



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

Tese de Doutorado

**“Síntese, caracterização e avaliação citotóxica de vidro bioativo com
adição de diferentes proporções de cério.”**

Autor: Alessandra Nogueira Santos

Orientadora: Professora Marivalda de Magalhães Pereira

Junho de 2014

Alessandra Nogueira Santos

**“Síntese, caracterização e avaliação citotóxica de vidro bioativo com
adição de diferentes proporções de cério.”**

Tese de Doutorado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Engenharia
Metalúrgica e de Minas da Universidade
Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientadora: Professora Marivalda de Magalhães Pereira

Junho de 2014

Belo Horizonte

Dedico este trabalho, em especial,
às pessoas que fazem a minha
vida ser mais leve, Jardel, Víctor,
Arthur e Giovanna.

Agradecimentos

À Deus, que sempre está ao meu lado, protegendo, guiando e ensinando sempre.

Aos meus filhos, Victor Augusto, Arthur e Giovanna, pelos inúmeros ensinamentos, embora sejam tão novinhos, me fazem ter a certeza de que dias melhores virão, e que o dia de amanhã será melhor do que o de hoje, mas não melhor do que o de depois de amanhã.

Ao meu marido Jardel Araújo, pelo incentivo, apoio e amor incondicional.

Aos meus pais, Araci Augusto e Diva, por mais uma vez estarem ao meu lado me apoiando e acreditando em meu sonho.

Ao meu irmão Fábio Nogueira, exemplo de garra.

À professora Dra. Marivalda, pela orientação e ensinamentos constantes.

Ao professor e coordenador do curso Dr. Herman pelo apoio e confiança.

Ao professor Dr. Vicente Buono pelos ensinamentos e prestatividade.

Ao professor Dr. Máx pelas conversas, ensinamentos, prestatividade e amizade.

Aos demais professores que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento científico.

Aos funcionários da secretaria da Pós, em especial à Aparecida (Cida) e ao Nelson.

Aos técnicos de laboratório da UFMG, Andréia, Patrícia e Hilda. Vocês são muito especiais.

Aos colegas e amigos conquistados, em especial, Alexandra, Ágda, Elke, Sandhra, Carolina, Dickson, Luisa, Fábio, Vanessa, André, Nádia, enfim, a todos, pelo apoio e amizade.

À Capes, à Fapemig e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Por fim, a todos que, com seus conhecimentos, incentivos e críticas colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada!

Sumário

Lista de Abreviaturas	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
2.1- Objetivo Geral	4
2.2- Objetivos Específicos	4
3. Revisão Bibliográfica	5
3.1- Motivação	5
3.2- O Tecido Ósseo	7
3.3- A Osteoporose	9
3.4- A Engenharia de Tecidos	12
3.5- Biomateriais	14
3.6- Vidro Bioativo	16
3.7- Cério	18
4. Metodologia	23
4.1- Síntese do vidro bioativo com e sem cério	23
4.1.1- Síntese do vidro bioativo 70S	24
4.1.2- Síntese do vidro bioativo 70S contendo cério em diferentes concentrações	25
4.1.3- Síntese assistida por ultrassom	27
4.2- Teste de bioatividade dinâmico em SBF	27
4.3- Técnicas de caracterização utilizadas	29
4.3.1- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	29
4.3.2- Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X (EDS)	29
4.3.3- Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de <i>Fourier</i> (FTIR)	29

4.3.4- Difração de raios X (DRX)	30
4.3.5- Espectrometria de (ICP-AES)	30
4.3.6- Fluorescência de Raios X	30
4.3.7- Análise por adsorção de Nitrogênio	30
4.4- Teste de citotoxicidade	31
5. Resultados e Discussão	33
5.1- Síntese e Caracterização das amostras de Vidro Bioativo/Ce	33
5.1.1- Síntese das amostras de Vidro bioativo/Ce	
5.2- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	33
5.3- Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)	34
5.4- Caracterização da cristalinidade por Difração de Raios X	36
5.5- Espectroscopia infravermelho por Transformada de <i>Fourier</i>	38
5.6- Averiguação da composição química das amostras	41
5.7- Adsorção de Nitrogênio	42
5.8- Teste de bioatividade dinâmico em SBF	44
5.9- Análise quantitativa da solução iônica do teste de bioatividade	52
5.10- Ensaio de Citotoxicidade	55
5.11- Síntese de vidro bioativo contendo cério assistida por ultrassom	55
6. Conclusões	58
7. Trabalhos Futuros	59
8. Referências Bibliográficas	60

Lista de Abreviaturas

B.E.T. - Brunauer, Emmett e Teller

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CDTN - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

DMEM - Meio mínimo essencial Dulbecco

DRX - Difração de raios X

EDS - *Electron Dispersive Spectrometry*

FTIR - *Fourier Transform Infrared*

HA - Hidroxiapatita

HN- Ácido Nítrico

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICP – AES - *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT – *Mosmann Toxicity Test*

MSCs - Células Tronco Mesenquimais

NPs - Nanopartículas

OMS - Organização Mundial de Saúde

pH - Potencial Hidrogeniônico

rpm - Rotações por minuto

SBF – *Simulated body fluid*

SDS - *Sodium dodecil sulfate*

SUS - Sistema Único de Saúde

TEOS - Tetraetilortossilicato

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VB - Vidro Bioativo

3D - Três Dimensões

Lista de Figuras

Figura 1- Ilustração de pessoas da terceira idade	5
Figura 2- Ilustração de um osso compacto e esponjoso	8
Figura 3- Ilustração comparativa de um osso normal e um osso com osteoporose	11
Figura 4- Ilustração esquemática da regeneração de tecidos utilizada pela engenharia de tecidos	13
Figura 5- Comparação de NPs de cério com outros antioxidantes	19
Figura 6- Representação do aumento de tempo de cultura de células cerebrais, quando sujeitas à presença de nanocéria	20
Figura 7- Tratamento com NPs de céria aumentou a proliferação de MSCs comparado ao controle. O nível de aumento depende da formulação da nanocéria	21
Figura 8- Imagem de MEV mostrando MSCs bem aderidas e possuindo boa morfologia no <i>scaffold</i> contendo nanocéria	22
Figura 9- Produção de colágeno por MSCs cultivadas por 2, 6 e 10 dias nos <i>scaffolds</i> de vidro bioativo contendo nanocéria	22
Figura 10- Esquema de realização das etapas fundamentais deste trabalho	23
Figura 11- Esquema da síntese do vidro bioativo 70S	25
Figura 12- Fotografia dos moldes de Teflon utilizados na secagem dos materiais estudados neste trabalho	25
Figura 13- Representação esquemática da síntese do vidro bioativo 70S/Ce	26
Figura 14- Esquema do teste de bioatividade dinâmico em SBF	29
Figura 15- Fotografias das amostras de VB 70S (A) e VB+Ce, respectivamente, na forma de monolito	33
Figura 16- Micrografia de MEV, com aumento de 10.000X, das superfícies das partículas (A) VB - 70S, (B) amostra VB+Ce [1] e (C) amostra VB+Ce [2]	34
Figura 17- Análise de EDS das amostras de VB 70S, VB+Ce [1] e VB+Ce [2]	35
Figura 18- Micrografia de MEV e análise de EDS confirmando a incorporação do Ce nas amostras (A) VB+Ce [1] e (B) VB+Ce [2]	36
Figura 19- Difratoograma de raios X da amostra de vidro bioativo 70S	37
Figura 20- Difratoograma das amostras VB+Ce [1/2]; VB+Ce [1], VB+Ce [2]	

tratadas a 700 °C	37
Figura 21- Difratoograma das amostras de VB/Ce tratadas a 900 °C	38
Figura 22- Ilustração da análise de FTIR realizada para as amostras (A) VB+Ce [1/2], (B) VB+Ce [2], (C) VB+Ce [1] e (D)VB 70S, todas tratadas a 700 °C	39
Figura 23- Ampliação das bandas na região de 1400 cm ⁻¹ até 400 cm ⁻¹ . (A) VB+Ce [1/2], (B) VB+Ce [2], (C) VB+Ce [1] e (D) VB 70S	39
Figura 24- Ilustração da análise de FTIR realizada para as amostras (A) VB+Ce [1], (B) VB+Ce [2], ambas tratadas a 900 °C	40
Figura 25- Ampliação das bandas na região de 1400 cm ⁻¹ até 400 cm ⁻¹ . (A) VB+Ce [1] e (B) VB+Ce [2]	40
Figura 26- Ilustração do tipo de isoterma caracterísitca dos materiais em estudo	43
Figura 27- Controle do pH da referência para os intervalos de tempo de 1 dia, 1 semana e 4 semanas	45
Figura 28- FTIR das amostras (A) VB+Ce [1/2], (B) VB+Ce [1] e (C) VB+Ce [2], imersas em SBF por intervalos de tempo de 1 dia, 1 semana e 4 semanas	46
Figura 29- Difratoograma de raios X das amostras tratadas a 700 °C durante 24 horas	47
Figura 30- Difratoograma de raios X das amostras tratadas a 700 °C durante 1 semana. Em $2\Theta = 29^\circ$ observa-se um pico típico da formação de hidroxiapatita	48
Figura 31- Difratoograma de raios X das amostras tratadas a 700 °C durante 4 semanas	48
Figura 32- A micrografia com aumento de 2500X, revela o crescimento da camada de HA após imersão por 1 dia, 1 semana e 4 semanas, para a amostra VB+Ce [1/2]	49
Figura 33- A micrografia com aumento de 2500X, revela o crescimento da camada de HA ao longo do tempo de 1 dia, 1 semana e 4 semanas, para a amostra VB+Ce [1]	50
Figura 34- A micrografia com aumento de 2500X, revela o crescimento da camada de HA ao longo do tempo de 1 dia, 1 semana e 4 semanas, para a amostra VB+Ce [2]	51
Figura 35- Líquido remanescente do teste de bioatividade para o intervalo de tempo de 1 dia	53

Figura 36- Líquido remanescente do teste de bioatividade para o intervalo de tempo de 1 semana	53
Figura 37- Líquido remanescente do teste de bioatividade para o intervalo de tempo de 4 semanas	54
Figura 38- Ensaio de citotoxicidade das amostras: VB 70S, VB+Ce [1/2], VB+Ce [1] e VB+Ce [2]	55
Figura 39- Análise geral de MEV e EDS da amostra VB+Ce [2] sintetizada assistida por ultrassom	56
Figura 40- Análise pontual de MEV e EDS da amostra VB+Ce [2] sintetizada assistida por ultrassom	56
Figura 41- DRX da amostra VB+Ce [2], tratada a 700 °C, sintetizada utilizando o equipamento de ultrassom	57

Lista de Tabelas

Tabela 1- Composição dos materiais produzidos	26
Tabela 2- Teor de Ce_2O_3 nas amostras de VB	41
Tabela 3- Ilustração da concentração do SiO_2 (%) nas amostras de VB	41
Tabela 4- Ilustração da concentração do CaO (%) nas amostras de VB	41
Tabela 5- Valores fornecidos pela análise de adsorção de N_2 por tipo de amostra e temperatura de tratamento térmico	44
Tabela 6- Valores de concentração de Ce nas soluções	54

Resumo

A literatura descreve experimentos nos quais a adição de nanopartículas de céria ao vidro bioativo melhorou significativamente a diferenciação de células tronco mesenquimais para osteoblastos e aumentou a produção de colágeno (matriz extracelular). Não se sabe se este efeito observado em função da presença de nanocéria pode ser também observado com a presença do elemento cério (Ce) na rede do vidro bioativo. A incorporação de Ce em vidros bioativos usando a rota sol-gel é o foco do presente trabalho, com o intuito de se desenvolver um material para engenharia de tecidos, com potencial para aumentar a osteogênese. Foram produzidos, vidros bioativos baseados na composição 70S (70% SiO₂-30% CaO), com adição do elemento Cério, usando a rota sol-gel. Proporções distintas de Ce foram introduzidas no vidro bioativo 70S. Foram utilizadas duas temperaturas de tratamento térmico, 700 °C e 900 °C. Todas as amostras passaram pelo processo de moagem e em seguida foram peneiradas, sendo utilizada a faixa de grãos entre 38 µm a 100 µm em todas as análises e testes. Foram realizadas análises por difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectrometria de emissão por plasma (ICP-AES), imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS), adsorção de nitrogênio e método de Brunauer-Emmett-Teller (BET).

Testes de bioatividade dinâmicos com intervalos de tempo de 1 dia, 1 semana e 4 semanas foram realizados. Após os testes de bioatividade, foram realizados ensaios de DRX e FTIR para averiguação da possível formação da camada de hidroxiapatita (HA) nas amostras. As soluções iônicas remanescentes dos testes de bioatividade também foram analisadas por ICP-AES. Resultados preliminares de citotoxicidade foram obtidos revelando a não citotoxicidade dos materiais em estudo.

Em busca de amostras mais homogêneas, uma rota alternativa de síntese também foi investigada neste estudo. Foram produzidas amostras via síntese assistida por ultra-som e tratadas a 700 °C. As amostras foram caracterizadas por MEV, EDS e DRX.

Palavras chaves: Cério, Rota sol-gel, Bioatividade e Citotoxicidade.

Abstract

The literature describes experiments in which the ceria nanoparticles significantly improved the bioactive glass mensenquimais differentiation of stem cells into osteoblasts and increased production of collagen (extracellular matrix). It is not known whether this effect is observed due to the presence of nanoceria can be also observed in the presence of cerium element (Ce) in the bioactive glass network. The incorporation of Ce in bioactive glasses using the sol-gel route is the focus of this work, with the goal of developing a material for tissue engineering, with the potential to enhance osteogenesis. Bioactive glass composition based on 70S (70% SiO₂-30% CaO) were produced, with the addition of cerium element, using the sol-gel route. Different ratios of Ce were introduced in bioactive glass 70S. Two thermal treatment temperatures, 700 °C and 900 °C were used. All samples passed through the milling process and then were sieved, the range of grain being used between 38 mM - 100 mM in all analyzes and tests. Analysis by X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy Fourier transform (FTIR), plasma emission spectrometry (ICP-AES), images of scanning electron microscopy (SEM), X-ray spectroscopy were performed by dispersing energy (EDS), nitrogen adsorption and the Brunauer-Emmett-Teller (BET).

Dynamic testing of bioactivity with time intervals of 1 day, 1 week and 4 weeks were conducted. After testing the bioactivity XRD and FTIR was performed to investigate the possible formation of the layer of hydroxyapatite (HA) in the samples. The remaining ionic solutions of bioactivity tests were also analyzed by ICP. Preliminary results were obtained showing cytotoxicity to non Cytotoxicity study.

In search of more homogeneous samples, an alternative route of synthesis was also investigated in this study. Samples were produced via synthesis assisted by ultrasound and treated at 700 °C. The samples were characterized by SEM, EDS and XRD.

Keywords: Cerium, sol-gel route, Bioactivity and Cytotoxicity.

1. Introdução

A busca incansável do ser humano por uma maior longevidade tem gerado a necessidade de alternativas para o reparo e substituição de tecidos vivos vitimados por traumas ou patogenias. O estudo de materiais biocompatíveis é justificado pelo fato de que o ser humano possui necessidade de repor ou regenerar parte de seu organismo sistematicamente, isto ocorre devido ao fato de que à medida que o ser humano envelhece, a tendência natural é que os seus órgãos comecem a funcionar de maneira menos eficaz devido às doenças degenerativas provenientes da longevidade, ficando assim os órgãos sujeitos a possíveis falhas.

A perda da função de algum órgão ou tecido, além de trágico para o paciente, gera um custo elevado para o sistema de saúde. Neste sentido, vale destacar que os Estados Unidos da América têm um custo de aproximadamente 400 milhões de dólares por ano em cirurgias dessa magnitude.¹ Mais de 8 milhões de intervenções cirúrgicas são realizadas por ano nos Estados Unidos com o intuito de reparar falhas em órgãos e tecidos decorrentes de patogenias ou traumas. No Brasil, devido aos elevados índices de mortalidade infantil e baixa expectativa de vida em relação aos países de primeiro mundo, o quadro é infinitamente mais grave, uma vez que os níveis de renda e saúde são extremamente baixos para a maior parte da população. Dificuldades técnicas e econômicas tornam-se notórias quando enfrentada a necessidade de implantes sintéticos de última geração e disponibilidade de órgãos e tecidos para utilização em transplantes.

A perda óssea é um agravante natural da saúde humana, o que acarreta uma incidência elevada de casos de desgaste ósseo em função do tempo. Percebe-se então, a necessidade de se investir em materiais que possam compensar a perda óssea, ou retardar esse processo. O método geralmente utilizado para enxerto ósseo, via de regra é o autoenxerto, ou seja, é feita a remoção de tecidos em uma determinada região do paciente para implantar em outra. Todavia, algumas limitações devem ser levadas em consideração, tais como depressão local no doador, potencial de reabsorção, tamanho e volumes inadequados de material para enxerto. O aloenxerto seria uma boa alternativa, este método se baseia na preparação de ossos de doadores da mesma espécie e de organismos diferentes; entretanto, esta metodologia se torna arriscada, pois pode transmitir doenças. É válido ressaltar a escassez de doadores e os possíveis problemas

de longo prazo que a reconstrução cirúrgica pode causar, uma vez que a população tem uma maior expectativa de vida e os implantes possuem uma vida útil limitada.²⁻³ A existência de proteínas osteoindutivas altamente puras têm possibilitado acreditar na fabricação de tecidos sintéticos, osteoindutivos para substituir os enxertos ósseos.⁴

Nenhuma das abordagens terapêuticas atuais revelou-se plenamente satisfatória.⁵⁻⁶ Dessa forma, a tendência mais recente é estimular a capacidade de regeneração do corpo, dando a este possibilidades de regeneração tecidual. Em 1969, Larry Hench na Universidade da Flórida, desenvolveu o primeiro vidro bioativo. Ele começou seu trabalho na busca de um material que poderia ligar-se ao osso, o problema a ser solucionado era que os implantes materiais disponíveis no momento, projetados para serem bioinertes, desencadeavam um encapsulamento fibroso após serem implantados, em vez de formar uma interface ou uma ligação estável com tecidos. Hench decidiu fazer um vidro degradável com alto teor de cálcio e a sua principal descoberta foi que a ligação com o osso foi tão forte, que para rompê-la era necessário fraturar novamente o osso.⁷ Na atualidade, partindo das valiosas contribuições de Hench, dispositivos projetados para serem implantados são construídos a partir da síntese de materiais à base de silício e cálcio, principalmente. Células retiradas de um sítio doador deverão se desenvolver nesses dispositivos que, posteriormente, serão implantados na região que necessita de reparação, estimulando o crescimento do osso natural a uma taxa mais acelerada; esta abordagem é conhecida como Engenharia de Tecidos. O desafio científico envolve a compreensão das células e os seus requisitos de transferência de massa e da fabricação de materiais para fornecer matrizes e modelos que guiem a regeneração tecidual.⁸

A abordagem clássica da engenharia de tecidos depende de um material que pode ser usado como um potencial estimulador para preenchimento de espaço danificado e para liberação controlada de células e agentes terapêuticos. Estruturas possuidoras de arquitetura e composição adequadas, baseadas no vidro bioativo e compósitos ou híbridos contendo uma fase bioativa, vêm sendo desenvolvidas por grupos de pesquisa, na forma de pós, *scaffolds* e filmes.⁹⁻¹¹ Os materiais produzidos foram extensivamente caracterizados do ponto de vista mecânico e estrutural, mostrando-se adequados para aplicações de engenharia de tecidos. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que eles suportam a adesão e a proliferação celular, e apresentam um potencial osteogênico.

Para aumentar o potencial osteogênico de materiais bioativos pode-se usar como estratégia a inclusão de elementos que tendem a ter um papel essencial na formação dos tecidos. Recentemente, foi comprovado que partículas nanométricas de óxido de cério (nanocéria) aumentam o crescimento e o desenvolvimento de células tronco mesenquimais (MSCs). Estas partículas foram sintetizadas por um grupo de pesquisadores americanos e, demonstraram inibir os danos relativos ao *stress* oxidativo.¹² Estudos das propriedades físicas e químicas da nanocéria, tais como, a capacidade de mudança reversível de seu estado de oxidação de 3+ para 4+, demonstraram que este material pode aumentar a vida média de cultura de células cerebrais.¹³ Também foi demonstrado que vidro bioativos com adição de nanopartículas de céria melhoraram significativamente a diferenciação de MSCs para osteoblastos, e aumentaram a produção de colágeno (matriz extracelular).¹⁴

Uma hipótese a se investigar, ainda não estudada e inédita, é considerar que o efeito observado em função da presença de nanocéria em vidros bioativos poderia, potencialmente também, ser observado com a presença do Ce na rede do vidro bioativo. Uma possível rota para a incorporação de Ce na rede do material vítreo é a rota sol-gel, usando como precursor um sal de Ce. Em função das variáveis de síntese e da temperatura de tratamento térmico do material produzido pela rota sol-gel, podem também ser formadas fases cristalinas, havendo inclusive a possibilidade de formação de óxido de cério (Céria). Neste caso, a formação *in loco* do óxido constituiria uma rota alternativa e inédita para possível incorporação de partículas de Céria no material obtido. A incorporação de Ce em vidros bioativos usando a rota sol-gel é o foco do presente trabalho.

Este estudo teve como objetivo o estudo da incorporação do cério em concentrações variadas no vidro bioativo de composição 70%SiO₂ - 30%CaO (70S) usando a rota sol-gel, e a avaliação do efeito da temperatura de tratamento térmico na cristalinidade e fases presentes no material formado. O nitrato de cério foi o sal utilizado para a inserção de Ce nas amostras. Durante a síntese foram utilizadas duas metodologias de mistura: agitação mecânica e uso de equipamento de ultrassom. Inicialmente, foi sintetizado o vidro bioativo 70S sem adição de Ce e com adição de Ce em três concentrações distintas. Os materiais obtidos foram tratados em duas temperaturas distintas, 700 °C e 900 °C, e em seguida foram caracterizados do ponto de vista químico e estrutural.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O estudo proposto teve como objetivo principal o desenvolvimento de novos materiais baseados na incorporação do elemento cério no vidro bioativo 70S, através da adição de nitrato de cério pela rota sol-gel e caracterização física, química e biológica dos materiais obtidos.

2.2. Objetivos Específicos

- Síntese de vidros com diferentes concentrações de cério usando a rota sol-gel e como precursor de cério, o sal nitrato de cério.
- Caracterização química e estrutural do vidro bioativo 70S com e sem cério.
- Verificação da possível formação da camada de hidroxiapatita em função de diferentes intervalos de tempo de imersão em solução fisiológica simulada (SBF).
- Avaliação da citotoxicidade dos materiais obtidos.

3. Revisão Bibliográfica

3.1- Motivação

O aumento da longevidade humana visto ao longo do último século, fez com que um grande número de indivíduos viesse a atingir uma idade crítica para o desenvolvimento de inúmeras doenças.¹⁵ Consequentemente, como resultado da maior longevidade humana há o aparecimento de morbidades relacionadas ao envelhecimento, como por exemplo, a osteoporose.

