo LA, Addor F, Campos PMBGM. Use of silicon for skin and hair care: An approach of chemical forms available and efficacy. *An Bras Dermatol* 2016;91:331–5. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20163986>.
- [188] Salinas AJ, Shruti S, Malavasi G, Menabue L, Vallet-Regí M. Substitutions of cerium, gallium and zinc in ordered mesoporous bioactive glasses. *Acta Biomater* 2011;7:3452–8. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.033>.
- [189] Fleury C, Petit A, Mwale F, Antoniou J, Zukor DJ, Tabrizian M, et al. Effect of cobalt and chromium ions on human MG-63 osteoblasts in vitro: Morphology, cytotoxicity, and oxidative stress. *Biomaterials* 2006;27:3351–60. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.035>.
- [190] Wu C, Zhou Y, Fan W, Han P, Chang J, Yuen J, et al. Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2012;33:2076–85. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.042>.
- [191] Raja FNS, Worthington T, Isaacs MA, Forto Chungong L, Burke B, Addison O, et al. The Antimicrobial Efficacy of Hypoxia Mimicking Cobalt Oxide Doped Phosphate-Based Glasses against Clinically Relevant Gram Positive, Gram Negative Bacteria and a Fungal Strain. *ACS Biomater Sci Eng* 2019;5:283–93. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.8b01045>.
- [192] Hoppe A, Brandl A, Bleiziffer O, Arkudas A, Horch RE, Jokic B, et al. In vitro cell response to Co-containing 1393 bioactive glass. *Mater Sci Eng C* 2015;57:157–63. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.014>.
- [193] Morozesk M, Souza I da C, Fernandes MN, Soares DCF. Airborne particulate matter in an iron mining city: Characterization, cell uptake and cytotoxicity effects of nanoparticles from PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub> and PM<sub>20</sub> on human lung cells. *Environ Adv* 2021;6:100125.

- <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100125>.
- [194] Abass AA, Abdulridha WAM, Alaarage WK, Abdulrudha NH, Haider J. Evaluating the antibacterial effect of cobalt nanoparticles against multi-drug resistant pathogens. *J Med Life* 2021;14:823–33. <https://doi.org/10.25122/jml-2021-0270>.
- [195] Gupta V, Kant V, Sharma AK, Sharma M. Comparative evaluation of antibacterial potentials of nano cobalt oxide with standard antimicrobials. *J Indian Chem Soc* 2022;99:100533. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100533>.
- [196] Mortazavi V, Mehdikhani Nahrkhalaji M, Fathi MH, Mousavi SB, Nasr Esfahani B. Antibacterial effects of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria. *J Biomed Mater Res - Part A* 2010;94:160–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32678>.
- [197] Raja FNS, Worthington T, De Souza LPL, Hanai SB, Martin RA. Synergistic Antimicrobial Metal Oxide-Doped Phosphate Glasses; A Potential Strategy to Reduce Antimicrobial Resistance and Host Cell Toxicity. *ACS Biomater Sci Eng* 2022;8:1193–9. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00876>.
- [198] Moradpoor H, Safaei M, Rezaei F, Golshah A, Jamshidy L, Hatam R, et al. Optimisation of cobalt oxide nanoparticles synthesis as bactericidal agents. *Open Access Maced J Med Sci* 2019;7:2757–62. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.747>.
- [199] Arsalan N, Kashi EH, Hasan A, Doost ME, Rasti B, Paray BA, et al. Exploring the interaction of cobalt oxide nanoparticles with Albumin, leukemia cancer cells and pathogenic bacterial by multispectroscopic, docking, cellular and antibacterial approaches. *Int J Nanomedicine* 2020;15:4607–23. <https://doi.org/10.2147/IJN.S257711>.
- [200] Al-Fakeh MS, Alsaedi RO. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of CoO Nanoparticles from a Co (II) Complex Derived from Polyvinyl Alcohol and Aminobenzoic Acid Derivative. *Sci World J* 2021;2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6625216>.
