



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

**Tese de Doutorado**

**Síntese e caracterização estrutural e biológica de vidros bioativos com capacidade de liberação controlada de íons metálicos Mn e Co com potencial efeito terapêutico osteogênico e angiogênico para aplicações na engenharia de tecidos**

Autor: Breno Rocha Barrioni

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marivalda de Magalhães Pereira

Belo Horizonte - MG

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

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

Breno Rocha Barrioni

**Síntese e Caracterização Estrutural e Biológica de Vidros Bioativos Com  
Capacidade De Liberação Controlada de Íons Metálicos Mn e Co Com Potencial  
Efeito Terapêutico Osteogênico e Angiogênico Para Aplicações Na Engenharia  
De Tecidos**

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

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marivalda de Magalhães Pereira

**Belo Horizonte – MG**  
**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Escola de Engenharia**  
**2018**

## AGRADECIMENTOS

Não posso concluir este trabalho sem antes deixar o meu agradecimento a diversas pessoas que fizeram parte dessa trajetória:

Primeiramente agradeço aos meus pais, Jelúcio Barrioni e Valéria Barrioni, por sempre me apoiarem e por tudo que já me proporcionaram. Nada disso teria acontecido sem ao apoio e o exemplo de força e dedicação de vocês.

Aos meus irmãos, Filipe Barrioni e Gabriel Barrioni, pelo companheirismo, pela grande amizade e pelo apoio em todas as minhas escolhas.

Um agradecimento especial à minha orientadora e amiga, Professora Marivalda de Magalhães Pereira, pela oportunidade de trabalhar em sua equipe, por ter sempre confiado em mim e nos meus projetos e por todo o suporte durante essa etapa.

Aos professores Rodrigo Lambert Oréfice e Herman Sander Mansur, pela disponibilidade de recursos e infraestrutura para análises, pelas sugestões e críticas que foram fundamentais no desenvolvimento do trabalho.

Aos professores Marcos Augusto de Sá, Alfredo Miranda de Goes, Marcelo Vidigal Caliari e Maria Fátima de Leite do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG), além das pós-doutorandas Thalita Marcolan Valverde e Ana Celeste Ximenes Oliveira e da colega de laboratório Andreia Grossi pela disponibilidade de infraestrutura, recursos e tempo para realização dos ensaios biológicos, que contribuíram imensamente para os resultados desse trabalho.

Aos professores Emílio Osório Neto e Cláudia Lima Caldeira pelas análises de ICP-OES realizadas no Laboratório de Análises Químicas (LAQ – DEMET - UFMG) e à professora Andreia Bicalho Henriques pelo auxílio nas análises de DRX.

À Talita Martins, pessoa tão especial em minha vida, pelo amor, carinho e apoio nesses últimos anos, e pelos bons momentos que passamos juntos.

Ao laboratório de Biomateriais, e todos aqueles que fizeram parte dessa equipe ao longo dos anos, se transformando também em grandes amigos e tornando mais divertidos os dias de trabalho. Além dos já citados, agradeço também à Agda Oliveira,

Sandhra Carvalho, Carolina Lins, Cheisy Moreira, Fabiana Pereira, Layla Mosqueira, Diogo Maia, Priscilla Mol e Ingrid Elen.

Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Metalúrgica, Minas e Materiais, em especial à Maria Aparecida Pacheco, Ilda Batista, Patrícia Azevedo e Nelson Azevedo por toda assistência e amizade durante esses anos de trabalho.

Aos colegas do PPGEM, em especial à Camila, Douglas, Nádia, Túlio, Marys, Tássio, e tantos outros, pela convivência durante esses anos.

Aos professores Eric Mazzer e Eduardo Nunes pela amizade, conselhos e boas conversas.

À República Confraria e todos meus irmãos Confrades pelos grandes momentos proporcionados e por sempre me apoiarem.

À todos os amigos de BH, em especial Cris, Bruno Sérgio, Bruno Ramos, Douglas, Diego, Luciano, Wanler, Thiago, Marinho, Bruna Espeschit, Vivian e Clara.

Ao Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais e ao PPGEM pela oportunidade e suporte durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

I would like to express my sincere gratitude to Professor Julian R. Jones for accepting me as a part of his research group, his guidance, expertise and support during the one-year “sandwich PhD”. It was a fantastic experience both professionally and personally. My gratitude to Imperial College London and all the staff members for this amazing opportunity and support on the development of my project.

I want also to express my deepest gratitude to the JRJ research group for making that year so much fun and for all the assistance on my project. Thank you for the great times in and outside Imperial College, in special to Paul, Ale, Fra, Gloria, Stella, Lizzie, Tian, Ali and Zhen. I also thank to the Union, where I lived great moments with some awesome people.

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XVI</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 ROTEIRO DA TESE .....	2
<b>CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1 O VIDRO BIOATIVO .....	4
2.1.1 <i>Métodos de produção.....</i>	5
2.1.2 <i>A estrutura dos vidros bioativos .....</i>	10
2.1.3 <i>Vidro Bioativo e bioatividade .....</i>	14
2.2 ÍONS INORGÂNICOS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS EM BIOCERÂMICAS .....	17
2.2.1 <i>Biocerâmicas dopadas com Manganês .....</i>	19
2.2.2 <i>Biocerâmicas dopadas com Cobalto.....</i>	21
2.3 APLICAÇÕES CLÍNICAS DE VIDROS BIOATIVOS .....	23
<b>CAPÍTULO 3. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS POR CAPÍTULO .....	26
<b>CAPÍTULO 4. ESTUDO DE VIDROS BIOATIVOS DERIVADOS DO PROCESSO SOL-GEL COM CAPACIDADE DE LIBERAÇÃO DE MANGANÊS.....</b>	<b>28</b>
4.1 INTRODUÇÃO.....	28
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
4.2.1 <i>Caracterização das amostras de vidro bioativo .....</i>	29
4.2.2 <i>Estudo da citotoxicidade.....</i>	31
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.3.1 <i>Caracterização térmica e cristalização.....</i>	32
4.3.2 <i>Análise da composição química.....</i>	36
4.3.3 <i>Análise estrutural.....</i>	37
4.3.4 <i>Propriedades texturais.....</i>	41
4.3.5 <i>Dissolução e bioatividade em SBF.....</i>	43
4.3.6 <i>Estudo da citotoxicidade.....</i>	48

4.4	CONCLUSÕES .....	52
<b>CAPÍTULO 5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE VIDROS BIOATIVOS CONTENDO MANGANÊS DERIVADOS DO PROCESSO SOL-GEL ... 53</b>		
5.1	INTRODUÇÃO.....	53
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	54
5.2.1	<i>Caracterização dos vidros bioativos.....</i>	54
5.2.2	<i>Estudo da citotoxicidade.....</i>	55
5.2.3	<i>Produtos de liberação iônica na diferenciação de hMSCs.....</i>	56
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.3.1	<i>Análise da composição química.....</i>	57
5.3.2	<i>Propriedades texturais.....</i>	58
5.3.3	<i>Análise estrutural.....</i>	60
5.3.4	<i>Dissolução em DMEM.....</i>	64
5.3.5	<i>Estudo da citotoxicidade.....</i>	66
5.3.6	<i>Produtos de liberação iônica na diferenciação de hMSCs.....</i>	67
5.4	CONCLUSÕES .....	76
<b>CAPÍTULO 6. INFLUÊNCIA DA INCORPORAÇÃO DE COBALTO E DA SELEÇÃO DO PRECURSOR NA ESTRUTURA E PROPRIEDADES DE VIDROS BIOATIVOS 77</b>		
6.1	INTRODUÇÃO.....	77
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	78
6.2.1	<i>Caracterização das amostras de vidro bioativo .....</i>	78
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
6.3.1	<i>Análise da composição química.....</i>	80
6.3.2	<i>Análise térmica.....</i>	80
6.3.3	<i>Avaliação estrutural.....</i>	82
6.3.4	<i>Propriedades texturais.....</i>	88
6.3.5	<i>Dissolução e bioatividade em SBF.....</i>	89
6.4	CONCLUSÕES .....	93
<b>CAPÍTULO 7. AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E DA BIOCOMPATIBILIDADE <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE VIDROS BIOATIVOS CONTENDO COBALTO ..... 95</b>		
7.1	INTRODUÇÃO.....	95
7.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	96
7.2.1	<i>Caracterização dos vidros bioativos.....</i>	96
7.2.2	<i>Análise da citotoxicidade celular e biocompatibilidade <i>in vivo</i>.....</i>	97
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	100

7.3.1	<i>Análise da composição química</i> .....	100
7.3.2	<i>Análise estrutural</i> .....	100
7.3.3	<i>Propriedades texturais</i> .....	103
7.3.4	<i>Dissolução e bioatividade em SBF</i> .....	104
7.3.5	<i>Biocompatibilidade in vitro e in vivo</i> .....	107
7.4	CONCLUSÕES .....	111
<b>CAPÍTULO 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>		<b>113</b>
8.1	CONCLUSÕES GERAIS.....	113
8.2	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	115
8.3	PUBLICAÇÕES RELACIONADAS COM O TRABALHO DE DOUTORADO .....	116
<b>CAPÍTULO 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>117</b>

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 2.1: Esquema das reações do TEOS que levam à formação de nanopartículas de sílica no processo sol-gel. Adaptado de Rahman et al., 2012 <sup>(37)</sup> ..... 7
- Figura 2.2: A evolução estrutura das unidades do vidro bioativo durante o processamento sol-gel de um modelo 70S30C. Adaptado de Lin et al., 2009 <sup>(41)</sup> ..... 9
- Figura 2.3: Ilustração esquemática da evolução na distribuição de cálcio durante o estágio de gelificação (a), estágio após secagem (b), e estágio de estabilização (c) em processos sol-gel. Adaptado de Lin et al., 2009 <sup>(41)</sup> ..... 10
- Figura 2.4: Desenho esquemático da estrutura (a) cristalina e (b) vítrea de sílica (apenas três átomos de oxigênio são apresentados por tetraedro SiO<sub>4</sub>, o quarto estaria acima ou abaixo do plano da imagem). Adaptado de Brauer, 2015 <sup>(6)</sup> ..... 11
- Figura 2.5: Esquema das estruturas Q<sup>n</sup> que podem descrever a conectividade da rede de sílica em vidros. O<sub>B</sub> representa um oxigênio ligante formador de rede (Si-O-Si). Fonte: Martin et al., 2012 <sup>(45)</sup> ..... 12
- Figura 2.6: (a) O papel do fosfato como formador de rede e (b) estrutura do ortofosfato. Fonte: Elgayar et al., 2005 <sup>(47)</sup> ..... 12
- Figura 2.7: Modelo da estrutura 3D do vidro bioativo 45S5, demonstrando unidades tetraédricas PO<sub>4</sub> isoladas, unidades Q<sup>2</sup> fazendo ligações cruzadas com unidades Q<sup>3</sup> e unidades terminais Q<sup>1</sup>. Na (verde) e Ca (amarelo) balanceando as cargas de oxigênios não ligantes. Fonte: Hoppe et al., 2014 <sup>(27)</sup> ..... 13
- Figura 2.8: Ilustração esquemática da sequência de reações que levam a formação de HAC em SBF. As primeiras três etapas envolvem reações entre a superfície do silicato e o fluido ao seu redor com as seguintes etapas: (1) troca iônica Ca<sup>2+</sup> ↔ H<sup>+</sup> e (2) quebra de ligações Si-O-Si, formando grupos Si-OH; (3) repolimerização 2Si-OH → Si-O-Si + H<sub>2</sub>O. A seguir ocorre (4) formação da camada de fosfato de cálcio amorfo (ACP – *amorphous calcium phosphate*) e (5) cristalização ACP → HAC pela incorporação de íons adicionais. Adaptado de Gunawidjaja et al., 2012 <sup>(61)</sup> ..... 16
- Figura 2.9: Visão geral da resposta biológica aos produtos de dissolução de vidros bioativos. A liberação de íons metálicos terapêuticos adicionais durante a degradação da matriz é proposta para aumentar o desempenho biológico dos vidros bioativo. Adaptado de Hoppe et al., 2011 <sup>(21)</sup> ..... 17