Uma pesquisa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostra que a expectativa de vida no País aumentou cerca de três anos entre 1999 e 2009. A nova expectativa de vida do brasileiro é de 73,1 anos. Entre as mulheres são registradas as menores taxas de mortalidade. Elas representam 55,8% das pessoas com mais de 60 anos. Na Figura 1, pode ser observado um casal de idosos que busca uma maior longevidade.



Figura 1- Ilustração de pessoas na terceira idade fazendo caminhada.

No período avaliado, a expectativa de vida feminina passou de 73,9 para 77 anos. Entre os homens, passou de 66,3 para 69,4 anos. Segundo o IBGE, a taxa de expectativa de vida no Brasil ainda é a menor da América Latina, só ficando à frente da Ásia (69,6 anos) e da África (55 anos). Levando em consideração que os níveis de fecundidade estão cada vez mais baixos, onde os menores índices são encontrados nos estados da Região Sudeste, sobretudo nos estados do Rio de Janeiro e de Minas Gerais, com 1,63 e 1,67 filhos por mulher, respectivamente, a pesquisa mostra que o aumento da

expectativa de vida ao nascer e a queda da fecundidade no País têm feito subir o número de idosos, que passou dos anos de 1999 à 2009 de 6,4 milhões para 9,7 milhões. Em percentuais, a proporção de idosos na população subiu de 3,9% para 5,1%; em compensação, no supracitado período, houve uma redução entre o número de crianças e adolescentes, passando de 40,1% para 32,8%, estreitando o topo da pirâmide etária brasileira. Mesmo assim, o País é considerado jovem.

O quadro é um retrato do que acontece com os países como o Brasil, que está envelhecendo ainda na fase do desenvolvimento. Já os países desenvolvidos tiveram um período maior, cerca de cem anos, para se adaptar. A importância dos idosos para o País não se resume à sua crescente participação no total da população, uma vez que, boa parte dos idosos são chefes de família e, nessas famílias a renda média é superior àquelas chefiadas por adultos não-idosos. Segundo o Censo 2000, 62,4% dos idosos e 37,6% das idosas são chefes de família, somando 8,9 milhões de pessoas.

É sabido que com o passar do tempo, a espécie humana perde massa óssea, dentre outros vários processos fisiológicos e patológicos, essa perda promove problemas ósseos que comprometem a função do tecido ósseo, a estética e conseqüentemente, a recuperação da saúde. Doenças e defeitos de tecidos duros, osteoporose e osteoartrite, são algumas das muitas condições médicas significativamente relatadas, levando à extensa necessidade do uso de materiais de enxerto apropriados.¹⁶

Uma opção bastante promissora tem sido os vários materiais sintéticos. Estes materiais são objeto de pesquisa com o intuito da correção de tais defeitos, e devem apresentar como características a biocompatibilidade, propriedade osteocondutora, resistência e estabilidade.¹⁰

No campo da cirurgia dental, as principais aplicações dos materiais sintéticos ou biomateriais, incluem o preenchimento de bolsas periodontais e aumento de mandíbula e maxila deficientes, causadas por perdas na dentição com o avanço da idade ou devido a doenças. O uso de biomateriais no reparo ósseo tem ajudado no tratamento de dor para milhões de pessoas que sofrem com defeitos músculo-esqueléticos, doenças e/ou traumatismo.

Tendo em vista a problemática mencionada anteriormente, percebe-se a necessidade de soluções rápidas e eficazes no que concerne ao tratamento da perda de massa óssea, seja em função da idade ou decorrente de algum tipo de trauma.

Para tentar solucionar o problema explicitado, é preciso ter conhecimento e enfrentar as peculiaridades do funcionamento, bem como as propriedades e composições do tecido ósseo.

3.2- O Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo que constitui os ossos, órgãos presentes em animais vertebrados. Neste tipo de tecido as células ósseas ficam em uma matriz extracelular rica em fibras colágenas e em fosfato de cálcio, resultando em uma mistura com elevada resistência óssea. A maior parte dos ossos do corpo humano pode ser classificada da seguinte forma: ossos longos (ex. fêmur), ossos curtos (ex. ossos do carpo), ossos planos (ex. costelas) e ossos irregulares (ex. vértebras). Toda esta estrutura faz parte de um tecido vivo, complexo e ricamente vascularizado.

É importante ter o cuidado para não confundir osso com tecido ósseo, haja vista que o osso é apenas um órgão formado principalmente por tecido ósseo, mas não de maneira exclusiva.

Um dos processos mais importantes do tecido ósseo é a sua ossificação, ou seja, a formação do tecido ósseo que ocorre a partir de uma cartilagem ou de uma membrana do tecido conjuntivo. Existem dois tipos de ossificação a saber, o primeiro é a ossificação endocondral que é a substituição gradativa do tecido cartilaginoso pelo tecido ósseo, sendo esta a responsável pela formação da maioria dos ossos durante a vida embrionária. O segundo é denominado intramembranosa, que é a formação do tecido ósseo no tecido conjuntivo e, que servirá de molde para o osso.

A regeneração dos ossos se perfaz quando ocorrido uma fratura, as células mesenquimais, que são as responsáveis pela formação das células ósseas, passam a se multiplicar diferenciando-se em osteócitos e osteoblastos. Com isso, há a formação de um osso não uniforme, que com o tempo será organizado até que haja a formação de um novo tecido ósseo.

O sistema ósseo do corpo humano possui como função a sustentação dos tecidos moles e a proteção de órgãos do corpo humano. Os ossos em conjunto com os músculos são responsáveis pelos movimentos do corpo humano, armazenamento e liberação de vários minerais no sangue, produção de células sanguíneas (hemácias, leucócitos e plaquetas) e armazenamento de triglicerídeos (reserva de energia).

A nutrição de uma das células formadoras do tecido ósseo (osteócitos) depende dos canalículos presentes na matriz óssea, que possibilitam as trocas de íons e moléculas entre os capilares e as células ósseas. Os ossos são recobertos na sua face interna (endóstio) e externa (perióstio) por uma camada de tecido que possui células osteogênicas. A Figura 2 ilustra um osso compacto e esponjoso com suas respectivas lacunas/canais por onde o osso é vascularizado.

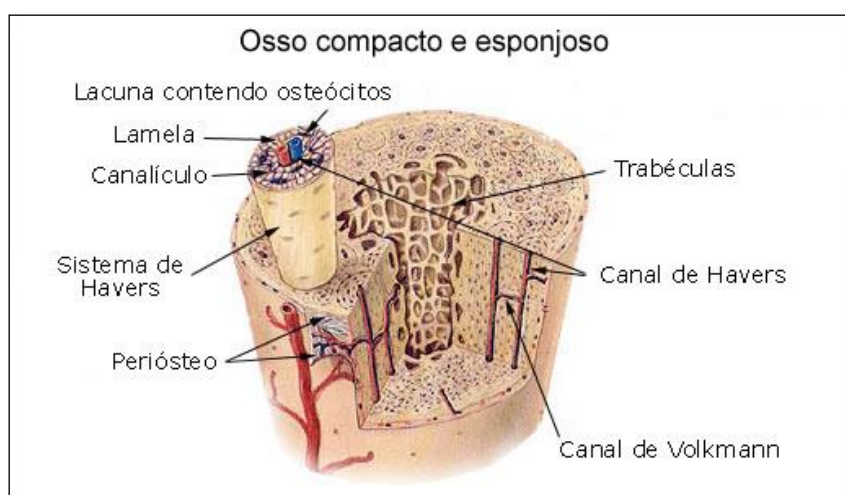


Figura 2- Ilustração de um osso compacto e esponjoso.¹⁷

O tecido ósseo é formado por células e uma matriz mineralizada. As células são os osteócitos (que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz), os osteoblastos (produzem a parte orgânica da matriz) e os osteoclastos (células relacionadas com a reabsorção do tecido ósseo e a processos de remodelação). Existem ainda as fibras colágenas (correspondentes a 95% da parte orgânica do osso) e uma pequena quantidade de substâncias amorfas que contêm mucopolissacarídeos ácidos e neutros associados a proteínas.

A parte inorgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea e os íons mais abundantes são o fosfato e o cálcio. Existem bicarbonatos, magnésio, potássio, sódio e citratos, em pequenas quantidades. O cálcio e o fósforo formam cristais de hidroxiapatita (HA), com composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Esses cristais arranjam-se ao longo de fibras colágenas e são envolvidos pelas substâncias amorfas. Os íons da superfície do cristal de HA são hidratados, existindo, portanto, uma camada de água e íons em volta do cristal. Essa camada é denominada capa de hidratação e facilita a troca iônica entre o cristal e o fluido intersticial. A associação de HA com fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência características do tecido ósseo.¹⁸

A perda óssea traz uma vulnerabilidade que pode proporcionar fraturas. Essas lesões podem ser por acidente, e dentre outros casos, os decorrentes da longevidade, agravadas pela osteoporose, que é o objeto de presente estudo.

3.3- A Osteoporose¹⁹

A evolução natural de perda óssea ocorre com qualquer ser humano que atinge a velhice. No entanto, há casos mais significativos, como por exemplo, a osteoporose, onde a quantidade de massa óssea diminui substancialmente e desenvolve ossos ociosos, finos e de extrema sensibilidade, mais sujeitos a fraturas.

A osteoporose é uma doença crônica complexa, multifatorial, caracterizada pela redução da densidade mineral óssea, que é maior no osso trabecular do que no cortical. Tal redução é concomitante no mineral ósseo e na matriz óssea de modo que o osso diminui em quantidade, mas continua apresentando uma composição normal. A densidade óssea diminuída leva a fraturas constantes, sendo os locais mais comuns a parte distal do rádio (Fratura de Colles), as vértebras torácicas e lombares e a parte proximal do fêmur.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o termo osteoporose é utilizado para se referir a uma condição na qual a densidade mineral óssea está com mais de 2,5 desvios padrões do pico de massa óssea.

A osteoporose afeta mais de 20 milhões de norte-americanos e leva a aproximadamente 1,5 milhões de fraturas por ano nos Estados Unidos, gerando um custo com o tratamento de aproximadamente 14 bilhões de dólares por ano. Diante desses dados,

chega-se a questionar a existência de uma epidemia. A prevalência de osteoporose e a incidência de fraturas variam de acordo com o sexo e a raça. As mulheres brancas na pós-menopausa apresentam maior incidência de fraturas. A partir dos 50 anos, 30% das mulheres e 13% dos homens poderão sofrer algum tipo de fratura por osteoporose ao longo da vida. No Brasil, a incidência mostrou-se similar, especialmente na população branca, porém deve ser considerado a miscigenação da população brasileira, tendo em vista, a menor incidência, em indivíduos da raça negra.

Os indivíduos com osteoporose podem ser divididos em dois grupos principais. O primeiro grupo é formado por indivíduos com densidade óssea baixa e fraturas devidas a processos fisiopatológicos que não foram esclarecidos completamente, esses são considerados tendo a osteoporose primária. Dentre estes pacientes aparecem principalmente a osteoporose pós-menopausa e a osteoporose senil. O segundo grupo é composto por indivíduos que apresentam densidade óssea menor e fraturas oriundas de processos hereditários. Estes pacientes podem apresentar osteoporose por excesso de glicocorticóides, hipogonadismo masculino, hiperparatiroidismo primário, hipertiroidismo ou distúrbios relacionados à vitamina D.

Embora a perda óssea pareça ser uma consequência normal do envelhecimento, nem todos os indivíduos idosos desenvolvem fraturas devido à osteoporose. Muitos fatores determinam quem desenvolverá fraturas, mas o fator principal está ligado à densidade mineral óssea. Na Figura 3, pode ser observada a diferença de densidade óssea entre um osso normal e um osso com a osteoporose, podendo ser verificado neste último porosidades maiores.

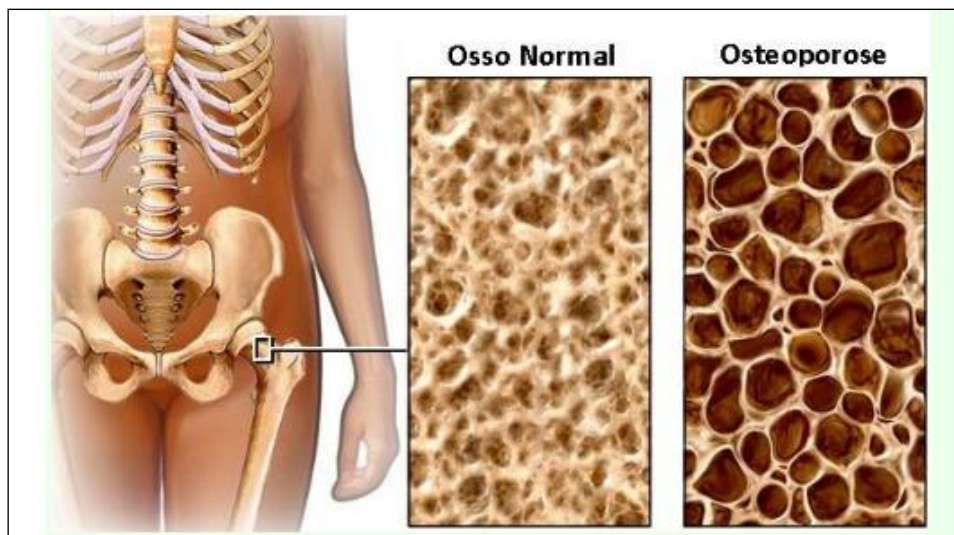


Figura 3- Ilustração comparativa de um osso normal e um osso com osteoporose.¹⁹

A massa óssea máxima é atingida durante o início da idade adulta. Fatores como atividade física, força muscular, dieta, hereditariedade e o estado hormonal contribuem para o desenvolvimento ósseo. Uma vez alcançada a massa esquelética máxima, um pequeno déficit de formação óssea se acumula a cada ciclo de reabsorção e formação de cada unidade multicelular básica, em razão da remodelagem não ser completamente eficaz.

A osteoporose é assintomática, a menos que resulte em uma fratura. As fraturas vertebrais por compressão em geral ocorrem após mínimos esforços, como por exemplo, uma inclinação do corpo para frente ou o levantamento de um objeto leve.

Segundo o Conselho Brasileiro de Osteoporose, todos os pacientes portadores dessa deficiência de massa óssea, devem inicialmente fazer exames básicos como hemograma completo, VHS, dosagens séricas de cálcio e fósforo, fosfatase alcalina, creatinina plasmáticas, calciúria de 24 horas e urinálise. Uma ferramenta fundamental para o diagnóstico da osteoporose é densitometria que visa determinar o risco de fraturas e, com isso auxiliam na identificação terapêutica, avaliando as mudanças com o tratamento ou a evolução natural da doença. Existem várias técnicas para mensurar a densidade mineral óssea.

No sentido de solucionar o problema de baixa densidade óssea, a engenharia de tecidos traz uma abordagem muito interessante acerca de regeneração óssea. É evidente que ao

se suspeitar da presença de tal enfermidade, a osteoporose, devem-se fazer todos os exames necessários, mas no que se refere à reestruturação óssea, a engenharia de tecidos juntamente com este trabalho almeja solucionar o problema da osteoporose com duas abordagens diferentes: i) um material injetável que possa preencher as lacunas promovidas pela osteoporose, dando origem a um osso mais resistente e com características ideais para um indivíduo específico; ii) no caso de fratura, um material que servirá de implante e ao mesmo tempo fará com que o osso natural cresça a uma taxa de tempo inferior à do osso natural, e ao mesmo tempo se degrade à mesma taxa.

Neste contexto, torna-se fundamental o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à engenharia de tecidos, a qual será abordada no próximo tópico.

3.4- A Engenharia de Tecidos

A capacidade regenerativa do osso é refletida em sua habilidade de se regenerar em uma matriz sem cicatriz, de forma oposta à cura de tecidos macios. Uma estratégia para restaurar tecidos doentes ou danificados é a medicina regenerativa, onde um material sintético, pode ser implantado e servir como guia e estímulo para o crescimento do tecido.²⁰ Com o tempo, o material deve liberar fatores que estimulem os mecanismos de regeneração do próprio corpo para produzir novo osso. O material deve também ser reabsorvido pelo corpo como produtos de degradação não-tóxicos na mesma taxa que o osso regenera.²¹ O novo osso pode se remodelar sob o carregamento local do sítio específico.

Idealmente, para a regeneração óssea de sítios que sustentam carga, as propriedades mecânicas dos materiais, como resistência e rigidez, devem igualar a do osso. O sucesso de qualquer material depende de quatro fatores: i) o material deve possuir estrutura hierárquica similar à do osso; ii) não ser tóxico e estimular a osteogênese; iii) ser capaz de estimular o crescimento de vasos sanguíneos; e iv) ter uma taxa de degradação (e perda controlada de resistência mecânica) enquanto o osso regenera.²²

Com esse objetivo, surge a Engenharia de Tecidos, uma ciência que tem como objetivo produzir um material *in vitro* que esteja apto a suportar uma vida celular específica através da manipulação de arquiteturas tridimensionais e, ser integrado a agentes biologicamente ativos (células vivas) tais que as propriedades resultantes do conjunto

estejam precisamente adaptadas para suportar a vida celular prescrita pelos tecidos receptores.²³ A Figura 4 ilustra o esquema de regeneração óssea utilizado pela engenharia de tecidos.

É necessário coletar células de um tecido doador, como por exemplo, células tronco ou células do tecido específico, aplicando essas células em um material sintético possuidor de características específicas para a proliferação das mesmas e também que o material seja biocompatível para que possa ser introduzido no paciente na área onde ocorreu o trauma. A taxa de degradação desse material também deve ser controlada, e à medida que o material estimular o crescimento do tecido natural, este, deve degradar na mesma taxa. A Figura 4 apresenta o esquema de funcionamento da engenharia de tecido.

Propriedades mecânicas, qualidades estruturais e geometria tridimensional são aspectos que devem ser analisados para a obtenção do material em questão. A estabilidade das características mecânicas após a implantação permite a essas matrizes manter um espaço tecidual de tamanho e forma adequados para a ocupação do tecido.

No que diz respeito às funções biológicas, incluem fatores que devem ser analisados com o máximo de cautela. Alguns desses aspectos a serem analisados são: migração celular dentro dos dispositivos, adesão celular (da matriz extracelular), dentre outros.²⁴

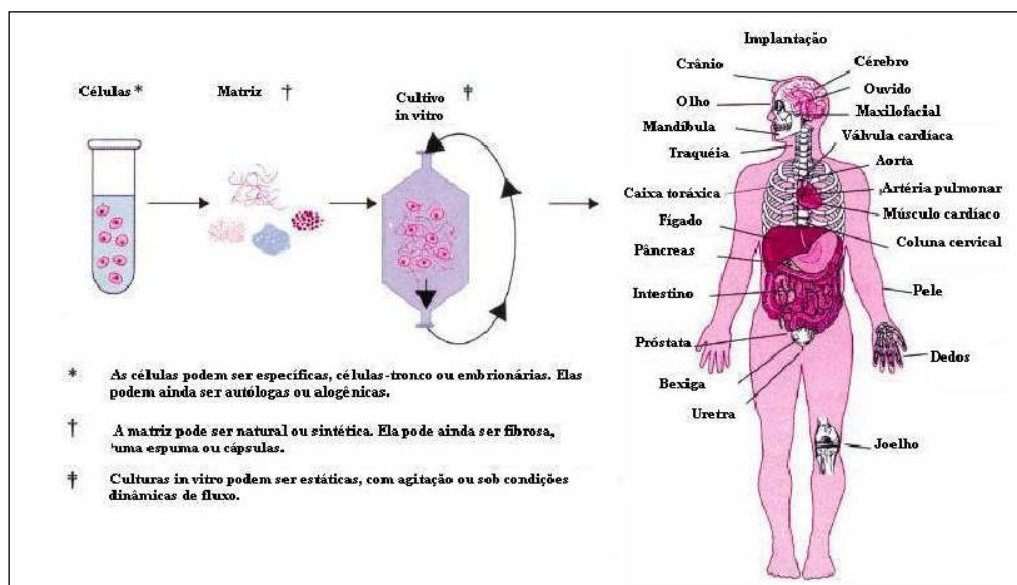


Figura 4– Ilustração esquemática da regeneração de tecidos utilizada pela engenharia de tecidos.²⁵

São exemplos de materiais utilizados em engenharia de tecidos para a confecção de matrizes tridimensionais: (a) polímeros naturais, como colágeno, gelatina, e quitosana; (b) polímeros sintéticos, como ácido poliglicólico (PGA), seus copolímeros (PLGA); (c) cerâmicas, como hidroxiapatita (HA) e fosfato tricálcico, vidros bioativos; (d) além de compósitos e híbridos sintetizados a partir desses materiais.^{26,27}

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para a produção de matrizes porosas tridimensionais e o processo sol-gel diferencia-se em relação aos demais métodos. Outro ponto significativo é a facilidade de modelar os géis, permitindo a obtenção de corpos cerâmicos com formatos pré-determinados.²⁸

Almejando um material que possua todas as características necessárias para ser aceito como substituto ósseo, o presente estudo aborda a possibilidade de se desenvolver materiais que sejam biocompatíveis, dentre outras características importantes, para serem utilizados na engenharia de tecidos. Os biomateriais mais utilizados e suas características serão abordados no tópico seguinte.

3.5- Biomateriais

Os biomateriais são materiais naturais ou sintéticos utilizados nas áreas da saúde com o intuito de substituir total ou parcialmente tecidos cuja função foi perdida. Neste estudo, serão destacados os materiais sintéticos, tais como as cerâmicas. O uso destes materiais é uma alternativa bastante utilizada para restauração ou substituição de tecidos danificados. Novos tipos de materiais têm sido pesquisados visando um melhor funcionamento e novas aplicações.²⁹

Os fatores que levam os pesquisadores a buscarem novos materiais são inúmeros, como por exemplo, o desempenho inadequado dos atuais materiais, a exemplo, os implantes metálicos que agem como substitutos ósseos e que devem ser trocados num período pré-determinado, sendo necessário uma nova intervenção cirúrgica, isto sem falar no custo extremamente oneroso destas intervenções.³⁰ Ainda levando em consideração que a população vive cada vez mais, torna-se inadequado o uso desse tipo de material, ou seja, quantas intervenções tornam-se necessárias.

Em 2004 foram gastos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) cerca de 60 milhões de reais com despesas ortopédicas. A demanda por esses serviços tende a aumentar com a expectativa da longevidade do brasileiro, havendo assim a necessidade de se ampliar e melhorar a oferta desta área da medicina.³⁰

Quando se pensa nas pessoas possuidoras dessa perda de massa óssea, dois aspectos são extremamente relevantes: i) primeiro, estas pessoas por estarem com uma densidade óssea muito baixa, estão mais propensas à fraturas, então há a necessidade de se obter um biomaterial que substitua esse tecido lesionado e que estimule o osso natural a crescer a uma taxa mais elevada do que a normal, e ao mesmo tempo, ir degradando-se; ii) segundo, há a necessidade de se obter um outro material que aja de forma preventiva, ou seja, tentar fazer com que a fratura não ocorra. Para que isso funcione, deve ser realizado um aumento de densidade óssea. Esta etapa consta da introdução (meio injetável) de um novo material que venha a densificar esse osso, até então frágil, para que este não se quebre, prevenindo assim a fratura.