- [201] Chohan ZH, Pervez H, Rauf A, Khan KM, Supuran CT. Antibacterial cobalt (II), copper (II), nickel (II) and zinc (II) complexes of mercaptothiadiazole - Derived furanyl, thienyl, pyrrolyl, salicylyl and pyridinyl Schiff bases. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2006;21:193–201. <https://doi.org/10.1080/14756360500397505>.
- [202] Sen CK. Human Wound and Its Burden: Updated 2020 Compendium of Estimates. *Adv Wound Care* 2021;10:281–92. <https://doi.org/10.1089/wound.2021.0026>.
- [203] Ielapi N, Costa D, Peluso A, Nobile C, Venditti V, Bevacqua E, et al. Wound Care Self-Efficacy Assessment of Italian Registered Nurses and Wound Care Education in Italian Nursing Education System: A Cross-Sectional Study. *Nurs Reports* 2022;12:674–84. <https://doi.org/10.3390/nursrep12030067>.
- [204] Grand View Research. Advanced Wound Dressing Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Foam Dressings, Film Dressings), By Application, By End-use (Hospitals, Specialty Clinics), By Region, And Segment Forecasts, 2023 - 2030. 2021.
- [205] Gomes F de P, Galvão NS, Albuquerque AD. Perfil sociodemográfico e clínico dos pacientes com lesões agudas e crônicas em atendimento ambulatorial. *Rev Eletrônica Acervo Saúde* 2021;13:e5196. <https://doi.org/10.25248/reas.e5196.2021>.
- [206] Deng X, Gould M, Ali MA. A review of current advancements for wound healing: Biomaterial applications and medical devices. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 2022;110:2542–73. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35086>.
- [207] Okur ME, Karantas ID, Şenyiğit Z, Üstündağ Okur N, Sıfaka PI. Recent trends on wound management: New therapeutic choices based on polymeric carriers. *Asian J Pharm Sci* 2020;15:661–84. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.11.008>.
- [208] Wang M, Bai J, Shao K, Tang W, Zhao X, Lin D, et al. Poly(vinyl alcohol) Hydrogels: The Old and New Functional Materials. *Int J Polym Sci* 2021;2021. <https://doi.org/10.1155/2021/2225426>.
- [209] Wang L, Duan L, Liu G, Sun J, Shahbazi MA, Kundu SC, et al. Bioinspired Polyacrylic Acid-Based Dressing: Wet Adhesive, Self-Healing, and Multi-Biofunctional Coacervate Hydrogel Accelerates Wound Healing. *Adv Sci* 2023;2207352:1–16. <https://doi.org/10.1002/advs.202207352>.
- [210] Wan Hafizi Wan Ishak OYJ and IA. pH-Responsive Gamma-Irradiated Poly(Acrylic Acid)-Cellulose-Nanocrystal-Reinforced Hydrogels. *Polymers (Basel)* 2020;12.

- [211] Negut I, Ristoscu C. Bioactive Glasses for Soft and Hard Tissue Healing Applications—A Short Review. *Appl Sci* 2023;13. <https://doi.org/10.3390/app13106151>.
- [212] Baino F, Hamzehlou S, Kargozar S. Bioactive glasses: Where are we and where are we going? *J Funct Biomater* 2018;9. <https://doi.org/10.3390/jfb9010025>.
- [213] da Silva Mantini Viana M, Valverde TM, Barrioni BR, de Goes AM, de Sá MA, de Magalhães Pereira M. Binary SiO<sub>2</sub>-CoO spherical bioactive glass nanoparticles for tissue engineering applications. *Ceram Int* 2022;48:34885–94. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.08.078>.
- [214] Saatchi A, Arani AR, Moghanian A, Mozafari M. Cerium-doped bioactive glass-loaded chitosan/polyethylene oxide nanofiber with elevated antibacterial properties as a potential wound dressing. *Ceram Int* 2021;47:9447–61. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.12.078>.