Figura 4.1: (a) Análise termogravimétrica (TGA) e (b) Termogravimetria derivada (DTG) das amostras de vidros bioativos. ....	33
Figura 4.2: Calorimetria exploratória diferencial (DSC) de vidros bioativos .....	34
Figura 4.3: Padrões de Difração de Raios-X: (a) VB-2,5Mn em função da temperatura final de processamento e (b) amostras tratadas à 650°C e precursor do manganês. .	36
Figura 4.4: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras VB, VB-1Mn, VB-2,5Mn e VB-5Mn. ....	38
Figura 4.5: Espectroscopia Raman das amostras VB, VB-1Mn, VB-2,5Mn e VB-5Mn.	40
Figura 4.6: Isotermas de adsorção de nitrogênio e (b) distribuição de tamanhos de poros (algoritmo BJH derivado das curvas de dessorção) das amostras VB, VB-1Mn, VB-2,5Mn e VB-5Mn. ....	42
Figura 4.7: Espectro de FTIR das amostras de vidros antes (0h) e após imersão em SBF por 1, 7 e 14 dias. ....	44
Figura 4.8: Variação da concentração de silício, e fósforo após diferentes períodos de imersão em SBF das amostras VB, VB-1Mn, VB-2,5Mn e VB-5Mn. ....	45
Figura 4.9: Variação da concentração de cálcio e manganês após diferentes períodos de imersão em SBF das amostras VB, VB-1Mn, VB-2,5Mn e VB-5Mn. ....	47
Figura 4.10: (a) Atividade metabólica de osteoblastos expostos ao produto iônico de amostras de vidros bioativos determinada por MTT e (b) avaliação da citotoxicidade de osteoblastos expostos a concentrações específicas de vidros bioativos determinada por LIVE/DEAD. Diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo controle negativo estão classificadas com asterisco (*). ....	49
Figura 4.11: Imagens de osteoblastos expostos ao produto iônico de vidros bioativos, apresentando a fluorescência verde (células viáveis – primeira e terceira colunas) e fluorescência vermelha (células mortas – segunda e quarta colunas). Controle negativo (A e B), controle positivo (C e D), VB (E e F), VB-1Mn (G e H), VB-2,5Mn (I e J) e VB-5Mn (K e L). A barra representa escala de 100 $\mu\text{m}$ . ....	50
Figura 4.12: Fluorescência verde (células viáveis – primeira coluna), fluorescência vermelha (células mortas – segunda coluna) e imagens da transmissão de luz de osteoblastos (terceira coluna) expostos ao produto iônico de amostras de vidro bioativo. Controle negativo (A, B e C), controle positivo (D, E e F), VB (G, H e I), VB-1Mn (J, K e L), VB-2,5Mn (M, N e O) e VB-5Mn (P, Q e R). A barra representa escala de 10 $\mu\text{m}$ . ....	51

Figura 5.1: (a) Isotermas de adsorção de nitrogênio e (b) distribuição de tamanhos de poros (algoritmo BJH derivado das curvas de dessorção) das amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N.....	59
Figura 5.2: Espectros de FTIR obtidos para as amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N.....	60
Figura 5.3: Padrões de Difração de Raios-X (DRX) obtidos para as amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N. ....	61
Figura 5.4: Espectroscopia de Fotoelétrons excitados por Raios-X (XPS) das amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N.....	62
Figura 5.5: Espectro de XPS de alta resolução Si 2p para as amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N.....	62
Figura 5.6: Espectro de XPS de alta resolução O 1s para as amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N.....	63
Figura 5.7: Espectros XPS de alta resolução Mn 2p das amostras 2,5Mn-N e 5Mn-N. ....	64
Figura 5.8: Perfil de liberação em DMEM de Si, P, Ca e Mn do grupo controle e das amostras VB, 2,5Mn-N, 5Mn-N. ....	66
Figura 5.9: Viabilidade celular determinada por MTT em hMSCs para VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N. Viabilidade celular média normalizada pela viabilidade média do grupo controle. $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**) em relação ao controle conforme determinado por método One-way ANOVA seguida de teste Tukey post-hoc. ....	67
Figura 5.10: Expressão da fosfatase alcalina (ALP) após 7, 14 e 21 dias de exposição de hMSCs ao produto iônico dos vidros bioativos (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ relativa ao controle basal, Two-way ANOVA e teste Tukey de comparação múltipla). ....	68
Figura 5.11: Imagens de fluorescência de hMSCs expostas ao produto iônico de vidros bioativos apresentando a expressão de colágeno tipo I em meio basal e osteogênico após 7, 14 e 21 dias. Corantes DAPI (fluorescência azul) e colágeno tipo I (fluorescência verde). A barra de escala representa 50 $\mu$ m. ....	70
Figura 5.12: Imagens de fluorescência de hMSCs expostas ao produto iônico de vidros bioativos apresentando a expressão de osteopontina em meio basal e osteogênico após 7, 14 e 21 dias. Corantes DAPI (fluorescência azul) e osteopontina (fluorescência verde). A barra de escala representa 50 $\mu$ m. ....	72
Figura 5.13: Imagens de fluorescência de hMSCs expostas ao produto iônico de vidros bioativos apresentando a expressão de osteocalcina em meio basal e osteogênico	

após 7, 14 e 21 dias. DAPI (fluorescência azul) e osteocalcina (fluorescência verde). Barra de escala de 50µm.....	74
Figura 5.14: Mineralização da matriz de hMSCs após exposição ao produto iônico dos vidros bioativos por 7, 14 e 21 dias em meio basal e osteogênico. Células foram coradas com alizarina vermelha S para visualização de depósitos de cálcio formados. Barra de escala 100µm.....	75
Figura 6.1: (a) Análise termogravimétrica (TGA) e (b) Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) de vidros bioativos obtidos por diferentes precursores de Co.....	81
Figura 6.2: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras VB, 5Co-N e 5Co-C.....	83
Figura 6.3: Padrão de difração de raios-X (DRX) das amostras VB, 5Co-N e 5Co-C..	84
Figura 6.4: Espectro de XPS das amostras do VB, 5Co-N e 5Co-C.....	85
Figura 6.5: Espectro de alta resolução (a) Si 2p (b) O 1s para as amostras VB, 5Co-N e 5Co-C. ....	86
Figura 6.6: Espectro de alta resolução XPS Co 2p das amostras 5Co-N e 5Co-C.....	88
Figura 6.7: (a) Isotermas de adsorção de nitrogênio e (b) distribuição de tamanhos de poros (algoritmo BJH derivado das curvas de dessorção) das amostras VB, 5Co-C e 5Co-N. ....	89
Figura 6.8: Concentração de Si, P, Ca e Co em SBF por diferentes períodos de tempo. ....	90
Figura 6.9: (a) Espectro de FTIR e (b) padrões de DRX de vidros bioativos imersos por duas semanas em SBF.....	92
Figura 6.10: Imagens da superfície de vidros bioativos obtidas por MEV antes e após duas semanas de imersão em SBF das amostras VB, 5Co-N e 5Co-C. ....	93
Figura 7.1: Análise estrutural por FTIR realizada para as amostras VB, VB-1Co, VB-2,5Co e VB-5Co.....	101
Figura 7.2: Análise estrutural por FTIR realizada para as amostras VB, VB-1Co, VB-2,5Co e VB-5Co.....	102
Figura 7.3: Padrão de Difração de Raios-X para as amostras VB, VB-1Co, VB-2,5Co e VB-5Co. ....	103
Figura 7.4: FTIR obtido 14 dias após imersão das amostras em SBF, na qual (a) VB, (b) VB-1Co, (c) VB-2,5Co e (d) VB-5Co.....	105

- Figura 7.5: Variação da concentração de silício, cálcio, fósforo e cobalto com o período de imersão em SBF para VB e amostras contendo Co.n ..... 106
- Figura 7.6: Viabilidade celular determinada por MTT em hASCs para VB, VB-1Co, VB-2,5Co e VB-5Co. Viabilidade celular média normalizada pela viabilidade média do grupo controle. Nível de significância estatística  $p < 0,05$  (\*) ou  $p < 0,01$  (\*\*) conforme determinado por método One-way ANOVA seguida de teste Tukey post-hoc..... 108
- Figura 7.7: Viabilidade celular determinada por MTT em HUVECs para VB, VB-1Co, VB-2,5Co e VB-5Co. Viabilidade celular média normalizada pela viabilidade média do grupo controle. Nível de significância estatística  $p < 0,05$  (\*) ou  $p < 0,01$  (\*\*) conforme determinado por método One-way ANOVA seguida de teste Tukey post-hoc..... 109
- Figura 7.8: Avaliação histológica da resposta ao implante de vidros bioativos na derme profunda do dorso de ratos, onde (A) controle, (B) VB e (C) VB-2,5Co, e análise morfométrica do infiltrado (D). Setas amarelas destacam o infiltrado celular e a neoformação de vasos sanguíneos é realçada pelas cabeças de setas verdes. Análise estatística One-way ANOVA, seguida de teste post-hoc Holm-Sidak. (\*) para  $p < 0,05$  vs. Controle. Barra de escala =  $50\mu\text{m}$ . ..... 110

## ÍNDICE DE TABELAS

---

Tabela 4.1: Composição química nominal e determinada pelo método de fusão de metaborato de lítio e ICP-OES (%mol) de vidros bioativos contendo manganês estabilizados à 650°C. ....	37
Tabela 4.2: Correlação entre as bandas principais observada por FTIR e Raman nas amostras de vidro bioativo contendo manganês. ....	41
Tabela 4.3: Propriedades texturais obtidas pela adsorção de nitrogênio para VB, VB-1Mn e VB-2,5Mn. ....	43
Tabela 5.1: Composição química nominal e determinada pelo método de fusão de metaborato de lítio e ICP-OES (%mol) das amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N. ....	58
Tabela 5.2: Parâmetros texturais obtidos pela adsorção de nitrogênio para as amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N. ....	59
Tabela 6.1: Composição química nominal e determinada pelo método de fusão de metaborato de lítio e ICP-OES (%mol) das amostras VB, 5Co-C e 5Co-N. ....	80
Tabela 6.2: Propriedades texturais obtidas pelos métodos BET e BJH para as amostras VB, 5Co-N e 5Co-C. ....	89
Tabela 7.1: Composição química nominal e determinada pelo método de fusão de metaborato de lítio e ICP-OES (%mol) de vidros bioativos estabilizados à 650°C contendo cobalto. ....	100
Tabela 7.2: Propriedades texturais obtidas pelos métodos BET e BJH para as amostras VB, VB-1Co, VB-2,5Co e VB-5Co. ....	104