Inúmeros materiais são alvos de pesquisas, no entanto, um material para ser considerado apto para aplicações biomédicas deve possuir propriedades adequadas compatíveis com o lugar onde será implantado, como por exemplo, resistência mecânica e tenacidade, isso no caso de implantes ósseos.

Um número elevado de materiais tem sido proposto para a utilização na engenharia de tecidos. Esses materiais são dispositivos utilizados como suportes que promovem a proliferação celular e o crescimento, fornecendo um ambiente estável ao cultivo celular. Estes materiais devem sustentar o crescimento celular, e apresentar propriedades mecânicas condizentes com o tecido a ser reconstruído, induzir respostas celulares mais rápidas ou ainda possuírem intrinsecamente propriedades diretamente relacionadas com a remodelagem dos tecidos.^{31,32} Os materiais devem possuir propriedades essenciais para seu bom desempenho, tais como: superfície que permita adesão e crescimento celular; nenhum componente ou subproduto de sua degradação deve provocar reações inflamatórias ou tóxicas; a porosidade deve proporcionar elevada área superficial para interação célula-matriz e ter espaço para a regeneração da matriz extracelular.³³

Muitos biomateriais desenvolvidos na última década estão sendo aperfeiçoados para usos diversos em engenharia de tecido, entre eles destacam-se as cerâmicas de fosfato de cálcio e os vidros bioativos (VB) por apresentarem excelentes propriedades de ligação com o osso.³⁴⁻³⁶

3.6- Vidro bioativo

Poucas cerâmicas são usadas clinicamente, apesar de várias já terem sido alvo de estudo. Dentre as mais utilizadas, merecem destaque a Al_2O_3 e ZrO_2 , usadas, inicialmente, na substituição total de juntas dos quadris e fêmur; os fosfatos de cálcio usados como revestimento de ligas metálicas e em formato de granulados ou de pequenas peças porosas para reparo ósseo; os vidros e vitrocerâmicas bioativos usados para substituição e reparo de ossículos do ouvido interno, dentes e vértebras.^{20,21}

Nos dias atuais, cerâmicas bioativas têm recebido uma enorme atenção dos pesquisadores e, isso se deve ao fato destas se ligarem ao osso, induzindo a formação de hidroxiapatita (HA), que é um forte indício de biocompatibilidade.³⁴⁻³⁶

Estudos pioneiros de testes *in vitro* foram realizados por Hench *et al.*, os quais mostraram o crescimento da camada de HA em vidros que liberavam íons de cálcio e fósforo para o meio, imergindo-os em uma solução de água destilada tamponada com tris-hidroximetilamino-metano e HCl (tampão) a um pH de 7,25 e temperatura de 37 °C.²²

Pesquisas anteriores mostraram que o vidro bioativo (45S5 Bioglass®) e os produtos iônicos de dissolução liberados pelo vidro regulam e ativam sete famílias de genes que ocasionam a osteoestimulação e regeneração de osso novo *in vitro* e *in vivo*. Cinco diferentes fontes celulares foram investigadas nestes estudos.³⁷⁻⁴⁹ Estes demonstram que numerosas fontes de células da linhagem osteoblasto (células troncos embrionárias, células fetais e células primárias adultas) são estimuladas num nível genético por uma dosagem crítica Ca e Si no produto iônico de dissolução. Alguns trabalhos preliminares mostraram que os genes regulados ou ativados controlam o ciclo da célula osteoblasto para favorecer a proliferação e subsequente diferenciação apenas das células que podem prosseguir na direção de criar uma matriz extra-celular mineralizada; isto é, osteócitos maduros e novo osso.

Os vidros bioativos têm sido amplamente pesquisados e relacionados com a cultura de células do tecido ósseo, os osteoblastos, por possuírem propriedades interessantes do ponto de vista biológico.^{50,51} Nestas biocerâmicas pode-se controlar suas propriedades químicas e suas ligações com os tecidos, sendo possível obter vidros com propriedades específicas para uma aplicação particular.⁵²⁻⁵⁴

Os vidros bioativos possuem uma habilidade de se unir ao tecido ósseo, e esta é atribuída à formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada sobre a superfície do vidro em contato com fluidos corpóreos e durante a cristalização dessa camada pode ocorrer a mineralização de fibras colágenas, promovendo dessa forma uma forte união entre a interface osso/biomaterial.^{55,56}

Outro fator importante relacionado aos vidros bioativos, é que, quando em contato com fluidos corpóreos ou em soluções fisiológicas, liberam sílica, devido à trocas iônicas com H^+ e H_3O^+ , causando alcalinização do meio. A alteração na concentração de H^+ pode influenciar profundamente o metabolismo celular, pois ocorre um aumento do pH do meio, o que no caso dos osteoblastos demonstra ser favorável, pois pesquisas demonstraram aumento da proliferação celular.^{52,57,58}

A influência ambiental localizada dos materiais em estudo foi investigada como uma importante variável para a proliferação celular. Experimentos recentes mostram que os vidros bioativos embora tenham sido alvo de inúmeras pesquisas, ainda abrangem uma área de pesquisa extremamente ativa.

Trabalhos sobre vidros bioativos obtidos pelo método sol-gel foram publicados incluindo vidros densos, partículas, materiais porosos e *scaffolds*.⁵⁹⁻⁶² As vantagens de se utilizar o método sol-gel estão relacionadas com a baixa temperatura de processamento, alta bioatividade, nanoescala de interconectividade, dentre outras. O processo sol-gel consiste num método físico-químico de síntese de óxidos cerâmicos em que ocorre a evolução de um sol (dispersão líquida de partículas coloidais, que são partículas sólidas de diâmetro inferior a 100 nm) para um material poroso, onde partículas maiores interconectam-se para formar uma rede sólida semelhante a uma esponja. Esse processo diferencia-se positivamente pela possibilidade de preparação de géis com o mesmo grau de homogeneidade da solução inicial.^{63,64}

A introdução de outros elementos na estrutura dos biomateriais pode alterar suas características, levando a respostas biológicas interessantes e favoráveis. Um exemplo é o aumento de proliferação celular na presença de cério.

3.7- Cério

Com o intuito de promover um material bioativo, terras raras, como por exemplo, a nanocéria, tem sido utilizada por grupos de estudiosos do campo da engenharia de tecidos ósseos e, também, em experimentos voltados para outras áreas específicas do campo da bioengenharia.

O óxido de cério tem a estrutura da fluorita com um parâmetro de rede de 0,44 nm,⁶⁵ entretanto, na escala nanométrica a deficiência de oxigênio na superfície da nanocéria causa uma expansão da rede que pode ser alterada pela dopagem com outros metais.⁶⁶⁻⁶⁹ O estado de oxidação naturalmente estável do óxido de cério é 4+, porém, a capacidade de troca reversível do oxigênio pode ser aproveitada eficientemente em nanoescala, onde a concentração de defeitos (lacunas de oxigênio) tem um papel vital na estabilização do estado de oxidação 3+, dando à nanocéria propriedades únicas como, por exemplo, a ação antioxidante.

Estudiosos do grupo do pesquisador Sudipta Seal e colaboradores comprovaram que a nanocéria é um antioxidante com características superiores aos antioxidantes naturais existentes.⁷⁰⁻⁷⁹ Sudipta Seal também comprovou que as nanopartículas de cério podem prevenir degeneração retinal induzida por peróxidos intracelulares⁷⁰ e prevenir danos na medula espinhal.⁷² Um mecanismo molecular para explicar as propriedades antioxidantes e protetoras da nanocéria foi estabelecido usando um modelo de atividade mimética de superóxido dismutase.^{73,79}

A eficiência da nanocéria com relação à proteção de células do cérebro de ratos contra morte celular induzida por ferimento traumático e exposição à luz UV foi estudada comparando suas propriedades com a de outros antioxidante como, por exemplo, a vitamina E, melatonina e N-acetil cisteína, através de estudos *in vitro* (Figura 5). As partículas de nanocéria deste estudo foram sintetizadas em água e variaram seus tamanhos entre 5-10 nm com estrutura da fluorita. É importante salientar que a proteção foi mais efetiva quando as células foram encubadas de 24 a 48 horas antes do dano. Os

resultados mostraram que uma dose única de nanopartículas (NPs) de cério protege as células com maior eficácia que a exposição à luz UV e que múltiplas doses de outros antioxidantes.⁷²

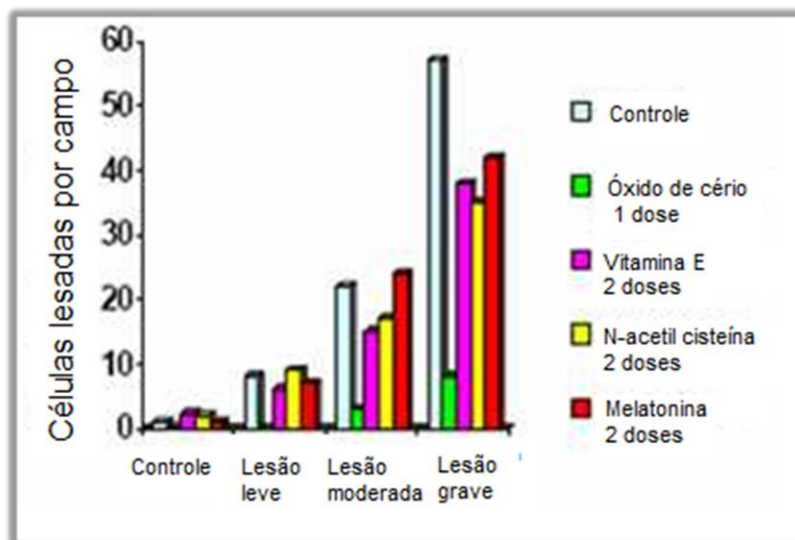


Figura 5- Comparação de NPs de céria com outros antioxidantes.⁷²

Estudos realizados com partículas de nanocéria comprovaram suas propriedades inibidoras relacionadas aos danos oriundos do *stress* oxidativo.¹² As propriedades físico-químicas da nanocéria, como por exemplo, a capacidade de mudança reversível de estado de oxidação entre 3+ e 4+ foram estudadas, e os seus resultados demonstraram que a vida média de cultura de células cerebrais, podem ser aumentadas como pode ser verificado na Figura 6.¹³ Outros estudos puderam comprovar que a nanocéria aumenta o crescimento e o desenvolvimento de células tronco mesenquimais (MSCs). Também pôde ser comprovado que materiais contendo vidro bioativo com nanocéria melhoram consideravelmente a diferenciação de MSCs para osteoblastos, e aumentam a produção de colágeno (matriz extracelular).

Nesse sentido, estabeleceu-se a hipótese de que a nanocéria pode melhorar a osteogênese, devido à regulação e à aceleração da expressão de fatores de crescimento, podendo levar ao sucesso no que se refere à regeneração de tecidos ósseos. A união resultante entre os vidros bioativos e o cério deverá ter a capacidade de estimular a regeneração óssea do corpo humano. Assim sendo, a presente pesquisa mudará os

horizontes no processo de desenvolvimento de materiais para regeneração do tecido ósseo.

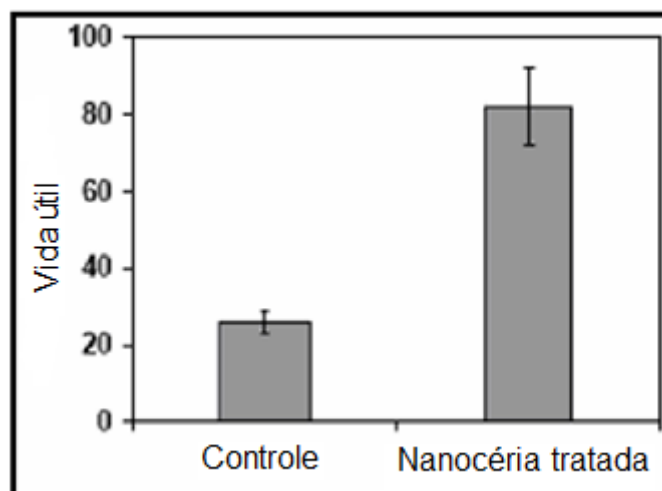


Figura 6- Representação do aumento de tempo de cultura de células cerebrais, quando sujeitas à presença de nanocéria.¹³

Em outros estudos foi demonstrado que a nanocéria promove a diferenciação de células mesenquimais humanas em osteoblastos. A baixa pressão de oxigênio é considerada um componente integral das células tronco mesenquimais humanas (MSCs) no microambiente da medula óssea. MSCs foram cultivadas sob atmosfera de oxigênio fisiologicamente relevantes (2% O₂) por 1 mês, estas exibiram um aumento do nível de proliferação, mantendo uma capacidade de formação de colônias significativamente mais alta e expressando níveis mais elevados de genes de células tronco, do que MSCs cultivadas em 20% O₂. Sob indução da diferenciação, MSCs cultivadas sob baixa pressão de oxigênio expressaram níveis mais altos de marcadores da diferenciação osteoblástica e adipósitas do que o controle. Ressalta-se que as MSCs mantiveram a habilidade de florescer em condições prolongadas de baixa pressão de oxigênio, sugerindo que este seja um elemento essencial para o grupo *in vivo* de MSCs. Os estudos preliminares de S. Seal mostraram que a adição de nanopartículas (NPs) de cério à culturas de MSCs imitaram o efeito de baixa pressão de oxigênio. Adição de NPs de cério à cultura de MSCs aumentou o crescimento celular (Figura 7) e na diferenciação as células produziram significativamente maior nível de colágeno. MSCs são sensíveis a compostos tóxicos derivados de oxigênio molecular, radicais hidroxila ou peróxido de hidrogênio. Diminuindo o oxigênio, a produção de radicais oxigênio é

significativamente reduzida. Assim, a observação dos efeitos de NPs de cério sobre MSCs pode ser relacionada com sua ação sobre o maior tempo de vida das MSCs na cultura, quando em contato com as NPs de cério.

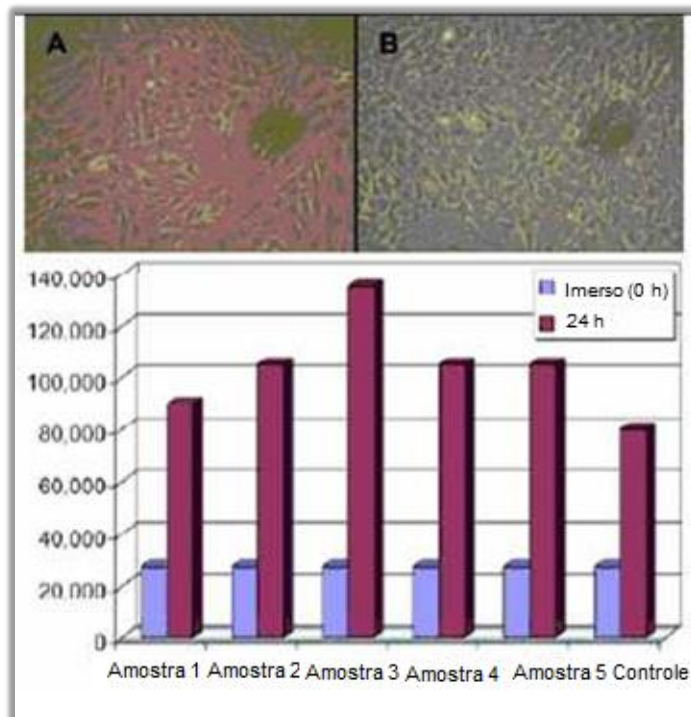


Figura 7- Tratamento com NPs de cério aumentou a proliferação de MSCs comparado ao controle. O nível de aumento depende da formulação da nanocéria.⁸⁰

Em outro estudo, *scaffolds* de vidros bioativos foram semeados com células tronco mesenquimais humanas da medula óssea, com densidade de 250.000 células/ cm² e cultivadas por 10 dias em meio basal e em meio contendo suplementos osteogênicos (ácido ascórbico, fosfato de β-glicerol e dexametasona).^{81,82} As MSCs exibiram um bom espalhamento com grandes áreas de adesão celular e prolongamentos celulares extensos e distintos (Figura 8). Na ausência de suplementos osteogênicos, MSCs expressaram fosfatase alcalina e uma matriz de colágeno depositadas, com e sem a incorporação de nanocéria incorporada nos scaffolds. Isto indica que o vidro induz a diferenciação das MSCs para a linhagem de osteoblastos. Deposição de matriz extracelular foi examinada pela medida da quantidade de colágeno produzida pelas células cultivadas nos scaffolds por 2, 6 e 10 dias. Após 2^o e 6^o dias de cultura, a incorporação de nanocéria não afetou a produção de colágeno (Figura 9). Entretanto, entre 6^o e 10^o dias em cultura, a produção de colágeno aumentou para MSCs cultivadas em vidros bioativos contendo nanocéria.

Assim, os resultados preliminares, dos trabalhos mencionados, confirmam a investigação prévia sobre a proliferação de MSCs e fortalecem a hipótese de que a nanocéria pode promover a diferenciação osteoblástica e a produção de colágeno.

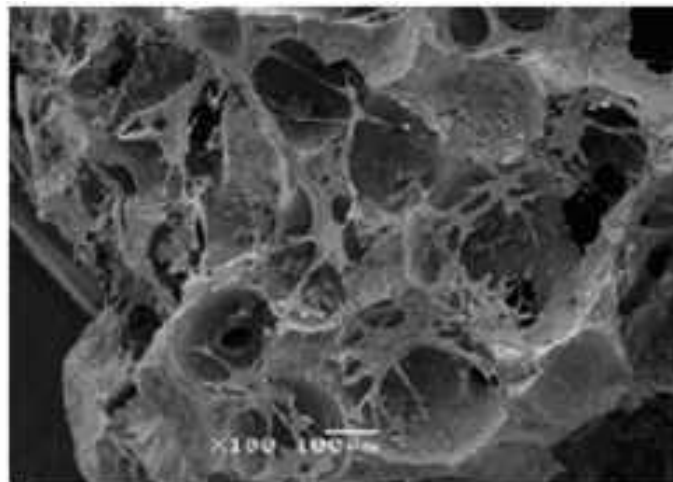


Figura 8– Imagem de MEV mostrando MSCs bem aderidas e possuindo boa morfologia no vidro bioativo contendo nanocéria.⁸¹

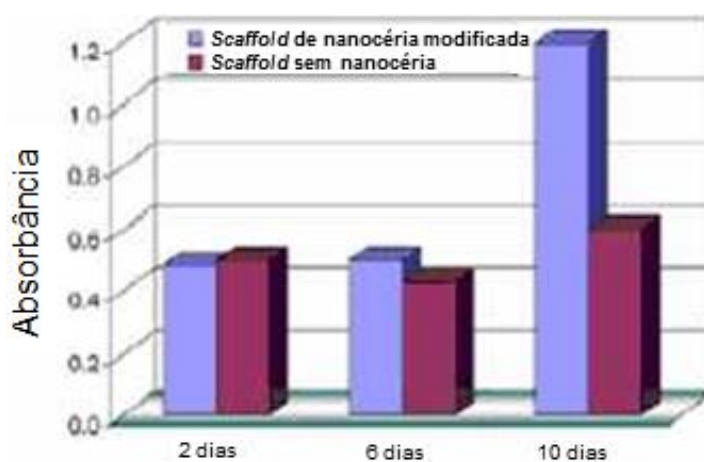


Figura 9- Produção de colágeno por MSCs cultivadas por 2, 6 e 10 dias nas amostras de vidro bioativo contendo nanocéria.⁸²

O presente trabalho segue a linha de introdução de cério, iniciando com a incorporação do elemento Ce no vidro bioativo 70S, através da adição de nitrato de cério pela rota sol-gel. A presença do Ce no material tem potencial para produzir os efeitos observados com a nanocéria.

4. Metodologia

O presente trabalho está dividido em quatro etapas (Figura 10). A primeira refere-se à síntese do vidro bioativo 70S visando à incorporação do cério em diferentes concentrações. A segunda etapa descreve a caracterização dos vidros bioativos com e sem cério. A terceira etapa é relativa ao teste de bioatividade dinâmico das amostras. A quarta etapa é referente à avaliação das respostas celulares aos vidros bioativos, com e sem cério. Por fim, a quinta etapa, busca uma forma diferenciada de síntese utilizando o banho ultrassônico para melhor dispersão de Ce nas amostras. A primeira, segunda e terceira etapas foram realizadas na escola de Engenharia, no entanto, a quarta etapa, foi realizada no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, que disponibilizou toda a infraestrutura necessária à realização dos ensaios.

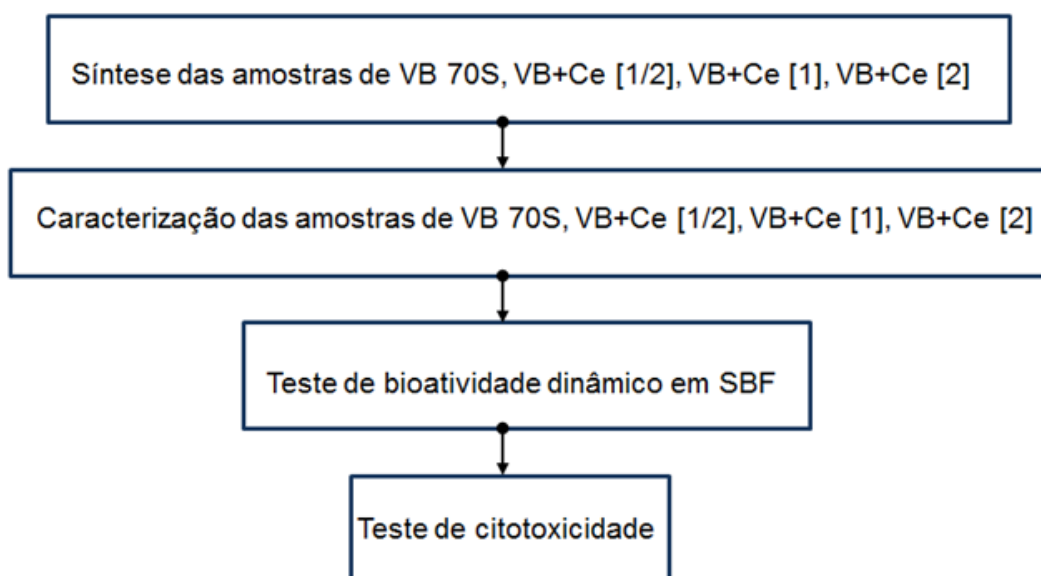


Figura 10– Esquema de realização das etapas fundamentais deste trabalho.