- [215] Martins TM de MPE de SCJ. Desenvolvimento e caracterização de matrizes compósitas tridimensionais flexíveis de quitosana/vidro bioativo para aplicação potencial no tratamento e regeneração de lesões cutâneas. UFMG, 2017.
- [216] Disc Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2011.
- [217] Dias LLS, Mansur HS, Donnici CL, Pereira MM. Synthesis and characterization of chitosan-polyvinyl alcohol-bioactive glass hybrid membranes. *Biomater* 2011;1:114–9. <https://doi.org/10.4161/biom.1.1.17449>.
- [218] Diken ME, Kizilduman BK, Yilmaz Kardaş B, Doğan EE, Doğan M, Turhan Y, et al. Synthesis, characterization, and their some chemical and biological properties of PVA/PAA/nPS hydrogel nanocomposites: Hydrogel and wound dressing. *J Bioact Compat Polym* 2020;35:203–15. <https://doi.org/10.1177/0883911520921474>.
- [219] Iqbal M, Zafar H, Mahmood A, Niazi MBK, Aslam MW. Starch-capped silver nanoparticles impregnated into propylamine-substituted pva films with improved antibacterial and mechanical properties for wound-bandage applications. *Polymers (Basel)* 2020;12:1–17. <https://doi.org/10.3390/POLYM12092112>.
- [220] Wang M, Cheng X, Jiang G, Xie J, Cai W, Li J, et al. Preparation and pervaporation performance of PVA membrane with biomimetic modified silica nanoparticles as coating. *J Memb Sci* 2022;653:120535. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2022.120535>.
- [221] Herrera-Kao W, Aguilar-Vega M. Storage modulus changes with temperature in poly(vinyl alcohol), PVA,/poly(acrylic acid), PAA, blends. *Polym Bull* 1999;42:449–56. <https://doi.org/10.1007/s002890050488>.
- [222] Wu GM, Lin SJ, Yang CC. Preparation and characterization of PVA/PAA membranes for solid polymer electrolytes. *J Memb Sci* 2006;275:127–33. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.09.012>.
- [223] Park JY, Hwang KJ, Yoon S Do, Lee JH, Lee IH. Influence of glyoxal on preparation of poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) blend film. *J Nanosci Nanotechnol* 2015;15:5955–8. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.10470>.
- [224] Wu GM, Lin SJ, Yang CC. High performance composite solid polymer electrolyte systems for electrochemical cells. *J Power Sources* 2013;244:287–93. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.01.044>.
- [225] Jia X, Li Y, Cheng Q, Zhang S, Zhang B. Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)/silica nanocomposites derived from copolymerization of vinyl silica nanoparticles and vinyl acetate. *Eur Polym J* 2007;43:1123–31. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.01.019>.
- [226] Arndt K-F, Richter A, Ludwig S, Zimmermann J, Kressler J, Kuckling D, et al. Poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) hydrogels: FT-IR spectroscopic characterization of crosslinking reaction and work at transition point. *Acta Polym* 1999;50:383–90. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1521-4044\(19991201\)50:11/12<383::aid-apol383>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-4044(19991201)50:11/12<383::aid-apol383>3.0.co;2-z).
- [227] Goiti E, Salinas MM, Arias G, Puglia D, Kenny JM, Mijangos C. Effect of magnetic nanoparticles on the thermal properties of some hydrogels. *Polym Degrad Stab* 2007;92:2198–205. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.02.025>.
- [228] McNeill IC, Sadeghi SMT. Thermal stability and degradation mechanisms of poly(acrylic acid) and its salts: Part 1-Poly(acrylic acid). *Polym Degrad Stab* 1990;29:233–46. [https://doi.org/10.1016/0141-3910\(90\)90034-5](https://doi.org/10.1016/0141-3910(90)90034-5).