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

---

<b>ACP</b>	Fosfato de cálcio amorfo, do inglês <i>Amorphous calcium phosphate</i>
<b>ALP</b>	Fosfatase alcalina, do inglês <i>Alkaline phosphatase</i>
<b>BE</b>	Energia de ligação, do inglês <i>Binding energy</i>
<b>BET</b>	Brunauer-Emmett-Teller
<b>BJH</b>	Barrett-Joyner-Halenda
<b>BMSCs</b>	Células estromais da medula óssea, do inglês <i>Bone marrow stromal cells</i>
<b>BO</b>	Oxigênio ligante, do inglês <i>Bridging oxygen</i>
<b>CEUA</b>	Comitê de ética no uso de animais
<b>DMEM</b>	Meio de eagle modificado de Duplecco, do inglês <i>Dulbecco modified eagle medium</i>
<b>DRX</b>	Difração de Raios-X
<b>DSC</b>	Calorimetria diferencial exploratória, do inglês <i>Differential scanning calorimetry</i>
<b>DTG</b>	Termogravimetria derivada, do inglês <i>Derivated thermogravimetry</i>
<b>ECM</b>	Matriz extracelular, do inglês <i>Extracellular matrix</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>FBS</b>	Soro fetal bovino, do inglês <i>Fetal bovine serum</i>
<b>FTIR</b>	Infravermelho com Transformada de Fourier
<b>HAC</b>	Hidroxiapatita carbonatada
<b>hASCs</b>	Células-tronco adiposas humanas, do inglês <i>Human adipose-derived stem cells</i>
<b>HIF-1</b>	Fator de indução da hipóxia, do inglês <i>Hypoxia-inducible factor</i>
<b>hMSCs</b>	Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana, do inglês <i>Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells</i>

<b>HUVECs</b>	Células endoteliais de veias umbilicais humanas, do inglês <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
<b>ICP-OES</b>	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>NBO</b>	Oxigênio não-ligante, do inglês <i>Non-bridging oxygen</i>
<b>NMR</b>	Ressonância Magnética Nuclear, do inglês <i>Nuclear magnetic resonance</i>
<b>OSC</b>	Osteocalcina
<b>OSP</b>	Osteopontina
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino, do inglês <i>Phosphate-buffered saline</i>
<b>PCZ</b>	Ponto de carga zero
<b>PIE</b>	Ponto isoelétrico
<b>pNPP</b>	Fosfato de p-nitrofenilo, do inglês <i>p-nitrophenyl phosphate</i>
<b>SBF</b>	Fluido corporal simulado, do inglês <i>Simulated Body Fluid</i>
<b>SSA</b>	Área superficial específica, do inglês <i>Specific surface area</i>
<b>TCP</b>	Placa de cultura de tecidos, do inglês <i>Tissue culture plate</i>
<b>TEOS</b>	Tetraetilortosilicato
<b>TEP</b>	Trietilfosfato
<b>Tg</b>	Temperatura de transição vítrea
<b>TGA</b>	Análise termogravimétrica, do inglês <i>Thermogravimetric Analysis</i>
<b>TMOS</b>	Tetrametilortosilicato
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento vascular endotelial, do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>XPS</b>	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X, do inglês <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>

## RESUMO

---

Vidros bioativos são materiais de destaque na engenharia de tecidos devido à sua alta bioatividade e biocompatibilidade. Diferentes composições de vidros bioativos podem ser obtidas pelo processo sol-gel, e a sua estrutura permite a incorporação de várias concentrações de diferentes íons com atividades fisiológicas e propriedades terapêuticas, que são liberados durante o processo de dissolução do material, aprimorando o seu desempenho. Dentre diferentes íons com propriedades terapêuticas estão o manganês, que tem demonstrado aprimorar a adesão celular, crescimento e proliferação de osteoblastos, e também o cobalto, conhecido por ser um poderoso agente angiogênico. Nesse contexto, este trabalho relata o desenvolvimento de novas composições de vidros bioativos derivados do processo sol-gel contendo manganês ou cobalto em sua estrutura, como potenciais íons metálicos terapêuticos. A influência da incorporação de diferentes concentrações desses íons na estrutura e propriedades dos vidros bioativos foi avaliada. Micropartículas de vidro bioativo contendo Mn e Co com capacidade de liberação controlada de íons em meio fisiológico foram obtidos. Análises estruturais confirmaram a presença de  $Mn^{2+}$  na estrutura dos vidros bioativos. Espécies  $Co^{2+}$  foram majoritariamente observadas nos vidros contendo esse íon, embora a utilização de diferentes precursores tenha demonstrado afetar a estrutura desses materiais, observando-se a presença de espécies  $Co^{3+}$  quando o cloreto de cobalto foi utilizado como precursor. A viabilidade de células expostas a diferentes concentrações do produto iônico dos materiais foi confirmada. Vidros bioativos contendo Mn demonstraram capacidade de estimular todos os estágios de diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana e subsequente mineralização, confirmando seu papel no aprimoramento da regeneração óssea. Já os estudos morfológicos e histológicos realizados após implante de vidros bioativos contendo Co em ratos demonstraram que não houve indução de respostas adversas, e a presença de infiltrado inflamatório e vasos neoformados foram indicativos de um alto nível de angiogênese no material. A incorporação de Mn e Co em vidros bioativos se mostrou como uma potencial estratégia para aprimoramento do seu potencial para a engenharia de tecidos.

**Palavras-chave:** vidro bioativo; sol-gel; manganês; cobalto;



## ABSTRACT

---

Bioactive glasses are outstanding materials in tissue engineering due to their high bioactivity and biocompatibility. Different bioactive glass compositions can be obtained by the sol-gel process, and their structure allows the incorporation of various concentrations of different ions with physiological activities and therapeutic properties. Those ions are released during the dissolution process of the material, improving its performance. Among the different ions with therapeutical properties, manganese has been shown to enhance cell adhesion, growth and proliferation of osteoblasts, while cobalt is a known angiogenic agent. In this context, this work reports the development of new bioactive glass compositions derived from the sol-gel process, containing manganese or cobalt in their structure, as potential therapeutic metallic ions. The influence of the incorporation of different concentrations of these ions on the structure and properties of the bioactive glasses was evaluated. Bioactive glass microparticles containing Mn and Co with controlled ion release capability in physiological medium were obtained. Structural evaluation confirmed the presence of  $Mn^{2+}$  in the structure of bioactive glasses, while  $Co^{2+}$  were mostly observed in the glasses containing this ion, although the use of different precursors has been shown to affect the structure of these materials, with the presence of  $Co^{3+}$  species when cobalt chloride was used as precursor. The viability of cells exposed to different concentrations of the bioactive glasses ionic product was confirmed. Bioactive glasses containing Mn demonstrated ability to stimulate all stages of differentiation of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and subsequent mineralization, confirming their role in enhancing bone regeneration. The morphological and histological studies performed after the implantation of bioactive glasses containing Co in rats demonstrated that there was no induction of adverse responses, and the presence of inflammatory infiltrate and neoformed vessels are indicative of a high level of angiogenesis in the material. The incorporation of Mn and Co in bioactive glasses has proved to be a potential strategy to improve its potential for tissue engineering.

**Keywords:** bioactive glass; sol-gel; manganese; cobalt

## CAPÍTULO 1. Introdução

---

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que combina os conhecimentos da engenharia e das ciências com o objetivo de reparar, substituir ou regenerar a função de tecidos e órgãos danificados <sup>(1)</sup>. Dentre os diferentes materiais aplicados nessa área, os vidros bioativos apresentam grande destaque. Descoberto por Larry Hench em 1969 <sup>(2)</sup>, os vidros bioativos induzem uma resposta específica em sua superfície quando implantados, resultando na formação de uma forte ligação entre o tecido e o material <sup>(3)</sup>. O vidro bioativo surgiu como uma alternativa aos materiais inertes utilizados como implantes, dando origem ao campo dos materiais bioativos, caracterizados como aqueles que podem provocar uma reação controlada em ambiente fisiológico, levando à regeneração do tecido <sup>(4)</sup>.

Diferentes composições de vidros bioativos já foram sintetizadas e são alvo de pesquisas, como as derivadas da composição original obtida por Hench, denominada 45S5 ou Bioglass® (45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% Na<sub>2</sub>O, 24,5% CaO e 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, % em peso). Essas diferentes composições de vidros bioativos podem ser obtidas pelo processo tradicional de fusão de vidros, onde os óxidos precursores são fundidos em alta temperatura, ou pelo método sol-gel, que se baseia na policondensação dos precursores orgânicos, como os alcóxidos metálicos, em baixa temperatura <sup>(3)</sup>. Vidros bioativos com diferentes composições e obtidos por diferentes métodos apresentam também propriedades físico-químicas e respostas biológicas distintas, tornando essencial o estudo do modo de atuação desse material na regeneração de tecidos, e a relação entre sua composição e propriedades, com o objetivo de se projetar vidros bioativos com propriedades superiores para as mais diversas aplicações.

A estrutura de vidros bioativos permite uma grande flexibilidade em sua composição, sendo possível a incorporação de várias concentrações de diferentes íons com atividades fisiológicas e propriedades terapêuticas, que são liberados durante o processo de dissolução do material <sup>(5,6)</sup>. Esses íons são liberados exatamente no local do implante, onde são necessários, otimizando o efeito terapêutico e reduzindo efeitos colaterais. Cada componente adicionado à estrutura do vidro bioativo possui uma funcionalidade específica, podendo melhorar o seu desempenho. Por exemplo, prata possui atividade antibacteriana <sup>(7)</sup>, enquanto que o estrôncio pode regular a reabsorção óssea <sup>(8)</sup>. A liberação de lítio tem se mostrado eficaz na regeneração de cartilagens <sup>(9)</sup>, e a angiogênese é estimulada quando o cobre ou cobalto são liberados de vidros bioativos <sup>(10)</sup>. Terapias inorgânicas tem sido consideradas como uma alternativa de

baixo custo à utilização de fatores de crescimento e terapias gênicas no reparo tecidual.

Cobalto e manganês são íons que também tem chamado atenção nos últimos anos para incorporação em biocerâmicas. Manganês é um elemento que possui função importante no metabolismo de ossos e músculos, sendo cofator para diversas enzimas que estão envolvidas na remodelação da matriz extracelular. Além disso, esse íon influencia a ativação de integrinas, receptores que mediam as interações celulares com a matriz extracelular e ligantes da superfície celular, sendo importantes na adesão celular <sup>(11)</sup>. O Mn pode ainda influenciar na reabsorção óssea induzida por radicais livres <sup>(12)</sup>. Materiais contendo manganês têm apresentado maior adesão celular e favorecimento da proliferação de osteoblastos quando comparados com o mesmo material sem a presença desse íon <sup>(11,13)</sup>. Já o cobalto pode estimular a angiogênese a partir de mecanismo de hipóxia, influenciando a formação de novos vasos sanguíneos, tendo importante papel na regeneração de tecidos. Vidros bioativos contendo esse íon têm sido avaliados para aplicação na engenharia de tecidos <sup>(14)</sup>, apresentando aumento na expressão de fatores de crescimento vasculares endoteliais <sup>(15)</sup> e estabilização do fator de indução da hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) <sup>(16)</sup>.

Tendo isso em vista, este trabalho tem como objetivo realizar o estudo sistemático de novas composições de vidros bioativos derivadas da 58S (60%SiO<sub>2</sub>-36%CaO-4%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, %molar), que tem apresentado excelente potencial para engenharia de tecidos, com elevada bioatividade. As novas composições foram obtidas pelo processo sol-gel, a partir da incorporação de cobalto e manganês em sua estrutura, íons com potencial efeito terapêutico, para obtenção de materiais superiores para a engenharia de tecidos. Apesar de trabalhos recentes terem avaliado a incorporação de Mn e Co em vidros bioativos derivados do processo de fusão <sup>(13,14)</sup>, composições derivadas da 58S e obtidas pelo processo sol-gel contendo esses íons não foram estudadas. O efeito da incorporação desses íons nas propriedades físico-químicas e biológicas dos vidros bioativos foi avaliado.