4.1. Síntese do vidro bioativo com e sem cério

Neste estudo, foi escolhido o vidro bioativo 70S, por ter sido o mesmo vidro bioativo utilizado nos estudos realizados com adição de nanocéria,⁸³ visando uma referência para comparações necessárias para guiar a realização do trabalho. Foi sintetizado o vidro bioativo 70S puro e contendo cério em diferentes concentrações para avaliar a interferência da inserção de Ce na estrutura do material. Duas temperaturas de

tratamento, 700 °C e 900 °C foram utilizadas para avaliação da interferência da mudança do estado de cristalinidade na resposta do biomaterial.

4.1.1. Síntese do vidro bioativo 70S

Estudos anteriores desenvolveram materiais de vidro bioativo.⁸⁴⁻⁸⁹ A síntese escolhida para a obtenção do vidro bioativo seguiu o método sol-gel, rota alcóxido. Os reagentes utilizados foram: água deionizada; ácido nítrico 2N – Synth; alcóxido tetraetil ortosilicato (TEOS) - Aldrich, 98% de pureza, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, precursor de SiO_2 e nitrato de cálcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - Synth, como precursor de CaO. A metodologia de obtenção de vidro bioativo usada foi desenvolvida anteriormente por Coelho.⁹⁰ A síntese de 1 mol de vidro bioativo (Figura 11) ocorreu pela hidrólise de 133,8 mL de TEOS na presença de 97,9 mL de água deionizada e 16,3 mL ácido nítrico 2N, etapa 1, por uma hora, sob agitação, em seguida foi adicionado de 85,01 g de nitrato de cálcio, deixando solubilizar por 30 minutos, etapa 2. A solução foi vertida em moldes de Teflon (Figura 12), etapa 3. As amostras foram envelhecidas, etapa 4, por 72 horas em estufa a 60 °C e a secagem, etapa 5, ocorreu a uma temperatura inicial de 70 °C e acréscimo de 10 °C por dia, durante sete dias. Para finalizar, foi realizado tratamento térmico de estabilização em forno do tipo mufla com aquecimento até 700 °C, com taxa de aquecimento de 1 °C por minuto, manutenção desta temperatura por 4 horas e depois diminuição da temperatura até 40 °C (taxa de 1 °C por minuto).

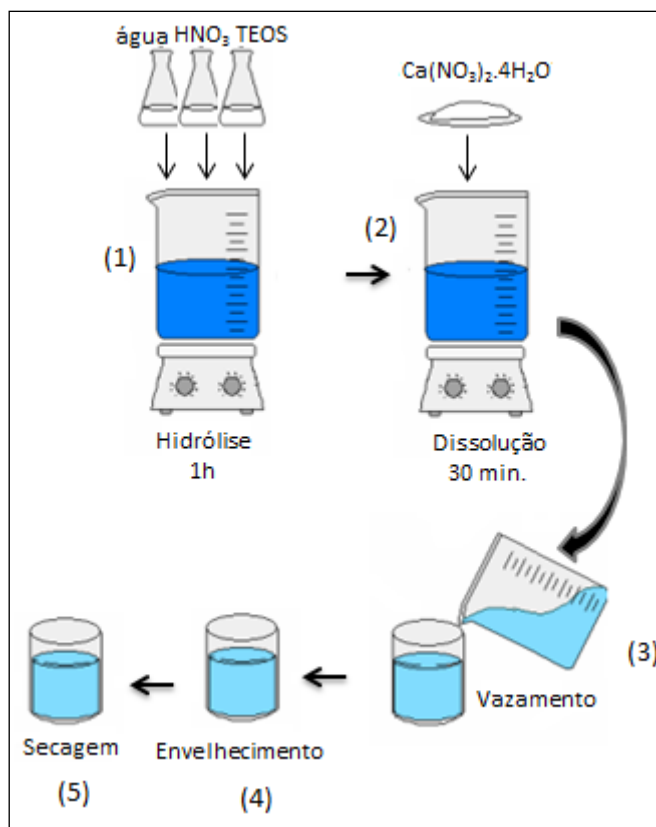


Figura 11- Esquema da síntese do vidro bioativo 70S (adaptada).¹⁰



Figura 12- Fotografia dos moldes de Teflon utilizados na secagem dos materiais estudados neste trabalho.²⁵

4.1.2. Síntese do vidro bioativo 70S contendo cério em diferentes concentrações

As amostras de vidro bioativo contendo cério foram confeccionadas em concentrações distintas, buscando assim, aperfeiçoar os resultados. As composições dos materiais produzidos estão presentes na Tabela 1. As concentrações das amostras foram escolhidas a partir da amostra produzida por *Julian Jones*⁹¹⁻⁹³ na qual foi introduzida a nanocéria em concentração equivalente à da amostra VB+Ce [1]. A partir dessa

composição, foram sintetizadas neste trabalho, amostras contendo o mesmo percentual, a metade do percentual e o do dobro do percentual de cério, porém, tendo como precursor de Ce, o nitrato de cério, para que seus efeitos pudessem ser avaliados.

Tabela 1- Composição dos materiais produzidos.

Amostras	%SiO ₂	%CaO	%Ce ₂ O ₃
70S	70	30	0
VB+Ce [1/2]	69,96	29,98	0,06
VB+Ce [1]	69,92	29,96	0,12
VB+Ce [2]	69,83	29,93	0,24

A síntese escolhida para a obtenção do vidro bioativo/cério foi via sol-gel, a mesma do vidro bioativo 70S, no entanto, foi acrescentado o nitrato de cério hexahidratado, da marca Aldrich, com grau de pureza 99,9%, conforme apresentado na Figura 13, na etapa que antecede a adição do nitrato de cálcio. Foi adicionado o nitrato de cério, etapa 2, que ficou sob agitação magnética por 30 minutos.

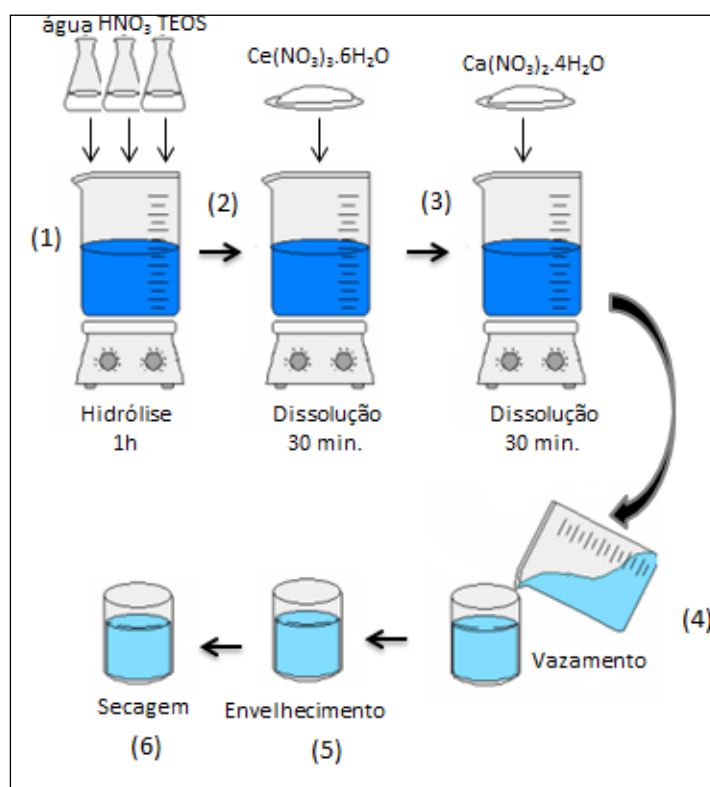


Figura 13- Representação esquemática da síntese do vidro bioativo 70S/Ce (adaptada).¹⁰

As amostras de vidro foram sujeitas a um tratamento térmico a temperatura de 700 °C e 900 °C. Todas as amostras foram moídas e peneiradas.

4.1.3- Síntese assistida por ultrassom

A propagação das ondas ultrassônicas no meio reacional origina uma variação de pressão, a qual é responsável pela cavitação. A cavitação é a criação e implosão de microbolhas de gás no centro de um líquido. A variação de pressão cria, em um ponto do líquido, momentos de compressão e decompressão alternados. Microfluxos de líquidos são formados devido à absorção de grande quantidade de energia vibracional dentro de pequeno volume, com pouco ou nenhum aquecimento associado. Isto favorece o transporte de massa entre fase líquida e a superfície sólida, contribuindo para a aceleração da velocidade da reação, observada em muitos casos. Um dos efeitos da cavitação ultrassônica é a criação de um ambiente único para reações sol-gel que conduzem às características particulares nas amostras como: textura fina, estrutura homogênea, etc.^{36,94}

Buscando uma melhor dispersão do cério nas amostras, foi realizada a síntese assistida por ultrassom. O procedimento adotado na síntese foi semelhante aos demais, no entanto, após a adição do precursor de Ce, a solução foi levada ao ultrassom modelo UP 2005 Ultrasonic Processor, da marca Hielsher Ultrasound Technology, sob um ciclo de 0,8 e amplitude de 80%, onde permaneceu por 10 minutos, em seguida, foi adicionado o precursor de cálcio e então, a solução permaneceu no equipamento por mais 20 minutos. As amostras foram levadas para a estufa sem circulação de ar por 3 dias, em seguida, na mufla, foram aquecidas até 700 °C, com taxa de aquecimento de 1 °C por minuto, mantendo por 6 horas a temperatura a 700 °C.

Todas as amostras, sintetizadas tanto pela forma convencional quanto pela síntese assistida por ultrassom, foram submetidas a moagem e peneiradas. A faixa de grãos utilizada foi de 38 µm a 100 µm para posterior utilização na caracterização, teste de bioatividade e citotoxicidade. Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.2- Teste de bioatividade dinâmico em SBF

As amostras foram imersas em SBF por diferentes tempos de imersão para a determinação do tempo de formação da camada de hidroxiapatita (HA) na superfície das

amostras. Foram eleitas para o teste de bioatividade, as amostras tratadas a 700 °C, em função de sua estrutura amorfa, que possibilita uma maior degradabilidade no meio, favorecendo também maior facilidade de formação da camada de HA. Os intervalos de tempo avaliados foram de 1 dia, 1 semana e 4 semanas. Um frasco nomeado de referência (o branco) foi feito para cada intervalo de tempo. Os testes foram realizados em triplicata. Uma fração de 75 mg de vidro bioativo foi imersa em 50 mL de solução de SBF. O tempo de teste é iniciado no momento em que é adicionado o SBF. O teste com maior riqueza de detalhes será descrito a seguir.

O teste consistiu na preparação da solução de SBF, seguindo o protocolo de Kobubo,⁹⁵ a 37 °C. As amostras foram submetidas a uma agitação de 120 rpm. Todos os frascos foram devidamente etiquetados. Adicionou-se 75 mg de vidro bioativo em um erlemeyer de polietileno de 100 mL. Foi acrescentado 50 mL de SBF para o primeiro intervalo de tempo pré-estabelecido. Foi registrado a hora de início e a posição das amostras no agitador de incubação. Adicionou-se 50 mL no frasco de referência e mediu-se seu pH. Depois de 5 minutos de início do experimento, adicionou-se 50 mL de SBF na amostra seguinte e, assim sucessivamente. Todos os testes foram realizados em triplicata. A Figura 14 mostra o esquema do teste de bioatividade dinâmico em SBF.

Foram utilizados papel de filtro (Whatman grau 2) e acetona para cessar as reações. Após 5 minutos, foi medido o pH da solução referência. No fim do primeiro intervalo de tempo, filtrou-se a solução de tal modo que a amostra ficou no papel de filtro. A solução filtrada foi levada ao CDTN, onde análises de ICP-AES, descrita em item posterior, foram realizadas. Em seguida, as amostras foram lavadas com água deionizada (DI), (apenas o suficiente para cobrir as partículas) para remover os sais não aderentes, em seguida, foram lavadas novamente com acetona para terminar a reação. O passo seguinte foi deixar as amostras secarem em uma placa de *Petri* devidamente identificadas em estufa a 60 °C.

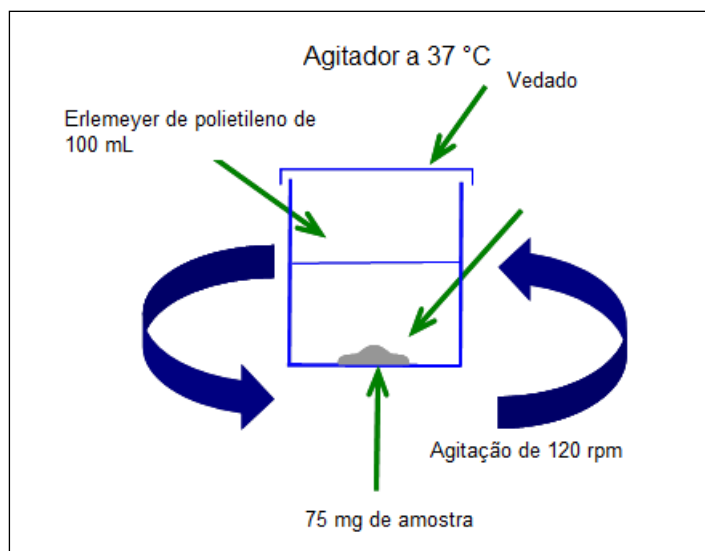


Figura 14- Esquema do teste de bioatividade dinâmica em SBF.

4.3- Técnicas de caracterização utilizadas

4.3.1- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Ensaio para avaliação da morfologia do material foram realizados através do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), da marca FEI, modelo Inspect S50, acoplado ao Espectrômetro por Dispersão de Energia de Raios X (EDS), modelo Genesis. Para a realização da análise de MEV, as amostras foram recobertas com carbono, fazendo com que a superfície das amostras tornasse condutora.

4.3.2- Espectroscopia por Dispersão de Energia de Raios X (EDS)

Com o intuito de analisar qualitativamente as composições das amostras, análises de EDS foram realizadas na superfície de todas as amostras de concentrações distintas de Ce e submetidas ao tratamento térmico de 700 °C e 900 °C, antes e após imersão em SBF. O equipamento utilizado foi elencado no tópico anterior, por estar acoplado ao MEV.

4.3.3.- Caracterização por espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) foi utilizada para a identificação de grupos químicos específicos, realizada em um equipamento da marca

Nicolet, modelo 6700, equipado com Transformada de Fourier com acessório ATR. O cristal utilizado foi CsI e o número de *scans* utilizados foi de 32.

4.3.4- Difração de raios X (DRX)

Para determinação das fases presentes, as amostras foram analisadas por difratometria de raios X. Mediu-se a radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,54056 \text{ \AA}$), trabalhando com 40 kV, 20 mA e 2Θ , variando de $3,03^\circ$ a $89,91^\circ$ com passo igual a $0,06^\circ$. Foi utilizado o programa “High Score” para auxiliar na identificação dos picos. Todas as amostras foram primeiramente peneiradas utilizando peneira de 38 - 110 μm .

4.3.5- Espectrometria de Plasma (ICP-AES)

Para análise química das amostras por ICP-AES, se fez necessário a abertura das amostras. A abertura se fez da seguinte maneira: 0,1 g de amostra foi misturada a 0,5 g de metaborato de lítio anidro em um cadinho de platina (Pt) e em seguida, a mostra foi fundida em um forno mufla à temperatura de $(1.300 \pm 20)^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Em seguida houve a dissolução do material fundido com HNO_3 (10% v/v).

A análise de espectroscopia ICP-AES, foi utilizada, como uma técnica de análise química quantitativa das amostras. Estas foram feitas em um espectrômetro de plasma da marca Spectro Analytical Instruments, modelo Spectroflame.

4.3.6- Fluorescência de Raios X

A fluorescência de raios X teve como objetivo, quantificar os elementos presentes em cada amostra, sendo assim uma análise quantitativa. O equipamento utilizado foi RIGAKU ZSX Primus II e o tubo de ródio. Foi utilizada esta técnica, com o objetivo de comparar a composição química fornecida por outras técnicas quantitativas que, embora forneça o mesmo dado, concentrações do elemento na amostra, trabalham com metodologia de funcionamento físico distinta.

4.3.7- Análise por adsorção de Nitrogênio

O método de análise B.E.T. é uma análise matemática que tem como objetivo descrever a adsorção física de moléculas de gás nitrogênio (N_2) sobre uma superfície sólida avaliando sua área superficial. O método BET foi utilizado para calcular as áreas superficiais específicas das amostras. O volume de poros e a distribuição do tamanho de

poro foram obtidos pelas isotermas de adsorção. As amostras foram secas a 40 °C por 48 h sob fluxo de N₂ para desgaseificação.

4.4- Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade dos biomateriais foi mensurada pelo ensaio de MTT, baseado em um método colorimétrico que avalia a capacidade de enzimas desidrogenases, presentes em células viáveis em converter o sal de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol, solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água.⁹⁶ Os cristais de formazan são solubilizados e a densidade ótica pode ser determinada pelo espectrofotômetro UV-vis a 595 nm. O número de células viáveis é diretamente proporcional à quantidade de cristais de formazan produzidos.

Células de cultura primária de fibroblastos humanos na quarta passagem foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 1×10^4 células/por poço. As populações celulares foram normalizadas com meio DMEM durante 24 horas, após esse período o meio foi trocado e as amostras foram colocadas nos respectivos poços.

Amostras do vidro bioativo 70S, VB+CE [1/2], VB+Ce [1], VB+Ce [2], tratadas a 700 °C e das amostras VB+Ce [1] e VB+Ce [2], tratadas a 900 °C, na concentração de 1mg/mL foram utilizadas para este experimento. Como controle positivo do experimento, células e meio DMEM e, como controle negativo, células e PBS 10x. O método de esterilização das amostras foi radiação ultravioleta por 40 minutos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n=3).

As células foram incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂ por 72 horas. Ao término deste período de incubação, o meio de cultura foi retirado e descartado e foi adicionado 210 µL/poço de meio DMEM. Em seguida, foi acrescentado 170 µL/poço de solução de MTT (Invitrogen) (5 mg/mL) e a placa foi incubada em estufa à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 2 horas. As células foram observadas ao microscópio ótico (M.O.) para visualização dos cristais de formazan e estes foram solubilizados através da adição de 210 µL/poço de uma solução de SDS (*sodium dodecil sulfate*) 10%-HCl (ácido clorídrico 0,01 M - 10% de dodecil sulfato de sódio em água) seguido de incubação em estufa à 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 18 horas. Transferiu-se 100 µL de cada poço para uma placa de 96 poços (fundo reto), em triplicata, e a

densidade ótica foi mensurada no espectrofotômetro a 595 nm. Durante o experimento, todos os passos envolvendo o reagente MTT foram executados em condições mínimas de luminosidade. Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA *two-way* seguido pelo teste de *Bonferroni* e expressos como média \pm EMP (erro médio padrão).^{25,57,96}

5. Resultados e Discussão

5.1- Síntese e Caracterização das amostras de Vidro Bioativo /Nitrato de Ce

5.1.1- Síntese das amostras de Vidro Bioativo / Nitrato de Ce (VB+Ce)

As amostras foram sintetizadas pelo método sol-gel, via alcoóxido. As amostras foram submetidas a duas temperaturas de tratamento térmico 700 °C e 900 °C. Numa análise preliminar visual pôde ser verificado que as amostras possuem uma estrutura relativamente quebradiça (as do vidro 70S, ainda maior) e de cor branca (Figura 15 - A). As amostras contendo Ce ficaram com a superfície mais lisa e mais difíceis de serem trituradas (Figura 15 – B). As amostras inicialmente foram obtidas na forma de monolitos (Figura 15) e em seguida foram trituradas e peneiradas. A faixa de grãos utilizados para todos os testes e análises foi de 38 - 100 µm.

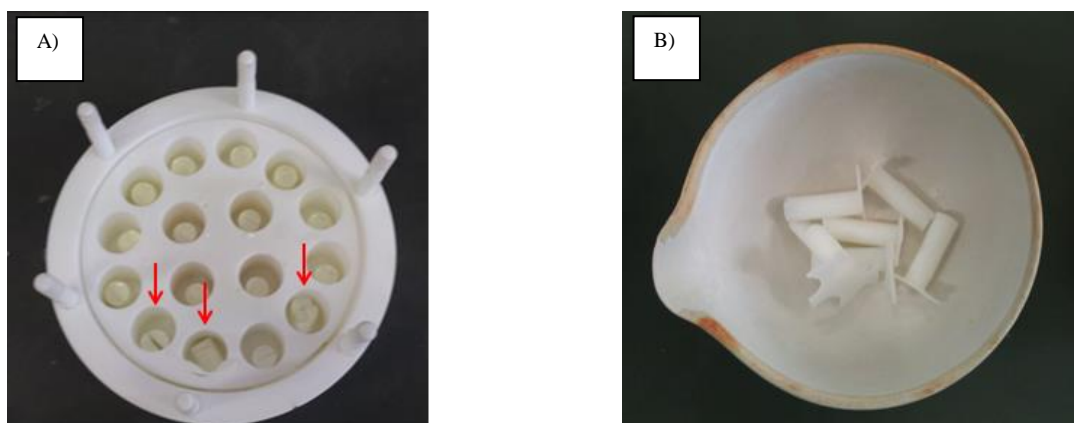


Figura 15- Fotografias das amostras de VB 70S (A) e VB+Ce, respectivamente, na forma de monolito.

5.2- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A partir das amostras obtidas, já trituradas, a morfologia da superfície das partículas dos vidros pôde ser visualizada nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresentada na Figura 16. A morfologia das amostras é relativamente parecida, no entanto, algumas amostras, onde a presença de cério é maior, apresenta maiores pontos brancos que posteriormente foram identificados no EDS como área onde há presença significativa de cério, evidenciando uma heterogeneidade da amostra. Os pontos são mais evidentes na amostra VB+Ce [2], onde há maior teor de Ce.

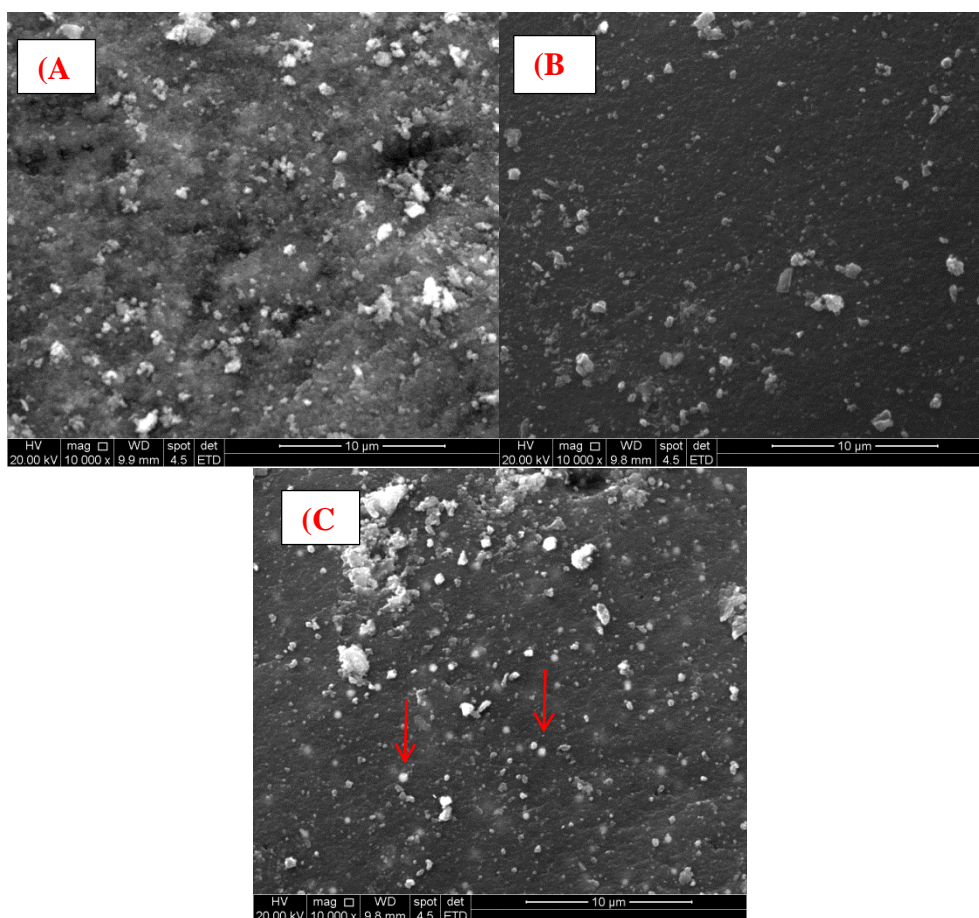


Figura 16- Micrografia de MEV, com aumento de 10.000X, das superfícies das partículas (A) VB - 70S, (B) amostra VB+Ce [1] e (C) amostra VB+Ce [2].