- [229] Jose J, Shehzad F, Al-Harathi MA. Preparation method and physical, mechanical, thermal characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) blends. *Polym Bull* 2014;71:2787–802.

- <https://doi.org/10.1007/s00289-014-1221-3>.
- [230] Manavi-Tehrani I, Rabiee M, Parviz M, Tahriri MR, Fahimi Z. Preparation, characterization and controlled release investigation of biocompatible pH-sensitive PVA/PAA hydrogels. *Macromol Symp* 2010;296:457–65. <https://doi.org/10.1002/masy.201051062>.
- [231] Chee BS, de Lima GG, de Lima TAM, Seba V, Lemarquis C, Pereira BL, et al. Effect of thermal annealing on a bilayer polyvinyl alcohol/polyacrylic acid electrospun hydrogel nanofibres loaded with doxorubicin and clarithromycin for a synergism effect against osteosarcoma cells. *Mater Today Chem* 2021;22:100549. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100549>.
- [232] Arik N, Inan A, Ibis F, Demirci EA, Karaman O, Ercan UK, et al. Modification of electrospun PVA/PAA scaffolds by cold atmospheric plasma: alignment, antibacterial activity, and biocompatibility. *Polym Bull* 2019;76:797–812. <https://doi.org/10.1007/s00289-018-2409-8>.
- [233] Kumeta K, Nagashima I, Matsui S, Mizoguchi K. Crosslinking reaction of poly(vinyl alcohol) with poly(acrylic acid) (PAA) by heat treatment: Effect of neutralization of PAA. *J Appl Polym Sci* 2003. <https://doi.org/10.1002/app.12910>.
- [234] Park JA, Kang JK, Lee SC, Kim SB. Electrospun poly(acrylic acid)/poly(vinyl alcohol) nanofibrous adsorbents for Cu(ii) removal from industrial plating wastewater. *RSC Adv* 2017;7:18075–84. <https://doi.org/10.1039/c7ra01362k>.
- [235] Zhang S, Shi Q, Christodoulatos C, Meng X. Lead and cadmium adsorption by electrospun PVA/PAA nanofibers: Batch, spectroscopic, and modeling study. *Chemosphere* 2019;233:405–13. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.190>.
- [236] Hafeez M, Shaheen R, Akram B, Zain-Ul-Abdin, Haq S, Mahsud S, et al. Green synthesis of cobalt oxide nanoparticles for potential biological applications. *Mater Res Express* 2020;7. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab70dd>.
- [237] García-Cerda LA, Escareño-Castro MU, Salazar-Zertuche M. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-cobalt ferrite nanocomposites. *J Non Cryst Solids* 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrsol.2006.12.046>.
- [238] Beyli PT, Doğan M, Gündüz Z, Alkan M, Turhan Y. Synthesis, Characterization and Their Antimicrobial Activities of Boron Oxide/Poly(Acrylic Acid) Nanocomposites: Thermal and Antimicrobial Properties. *Adv Mater Sci* 2018;18:28–36. <https://doi.org/10.1515/adms-2017-0025>.
- [239] Wu L, Li L, Fan M, Tang P, Yang S, Pan L, et al. Strong and tough PVA/PAA hydrogel fiber with highly strain sensitivity enabled by coating MWCNTs. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2020;138. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2020.106050>.
- [240] Lim M, Kim D, Seo J. Enhanced oxygen-barrier and water-resistance properties of poly(vinyl alcohol) blended with poly(acrylic acid) for packaging applications. *Polym Int* 2016;65:400–6. <https://doi.org/10.1002/pi.5068>.
- [241] Soliman TS, Vshivkov SA, Elkalashy SI. Structural, linear and nonlinear optical properties of Ni nanoparticles – Polyvinyl alcohol nanocomposite films for optoelectronic applications. *Opt Mater (Amst)* 2020;107:110037. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2020.110037>.