## 1.1 Roteiro da tese

Uma revisão da literatura é apresentada no Capítulo 2, com foco no processamento, estrutura e propriedades de vidros bioativos. Já o Capítulo 3 apresenta os objetivos gerais do trabalho, assim como os objetivos específicos de cada capítulo desta Tese de Doutorado. Os Capítulos 4 a 7 apresentam os resultados obtidos durante a

execução desse trabalho. Esses capítulos foram descritos na forma de artigos, e divididos de acordo com os seus objetivos específicos. Cada capítulo é independente, e por esse motivo tornou-se necessário a repetição de algumas metodologias e definições presentes em outros capítulos. Além disso, diferentes metodologias e equipamentos podem ter sido utilizados para análise similares em cada capítulo, já que o trabalho foi realizado parcialmente na Escola de Engenharia e no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e em parte durante o período de doutorado sanduiche no Imperial College London.

No Capítulo 4, é apresentado o estudo de vidros bioativos contendo manganês, obtidos pelo processamento sol-gel, e o efeito dessa incorporação na estrutura, propriedades térmicas e texturais, dissolução, bioatividade e citotoxicidade dos materiais. O trabalho foi realizado em parceria com o Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB – UFMG). Já o Capítulo 5 tem o foco na avaliação de uma nova fonte de manganês para obtenção de vidros bioativos, e o estudo do potencial osteogênico dos vidros bioativos com capacidade de liberação de Mn, avaliando-se a expressão de diferentes marcadores da diferenciação osteogênica quando células-tronco mesenquimais humanas foram expostas ao produto iônico dos vidros bioativos.

O Capítulo 6 descreve a incorporação de cobalto na estrutura de vidros bioativos derivados da composição 58S, um íon terapêutico com capacidade de aprimorar o processo de angiogênese. O efeito da utilização de diferentes precursores na incorporação de Co foi investigado, de modo a se determinar qual o mais adequado para as diferentes aplicações. Os trabalhos realizados no Capítulo 5 e 6 foram realizados durante período de estudo no Imperial College London. Diferentes composições de vidro bioativo contendo Co foram sintetizados no Capítulo 7, no qual a influência dessa incorporação na estrutura do material e a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* também foram avaliados, em um trabalho realizado em parceria com o Departamento de Bioquímica e Imunologia, Departamento de Morfologia e Departamento de Patologia Geral (ICB – UFMG). Por fim, as considerações finais sobre este trabalho de Doutorado são apresentadas no Capítulo 8, assim como sugestões para trabalhos futuros e publicações relacionadas a este trabalho.

## CAPÍTULO 2. Revisão Bibliográfica

---

### 2.1 O vidro bioativo

A segunda geração de biomateriais teve o início do seu desenvolvimento quando uma composição especial de vidro foi sintetizada por Hench e colaboradores na Universidade de Flórida, em 1969 <sup>(2)</sup>. A composição do vidro de 45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% Na<sub>2</sub>O, 24,5% CaO e 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (% em peso) foi selecionada de modo a fornecer P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e a maior quantidade de CaO em uma matriz de Na<sub>2</sub>O-SiO<sub>2</sub>, com composição próxima à eutética, facilitando o processo de fusão. O vidro foi fundido e moldado em pequenos retângulos para testes em ratos, sendo posteriormente implantados em defeitos no fêmur desses animais. Após seis semanas de testes, observou-se que os implantes cerâmicos formavam uma ligação muito forte com o osso, só podendo ser removidos com a quebra dessa ligação <sup>(17)</sup>. Foi observada a formação de cristais de hidroxiapatita na interface dessa ligação, posteriormente relacionada a uma série de reações que ocorrem em sua superfície quando em meio fisiológico <sup>(3)</sup>. Os cristais de hidroxiapatita eram ligados a fibrilas de colágeno produzidas na interface por osteoblastos, formando uma forte interação entre implante e tecido <sup>(18)</sup>. Essa composição de vidro bioativo, posteriormente denominada Bioglass<sup>®</sup> ou 45S5, surgiu como uma alternativa aos materiais inertes, dando origem ao campo das cerâmicas bioativas, grupo de materiais caracterizado como aqueles que induzem uma resposta biológica específica na sua superfície, resultando na formação de uma ligação entre os tecidos e os materiais <sup>(4)</sup>.

Composições de vidros bioativos como a 45S5 produzem rápida regeneração de osso trabecular, com arquitetura e qualidade biomecânica semelhante ao tecido original <sup>(19)</sup>. No entanto, vidros bioativos têm apresentado resultados promissores também na regeneração de tecidos macios, abrindo um novo horizonte na aplicação desses materiais que ainda deverá ser explorado <sup>(20)</sup>. Além disso, vidros bioativos tem chamado atenção devido ao seu potencial de liberação controlada de íons terapeuticamente ativos, com funcionalidades específicas que auxiliam no reparo de tecidos, como o favorecimento da angiogênese, propriedades antimicrobianas, influência na osteogênese, etc <sup>(21)</sup>. Esses materiais podem ser utilizados na forma de pós, nanopartículas ou *scaffolds*, além de serem utilizados na fabricação de compósitos ou materiais híbridos, no revestimento de estruturas poliméricas e metálicas, entre outros <sup>(22–24)</sup>, e podem ser obtidos a partir do método tradicional de fusão (fusão dos óxidos precursores a alta temperatura), ou pelo método sol-gel

(policondensação de precursores orgânicos, como os alcóxidos metálicos, a baixa temperatura) <sup>(25)</sup>.

Diversas composições de vidros bioativos foram desenvolvidas ao longo dos anos, podendo possuir menos componentes do que o vidro 45S5 ou apresentar elementos adicionais incorporados em sua estrutura, como magnésio, estrôncio, boro, zinco, dentre outros, que aprimoram as propriedades do material dependendo da sua aplicação <sup>(4)</sup>. Diferentes composições resultam em alterações nas propriedades físico-químicas e na resposta biológica desses materiais para regeneração de tecidos. Portanto, é essencial o estudo de como os vidros bioativos podem estimular ativamente e aprimorar a formação de novos tecidos, e a relação entre diferentes composições de vidros bioativos e suas propriedades. Esse conhecimento pode ser utilizado para projetar vidros bioativos com propriedades superiores, sendo modelados de acordo com as especificações de cada aplicação.

### **2.1.1 Métodos de produção**

Vidros bioativos podem ser sintetizados pela rota tradicional de fusão de vidros, ou pelo processamento sol-gel.

#### **Vidros bioativos derivados da técnica de fusão**

Nesta técnica, quantidades estequiométricas de diferentes constituintes óxidos, carbonatos e fosfatos de alta pureza são utilizados como matéria prima <sup>(26)</sup>, homogeneizados, e fundidos em temperaturas elevadas, normalmente entre 1350 e 1500°C <sup>(27)</sup>. O vidro fundido pode ser vertido em moldes de grafite, de modo a se obter blocos de vidro sólido na forma de interesse, ou então vertidos em água ou óleo, obtendo-se lamelas ou flocos de vidro <sup>(28)</sup>. Logo após, o material pode ser recozido para remover o estresse interno do vidro <sup>(26)</sup>. Posteriormente a essa etapa realiza-se o tratamento final, como o esmerilhamento dos vidros, ou produção de pós através da moagem. O material final pode ser utilizado para os mais diversos fins, como por exemplo ser diretamente aplicado como material para preenchimento de defeitos, serem utilizados na produção de compósitos vidro bioativo/polímero, ou ainda na fabricação de matrizes tridimensionais para a engenharia de tecidos <sup>(4,13,29)</sup>. O método de fusão é bastante flexível, permitindo a produção de diversas composições de vidros bioativos, simplesmente variando-se o número e a proporção das matérias primas utilizadas. Além do fácil controle da composição química do vidro, o método de fusão

apresenta processamento relativamente rápido e a possibilidade de síntese de grandes quantidades de uma só vez.

No entanto, o teor de sílica deve ser menor que 60% (mol %) em vidros derivados do processo de fusão para que sejam considerados bioativos, enquanto que vidros bioativos sintetizados pelo método sol-gel esse valor pode chegar a até 90% (mol %) <sup>(28)</sup>. Vidros bioativos sintetizados por esse processo, como o Bioglass<sup>®</sup>, tendem a cristalizar durante o processo de sinterização, formando uma fase predominantemente cristalina que pode afetar a bioatividade do material <sup>(27)</sup>. No entanto, o processo de fusão continua sendo bem explorado, por ser um método de relativamente fácil controle, em que diferentes composições e formas de materiais podem ser obtidos, apresentando resultados muito atrativos para a engenharia de tecidos.

### **Vidros bioativos derivados da técnica sol-gel**

O método sol-gel tem se destacado nos últimos anos como uma alternativa ao processo tradicional de fusão para produção de vidros. O processo é realizado em temperaturas baixas, permitindo controlar a estrutura de poros do gel, de acordo com a bioatividade e biodegradabilidade desejada <sup>(25)</sup>. Além disso, composições sol-gel normalmente apresentam menos componentes, alta homogeneidade e pureza, e a possibilidade de utilização de várias rotas para obtenção da forma do produto final <sup>(30)</sup>. Composições típicas de vidros bioativos sol-gel são aquelas do sistema ternário <sup>(31)</sup>, como por exemplo a 58S (60% mol SiO<sub>2</sub>, 36% mol CaO, 4% mol P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e 77S (80% mol SiO<sub>2</sub>, 36% mol CaO, 4% mol P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), ou do sistema binário <sup>(32)</sup>, como a 70S30C (70% mol SiO<sub>2</sub>, 30% mol CaO). Vidros bioativos derivados do processo sol-gel possuem alta versatilidade, e géis, aerogéis, pós nanoporosos, materiais densos, matrizes tridimensionais, etc, podem ser produzidos por esse método sendo excelentes materiais para a regeneração de tecidos <sup>(33)</sup>.

O processo sol-gel consiste basicamente na transformação de um sol (suspensão coloidal de partículas sólidas) em um líquido (gel). A diferença entre um sol e uma solução reside no fato de que a solução é um sistema de uma única fase, enquanto que o sol é uma suspensão de uma fase sólida em uma fase líquida. Em um sol, as partículas coloidais são tão pequenas, da ordem de 1 a 100 nm, que as forças gravitacionais são desprezíveis e as interações são dominadas por forças de pequena ordem, tais como atração de Van der Waals e cargas superficiais <sup>(34)</sup>. A diminuição da

carga superficial das partículas suspensas leva a perda de mobilidade através da interconexão, originando uma rede tridimensional rígida e porosa, o gel.

Nesse processo, os precursores usados para a preparação do colóide consistem de um elemento metálico rodeado por vários ligantes não metálicos, sendo os mais utilizados os alcóxidos metálicos, como o tetraetil ortossilicato (TEOS) e o tetrametilortossilicato (TMOS) <sup>(35,36)</sup>. Os géis silicatos poliméricos são produzidos pelas reações de hidrólise e condensação do precursor alcóxido (Figura 2.1) <sup>(28)</sup>. A reação de hidrólise substitui um grupo alcóxido por hidroxila. Duas moléculas hidrolisadas parcialmente podem se ligar em uma reação de condensação envolvendo grupos silano (Si-OH) para produzir ligações siloxanas (Si-O-Si) mais água ou álcool como subproduto <sup>(37)</sup>. Os parâmetros de reação que influenciam a química do processo sol-gel são o pH da solução, a razão molar de sílica e água, os catalisadores, os solventes e a temperatura de reação <sup>(38)</sup>.