5.3- Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

Foi detectada a presença dos elementos químicos silício (Si), cálcio (Ca) e carbono (C), este último devido ao processo de metalização das amostras. Observam-se na Figura 17, os principais constituintes presentes na amostra. O Ce, está presente em quantidade abaixo do limite de detecção da técnica usada.

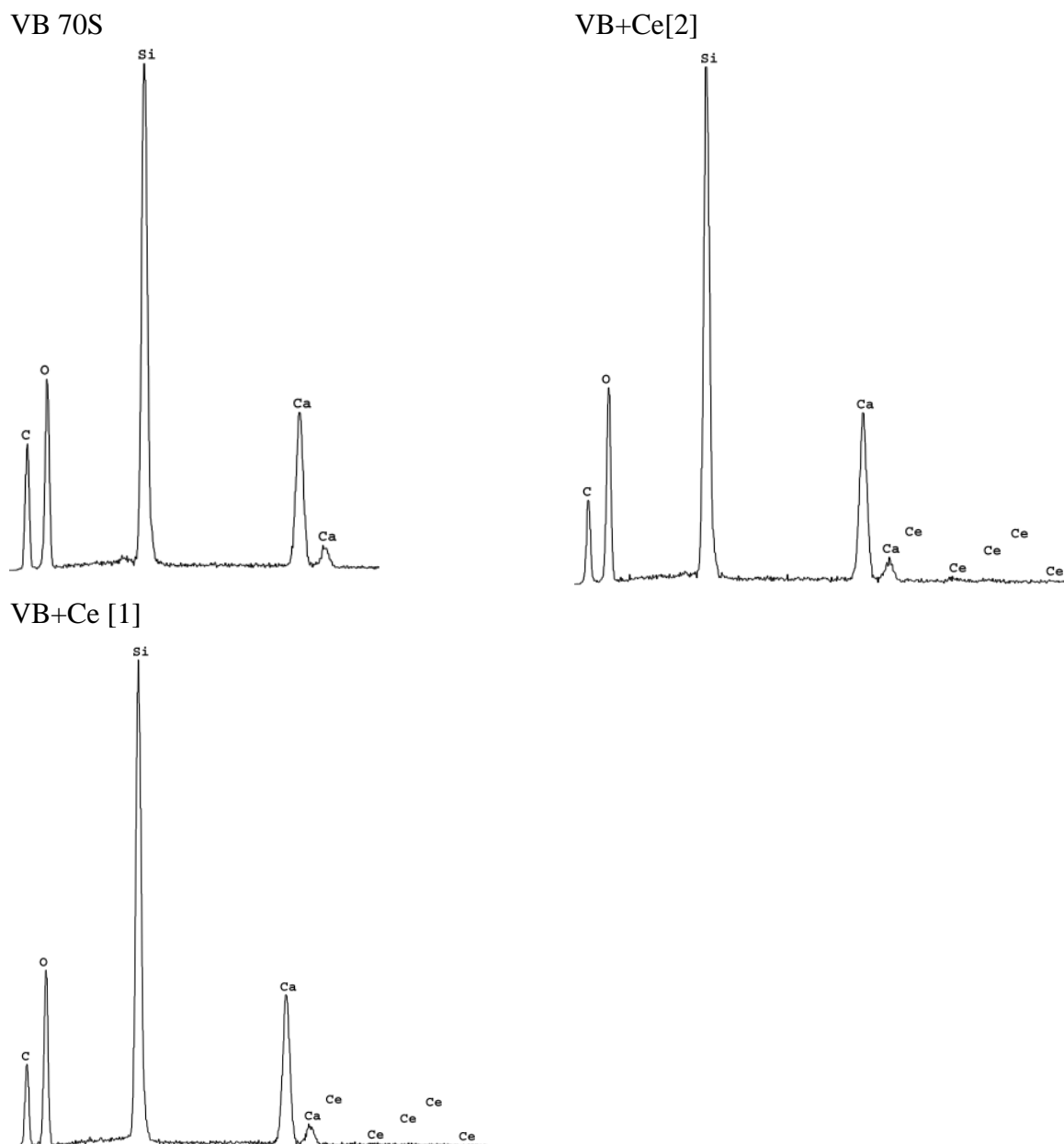


Figura 17- Análise de EDS das amostras de VB 70S, VB+Ce [1] e VB+Ce [2].

Para confirmação da presença do Ce e certificar de que o mesmo havia sido incorporado no processo de síntese, foi realizada uma análise nos pontos brancos do MEV, que se evidenciaram principalmente na amostra VB+Ce [2]. A Figura 18 ilustra os pontos encontrados na micrografia com aumento de 10.000X, para as amostras VB+Ce [1] e VB+Ce [2], respectivamente. Na parte cinza consta somente a presença de Si e Ca, componentes do vidro bioativo, já nos pontos pequenos brancos foi observado a presença do Ce, conforme mostrado nos espectros de EDS correspondentes.

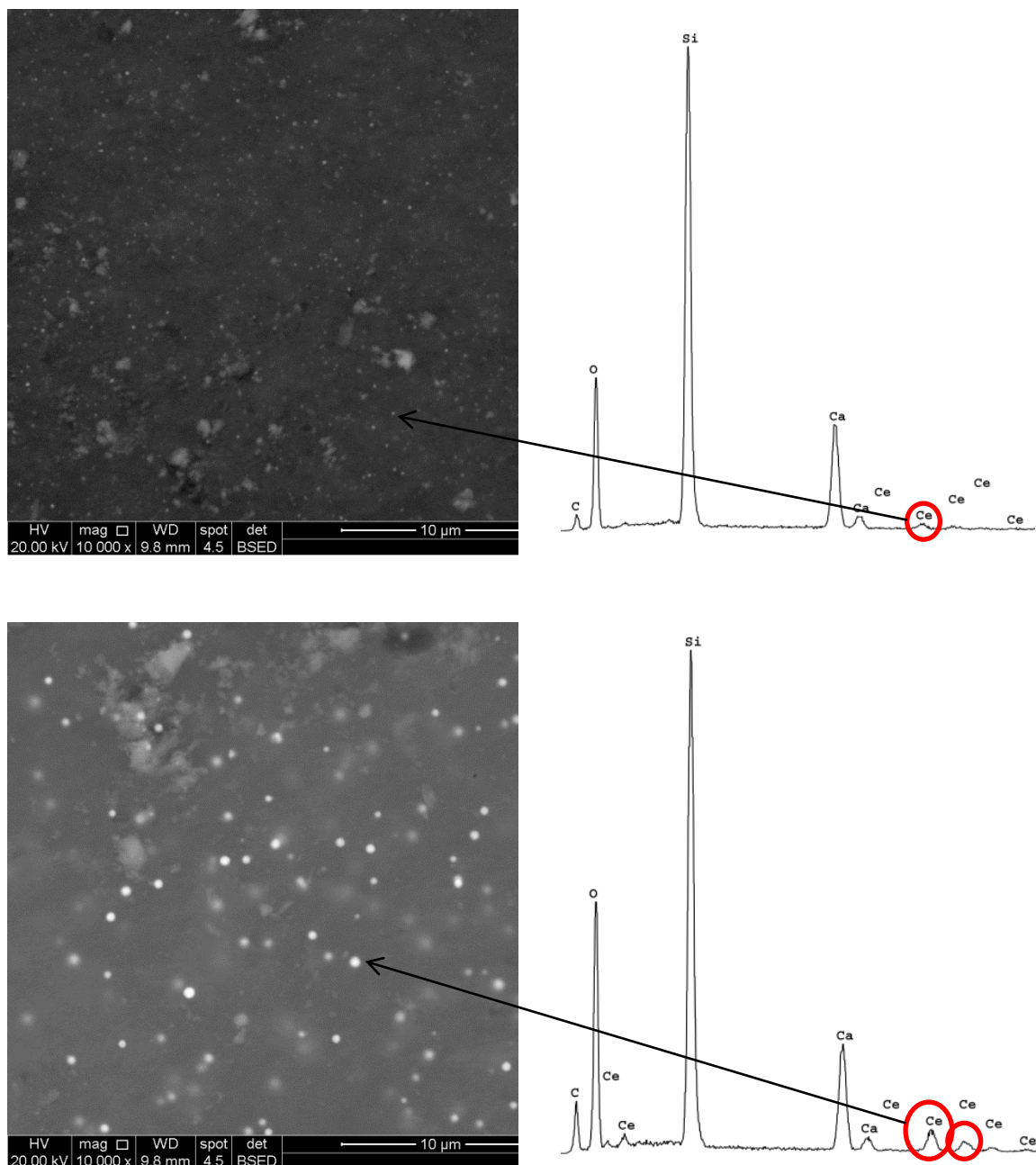


Figura 18- Micrografia de MEV e análise de EDS confirmando a incorporação do Ce nas amostras (A) VB+Ce [1] e (B) VB+Ce [2].

5.4- Caracterização da cristalinidade por Difração de Raios X

A Figura 19 mostra o difratograma de raios X da amostra de vidro bioativo 70S. Observa-se que a amostra possui difratograma característico de material amorfo, em concordância com a literatura.⁹⁰

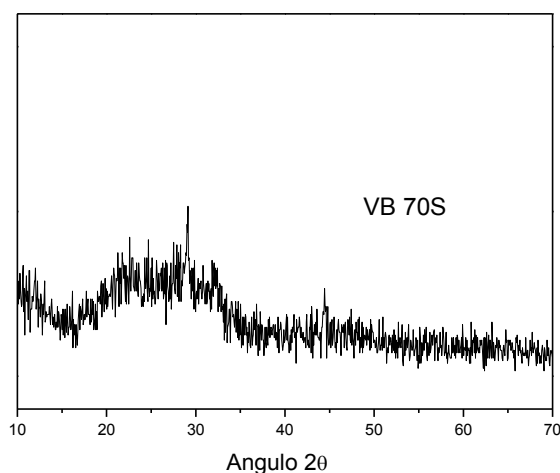


Figura 19- Difratoograma de raios X da amostra de vidro bioativo 70S.

Os difratogramas das amostras VB+Ce [1/2]; VB+Ce [1], VB+Ce [2], tratadas a 700 °C, analisadas por DRX, Figura 20, foram realizados para identificar a cristalinidade das mesmas. Pelos difratogramas apresentados pode-se considerar que os materiais produzidos, tratados a 700 °C são predominantemente amorfos.

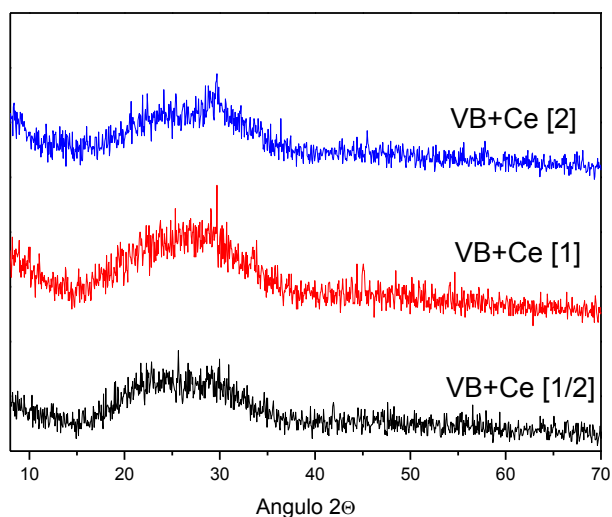


Figura 20- Difratoograma das amostras VB+Ce [1/2]; VB+Ce [1], VB+Ce [2] tratadas a 700 °C.

As amostras de VB/Ce, submetidas a um tratamento térmico de 900 °C, Figura 21, tiveram sua cristalinidade alterada. As amostras apresentaram fases cristalinas típicas da Ciclowollastonita (CaSiO_3) sistema triclínico (*) e Pseudowollastonita ($\text{Ca}_3(\text{Si}_3\text{O}_9)$) sistema triclínico (#). Embora as amostras apresentem sistemas cristalinos iguais, os

índices de Muller são diferentes. Possuem a mesma composição, mas tratam-se de fases diferentes. Foi utilizado o programa “High Score” para auxiliar na identificação dos picos. Todos os resultados foram normalizados.

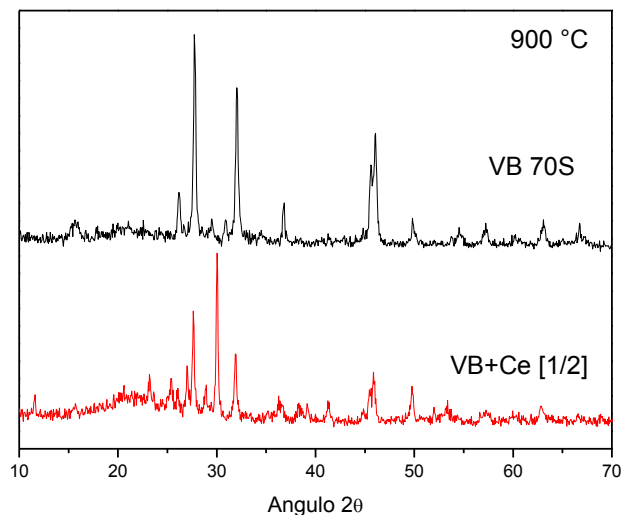


Figura 21- Difratoograma das amostras de VB/Ce tratadas a 900 °C.

5.5- Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A Figura 22 ilustra o espectro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das amostras VB+Ce [1/2], (B) VB+Ce [2], (C) VB+Ce [1] e (D) VB 70S, todas tratadas a 700 °C, na qual pode-se observar as bandas de absorção características na região entre 4000 cm^{-1} e 500 cm^{-1} . A banda centrada em 3450 cm^{-1} está relacionada com o estiramento SiO – H dos grupos silanois superficiais que fazem ligação de hidrogênio com as moléculas de água e correspondem às vibrações de estiramento dos grupos hidroxila.²⁵ Há uma banda O-H em 1630 cm^{-1} , referente ao modo de deformação das moléculas de água adsorvidas, observa-se também, uma banda na região do número de onda característico das ligações Si-O-Si, estiramento de 1090 cm^{-1} e 800 cm^{-1} . Outra banda está presente e associa-se ao modo vibracional das ligações Si-OH com estiramento, em 950 cm^{-1} .¹⁰ As bandas em 1200 cm^{-1} e 1090 cm^{-1} são associadas aos modos vibracionais LO e TO, respectivamente, de estiramento assimétrico das ligações Si-O-Si em várias espécies cíclicas. Houve um deslocamento da banda de 1200 cm^{-1} provavelmente devido à sobreposição com o modo de dobramento das ligações Si-O-Si em 1400 cm^{-1} . A Figura 25 ilustra a ampliação das bandas na região de 400 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} .

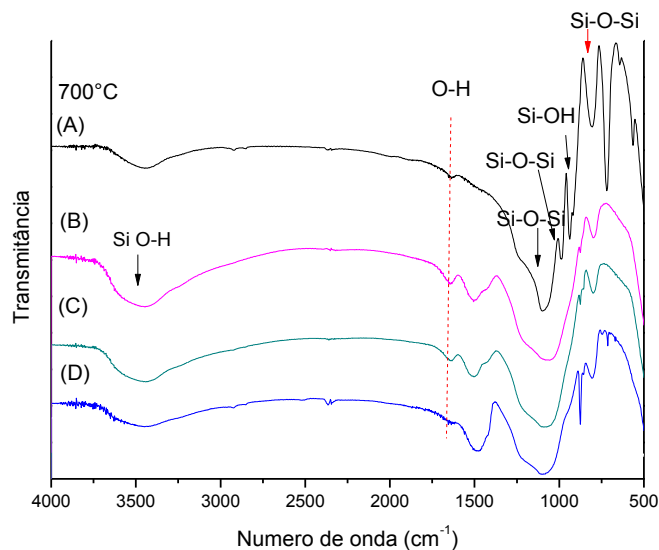


Figura 22- Ilustração da análise de FTIR realizada para as amostras (A) VB+Ce [1/2], (B) VB+Ce [2], (C) VB+Ce [1] e (D) VB 70S, todas tratadas a 700 °C.

A Figura 23 ilustra a ampliação das bandas na região de 400 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} . As bandas mencionadas na Figura 22 e Figura 23 estão presentes também nos espectros das amostras que sofreram um tratamento térmico de 900 °C (Figura 24). A Figura 25 revela uma ampliação das bandas presentes na área entre 400 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} .

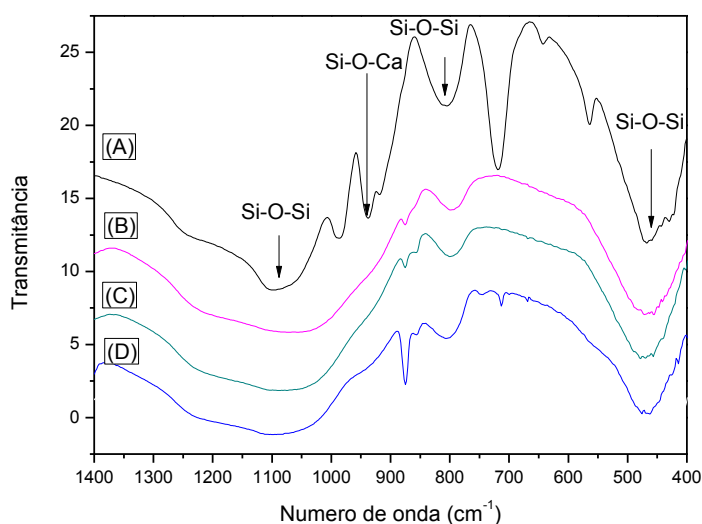


Figura 23- Ampliação das bandas na região de 400 cm^{-1} a 1400 cm^{-1} . (A) VB+Ce [1/2], (B) VB+Ce [2], (C) VB+Ce [1] e (D) VB 70S, todas tratadas a 700 °C.

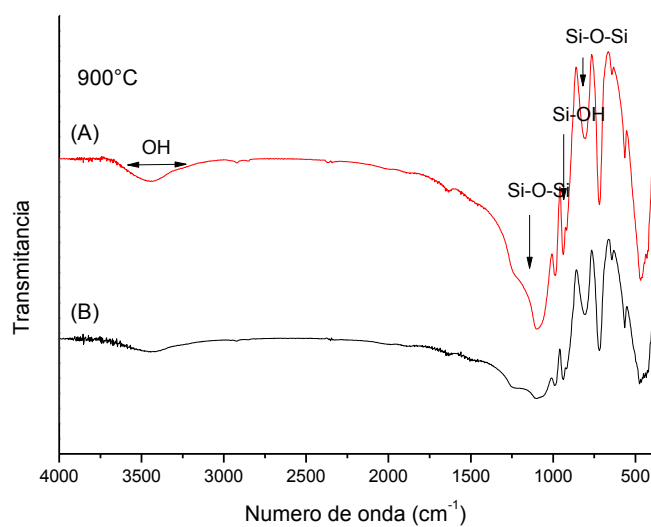


Figura 24- Ilustração da análise de FTIR realizada para as amostras (A) VB+Ce [1], (B) VB+Ce [2], ambas tratadas a 900 °C.

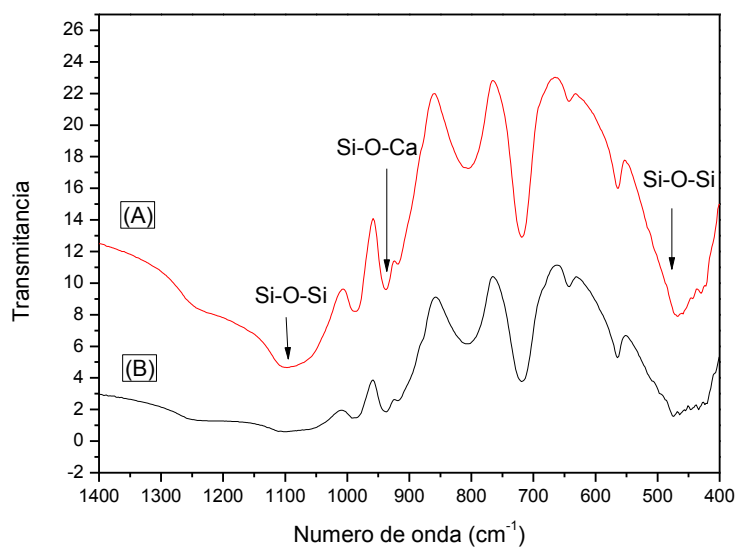


Figura 25- Ampliação das bandas na região de 400 cm^{-1} a 1400 cm^{-1} . (A) VB+Ce [1] e (B) VB+Ce [2], ambas tratadas a 900 °C.

A diferença encontrada entre as amostras de vidro bioativo pode estar associada à diferença de concentração de Ce e à diferença de tratamento térmico realizado nas amostras.

5.6- Composição química das amostras

Para confirmação do teor de cério presente no material, foram realizadas três análises distintas. A Tabela 2 mostra as concentrações encontradas para o óxido de cério de duas amostras, obtidas por ICP-AES e fluorescência de raios X.

Tabela 2- Teor de Ce_2O_3 (%) nas amostras de VB.

Amostras	Concentração nominal	ICP-AES	Fluorescência de raios X
VB+Ce [1] (700 °C)	0,12	0,25±0,03	0,20±0,02
VB+Ce [2] (700 °C)	0,24	0,44±0,04	0,44±0,04

Duas técnicas distintas foram utilizadas para verificar a concentração do SiO_2 , ICP-AES e Fluorescência de raios X (Tabela 3). A diferença entre os valores encontrados se dá pelo fato de que na fluorescência de raios X levou em consideração a perda ao fogo que foi de 20,6% para a amostra VB+Ce [1] e de 17,3% para a amostra VB+Ce [2]. No entanto, em relação à concentração nominal houve uma diferença significativa verificada pelas duas análises, o que será alvo de estudos futuros.