- [242] Jain N, Singh VK, Chauhan S. A review on mechanical and water absorption properties of polyvinyl alcohol based composites/films. *J Mech Behav Mater* 2017;26:213–22. <https://doi.org/10.1515/jmbm-2017-0027>.
- [243] Cheng Y, Hu Y, Xu M, Qin M, Lan W, Huang D, et al. High strength polyvinyl alcohol/polyacrylic acid (PVA/PAA) hydrogel fabricated by Cold-Drawn method for cartilage tissue substitutes. *J Biomater Sci Polym Ed* 2020;31:1836–51. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1782023>.
- [244] Chen K, Chen G, Wei S, Yang X, Zhang D, Xu L. Preparation and property of high strength and low friction PVA-HA/PAA composite hydrogel using annealing treatment. *Mater Sci Eng C* 2018;91:579–88. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.080>.
- [245] Ismail H, Zaaba NF. The mechanical properties, water resistance and degradation behaviour of silica-filled sago starch/PVA plastic films. *J Elastomers Plast* 2014;46:96–109. <https://doi.org/10.1177/0095244312462163>.
- [246] Davar F, Majedi A, Mirzaei A. Polyvinyl alcohol thin film reinforced by green synthesized zirconia nanoparticles. *Ceram Int* 2018;44:19377–82. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.07.167>.

- [247] Shi S, Wu H, Zhi C, Yang J, Si Y, Ming Y, et al. A skin-like nanostructured membrane for advanced wound dressing. *Compos Part B Eng* 2023;250:110438. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2022.110438>.
- [248] Costa NN, de Faria Lopes L, Ferreira DF, de Prado EML, Severi JA, Resende JA, et al. Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/PAA blends for use as wound dressing: In vitro analysis and physicochemical evaluation. *Mater Sci Eng C* 2020;109:110643. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110643>.
- [249] Kurkuri MD, Aminabhavi TM. Poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) sequential interpenetrating network pH-sensitive microspheres for the delivery of diclofenac sodium to the intestine. *J Control Release* 2004;96:9–20. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.12.025>.
- [250] Menzies KL, Jones L. The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials. *Optom Vis Sci* 2010;87:387–99. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181da863e>.
- [251] Lv Q, Wu M, Shen Y. Enhanced swelling ratio and water retention capacity for novel super-absorbent hydrogel. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2019;583:123972. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.123972>.
- [252] Feng D, Bai B, Wang H, Suo Y. Novel Fabrication of PAA/PVA/Yeast Superabsorbent with Interpenetrating Polymer Network for pH-Dependent Selective Adsorption of Dyes. *J Polym Environ* 2018;26:567–88. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-0972-y>.
- [253] Ashraful Alam M, Takafuji M, Ihara H. Thermosensitive hybrid hydrogels with silica nanoparticle-cross-linked polymer networks. *J Colloid Interface Sci* 2013;405:109–17. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.04.054>.
- [254] Kim J, Kang T, Kim H, Shin HJ, Oh SG. Preparation of PVA/PAA nanofibers containing thiol-modified silica particles by electrospinning as an eco-friendly Cu (II) adsorbent. *J Ind Eng Chem* 2019;77:273–9. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.04.048>.
- [255] Cardoso ELM, Natividade L de ML, Escher RB, Silva MBF da, Dutra LMA, Ferreira RP, et al. Indicação dos curativos baseado nos produtos padronizados pela secretaria de saúde do distrito federal 2019.
- [256] Padrão O, Enfermeira R, Cristine B, Maria E, Souza H De, Amaral P, et al. Coberturas para feridas 2020.
- [257] Singh B, Pal L. Sterculia crosslinked PVA and PVA-poly(AAm) hydrogel wound dressings for slow drug delivery: Mechanical, mucoadhesive, biocompatible and permeability properties. *J Mech Behav Biomed Mater* 2012;9:9–21. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.01.021>.
- [258] Cui Y, Kumar S, Rao Kona B, Van Houcke D. Gas barrier properties of polymer/clay nanocomposites. *RSC Adv* 2015;5:63669–90. <https://doi.org/10.1039/c5ra10333a>.