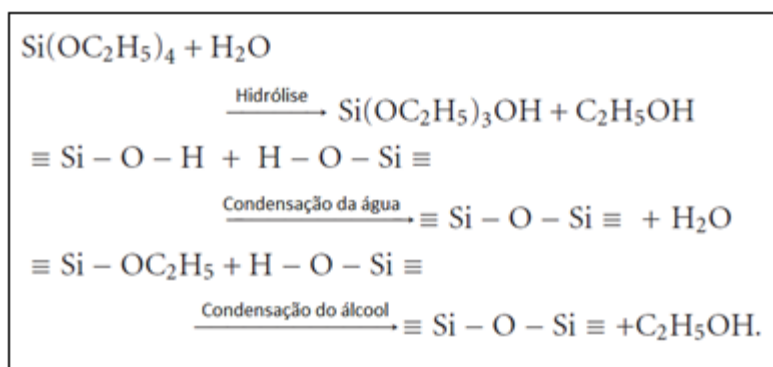


Figura 2.1: Esquema das reações do TEOS que levam à formação de nanopartículas de sílica no processo sol-gel. Adaptado de Rahman et al., 2012 <sup>(37)</sup>.

Com o tempo, as partículas coloidais e espécies condensadas de sílica se ligam formando uma rede tridimensional, o gel. O processo de polimerização pode ser dividido em três domínios de pH's: pH abaixo de 2, entre 2 e 7 e acima de 7, de acordo com as características superficiais da sílica como o ponto de carga zero (PCZ), onde a carga superficial é zero, e o ponto isoelétrico (PIE), onde a mobilidade das partículas da sílica é zero, ambos na faixa de pH entre 1 e 3. Em pH<2, a formação e a agregação de partículas primárias ocorrem simultaneamente. As partículas carregam pouca carga, o que permite a colisão entre elas, dando origem a cadeias e, posteriormente, a um sólido tridimensional. Já em pH's entre 2 e 7, a polimerização ocorre entre espécies condensadas. Uma vez formados os dímeros, eles reagem preferencialmente com monômeros para formar trímeros e, que tornam a reagir para



formar tetrâmeros. O crescimento e agregação ocorrem por contínua adição de moléculas pequenas às moléculas mais condensadas, formando cadeias e, por fim, uma rede tridimensional. Acima do pH igual a 7, as partículas de sílica são carregadas negativamente e repelem-se mutuamente. Com isso, elas não colidem, proporcionando um crescimento das partículas sem agregação. A solubilidade dessas partículas influencia na taxa de crescimento, já que depende da distribuição de tamanho. Como as partículas pequenas são mais solúveis do que as grandes, têm-se uma tendência geral de crescimento do tamanho médio das partículas e uma diminuição no seu número total <sup>(38-40)</sup>.

O tratamento térmico é utilizado posteriormente para o envelhecimento, secagem e estabilização do gel para a produção de vidros nanoporosos <sup>(28)</sup>. O envelhecimento envolve a manutenção do material imerso em líquido por um longo período de tempo (horas a dias), em ambiente selado. Durante o envelhecimento, a policondensação continua junto com a reprecipitação da rede do gel, e a resistência do gel aumenta <sup>(39)</sup>. O gel é úmido devido ao excesso de água utilizado no processo e também à água e etanol formados durante as reações de condensação. A evaporação de subprodutos do processo sol-gel presentes nos interstícios entre as nanopartículas aderidas forma uma estrutura porosa, típica desse processo, com diâmetros normalmente na faixa de 1 a 30nm <sup>(28)</sup>. O gel seco é posteriormente aquecido a maiores temperaturas, normalmente acima de 600°C, onde ocorre a remoção de silanol da superfície (Si-OH) da rede porosa, resultando num sólido poroso quimicamente estável <sup>(39)</sup>. Aquecimento a temperaturas mais elevadas levam à densificação dos materiais, com a remoção dos poros e aumento da densidade. A Figura 2.2 apresenta um resumo da evolução da nanoestrutura após diferentes etapas do processamento sol-gel, desde a formação de partículas primárias (com cerca de 2 nm de diâmetro), partículas secundárias (5-8 nm), até a formação das partículas terciárias (10-30 nm), conforme resultados obtidos para um modelo de vidro bioativo de composição 70S30C <sup>(41)</sup>.

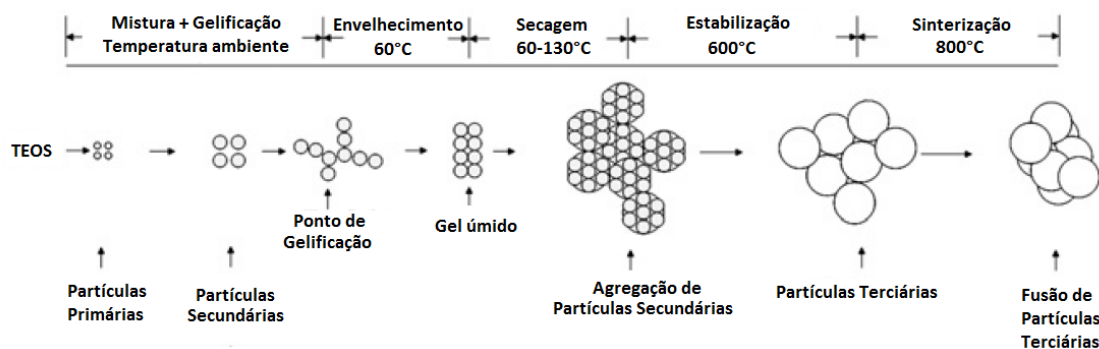


Figura 2.2: A evolução estrutural das unidades do vidro bioativo durante o processamento sol-gel de um modelo 70S30C. Adaptado de Lin et al., 2009<sup>(41)</sup>.

Precursores normalmente utilizados para a introdução de cálcio e fósforo no vidro bioativo produzido pelo processo sol-gel são o nitrato de cálcio e o trietilfosfato (TEP), respectivamente. O processo térmico remove também subprodutos dos precursores não alcóxidos, como os nitratos<sup>(28)</sup>. No entanto, o cálcio só entra na rede da sílica e se torna um modificador de rede em temperaturas maiores que 400°C<sup>(28)</sup>, conforme pode ser observado na Figura 2.3. O nitrato de cálcio fica dissolvido no sol (Figura 2.3 (a)), se depositando em partículas de sílica secundárias após secagem (Figura 2.3 (b)), e durante a estabilização o nitrato se decompõe, sendo parte do cálcio incorporado à rede de partículas secundárias de sílica como modificadores de rede<sup>(41)</sup>.

Vidros sintetizados pelo processo sol-gel apresentam normalmente baixa resistência mecânica, sendo difícil obter materiais livres de trincas, especialmente monolitos. Esses materiais tentem a trincar durante o processo de secagem, devido principalmente a dois fatores: alta contração que ocorre durante a secagem, e a evaporação dos subprodutos líquidos durante a reação de condensação, que causa estresse capilar na estrutura porosa e conseqüentemente a fratura<sup>(27,28)</sup>. Outras desvantagens do processo são o longo tempo de processamento e o alto custo dos materiais precursores.

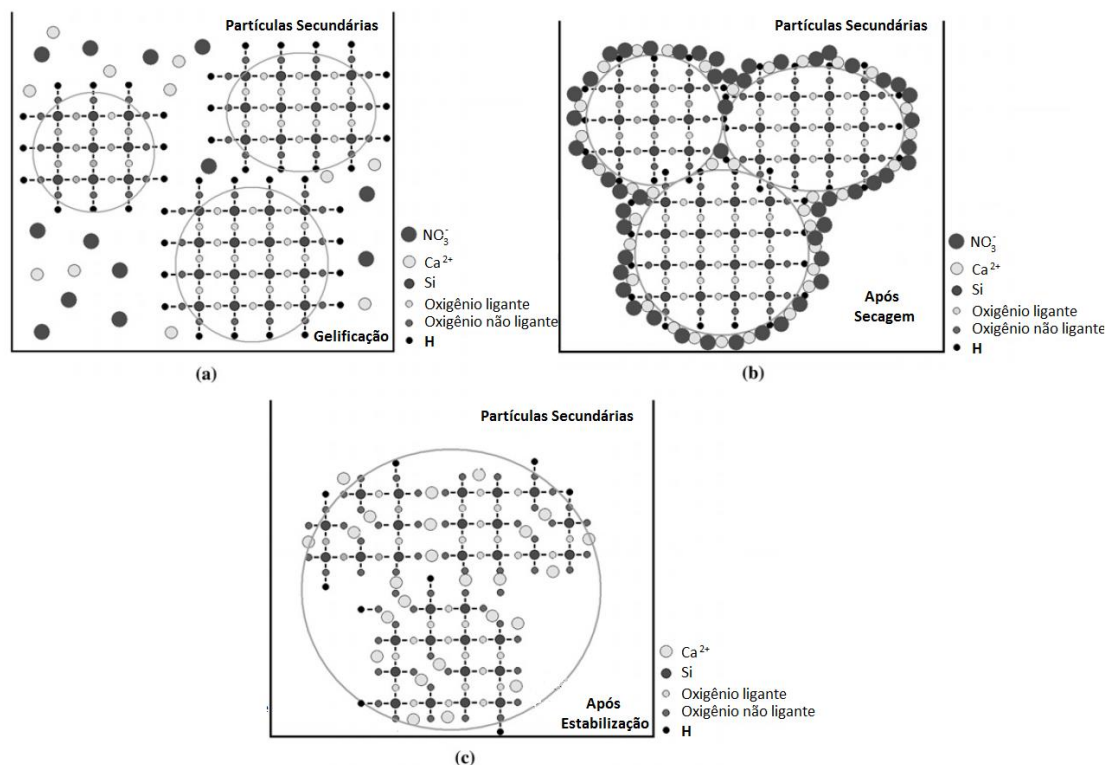


Figura 2.3: Ilustração esquemática da evolução na distribuição de cálcio durante o estágio de gelificação (a), estágio após secagem (b), e estágio de estabilização (c) em processos sol-gel. Adaptado de Lin et al., 2009 <sup>(41)</sup>.

## 2.1.2 A estrutura dos vidros bioativos

Vidros são caracterizados por sua estrutura amorfa e seu comportamento térmico, apresentando um intervalo de transição vítrea ( $T_g$ ), onde o sistema se transforma de um líquido super-resfriado em um vidro sólido <sup>(6)</sup>. A  $T_g$  é influenciada pelas características químicas do vidro, podendo ser alterada de acordo com elementos adicionados à rede do material <sup>(42)</sup>. Em contraste com sólidos cristalinos, os átomos estão arranjados na estrutura do vidro de maneira aleatória, não apresentando uma organização de longo alcance. A Figura 2.4 apresenta um desenho esquemático da estrutura da sílica cristalina e da sílica vítrea, onde se percebe a desorganização da estrutura amorfa. Além disso, quando vidros são aquecidos, eles apresentam um decréscimo na sua viscosidade por várias ordens de grandeza, razão pela qual podem ser facilmente processados em várias formas, seja pelo método de fusão ou sol-gel.