Tabela 3- Ilustração da concentração do SiO_2 (%) nas amostras de VB.

Amostras	Concentração nominal	ICP-AES	Fluorescência de raios X
VB+Ce [1] (700 °C)	69,91	69±3	61
VB+Ce [2] (700 °C)	69,83	73±3	64

As mesmas técnicas utilizadas para a obtenção da concentração do SiO_2 foram utilizadas para determinação da concentração de CaO (Tabela 4).

Tabela 4- Ilustração da concentração do CaO (%) nas amostras de VB.

Amostras	Concentração nominal	ICP-AES	Fluorescência
VB+Ce [1] (700 °C)	29,96	20±2	18
VB+Ce [2] (700 °C)	29,93	22±2	18,4

A análise de fluorescência de raios X levou em consideração a perda ao fogo que foi de 20,6% para a amostra VB+Ce [1] e 17,3% para a amostra VB+Ce [2].

Os valores encontrados foram relativamente próximos dos valores nominais para concentração de cada elemento nas amostras evidenciando assim a composição química desejada.

5.7- Adsorção de Nitrogênio

A estrutura mesoporosa e a elevada área superficial são aspectos típicos de materiais obtidos por sol-gel. Essas características intensificam a taxa das reações na superfície, conduzindo para uma liberação mais acelerada de espécies iônicas durante a dissolução do material. A área superficial específica tem um papel importante na bioatividade de biomateriais. A habilidade do substrato de induzir a formação de uma camada biologicamente ativa de HA não depende somente da composição química do vidro bioativo, mas também da textura produzida pelo processamento sol-gel. Tais estudos foram realizados em pós de vidro bioativo que apresentavam área superficial específica entre $300 \text{ m}^2/\text{g}$ a $700 \text{ m}^2/\text{g}$ e volume de poros maior que $0,4 \text{ cm}^3/\text{g}$. Este aspecto subestrutural poderia ser relacionado a uma maior densidade de sítios potenciais de nucleação na formação da camada de hidroxiapatita sobre a superfície de vidros bioativos com até 90% em mol de SiO_2 .^{97,98}

A determinação da área superficial das amostras foi feita pelo método de Brunauer-Emmett-Teller (BET). O volume de poros e a distribuição do tamanho de poros foram obtidos pelas isotermas de adsorção. As amostras foram secas a 40°C por 48 horas sob fluxo de N_2 para desgaseificação.

Pode ser verificado que os materiais em estudo encontram-se com estruturas mesoporosas, ou seja, tamanho de poros na faixa de 2 nm a 50 nm. As isotermas de adsorção/dessorção correspondem ao tipo IV (Figura 26) indicando material constituído por mesoporos. Estruturas mesoporosas são estruturas favoráveis quando se trata de biomateriais, isto por possuírem elevada área superficial o que resulta em alta bioatividade e elevada tendência a biorreabsorção.⁹⁰

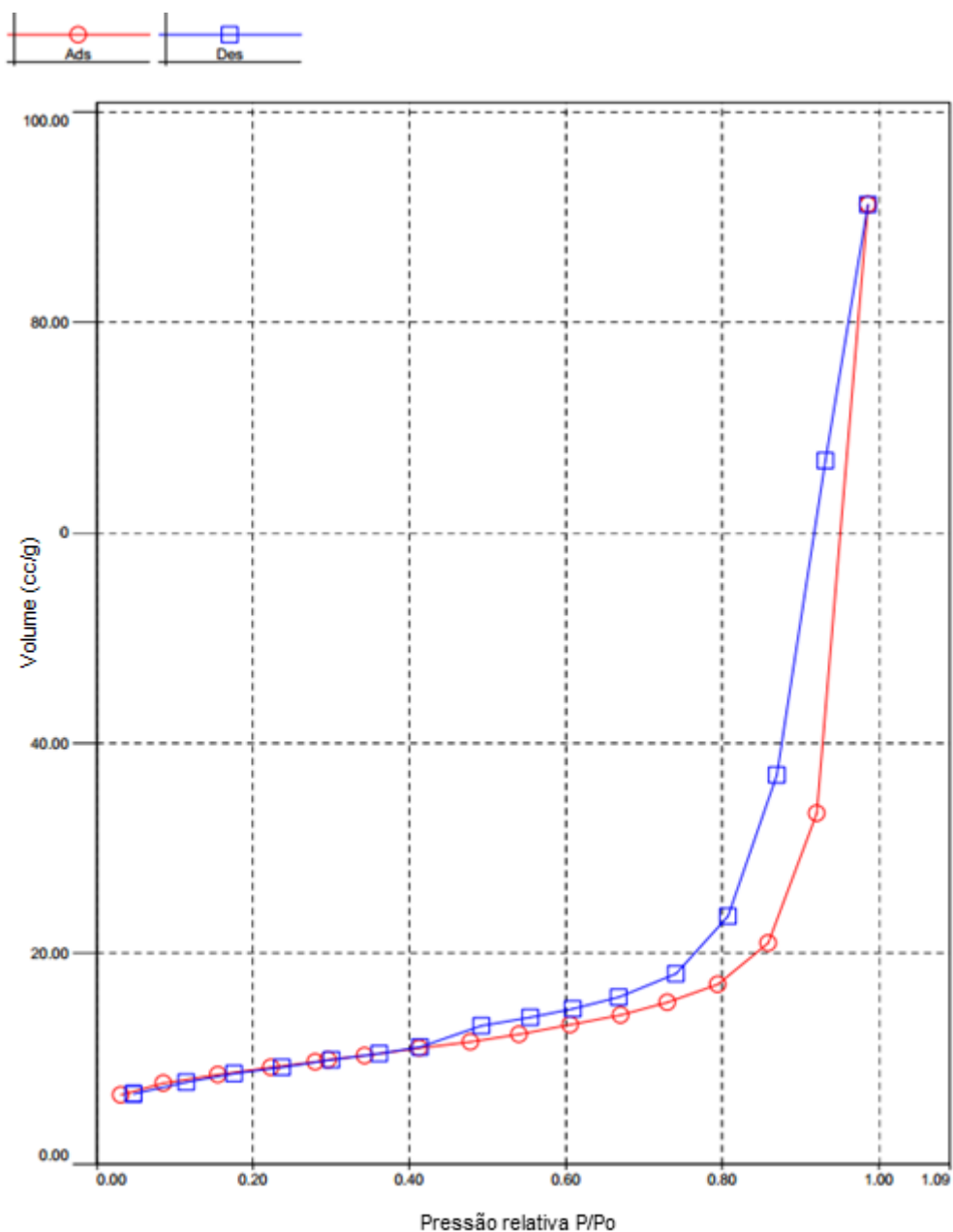


Figura 26- Ilustração do tipo de isoterma caracterísitca dos materiais estudados.

O efeito da variação da temperatura de tratamento térmico e da concentração de cério sobre a área superficial e mesoporosidade consta elencado na Tabela 5.

Tabela 5- Valores fornecidos pela análise de adsorção de N₂ por tipo de amostra e temperatura de tratamento térmico.

Amostras	Área superficial específica (m²/g)	Volume de poros (cm³/g)	Tamanho médio de poros (nm)
VB 70S (700 °C)	47,94	0,11	9,38
VB+Ce [1/2] (700 °C)	109,48	0,35	12,96
VB+Ce [1] (700 °C)	96,61	0,46	19,02
VB+Ce [2] (700 °C)	109,96	0,41	14,82
VB+Ce [1] (900 °C)	13,22	0,08	23,52

Os valores encontrados para área superficial, volume de poros e tamanho médio de poros estão dentro dos valores encontrados na literatura.⁹¹⁻⁹⁴ A amostra VB+Ce [1] tratada a 900 °C apresentou o menor volume de poros, provavelmente devido ao aumento da temperatura de tratamento térmico, indicando alta densificação da amostra, adquirindo uma estrutura mesoporosa a partir dessa temperatura com tamanho de poros na faixa de 2 nm a 50 nm, possuindo alta área superficial que implica em alta bioatividade e elevada tendência a biorreabsorção. A amostra que apresentou maior volume de poros foi a VB+Ce [1] tratada a 700 °C com tamanho médio de poros equivalente a 19 nm. As amostras tratadas a 700 °C apresentaram maior área superficial específica justamente pelo fato das amostras tratadas a 900 °C terem sofrido maior densificação, ou seja, com o aumento da temperatura a amostra começa a se apresentar de forma mais organizada o que implica na densificação apresentada o que é reforçado pela análise de DRX, onde fases cristalinas começam a aparecer a essa temperatura.

5.8- Teste de bioatividade dinâmico em SBF

O teste de bioatividade de um material deve ser realizado de maneira a simular o ambiente *in vivo*. As amostras VB+Ce [1/2], VB+Ce [1] e VB+Ce [2], tratadas a 700 °C foram imersas em SBF (simulated body fluid), seguindo o protocolo de Kokubo⁹⁶ para a confecção da solução e, em seguida, foram levadas para o agitador, ficando sob agitação em intervalos de tempo de 1 dia, 1 semana e 4 semanas. Durante os estudos de bioatividade, foram avaliadas as variações do pH das soluções de SBF usadas nos testes dinâmicos, esboçados na Figura 27. Foi realizado a leitura do pH da solução controle

em períodos de tempo distintos. Pode ser observado que o pH das soluções não variam significativamente, revelando certa estabilidade do ensaio.

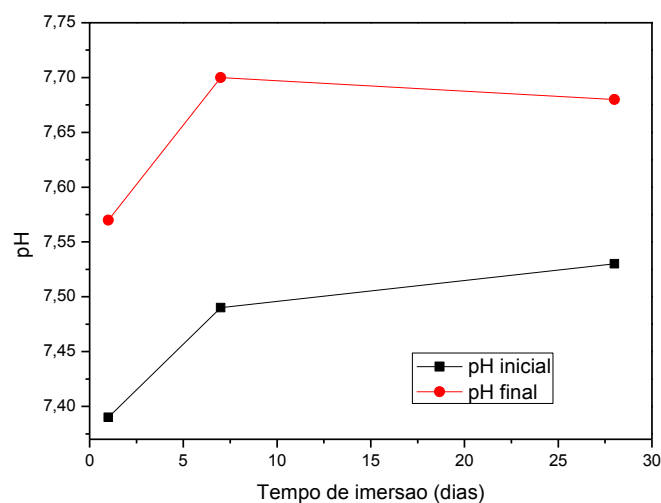


Figura 27- Controle do pH da amostra de referência para os intervalos de tempo de 1 dia, 1 semana e 4 semanas.

Quando um material bioativo é implantado no corpo humano, várias reações bioquímicas e biofísicas ocorrem na interface implante-tecido. Estas reações resultam em uma forte interação interfacial associada à formação de uma camada de hidroxiapatita (HA) na superfície do implante.⁹⁹

Com a intenção de avaliar a possível presença da camada de HA, foram feitas análises de FTIR das amostras que mostram bandas em 875 cm^{-1} e 560 cm^{-1} ilustradas na Figura 28, típicas da HA, indicando formação de estruturas semelhantes à da hidroxiapatita.

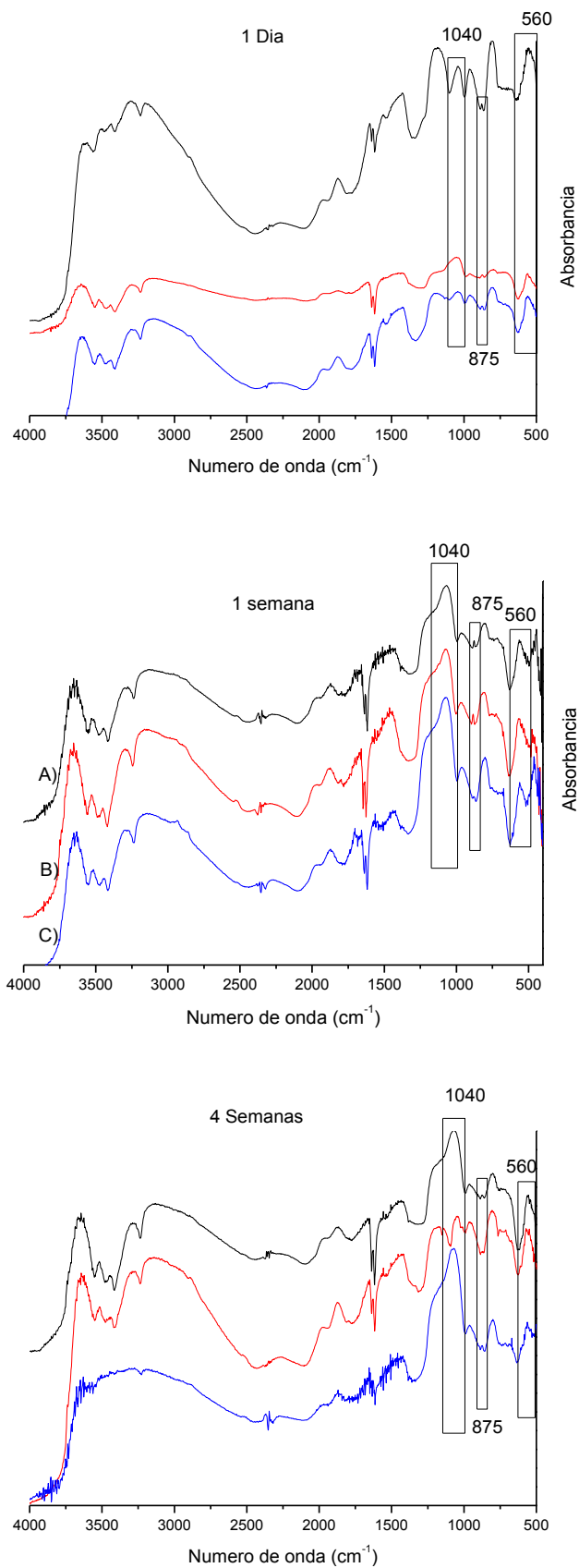


Figura 28- FTIR das amostras (A) VB+Ce [1/2], (B) VB+Ce [1] e (C) VB+Ce [2], imersas em SBF por intervalos de tempo de 1 dia, 1 semana e 4 semanas.

As amostras imersas em SBF por diferentes intervalos de tempo também foram analisadas por DRX. Observando os resultados de difração de raios X da Figura 29, pode-se concluir que as amostras permaneceram amorfas quando em contato com a solução SBF por um período de tempo de 1 dia, ou seja, não houve formação da camada de hidroxiapatita. Já nas amostras imersas em SBF por um período de tempo superior, ou seja, 1 semana, conforme ilustra a Figura 30, picos de fases cristalinas se evidenciaram. Os espectros de DRX confirmaram a presença de estruturas cristalinas na superfície das amostras, entretanto não se pode afirmar a formação da camada de HA. Os dados sugerem que houve precipitação de fosfato de cálcio nas amostras, entretanto não podemos afirmar quais as fases estão presentes nas amostras analisadas. Fases cristalinas não foram possíveis de serem identificados nas amostras que ficaram imersas por 4 semanas (Figura 31) em SBF, provavelmente em função da agitação mecânica que ficaram sujeitas. Todos os testes foram feitos em triplicata.

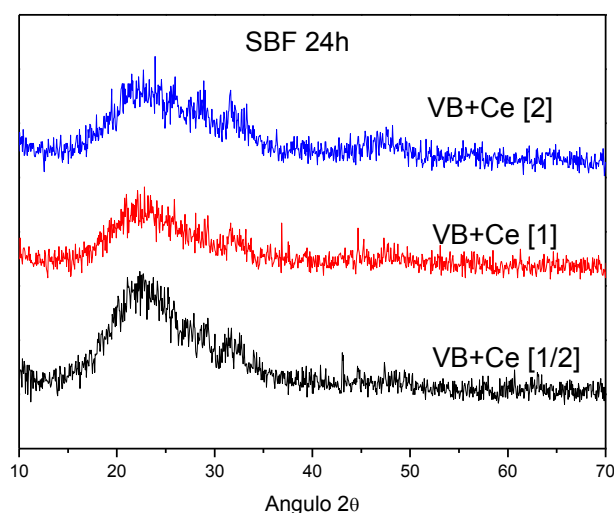


Figura 29- Difratograma de raios X das amostras tratadas a 700 °C durante 24 horas.

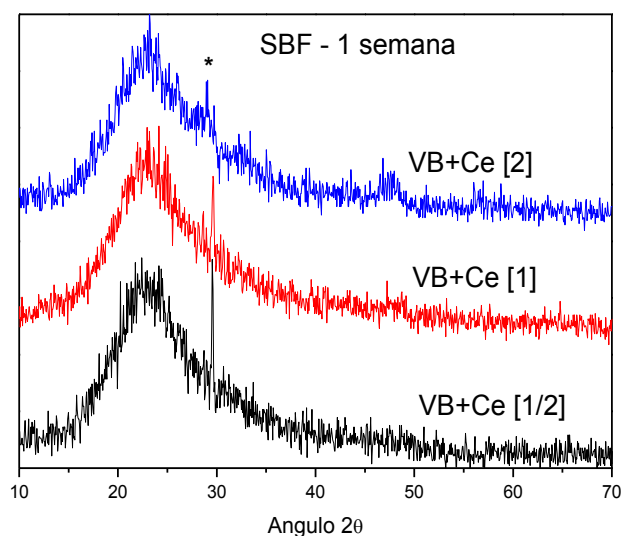


Figura 30- Difratoograma de raios X das amostras tratadas a 700 °C durante 1 semana. Em $2\theta = 29^\circ$ observa-se um pico indicando fase cristalina.¹⁰⁰

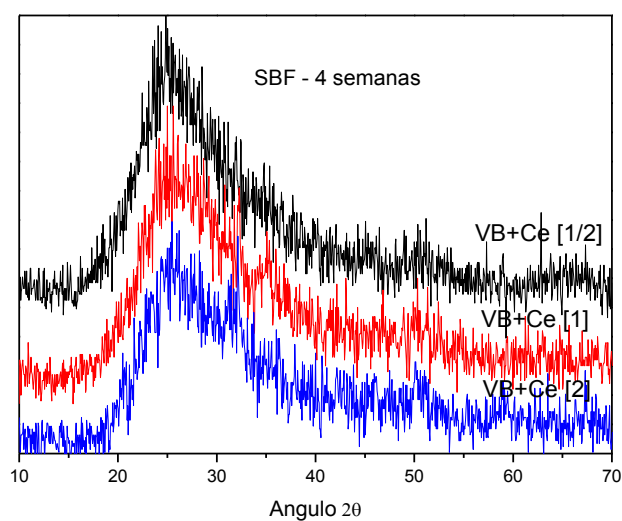


Figura 31- Difratoograma de raios X das amostras tratadas a 700 °C durante 4 semanas.

As amostras após serem imersas em SBF pelos períodos de 1 dia, 1 semana e 4 semanas passaram também pela análise de MEV/EDS para verificação de alguma fase cristalina formada na superfície das amostras. A Figura 32 ilustra a formação de estruturas que podem ser indício da formação de estrutura cristalina, nos três intervalos de tempo para a amostra VB+Ce [1/2], visualizado no MEV e no EDS. O mesmo ocorreu com a amostra VB+Ce [1], Figura 33 e também com a amostra VB+Ce [2], Figura 34.

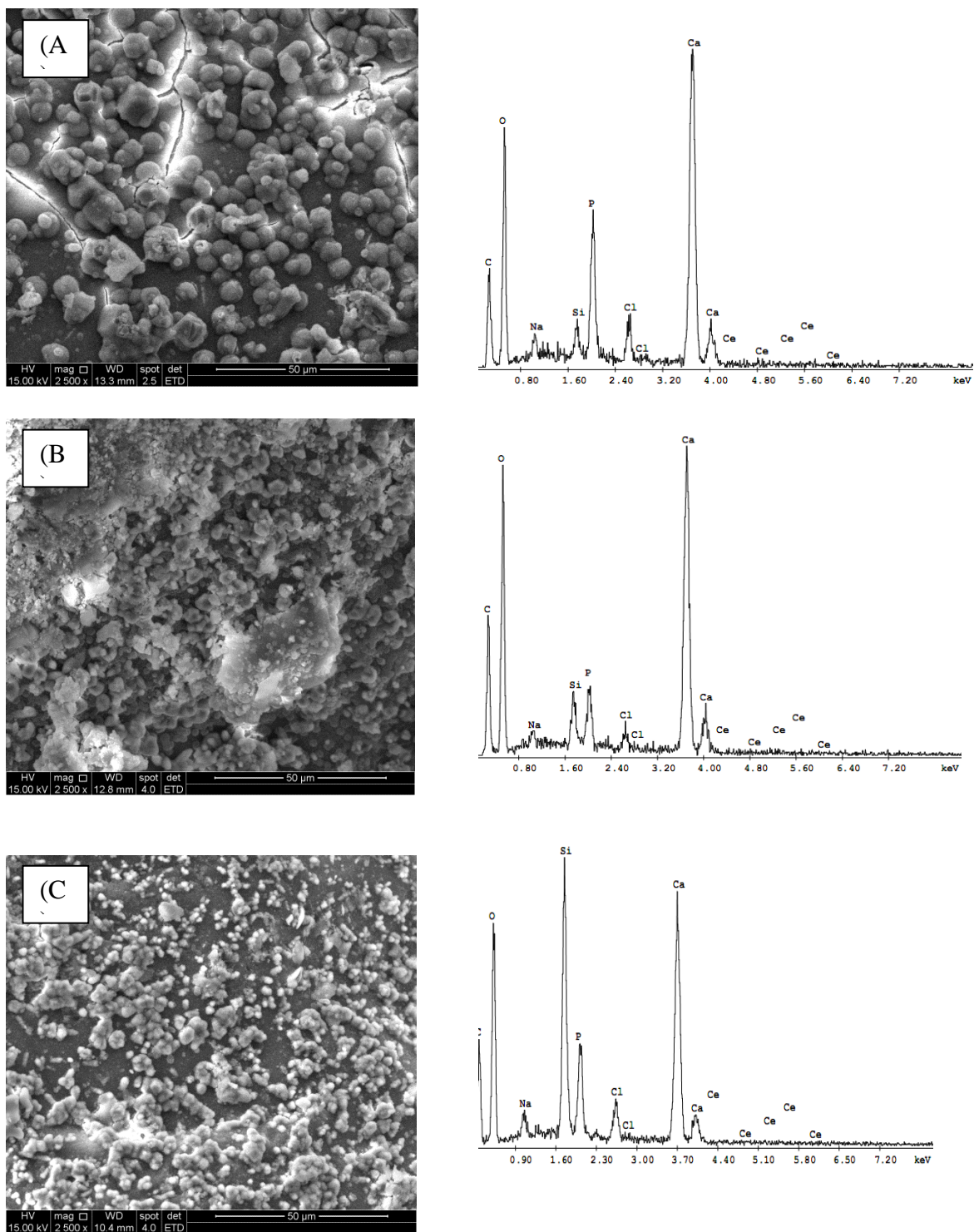


Figura 32- A micrografia com aumento de 2.500X, revela o crescimento de fosfato de cálcio após imersão por 1 dia, 1 semana e 4 semanas, para a amostra VB+Ce [1/2].