- [259] Lamke LO, Nilsson GE, Reithner HL. The evaporative water loss from burns and the water-vapour permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns. *Burns* 1977;3:159–65. [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(77\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0305-4179(77)90004-3).
- [260] Thomas S. SY. Exudate-handling mechanisms of two foam-film dressings. *J Wound Care* n.d.;17:309–15.
- [261] Pacheco MS, Kano GE, Paulo L de A, Lopes PS, de Moraes MA. Silk fibroin/chitosan/alginate multilayer membranes as a system for controlled drug release in wound healing. *Int J Biol Macromol* 2020;152:803–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.140>.
- [262] Thomas S LP. A comparative study of the properties of twelve hydrocolloid dressings. *World Wide Wounds* 1997;1.
- [263] Gharibi R, Yeganeh H, Gholami H, Hassan ZM. Aniline tetramer embedded polyurethane/siloxane membranes and their corresponding nanosilver composites as intelligent wound dressing materials. *RSC Adv* 2014;4:62046–60. <https://doi.org/10.1039/c4ra11454j>.
- [264] Gharibi R, Kazemi S, Yeganeh H, Tafakori V. Utilizing dextran to improve hemocompatibility of antimicrobial wound dressings with embedded quaternary ammonium salts. *Int J Biol Macromol* 2019;131:1044–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.185>.
- [265] Singh B, Pal L. Development of sterculia gum based wound dressings for use in drug delivery. *Eur Polym J* 2008;44:3222–30. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.07.013>.
- [266] Quinlan E, Partap S, Azevedo MM, Jell G, Stevens MM, O'Brien FJ. Hypoxia-mimicking bioactive glass/collagen glycosaminoglycan composite scaffolds to enhance angiogenesis and bone repair. *Biomaterials* 2015;52:358–66. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.006>.

- [267] Kim JW, Mahapatra C, Hong JY, Kim MS, Leong KW, Kim HW, et al. Functional Recovery of Contused Spinal Cord in Rat with the Injection of Optimal-Dosed Cerium Oxide Nanoparticles. *Adv Sci* 2017;4. <https://doi.org/10.1002/advs.201700034>.
- [268] Wu J, Su C, Jiang L, Ye S, Liu X, Shao W. Green and Facile Preparation of Chitosan Sponges as Potential Wound Dressings. *ACS Sustain Chem Eng* 2018;6:9145–52. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01468>.
- [269] Sathiyaseelan A, Saravanakumar K, Mariadoss AVA, Wang MH. Antimicrobial and wound healing properties of feo fabricated chitosan/pva nanocomposite sponge. *Antibiotics* 2021;10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050524>.
- [270] Rafati Z, Sirousazar M, Hassan ZM, Kheiri F. Honey-Loaded Egg White/Poly(vinyl alcohol)/Clay Bionanocomposite Hydrogel Wound Dressings: In Vitro and In Vivo Evaluations. *J Polym Environ* 2020;28:32–46. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01586-w>.
- [271] Jahani-Javanmardi A, Sirousazar M, Shaabani Y, Kheiri F. Egg white/poly (vinyl alcohol)/MMT nanocomposite hydrogels for wound dressing. *J Biomater Sci Polym Ed* 2016;27:1262–76. <https://doi.org/10.1080/09205063.2016.1191825>.
- [272] Tom IM, Ibrahim MM, Umoru AM, Umar JB, Bukar MA, Haruna AB, et al. Infection of Wounds by Potential Bacterial Pathogens and Their Resistogram. *OALib* 2019;06:1–13. <https://doi.org/10.4236/oalib.1105528>.
- [273] Bessa LJ, Fazii P, Di Giulio M, Cellini L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: Some remarks about wound infection. *Int Wound J* 2015;12:47–52. <https://doi.org/10.1111/iwj.12049>.