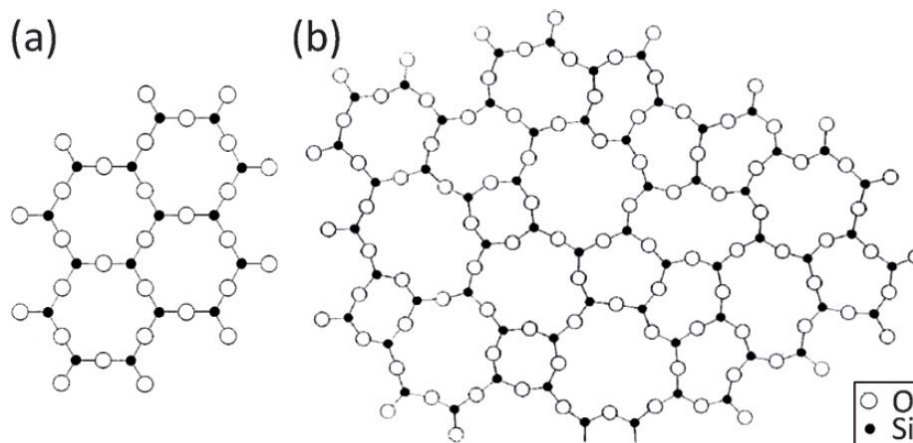


Figura 2.4: Desenho esquemático da estrutura (a) cristalina e (b) vítrea de sílica (apenas três átomos de oxigênio são apresentados por tetraedro SiO<sub>4</sub>, o quarto estaria acima ou abaixo do plano da imagem). Adaptado de Brauer, 2015<sup>(6)</sup>.

A rede vítrea é formada basicamente por dois componentes, denominados formadores de rede e modificadores de rede. Os formadores de rede são os principais componentes da estrutura do vidro, contribuindo para a formação da rede tridimensional, podendo formá-la sem a necessidade de componentes adicionais incorporados. São exemplos normalmente utilizados a sílica (SiO<sub>2</sub>), pentóxido de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e o trióxido de boro (B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sup>(6)</sup>. Já os modificadores de rede são os que interrompem essa estrutura tridimensional vítrea formada, tendo como exemplos o cálcio e o sódio.

Vidros bioativos baseados em silicatos são os mais empregados atualmente. A unidade básica de silicatos é o SiO<sub>4</sub> tetraédrico, que pode ser conectado com outro tetraedro a partir de ligações Si-O-Si, denominadas de oxigênios ligantes em ponte<sup>(6)</sup>. Cada ânion de oxigênio é coordenado por dois cátions de silício, correspondendo aos vértices do tetraedro, impedindo o empacotamento de camadas de ânions e resultando em estruturas relativamente abertas<sup>(26)</sup>. O tetraedro de silício e suas ligações associadas podem ser referidas como unidades Q<sup>n</sup>, representando um silício que conecta a *n* oxigênios ligantes<sup>(43)</sup>, conforme esquema da Figura 2.5. Um estudo de ressonância magnética nuclear (NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*) do <sup>29</sup>Si demonstrou que a rede tridimensional do Bioglass<sup>®</sup> consiste primariamente de 69% de cadeias e anéis de unidades Q<sup>2</sup>, ou seja, com dois oxigênios ligantes, e 31% de unidades Q<sup>3</sup>, que fornecem ligações cruzadas à estrutura<sup>(28,44)</sup>. A predominância de unidades Q<sup>2</sup> mostra que a estrutura do vidro bioativo tem menor orientação quando comparada com vidros convencionais, que normalmente apresentam predominância de unidades Q<sup>3</sup> e Q<sup>4</sup><sup>(6)</sup>.

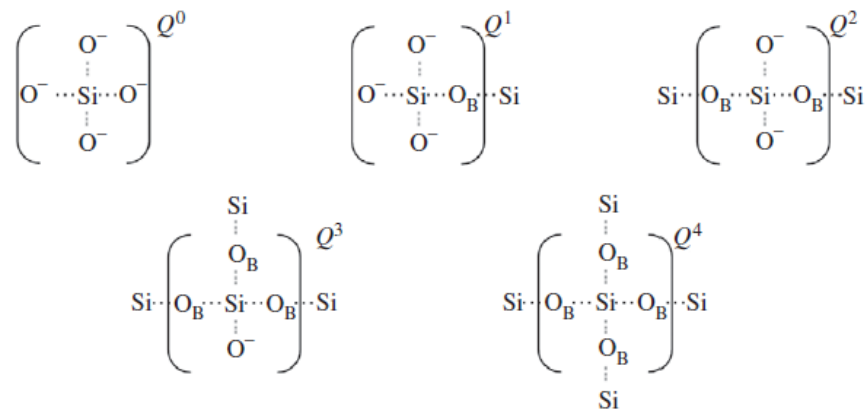


Figura 2.5: Esquema das estruturas  $Q^n$  que podem descrever a conectividade da rede de sílica em vidros.  $O_B$  representa um oxigênio ligante formador de rede (Si-O-Si).  
Fonte: Martin et al., 2012 <sup>(45)</sup>

Outras composições de vidros bioativos possuem um segundo formador de rede,  $P_2O_5$ , além do  $SiO_2$ . Vários trabalhos mostram que o fósforo está presente na estrutura de vidros bioativos na forma de ortofosfato em vez de fazer parte na rede do silicato <sup>(28,46)</sup>, e os resultados da NRM de  $^{31}P$  indicam que os grupos ortofosfatos ( $PO_4^{3-}$ ) estão cercados por cátions modificadores de rede para fins de balanceamento de carga (Figura 2.6) <sup>(47)</sup>, com apenas pequenas quantidades de ligações Si-O-P sendo observadas na estrutura de vidros bioativos <sup>(48)</sup>.

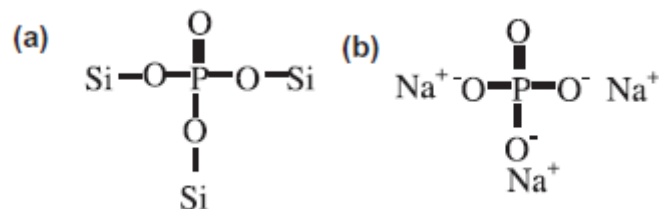


Figura 2.6: (a) O papel do fosfato como formador de rede e (b) estrutura do ortofosfato.  
Fonte: Elgayar et al., 2005 <sup>(47)</sup>

O fosfato é rapidamente liberado pela estrutura do vidro quando exposto ao ambiente aquoso <sup>(49)</sup>, principalmente devido ao fato de os grupos  $PO_4^{3-}$  estarem isolados da rede de sílica, removendo os cátions modificadores de rede para fins de balanceamento de carga <sup>(3)</sup>. Essa liberação de íons fosfatos favorece a rápida formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfo na superfície do material, que se cristaliza e dá origem à camada de hidroxiapatita carbonatada <sup>(50)</sup>.

Vidros bioativos podem também apresentar boratos ( $B_2O_3$ ) como formadores de rede, podendo ser associados com  $SiO_2$  ou  $P_2O_5$ , ou sintetizados vidros com exclusivamente boratos no papel de formadores de rede <sup>(51,52)</sup>. Boratos são também frequentemente utilizados como aditivos para facilitar o processamento de vidros bioativos, já que a sinterização de vidros boratos ou borosilicatos é mais facilmente controlada do que a de vidros silicatos <sup>(6,26)</sup>.

O segundo componente da estrutura de vidros são os modificadores de rede. Esses componentes alteram a estrutura do vidro convertendo oxigênios ligantes (com ligações químicas com caráter predominantemente covalentes) em oxigênios não ligantes (ligações  $Si-O^M^+$ , de caráter predominante iônicas, onde M é um cátion modificador), alterando a estrutura do vidro <sup>(6,28)</sup>. São exemplos o sódio, cálcio, estrôncio, dentre outros. A Figura 2.7 representa a estrutura geral de vidros bioativos em um modelo 3D para a composição 45S5. Cada átomo de silício é complexado com quatro oxigênios em um arranjo tetraédrico. Dependendo da formulação, o vidro pode apresentar diferentes quantidades de sódio, cálcio e outros modificadores de rede. Observa-se as unidades tetraédricas de grupos fosfatos isoladas da estrutura, e com suas cargas balanceadas pelo cátions modificadores de rede.

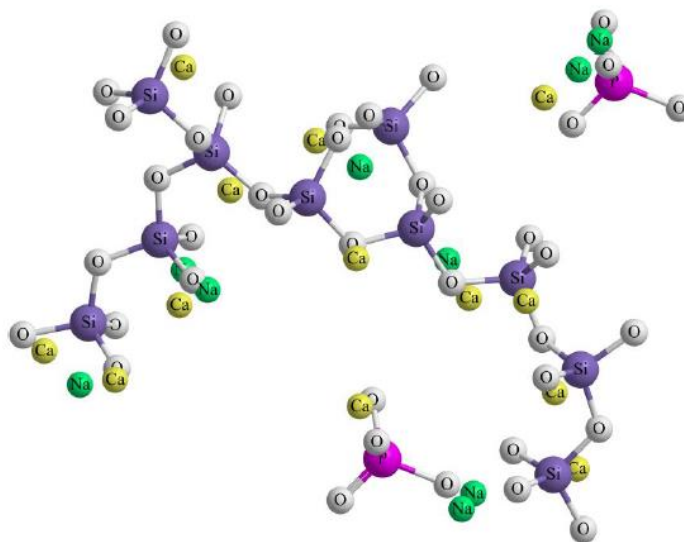


Figura 2.7: Modelo da estrutura 3D do vidro bioativo 45S5, demonstrando unidades tetraédricas  $PO_4$  isoladas, unidades  $Q^2$  fazendo ligações cruzadas com unidades  $Q^3$  e unidades terminais  $Q^1$ . Na (verde) e Ca (amarelo) balanceando as cargas de oxigênios não ligantes. Fonte: Hoppe et al., 2014 <sup>(27)</sup>

O conhecimento sobre a estrutura de vidros bioativos é extremamente importante para a obtenção de composições alternativas e para entender o seu comportamento. Por exemplo, estruturas mais compactas (contendo menor teor de modificadores de rede)

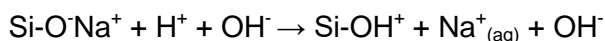
apresentam menor taxa de dissolução e bioatividade quando comparados com estruturas com cadeias abertas <sup>(53)</sup>. A conectividade da rede diminui ao se adicionar mais cátions modificadores de rede à estrutura de vidros bioativos <sup>(6)</sup>. Já o fósforo pode ficar localizado nos interstícios da rede da sílica, extraindo alguns cátions modificadores para balanceamento de cargas, podendo resultar na repolimerização da rede de sílica, e conseqüentemente aumentando o valor da conectividade da rede <sup>(50)</sup>. No entanto, é difícil prever exatamente as alterações na estrutura quando há substituição de íons da rede, já que muitos vidros bioativos apresentam composição complexa, com vários componentes, tornando essencial a análise estrutural do vidro bioativo <sup>(6)</sup>.

### 2.1.3 Vidro Bioativo e bioatividade

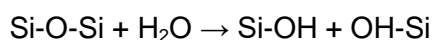
A diferença na estrutura de vidros bioativos e vidros convencionais gera diferenças acentuadas entre suas propriedades. A estrutura aberta da rede formada em vidros bioativos permite que moléculas de água penetrem na sua estrutura muito mais facilmente do que em vidros convencionais, resultando em diferentes padrões de dissolução <sup>(6)</sup>. Vidros bioativos apresentam uma superfície altamente reativa, capaz de liberar íons em solução <sup>(27)</sup>. A acumulação desses produtos de dissolução causa alterações na composição química e no pH da solução, fornecendo regiões na sua superfície e um pH que induzem a nucleação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC) <sup>(54)</sup>. Essa camada de HAC formada na sua superfície é similar ao constituinte natural do osso, e interage com fibrilas do colágeno de defeitos ósseos, formando uma forte ligação entre o material implantado e o tecido ósseo, estimulando a adesão, proliferação e diferenciação de células e conseqüente formação de um novo tecido, regenerando a área do implante <sup>(3)</sup>. A bioatividade de biomateriais pode ser avaliada *in vitro* pela formação de HAC em SBF (*Simulated Body Fluid*), sendo um indicador da bioatividade *in vivo* <sup>(55)</sup>. A solução SBF mimetiza o meio fisiológico do corpo, simulando as condições de concentração iônica, espécies iônicas e pH do fluido fisiológico, sendo o método mais utilizado para acessar o potencial de mineralização de biomateriais *in vitro* <sup>(55,56)</sup>. Cinco etapas são propostas para o mecanismo geral de formação de HAC na superfície do vidro bioativo quando em fluido corporal *in vivo* ou em SBF *in vitro* <sup>(28,57,58)</sup>:

*Etapa 1:* Rápida troca iônica entre os modificadores de rede do vidro bioativo ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , por exemplo) com íons  $\text{H}^+$  (ou  $\text{H}_3\text{O}^+$ ) presentes na solução levando à hidrólise dos grupos de sílica e formação de silanol ( $\text{Si-OH}$ ) na superfície do vidro. A troca

iônica é controlada por difusão. O pH da solução aumenta como resultado da troca de íons  $H^+$  em solução, e regiões pobres em cátions (ricas em sílica) são formadas próximas à superfície do material.