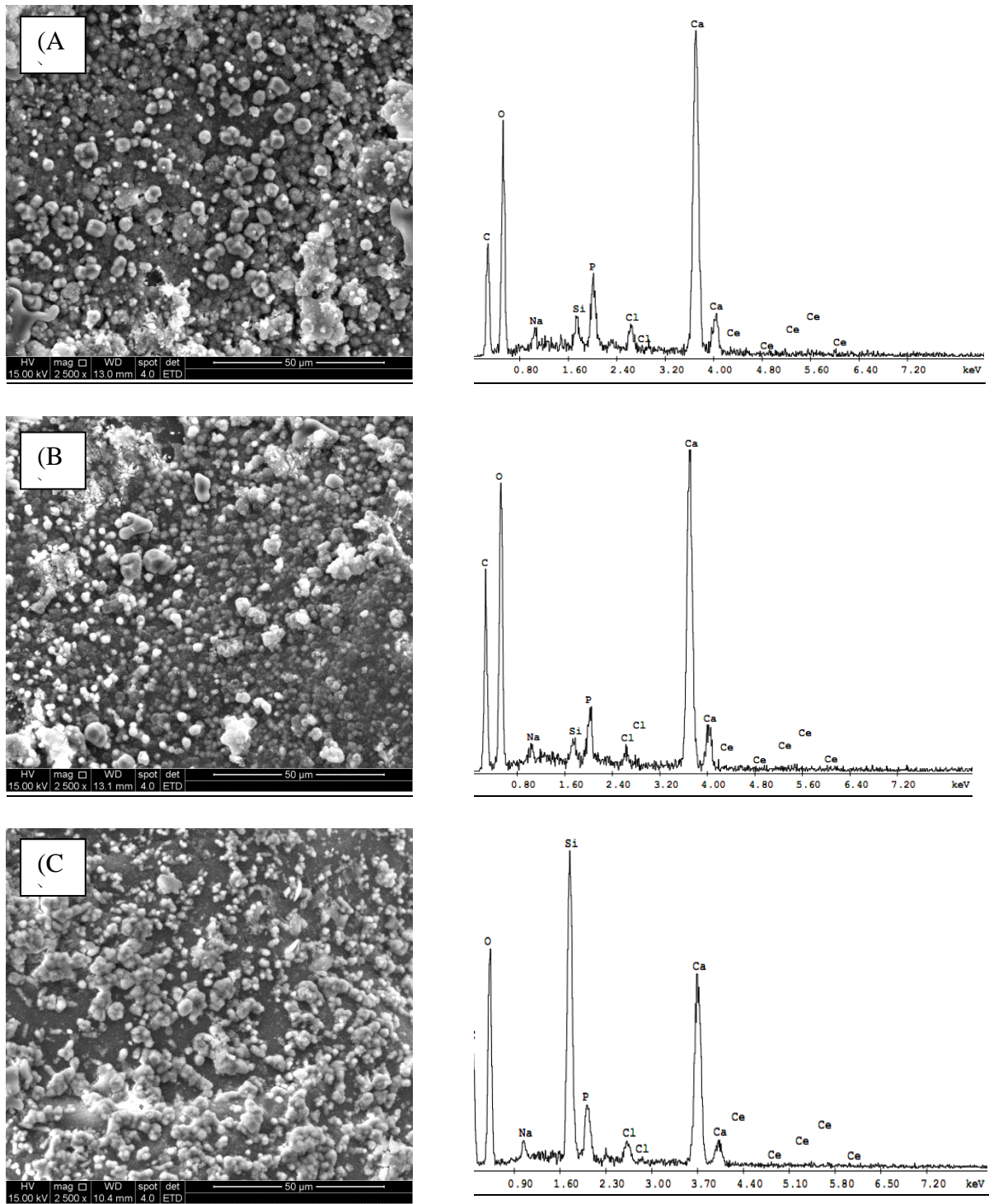


Figura 33- A micrografia com aumento de 2.500X, revela o crescimento da camada de fosfato de cálcio ao longo do tempo de 1 dia, 1 semana e 4 semanas, para a amostra VB+Ce [1].

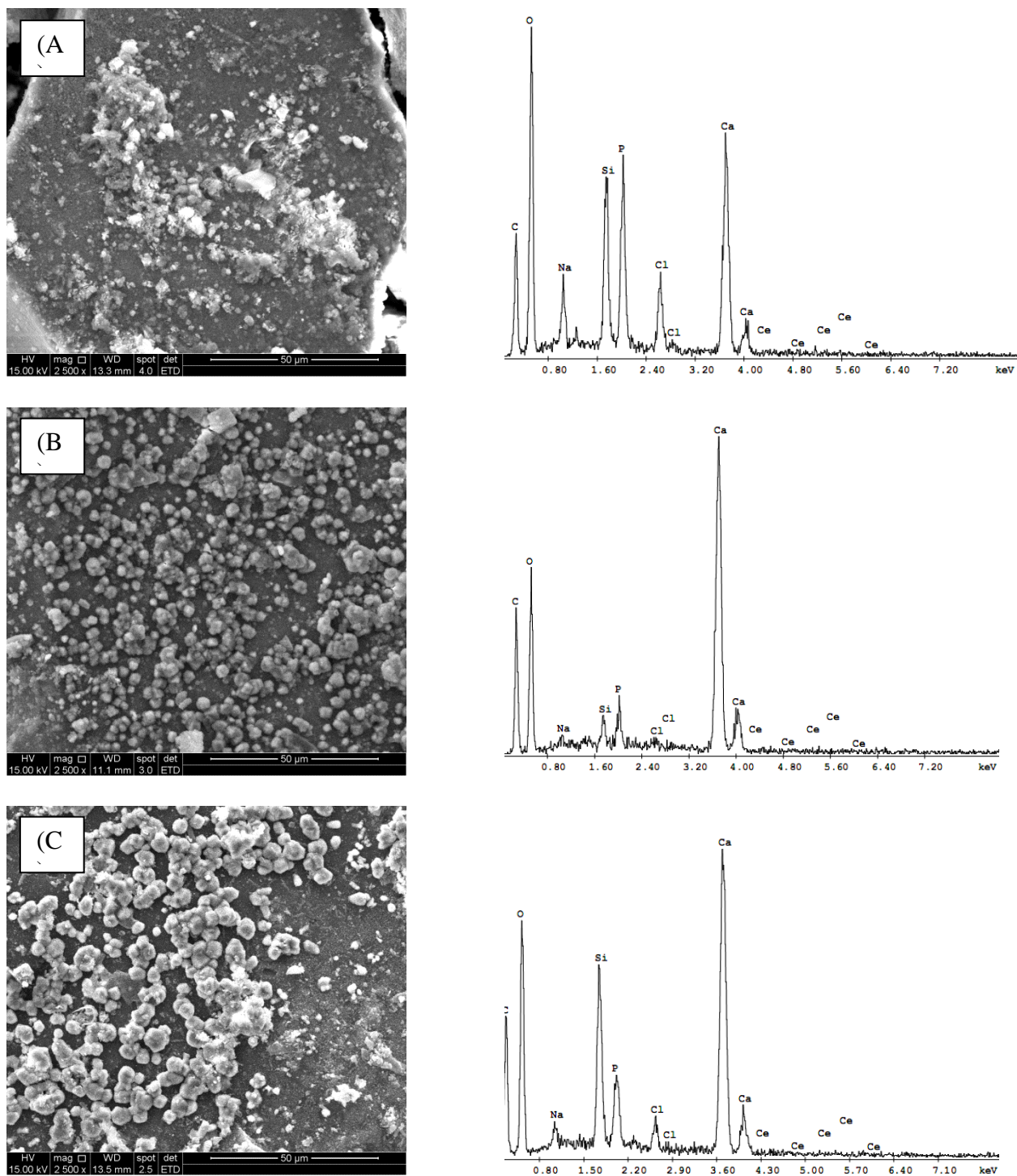


Figura 34- A micrografia com aumento de 2.500X, revela o crescimento da camada de fosfato de cálcio ao longo do tempo de 1 dia, 1 semana e 4 semanas, para a amostra VB+Ce [2].

No teste de bioatividade, houve pequena variação do pH das amostras, revelando estabilidade do ensaio. O DRX, FTIR, MEV/EDS das amostras após teste de

bioatividade revelaram formação da camada de fosfato de cálcio, não podendo afirmar se houve formação da camada de hidroxiapatita, no primeiro dia, para as amostras VB+Ce [1/2], VB+Ce [1] e VB+Ce [2]; com uma semana de imersão os resultados foram otimizados para as três amostras, ou seja, a camada de fosfato de cálcio ficaram mais evidentes, no entanto, o ensaio realizado com 4 semanas de imersão, não apresentou resultados tão positivos; uma das explicações mais prováveis se dá ao fato do ensaio ter sido feito de forma dinâmica, ou seja, as colisões entre as partículas podem ter removido a camada de fosfato de cálcio.

5.9- Análise quantitativa da solução iônica do teste de bioatividade

Com o intuito de testar a bioatividade de materiais sintéticos, estudos pioneiros foram realizados por Hench *et al.*, os quais mostraram o crescimento da camada de HA, *in vitro*, em vidros que liberavam íons de cálcio e fósforo para o meio.²² As Figuras 35, 36 e 37 mostram as concentrações por ICP-AES encontradas no líquido remanescente, do teste de bioatividade para o intervalo de tempo de 1 dia, 1 semana e 4 semanas das referidas amostras. Vale ressaltar que o limite de detecção do aparelho para o Ce é de 0,10 [mg/L], 0,50 [mg/L] para o Si e 0,20 [mg/L] para o Ca.

O valor relativamente alto encontrado para o Si e principalmente para o Ca na solução se deve provavelmente ao fato da liberação de íons para a solução simuladora do plasma humano, o que está em concordância com a literatura.²² Pode-se observar pelas Figuras 35, 36 e 37 que no intervalo de tempo maior, ou seja, 4 semanas, a presença de íons de Ca foi ainda maior, entre 170 mg.L⁻¹ e 185 mg.L⁻¹, reforçando a ideia de que no período de 4 semanas, em função do teste de bioatividade ter sido realizado de forma dinâmica, a camada de fosfato de cálcio pode ter sido removida, por isso a camada cristalina não foi detectada pelo DRX.

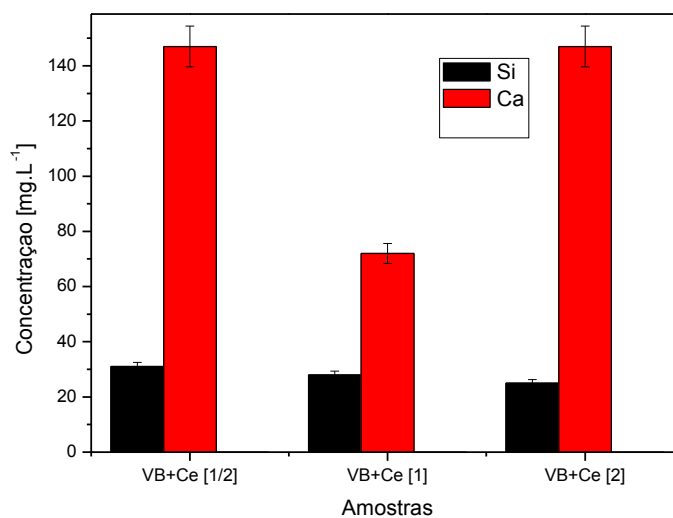


Figura 35- Concentração de íons de Si e Ca no líquido remanescente do teste de bioatividade para o intervalo de tempo de 1 dia.

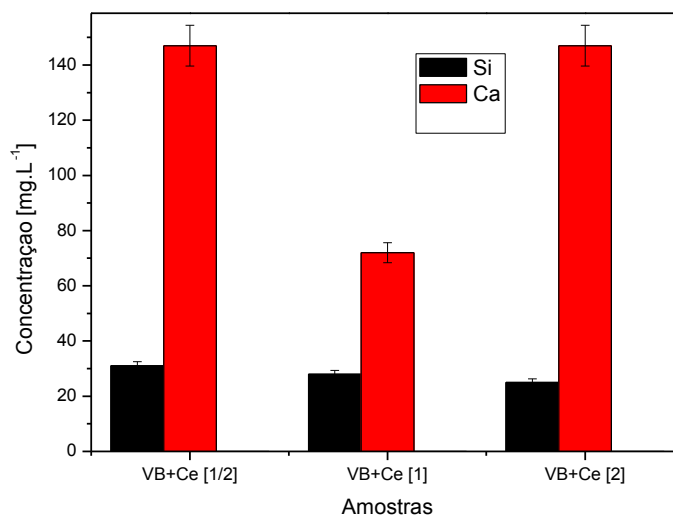


Figura 36- Concentração de íons de Si e Ca no líquido remanescente do teste de bioatividade para o intervalo de tempo de 1 semana.

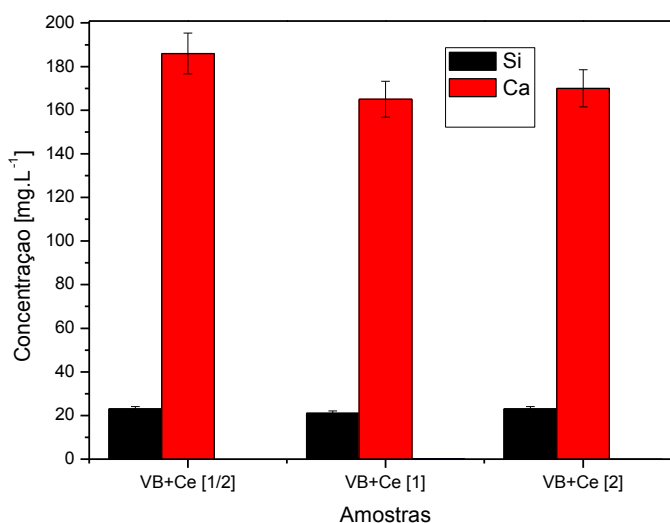


Figura 37- Concentração de íons de Si e Ca no líquido remanescente do teste de bioatividade para o intervalo de tempo de 4 semanas.

Os resultados presentes nas Figuras 35, 36 e 37 mostram que a maioria do Ce incorporado está ainda presente nas amostras, pois os valores encontrados no líquido remanescente do teste de imersão em SBF, conforme mostra a Tabela 6, são relativamente baixos quando comparados com os valores de concentração de cada elemento inicialmente presente nas amostras.

Tabela 6- Valores de concentração de Ce nas soluções.

Amostras	1 dia [mg.L ⁻¹]	1 semana [mg.L ⁻¹]	4 semanas [mg.L ⁻¹]
VB+Ce [1/2]	0,02±0,001	0,02±0,001	0±0
VB+Ce [1]	0,01±0,0005	0,01±0,0005	0,06±0,003
VB+Ce [2]	0,04±0,002	0,04±0,002	0,04±0,002

A grande preocupação inicial desse trabalho era manter o cério na amostra mesmo após imersão na solução simuladora do fluido fisiológico. De acordo com o resultado presente na Tabela 6, pode-se afirmar que o cério está sim presente na amostra, pois ele não se encontra em maiores concentrações na solução remanescente do teste de bioatividade, embora não se saiba ainda como ele está presente no material.

5.10- Ensaio de Citotoxicidade

Na Figura 38 pode ser observado o estudo comparativo de viabilidade celular das células tratadas com os materiais produzidos em relação ao grupo controle, utilizando a técnica do MTT. Pôde-se observar que as células tratadas com VB 70S tiveram um aumento significativo quando comparadas com o grupo controle no ensaio de MTT. No entanto, as amostras contendo o Ce, tratadas a 700 °C, em todas as concentrações, apresentaram uma viabilidade celular ligeiramente menor do que o grupo controle. As amostras tratadas a 900 °C apresentaram viabilidade celular ligeiramente mais elevada do que as tratadas a 700 °C, e mais elevada que o grupo controle. Portanto, pode-se dizer que apresentaram resultados mais promissores. A proliferação das células cultivadas em contato com as amostras contendo o VB 70S foi próxima ou maior quando comparadas às células cultivadas somente em meio DMEM.

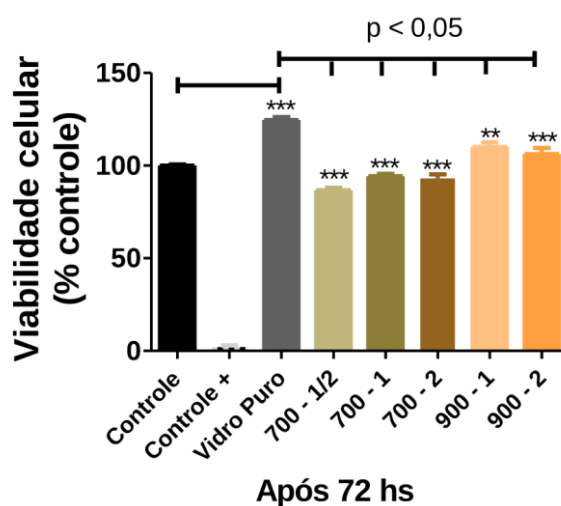


Figura 38- Ensaio de citotoxicidade das amostras: VB 70S, VB+Ce [1/2], VB+Ce [1] e VB+Ce [2].

5.11- Síntese de vidro contendo cério assistida por ultrassom

Buscando uma alternativa para melhor dispersão do Ce, foi utilizada uma rota alternativa, lançando mão do equipamento de ultrassom, como possível ferramenta para otimização da homogeneização do elemento nas amostras. Foi realizada a microscopia eletrônica de varredura, juntamente com o EDS para averiguação da distribuição do Ce nas amostras (Figura 39).

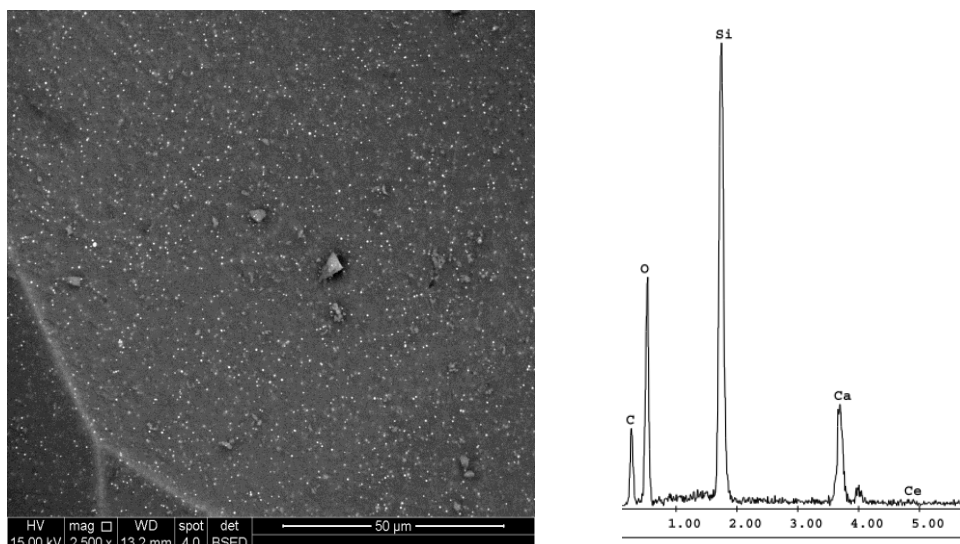


Figura 39- Análise geral de MEV e EDS da amostra VB+Ce [2] sintetizada assistida por ultrassom.

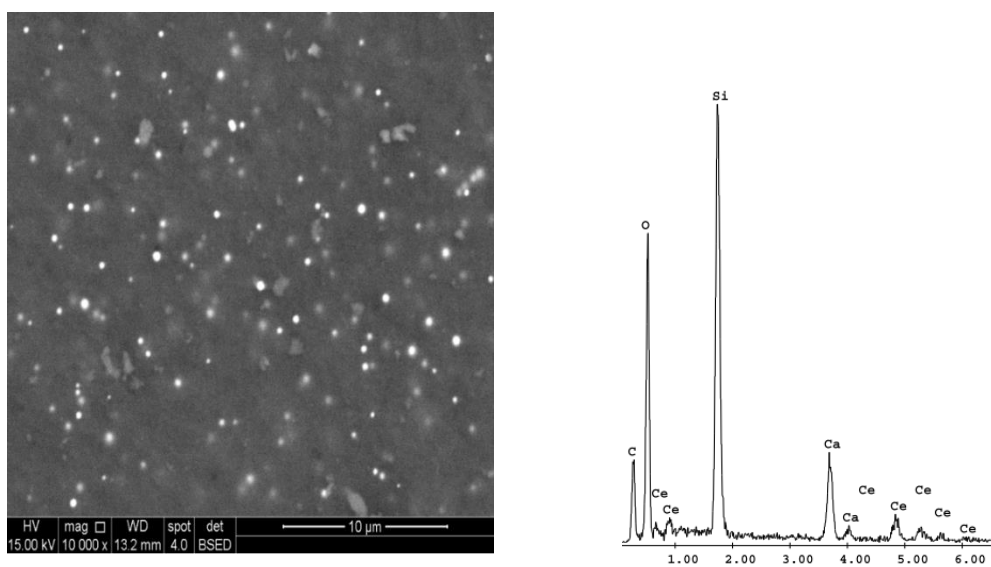


Figura 40- Análise pontual de MEV e EDS da amostra VB+Ce [2] sintetizada assistida por ultrassom.

Nas duas rotas de síntese utilizadas, tanto a convencional quanto a síntese utilizando o aparelho de ultrassom, foi verificada a incorporação do Ce nas amostras. Na análise geral por EDS das duas rotas de síntese não foi possível identificar a presença do Ce nas amostras. No entanto, nos pontos claros, foi evidenciado que estas são áreas onde há maior presença do Ce. Ao analisar o material produzido pela rota assistida por ultrassom, numa análise preliminar, via observação macroscópica, acredita-se que a amostra encontra-se mais homogênea com relação aos aglomerados de Ce, no entanto, os aglomerados ainda estão presentes indicando a formação de uma fase mais rica em cério.

A estrutura amorfa da amostra de vidro bioativo não se alterou após a síntese utilizando o banho de ultrassom (Figura 41).

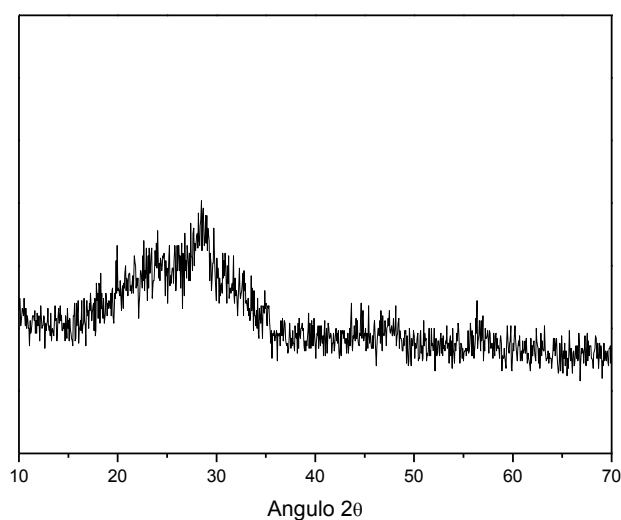


Figura 41- DRX da amostra VB+Ce [2], tratada a 700 °C, sintetizada utilizando o equipamento de ultrassom.