*Etapa 2:* O aumento no pH (ou na concentração de  $OH^-$ ) leva ao ataque da rede de sílica do vidro, com quebra das ligações Si-O-Si. Sílica solúvel é perdida para a solução na forma de  $Si(OH)_4$ , deixando mais silanóis na interface entre vidro e solução.



*Etapa 3:* Condensação e polimerização de uma região amorfa rica em  $SiO_2$  (tipicamente 1-2 $\mu$ m de espessura) na superfície do vidro, sem a presença de cátions alcalinos e alcalinos terrosos.

*Etapa 4:* Difusão de íons  $Ca^{2+}$  e  $PO_4^{3-}$  para a superfície pela camada rica em sílica e pela solução, levando à formação de um filme amorfo rico em  $CaO-P_2O_5$  na superfície.

*Etapa 5:* Finalmente, ocorre a cristalização do filme amorfo rico em  $CaO-P_2O_5$  pela incorporação de  $OH^-$  e  $CO_3^{2-}$  da solução, com formação de uma camada de HAC.

Uma ilustração esquemática das etapas de formação da camada de HAC em vidros bioativos quando em contato com solução fisiológica é apresentada na Figura 2.8. A composição do vidro bioativo é a variável que tem maior influência na taxa de formação da camada de HAC e ligação com o tecido. Vidros com menor teor de sílica apresentam uma rede menos interconectada, mais susceptível à dissolução, e portanto as etapas descritas ocorrem mais rapidamente <sup>(28)</sup>. A bioatividade é diretamente relacionada com a energia de dissolução da sílica no vidro <sup>(59)</sup>. No entanto, a conectividade da rede é fundamental para a formação da HAC, e depende do teor de sílica e também de quais átomos modificadores estão presentes na estrutura do vidro <sup>(6)</sup>. Por exemplo, ao se adicionar sódio em substituição ao silício, a taxa de dissolução aumenta, mas a substituição de sódio ou cálcio por íons de maiores valências como  $Al^{3+}$  e  $Ti^{4+}$  reduzem a solubilidade e conseqüentemente a bioatividade <sup>(60)</sup>. Como a estrutura do vidro e a liberação de íons afeta a formação da camada de hidroxiapatita carbonatada em vidros bioativos, os dois fatores devem ser levados em consideração quando necessárias novas composições de vidros que apresentem rápida taxa de



formação (por exemplo, para aplicações dentárias) ou formação extremamente lenta (por exemplo em vidros que não mineralizem, para reparo de cartilagens) <sup>(6)</sup>.

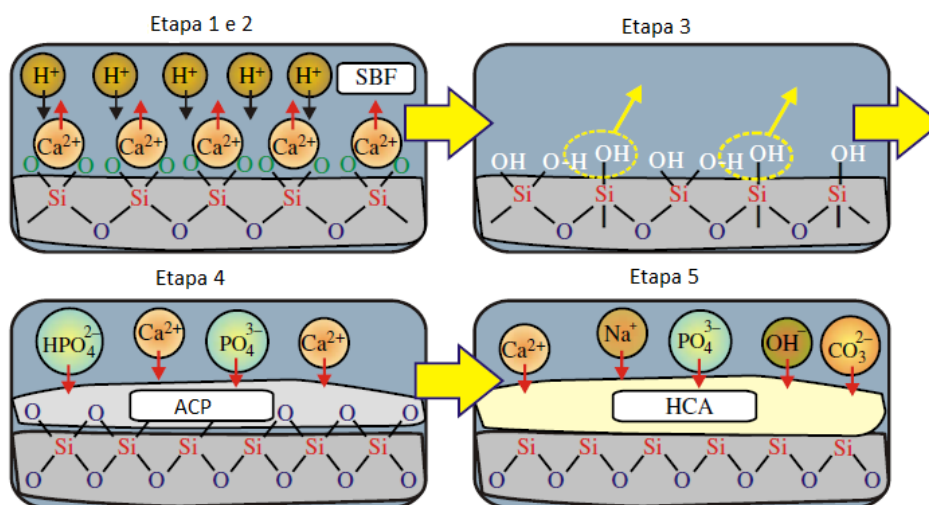


Figura 2.8: Ilustração esquemática da sequência de reações que levam a formação de HCA em SBF. As primeiras três etapas envolvem reações entre a superfície do silicato e o fluido ao seu redor com as seguintes etapas: (1) troca iônica  $\text{Ca}^{2+} \leftrightarrow \text{H}^+$  e (2) quebra de ligações Si-O-Si, formando grupos Si-OH; (3) repolimerização  $2\text{Si-OH} \rightarrow \text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O}$ . A seguir ocorre (4) formação da camada de fosfato de cálcio amorfo (ACP – *amorphous calcium phosphate*) e (5) cristalização  $\text{ACP} \rightarrow \text{HCA}$  pela incorporação de íons adicionais. Adaptado de Gunawidjaja et al., 2012 <sup>(61)</sup>.

Após a formação de HCA, as próximas etapas são menos claras. No entanto, algumas etapas são propostas <sup>(62,63)</sup>: as camadas reativas formadas aumentam a adsorção e dessorção de fatores de crescimento (etapa 6) e diminuem consideravelmente o tempo de ação dos macrófagos para prepararem o local de implante para a reparação do tecido (etapa 7). A fixação de células-tronco (etapa 8) e proliferação e diferenciação de células (etapa 9) ocorre rapidamente em materiais de elevada bioatividade. Em materiais com baixa bioatividade e materiais bioinertes, eventos celulares semelhantes podem demorar várias semanas para ocorrer em sua superfície. Células osteoprogenitoras colonizam a superfície dos materiais bioativos e iniciam a produção de vários fatores de crescimento que estimulam divisão celular, mitose, e produção de proteínas da matriz extracelular (etapa 10). A mineralização da matriz acontece em seguida, e osteócitos maduros, incorporados em uma matriz de colágeno-HCA, são os produtos finais do processo (etapa 11).

As 11 etapas de reações que acontecem na superfície de vidros bioativos em meio fisiológico, listadas anteriormente, descrevem a formação de uma camada de HCA, que leva a formação de uma forte ligação interfacial com o osso. No entanto, produtos

de dissolução iônica liberados de vidros bioativos tem mostrado capacidade de induzir também uma resposta biológica, afetando o comportamento celular, influenciando a diferenciação e proliferação de células e genes envolvidos no processo de reparo de tecidos <sup>(27)</sup>. Esses efeitos surgem como consequência da incorporação de agentes terapêuticos em vidros bioativos, mas também dependem das propriedades do material, como área e carga da superfície, cristalinidade, morfologia, etc. A Figura 2.9 apresenta uma visão geral da resposta de vidros bioativos, com base em relatos da literatura. Produtos de dissolução de vidros bioativos podem estimular secreção de fatores de crescimento angiogênico, estimulando a neovascularização, além de auxiliar no aumento da proliferação de osteoblastos, e apresentar também atividade antibacteriana. Cada íon apresenta um efeito terapêutico específico, podendo auxiliar no reparo de tecidos de acordo com a finalidade desejada.

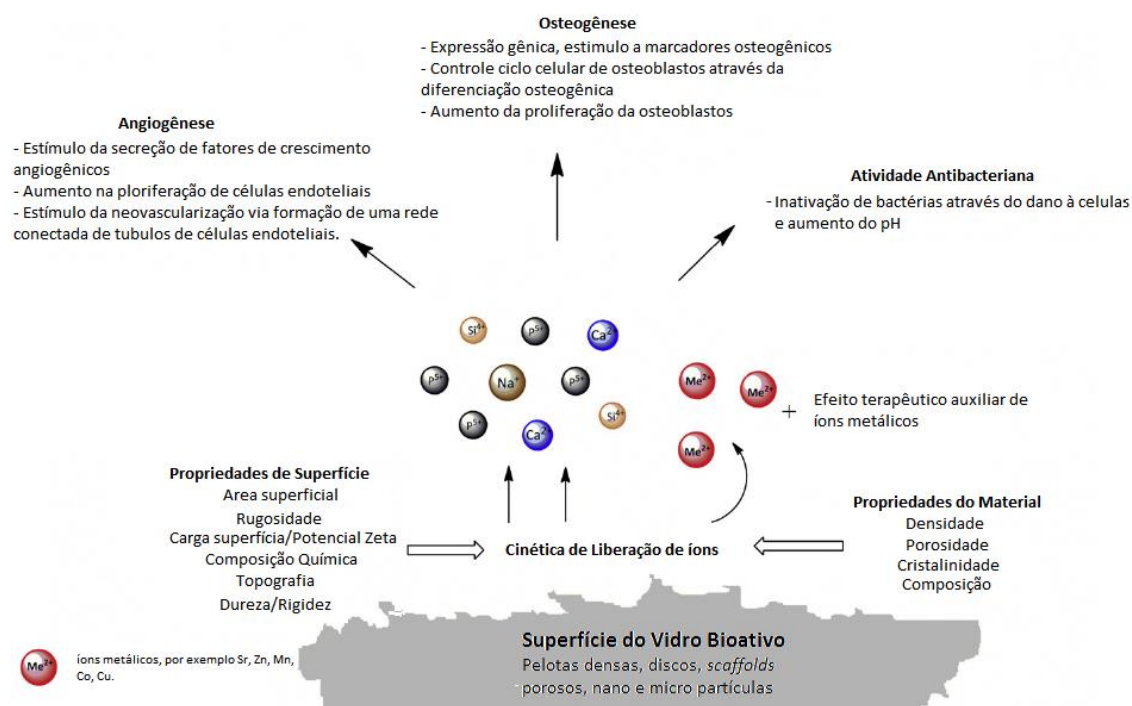


Figura 2.9: Visão geral da resposta biológica aos produtos de dissolução de vidros bioativos. A liberação de íons metálicos terapêuticos adicionais durante a degradação da matriz é proposta para aumentar o desempenho biológico dos vidros bioativo. Adaptado de Hoppe et al., 2011 <sup>(21)</sup>.

## 2.2 Íons inorgânicos como agentes terapêuticos em biocerâmicas

Estruturas de vidro bioativo permitem uma grande flexibilidade em sua composição, já que não são dependentes de uma estequiometria específica, permitindo a incorporação de várias concentrações de íons com atividades fisiológicas e propriedades terapêuticas <sup>(6)</sup>. Esses íons são liberados durante o processo de

dissolução do material e tem a capacidade de executar uma ação terapêutica no corpo humano. O estudo do efeito do produto de dissolução iônica no comportamento celular permite a fabricação de sistemas avançados com liberação controlada de íons com propriedades aprimoradas para diferentes aplicações na engenharia de tecidos <sup>(64)</sup>.