6. Conclusões

Foram produzidos vidros bioativos contendo Ce. Utilizou-se a rota sol-gel e o emprego de ultrassom na obtenção dos materiais. O processo de síntese visando a incorporação do Ce em diferentes concentrações no vidro bioativo (VB) 70S foi realizado com êxito. Todas as amostras tratadas a 700 °C mantiveram-se amorfas. As amostras tratadas a 900 °C apresentaram picos de cristalinidade típicos da wollastonita (ciclowollastonita e pseudowollastonita). Inicialmente houve dificuldade de avaliar a presença do Ce nas amostras, uma vez que as técnicas disponíveis não conseguiam detectar o Ce por estar presente em baixas concentrações. As análises químicas de ICP-AES e fluorescência aos raios X apresentaram as composições químicas das amostras, evidenciaram a presença de Ce nas amostras. O volume de poros, o tamanho médio de poros e a área superficial específica das amostras estão de acordo com a literatura. No teste de bioatividade, houve pequena variação do pH das amostras, revelando estabilidade das amostras. Os ensaios de DRX, FTIR, MEV e EDS das amostras após teste de bioatividade revelaram indícios de formação da camada de fosfato de cálcio no primeiro dia para as amostras VB+Ce [1/2], VB+Ce [1] e VB+Ce [2]; com uma semana de imersão os resultados foram otimizados para as três amostras, no entanto, o ensaio realizado com 4 semanas de imersão, não apresentou a presença da camada de fosfato de cálcio. Uma das explicações mais prováveis se deve ao fato do ensaio ter sido feito de forma dinâmica, ou seja, as colisões entre as partículas podem ter removido a camada de HA. A análise de ICP-AES também foi realizada na solução de SBF após os testes de bioatividade, que apresentaram presença significativa de Si e Ca, provavelmente em função da liberação de íons de Si e Ca das amostras para o meio no momento da formação de HA. Os testes preliminares de viabilidade celular sugerem que amostras contendo Ce não são citotóxicas. A síntese utilizando o equipamento de ultrassom produziu amostras aparentemente mais homogêneas. Regiões onde a presença de cério revelou-se mais significativas ainda mantiveram-se presentes, mantendo a característica de heterogeneidade da amostra.

7. Trabalhos Futuros

- 1) Verificar se a incorporação de Ce pela rota sol-gel, usando um precursor na forma de sal de Ce, produz materiais capazes de promover diferenciações de células tronco mesenquimais em osteoblastos.

- 2) Produzir sistemas injetáveis utilizando o cério juntamente com o vidro bioativo 70S para indução da osteogênese tendo como base de dispersão o PVA.

- 3) Desenvolver *scaffolds* tridimensionais utilizando os híbridos VB+Ce [1] e VB+Ce [2] com PVA para aumentar a resistência mecânica e a tenacidade dessas matrizes 3D, utilizando células tronco para verificação de uma possível diferenciação de células tronco em osteoblastos em função da presença de Ce.

- 4) Estudo da possível ação antioxidante e do possível aumento da produção de colágeno (matriz extracelular) na presença das amostras VB +Ce [1] e VB+Ce [2].

8. Referências Bibliográficas

- 1) Marinho, A. Um estudo sobre filas para transplantes no Sistema Único de Saúde brasileiro. *Cad. Saúde Pública*, v.22, n.10, 2006.
- 2) Jones, J. R.; Hench, L. L. Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v.7, p.301-307, 2003.
- 3) Langer, R. Tissue Engineering: A New Field and Its Challenges. *Pharmaceutical Research*, v.14, n.7, p.840-841, 1997.
- 4) Brekke, H.J. *et al* Principles of Tissue Engineering governing Osteogenic Devices. In: Proceedings of the 11th International Symposium on Ceramics in Medicine, 11, 1998, New York. *Bioceramics*, USA (New York): World Scientific, 1998.p.57-62.
- 5) Cancedda, R.; Giannoni, P.; Mastrogiacomo, M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*, v. 28, p. 4240-4250, 2007.
- 6) Reichert, J. C.; Saifzadeh, S.; Wullschleger, M. E.; Epari, D. R.; Schütz, M.A.; Duda, G.N.; Schell, H.; Van Griensven, M.; Redl, H.; Hutmacher, D.W. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials*, v.30, p.2149-2163, 2009.
- 7) Hench, L.L. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med.*; v.17, p. 967-978, 2006.
- 8) Vacanti, J.; Vacanti, C. The History and Scope of Tissue Engineering. *Principles of Tissue Engineering*, 3^a ed., Elsevier, Inc, Capítulo 1, p. 3-6, 2007.
- 9) Pereira, M. M.; Jones, J.R.; Hench, L.L. Bioactive Glass and Hybrid Scaffolds Prepared by the Sol-Gel Method for Bone Tissue Engineering. *Advances In Applied Ceramics*, Inglaterra, v. 104, n. 01, p. 35-42, 2005.
- 10) Oliveira, A.A.R.; *Síntese e caracterização de Espumas Híbridas vidro bioativo/PVA para aplicação em engenharia de tecidos*. 2007. 130 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Universidade Federal de Minas Gerais.
- 11) Kretlow, J.D.; Klouda, L.; Mikos, A.G. Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v.59, p. 263-273, 2007.

- 12) Chen, J.P.; SEAL, S.S.; Mcginnis, J.F. Rare Earth Nanoparticles Prevent Retinal Degeneration Induced by Intracellular Peroxides. *Nature Nanotechnology*, p.142-150, 2006.
- 13) Rzigalinski, B.A.; et al.; Cerium oxide nanoparticles increase the lifespan of cultured braincells and protect against free radical and mechanical trauma. *FASEB*, v.17, p.A606, 2003.
- 14) Karakoti, A.S.; Tsigkou, O.; Yue, S.; Lee, P.D.; Srevens M.M.; Jones, J.R.; Seal, S. Rare earth oxides as nanoadditives in 3-D nanocomposite scaffolds for bone regeneration. *Journal of Materials Chemistry*, 2010.
- 15) Santos, A.N.; *Aspectos bioeletroquímicos de dendrímeros como nanoplataformas para aplicações clínicas*. 2008. 178 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Itajubá.
- 16) Kinowski, C.; Bouazaoui, M.; Bechara, R.;Hench, L.; Turrell, S.: Kinetics of densification of porous sílica gels: a structural and textural study. *Journal of Noncrystalline Solids*, vol.291, p.143-152, 2001.
- 17) Meldau, D.C. **Tecido Ósseo**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/histologia/tecido-osseo>> Acessado em 18 de agosto de 2011.
- 18) Junqueira, L.C.; Carneiro, J.: *Histologia Básica*, 3^a-ed., Guanabara Koogan, p. 482, 1974.
- 19) Caio, J.S. Disponível em: <http://osteoporose2.blogspot.com/> Acessado em 21 de agosto de 2011.
- 20) C. Pritsos, E. Kontonasaki, X. Chatzistavrou, L. Papadopoulou, F. Pappas, P. Koidis, K.M. Paraskevopoulos. Studying morphological characteristics of thermally treated bioactive glass ceramic using image analysis. *J. Eur, Ceram. Soc.* 25, p.891, 2005.
- 21) Xiaofeng Chen, Yongchun Meng, Yuli Li, Naru Zha. Investigation on bio-mineralization of melt and sol-gel derived bioactive glasses. *Applied Surface Science*, 255, p.562–564, 2008.
- 22) Andrade, A.L.; Domingues, R.Z. Cerâmicas Bioativa – Estado da Arte. *Quim. Nova*, vol. 29, n.1, p. 100-104, 2006.

- 23) Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J.; Lemons, J.E.: Introduction to materials in medicine. *Academic Press*, San Diego, p.483, 1996.
- 24) Lanza, P.R.; Langer, R.L.; Chick, W.: Principles of Tissue Engineering. Texas: R.G. Landes and Academic Press, p.810, 1997.
- 25) Silva, A.R.P. *Avaliação da Diferenciação Osteogênica de Células-Tronco Do Tecido Adiposo Humano Cultivadas em Espuma de Vidro Bioativo e Biorreator de Perfusão para Engenharia de Tecido Ósseo*. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Universidade Federal de Minas Gerais.
- 26) Kretlow, J.D.; Young, S.; Klouda, L.; Wong, M.; Mikos, A. G. Injectable Biomaterials for Regenerating Complex Craniofacial Tissues. *Adv. Mater.* 2009, v.21, p.3368-3393, 2009.
- 27) Couto, D.S.; Hong, Z.; Mano, J.F. Development of bioactive and biodegradable chitosan-based injectable systems containing bioactive and biodegradable chitosan-based injectable systems containing bioactive glass nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, v.5, p. 115-123, 2009.
- 28) Lima, P.T.; Bertran, C.A.; Thim, G.P.: Rotas de síntese e a homogeneidade dos precursores de mulita e cordierita. *Química Nova*, vol.21, nº 5, p.608-613, 1998.
- 29) Oréfice, R.L.; Pereira, M.M.; Mansur, H.S. *Biomateriais: Fundamentos & Aplicações*. Rio de Janeiro, Cultura Médica, 2006, 538p.
- 30) Soares, G.A.: Biomateriais. *Fórum de Biotecnologia Biomateriais*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.
- 31) Tami, N.; Myoui, A.; Tomita, T.; Nakase, T.; Tanaka, J.; Ochi, T.; Yoshikawa, H. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J. Biomes Mater Res* 59; p.110-117, 2002.
- 32) Tamai, N.; Myoui, A.; Kudawara, I.; Ueda, T.; Yoshikawa, H. Novel fully interconnected porous hydroapatite ceramic surgical treatment of benign bone tumor. *J. Orthop Sci.* 15; p. 560-568, 2010.
- 33) Partridge, k.; Yang, X.; Clarke, N.M.; Okubo, Y.; Bessho, K.; Sebald, W.; Howdle, S.M.; Shakesheff, K.M., Oreffo, R.O. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. *Biochem. Biophys Res Commun*; 292: p.144-152, 2002.

- 34) Lemos, E.M.F. *Síntese e Caracterização de Filmes e Matrizes Híbridas e Nanocompósitas de Quitosana e Vidro Bioativo*. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Universidade Federal de Minas Gerais. Orientadora:
- 35) Carvalho, S.M. *Desenvolvimento e Avaliação 'In Vitro' de Membranas Compósitas de Quitosana, Álcool Polivinílico, Polietileno Glicol e Policaprolactona Triol com Adição de Nanopartículas de Vidro Bioativo para Regeneração Periodontal*. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Universidade Federal de Minas Gerais.
- 36) Oliveira, A.A.R. *Nova metodologia de obtenção de nanopartículas de vidro bioativo, poliuretanas biodegradáveis e seus compósitos para aplicações biomédicas*. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais).
- 37) Disponível em: <http://innovation.freedomblogging.com/2008/07/03/hip-knee-replacements-changing-butimproving-little-doc-says/>. Acessado em 18 de agosto de 2011.
- 38) Bielby, R.C., et al. Time and concentration dependent effects of dissolution products of 58S sol-gel bioactive glass on proliferation and differentiation of murine and human osteoblasts. *Tissue Engineering*. 10 (7-8); p.1018-1026, 2004.
- 39) Disponível em: <http://innovation.freedomblogging.com/2008/07/03/hip-knee-replacements-changing-butimproving-little-doc-says/> Acessado em 21 de agosto de 2011.
- 40) Bielby, R.C., et al., Time- and concentration-dependent effects of dissolution products of 58S sol-gel bioactive glass on proliferation and differentiation of murine and human osteoblasts. *Tissue Engineering*, 2004. 10(7-8): p. 1018-1026.
- 41) Bielby, R.C., et al., Enhanced derivation of osteogenic cells from murine embryonic stem cells after treatment with ionic dissolution products of 58S bioactive sol-gel glass. *Tissue Engineering*, 2005. 11(3-4): p. 479-488.
- 42) Christodoulou, I., et al., Dose- and time-dependent effect of bioactive gel-glass ionic dissolution products on human fetal osteoblast-specific gene expression. *Journal of Biomedical Materials Research Part B- Applied Biomaterials*, 2005. 74B(1): p. 529-537.
- 43) Christodoulou, L., et al., Characterization of human fetal osteoblasts by microarray analysis following stimulation with 58S bioactive gel-glass ionic dissolution products.

Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials, 2006. 77B(2): p. 431-446.

44) Hench, L.L., Glass and genes: The 2001 W. E. S. Turner Memorial Lecture. *Glass Technology*, 2003. 44(1): p. 1-10.

45) Jell, G., et al., Bioactive glass-induced osteoblast differentiation: A noninvasive spectroscopic study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008. 86A(1): p. 31-40.

46) Gough, J.E., J.R. Jones, and L.L. Hench, Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold. *Biomaterials*, 2004. 25(11): p. 2039-2046.

47) Jones, J.R., et al., Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells. *Biomaterials*, 2007. 28(9): p. 1653- 1663.

48) Leach, J.K. and D.J. Mooney, Synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Pharmaceutical Research*, 2008. 25(5): p. 1209-1211.

49) Leu, A. and J.K. Leach, Proangiogenic potential of a collagen/bioactive glass substrate. *Pharmaceutical Research*, 2008. 25(5): p. 1222-1229.

50) Jell, G.; Notingher, I.; Tsigkou, O.; Notingher, P.; Polak, J.M.; Hench, L.L.; Stevens, M.M. Bioactive glass-induced osteoblast differentiation: a noninvasive spectroscopic study. *J. Biomed Mater Res. A*, 86, p.31-40, 2008.

51) Xynos, I.D.; Hukkanem, M.V.; Batten, J.J.; Buttery, L.D.; Hench, L.L.; Polak, J.M. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: implication and application for bone tissue engineering. *Calcif Tissue Int.* 67, p.321-329, 2000.

52) Valerio, P.; Pereira, M.M.; Goes, A.M.; Leite, M.F. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, 25, p. 2941-2948, 2004.

53) Jones, J.R.; Ehrefried, L.M.; Hench, L.L. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, p. 964-973, 2006.

54) Xynos, I.D.; Edgar, A.J.; Buttery, L.D.; Hench, L.L.; Polak, J.M. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation on human osteoblasts and induce

insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res. Commun*, 276, p.461-465, 2000.

55) Hench, L.L. Tehe story of Bioglass. *J. Mater Sci. Mater Med*, 17, p.967-978, 2006.

56) Hench, L.L.; Polak, J. M. Third-generation biomedical materials. *Science*, 295, p. 1014-1017, 2002.

57) Carvalho, S.M. *Análise do comportamento de cementoblastos de ratos em contato com o produto iônico da dissolução de vidros bioativos*. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais).Universidade Federal de Minas Gerais.

58) Carvalho S.M; Oliveira A.A.; Andrade, V.; Leite, M.F.; Pereira, M.M. Comparative Effect of the Ionic Products from Bioactive Glass Dissolution on the Behavior of Cementoblasts, Osteoblasts, and Fibroblasts. *Key Engineering Materials*, p.396-398, p.55-59, 2010.

59) Li, S.; Nguyen, L.; Xiong, H.; Wang, M.; Hu, T.C.; She, J.X.; Serkiz, S.M.; Wicks, G.G.; Dynan, W.S. Porous-wall hollow glass microspheres as novel potential nanocarriers for biomedical applications. *Nanomedicine*, 6 p.127-136, 2010.

60) Gough, J.E.; Jones, J.R.; Hench, L.L. Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold. *Biomaterials*, 25, p.2039-2046, 2004.

61) Valerio, P.; Guimarães, M.H.; Pereira, M.M.; Leite, M.F.; Goes, A.M. Primary osteoblast cell response to sol-gel derived bioactive glass foams. *J Mater Sci Mater Med*, 16, p.851-856, 2005.

62) Altomare, L.; Bellucci, D.; Bolelli, G.; Bonferroni, B.; Cannillo, V.; De Nardo, L.; Gadow, R.; Killinger, A.; Lusvarghi, L.; Sola, A.; Stiegler, N. Microstructure and in vitro behaviour of 45S5 bioglass coatings deposited by high velocity suspension flame spraying (HVSFS). *J Mater Sci Mater Med*, 22, p.1303-1319, 2011.

63) Pereira, M.M.; Jones, J.R.; Orefice, R.L.; Hench, L.L. Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method. *J Mater Sci Mater Med*, 16, p.1045-1050, 2005.

64) Pereira, M.M.; Clark, A.E.; Hench, L.L. Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro. *J Biomed Mater Res*, 28, p.693-698, 1994.

- 65) Yashima, M., S. Kobayashi, and T. Yasui, Crystal structure and the structural disorder of ceria from 40 to 1497 degrees C. *Solid State Ionics*, 2006. 177(3-4): p. 211-215. 39.
- 66) Deshpande, S., et al., Size dependency variation in lattice parameter and valency states in nanocrystalline cerium oxide. *Applied Physics Letters*, 2005. 87(13).
- 67) Patil, S., et al., Role of trivalent La and Nd dopants in lattice distortion and oxygen vacancy generation in cerium oxide nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 2006. 88(24).
- 68) Mamontov, E., et al., Lattice defects and oxygen storage capacity of nanocrystalline ceria and ceria- zirconia. *Journal Of Physical Chemistry B*, 2000. 104(47): p. 11110-11116.
- 69) Campbell, C.T. and C.H.F. Peden, Chemistry - Oxygen vacancies and catalysis on ceria surfaces. *Science*, 2005. 309(5735), p. 713-714.
- 70) Chen, J. Patil, S. Seal S. and McGinnis, J.F., Rare Earth Nanoparticles Prevent Retinal Degeneration Induced by Intracellular Peroxides. *Nature Nanotechnology*, October 2006, p.142-150.
- 71) Chen, J., et al., Nanoceria particles prevent ROI-induced blindness. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 613: p. 53- 9.
- 72) Das, M., et al., Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials*, 2007. 28(10): p. 1918-25.
- 73) Heckert, E.G., et al., The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials*, 2008. 29(18): p. 2705-2709.
- 74) Karakoti, A.S., et al., Nanoceria as antioxidant: Synthesis and biomedical applications. *Jom*, 2008. 60 (3): p. 33-37.
- 75) Niu, J., et al., Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*, 2007. 73(3): p. 549-59.
- 76) Rzigalinski, B.A., Nanoparticles and cell longevity. *Technol Cancer Res Treat*, 2005. 4(6): p. 651-9.
- 77) Rzigalinski, B.A., et al., Radical nanomedicine. *Nanomed*, 2006. 1(4): p. 399-412.
- 78) Tarnuzzer, R.W., et al., Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage. *Nano Lett*, 2005. 5(12): p. 2573-7.

- 79) Korsvik, C., et al., Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem Commun (Camb)*, 2007(10): p. 1056-8.
- 80) Sugaya, K. and S. Seal, *A method for increasing stem cell proliferation and uses thereof - Patent applications, UCF IP ID 7219*. 2007.
- 81) Lennon, D.P., J.M. Edmison, and A.I. Caplan, Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: Effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 2001. 187(3): p. 345-355.
- 82) Marutle, A., et al., Modulation of human neural stem cell differentiation in Alzheimer (APP23) transgenic mice by phenserine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. 104(30): p. 12506-12511.
- 83) Chen, J.P.; Seal, S.S.; McGinnis, J.F. Rare Earth Nanoparticles Prevent Retinal Degeneration Induced by Intracellular Peroxides. *Nature Nanotechnology*, p.142-150, 2006.
- 84) Coelho, M.B.; Pereira, M.M. Sol-gel synthesis of bioactive glass scaffolds for tissue engineering: effect of surfactant type and concentration. *Journal Of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials*, v.75B, n. 2, p. 451-456, 2005.
- 85) Coelho, M.B.; Soares, I.R.; Mansur, H.S.; Pereira, M.M. Effect of the type of surfactant on bioactive glasses foam formation. *Key Engineering Materials*, v.240, p.257-260, 2002.
- 86) Sepulveda, P.; Jones, J.R., Hench, L.L. Bioactive sol-gel foams for tissue repair. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.59, p. 340-348, 2002.
- 87) Jones, J.R.; Ehrefried, L.M.; Hench, L.L. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, p. 964-973, 2006.
- 88) Jones, J.R.; Hench, L.L. Effect of surfactant concentration and composition on the structure and properties of sol-gel-derived bioactive glass foam scaffolds for tissue engineering. *Journal of Materials Science*, v. 38, p. 3783-3790, 2003.
- 89) Jones, J.R.; Hench, L.L. Factors affecting the structure and properties of bioactive foam scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*. v. 68B, p. 36-44, 2004.
- 90) Coelho, M.B. *Desenvolvimento de metodologia para produção de estruturas tridimensionais porosas de vidro bioativo para aplicação em engenharia de tecidos*.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Universidade Federal de Minas Gerais.

- 91) Saravanapavan, P.; Hench, L.L. Mesoporous calcium silicate glasses. I. Synthesis. *Journal of Non-Crystalline Solids* v.318, p. 1–13; 2003.
- 92) Lin, S.; Ionescu, C.; Baker S. Mark E. Smith Æ Julian R. Jones. Characterisation of the inhomogeneity of sol–gel-derived SiO₂–CaO bioactive glass and a strategy for its improvement. *J. Sol-Gel Sci Technol*, v. 53, p. 255–262, 2010.
- 93) Wang ,S.; Falk, M.M.; Rashad, A.; Saad, M.M.; Marques, A.C.; Almeida, R.M.; Marei, M.K.; Jain, H. Jain. Evaluation of 3D nano–macro porous bioactive glass scaffold for hard tissue engineering. *J Mater Sci: Mater Med*, v. 22, p. 1195–1203, 2011.
- 94) Barbosa, J.C.S.; Serra, A.A. Ultrassom (I): Influência do ultrassom na química. *Química Nova*, v. 4, p. 15, 1992.
- 95) Kokubo, T. et.al. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. v. 24, p. 2161-2175, 2003.
- 96) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- 97) Li, R., Clark, A.E.; Hench, L.L. An Investigation of Bioactive Glass Powders by Sol-Gel Processing. *Journal of Applied Biomaterials*. v.2, p. 231-239, 1991.
- 98) Pereira, M.M.; Clark, E.A.; Hench, L.L. Calcium Phosphate Formation on Sol-Gel-Derived Bioactive Glasses in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.28, p. 693-698, 1994.
- 99) Hench, L.L. - Bioceramics: from concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.*, p.74, n.7, p.1487-1510, 1991.
- 100) Dias, L.L.S.; Mansur, H.S.; Donnici, C.L.; Pereira, M.M. Synthesis and characterization of chitosan-polyvinyl alcohol-bioactive glass hybrid membranes. *Biomatter* 1:1, p.1-6, July/August/September, 2011.