Íons modificadores de rede são os mais utilizados como agentes terapêuticos em vidros bioativos, já que são ligados ionicamente a átomos de oxigênio não ligantes, podendo ser liberados rapidamente por troca iônica com o fluido corporal <sup>(6)</sup>. Esses íons são liberados exatamente no local onde eles são necessários, resultando em um efeito terapêutico otimizado e com redução de efeitos colaterais. Além disso, podem ser liberados continuamente, mantendo o efeito terapêutico ao longo da degradação. A taxa de degradação de vidros bioativos pode ser ajustada (e assim otimizando o efeito terapêutico) através da variação da composição, alteração da conectividade de rede e do tipo de modificador de rede <sup>(65)</sup>. Ao longo dos últimos anos, um número crescente de novas composições de vidro bioativo tem sido desenvolvido, várias delas com o foco na incorporação de íons modificadores com potencial efeito terapêutico <sup>(21,65)</sup>. Outras biocerâmicas, como o fosfato de cálcio e hidroxiapatita, também tem sido sintetizadas incorporando-se agentes terapêuticos, apresentando resultados promissores <sup>(66,67)</sup>.

Cada componente adicionado à estrutura do vidro bioativo apresenta uma funcionalidade específica. Por exemplo, o cálcio favorece a diferenciação de osteoblastos e mineralização da matriz extracelular <sup>(68)</sup>, enquanto o estrôncio regula a reabsorção óssea e osteoclastogênese, sendo um possível agente para tratamento de osteoporose <sup>(8)</sup>. A sílica solúvel pode contribuir para a atividade de osteoblastos, e altas concentração de Si foram detectadas nos estágios iniciais de calcificação da matriz óssea <sup>(64)</sup>. O flúor é utilizado na formação de fluorapatita, reduzindo a desmineralização do esmalte e dentina, prevenindo cáries dentárias <sup>(69)</sup>. A prata apresenta efeito antimicrobiano <sup>(7)</sup>, assim com o gálio e cobre <sup>(70,71)</sup>. O cobre pode ainda auxiliar na vascularização, assim como o cobalto, que promove a angiogênese pela ativação do fator de indução da hipóxia <sup>(10,16)</sup>. O manganês é cofator de enzimas envolvidas na remodelação da matriz extracelular, influenciando na ativação de integrinas e também na inibição da reabsorção óssea <sup>(67,72,73)</sup>. No entanto, um desafio nessa área é a obtenção de um controle de dissolução e a avaliação da sua concentração iônica ideal, fornecendo um ambiente favorável às células, já que muitos desses íons podem ser tóxicos acima de determinadas concentrações <sup>(17)</sup>.

Apesar de já ser bem estabelecida a aplicação de vidros bioativos para reparo de tecidos calcificados, novos trabalhos tem mostrado o potencial desses materiais também para tecidos macios, com vários dos estágios iniciais de regeneração sendo afetados pelo produtos de dissolução dos vidros bioativos <sup>(17,20)</sup>. O controle do perfil de liberação iônica e a composição do material permite a sua aplicação em diferentes tipos celulares, como nos curativos de feridas e regeneração de tecidos cardíacos, pulmonares e gastrointestinal <sup>(74,75)</sup>. Esse “efeito reparador” em tecidos macios é atribuído principalmente ao aumento da angiogênese, que ocorre devido à liberação de íons do vidro bioativo no local do defeito <sup>(17)</sup>. A incorporação de diferentes íons com propriedades terapêuticas na estrutura de vidros bioativos e outras biocerâmicas pode melhorar o desempenho desses materiais *in vitro* e *in vivo*, além de fornecer funcionalidades específicas para as mais diversas aplicações na engenharia de tecidos, estimulando genes de células através de mecanismos de regeneração e reparo.

### 2.2.1 Biocerâmicas dopadas com Manganês

Manganês é um elemento traço que desempenha um importante papel no metabolismo de ossos e músculos <sup>(13)</sup>. Esse elemento encontra-se presente em pequenas concentrações em vários tecidos e órgãos, como osso, pâncreas, fígado e mucosa intestinal <sup>(13)</sup>. O manganês é cofator para enzimas envolvidas na remodelação da matriz extracelular (ECM - *extracellular matrix*) e é necessário para a produção de proteoglicanos, componente importante de estruturas ósseas e cartilaginosas <sup>(67)</sup>. A proteína mais importante da ECM é o colágeno, que fornece propriedades estruturais para tecidos conjuntivos, sendo degradada no processo de remodelação do tecido ósseo, com a liberação de seus componentes essenciais, tais como a prolidase, uma metaloprotease que tem uma exigência específica de manganês <sup>(13)</sup>. O manganês influencia fortemente a ativação de integrinas, uma família de receptores que mediam as interações celulares com a matriz extracelular e ligantes da superfície celular <sup>(72,76)</sup>. Pelas interações entre a integrina e membranas celulares, as células reconhecem e aderem à matriz extracelular, tendo importante papel também em outros fenômenos biológicos básicos como a sobrevivência, proliferação, diferenciação e morfogênese <sup>(11)</sup>. O manganês também é conhecido por ser um elemento importante para a manutenção da homeostase do metabolismo da glucose e de lipídios <sup>(77)</sup>.

O manganês pode influenciar a inibição da reabsorção óssea induzida por radicais livres <sup>(12)</sup>, e a osteoporose tem sido associada à deficiência prolongada desse

elemento <sup>(78)</sup>. Alguns autores sugerem que a osteoporose pode ser causada pela falta de Mn, com a perda de cálcio sendo uma consequência e não a origem da doença <sup>(67,79,80)</sup>, porém mais estudos nesta área são necessários para confirmar essa hipótese. Manganês como suplemento após ovariectomia em ratos foi relatado como sendo um inibidor eficaz da perda óssea, aumentando significativamente o nível de osteocalcina, um sensível biomarcador de formação óssea <sup>(12,77)</sup>. Em outro trabalho, uma dieta deficiente em Mn resultou no aumento de fraturas e densidade óssea reduzida em chifres de veados <sup>(79)</sup>. A deficiência de manganês pode resultar num retardo do processo de osteogênese, devido a uma menor atividade dos osteoblastos, podendo levar à deformação óssea, inibição do crescimento, e até mesmo à reabsorção óssea <sup>(81)</sup>.

Testes de citotoxicidade em hidroxiapatita contendo manganês demonstraram que a dopagem desse material não causa efeito tóxico na cultura de osteoblastos <sup>(73)</sup>. Experimentos mostraram aumento no potencial de adesão de osteoblastos (células MC3T3-E1) em hidroxiapatitas dopadas com esse íon, quando comparados com a hidroxiapatita pura <sup>(11)</sup>. As células aderiram às amostras, com melhor espalhamento na superfície da biocerâmica contendo Mn, e proteínas da matriz extracelular se distribuíram amplamente ao redor das células. Além disso, o potencial de proliferação celular foi melhorado <sup>(11)</sup>. Uma solução de fosfato de cálcio que permite a deposição de uma camada fina nanocristalina de apatita em implantes metálicos foi modificada com  $Mn^{2+}$ , e o recobrimento formado demonstrou capacidade de estimular a produção de osteocalcina por osteoblastos (células MG-63) <sup>(82)</sup>. Fosfato tricálcico apresentou efeitos positivos na proliferação e diferenciação de pré-osteoblastos quando pequenas quantidades de  $Mn^{2+}$  foram adicionadas, efetivamente acelerando a mineralização óssea <sup>(67)</sup>. No entanto, culturas de células osteoblásticas humanas com adição direta de  $Mn^{2+}$  demonstraram crescimento e proliferação celular dependente da concentração, reduzindo a expressão de fosfatase alcalina e expressão de colágeno tipo 1 em concentrações maiores que 0,01 mM  $MnCl_2$ ; portanto, a liberação de íons em um biomaterial deve ser cuidadosamente ajustada de acordo com os níveis de tolerância <sup>(76,83)</sup>.

A dopagem com Mn também foi avaliada em vidro bioativo, com composição molar de até 0,5% MnO (molar), sintetizado pelo processo de fusão <sup>(13)</sup>. Mn não afetou a estabilidade térmica do vidro, mas uma pequena redução de cinética de bioatividade do vidro foi observada durante as primeiras etapas do processo. Estudos da liberação de  $Mn^{2+}$  em SBF mostraram que esses íons podem estar envolvidos no mecanismo de

bioatividade dos vidros, podendo ser incorporados nos cristais de hidroxiapatita formados. Além disso, as amostras contendo manganês apresentaram aumento na diferenciação de osteoblastos e mineralização quando comparadas com vidros bioativos puros, com efeitos benéficos sobre a expressão de fosfatase alcalina e de proteínas morfogenéticas ósseas <sup>(13)</sup>. Nanopartículas mesoporosas obtidas pelo método Stöber contendo Mn também apresentaram liberação controlada desse íon, além de atividade antibacteriana devido ao produto de dissolução dos vidros bioativos <sup>(84)</sup>.

A dopagem de biocerâmicas com manganês é promissora, já tendo demonstrado diversos benefícios principalmente em hidroxiapatita. No entanto, poucos trabalhos relatam a dopagem de vidros bioativos com esse elemento, principalmente em vidros bioativos sintetizados pela rota sol-gel, sendo uma área promissora para o desenvolvimento de novos biomateriais.

## 2.2.2 Biocerâmicas dopadas com Cobalto

O cobalto é um conhecido agente estabilizador do fator de indução da hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ), tendo como consequência a ativação de uma cascata de genes pró-vasculogênicos críticos para a angiogênese <sup>(14,85)</sup>. A angiogênese é de extrema importância para a regeneração de tecidos ósseos, e depende do estímulo hipóxico e da produção de fatores de crescimento vasculares endoteliais (VEGF – *vascular endothelial growth factor*). O fator de indução da hipóxia é o mecanismo principal para detectar e responder a alterações na disponibilidade local de oxigênio em uma ampla variedade de organismos, apresentando efeito em genes que influenciam a angiogênese e o metabolismo celular, além de poder recrutar células inflamatórias e mesenquimais e influenciar a diferenciação <sup>(86)</sup>. O fator de transcrição HIF-1 é um heterodímero composto por uma subunidade HIF-1 $\alpha$  regulada pelo oxigênio, e uma subunidade HIF-1 $\beta$  expressada constitutivamente <sup>(87)</sup>. O HIF-1 $\alpha$  é continuamente sintetizado e degradado em condições normais de oxigênio, mas quando em condições de hipóxia sua degradação é inibida, podendo dimerizar com o HIF-1 $\beta$ , levando ao recrutamento de proteínas co-ativadoras, e conseqüentemente ao aumento da transcrição. Assim, o HIF-1 media as vias fisiológicas e de desenvolvimento que promovem entrega de oxigênio às células e permitem que elas sobrevivam com privação de oxigênio <sup>(87,88)</sup>. O cobalto é um conhecido agente estabilizador do HIF-1 $\alpha$ , tendo como consequência a ativação de uma cascata de genes pró-vasculogênicos críticos para a angiogênese <sup>(14,85)</sup>. Com isso, biomateriais com liberação controlada de

cobalto têm sido sugeridos como uma potencial estratégia para a promoção da neovascularização, aprimorando a regeneração de tecidos <sup>(15,16,85)</sup>.

Nanopartículas de hidroxiapatita contendo cobalto (5 a 12 % em peso) foram avaliadas para a regeneração óssea alveolar de ratos com osteoporose, demonstrando um alto nível de reparação após seis meses de implantação, com um aumento da densidade óssea alveolar, intensa angiogênese, vascularização e migração de células formadoras de ossos na região <sup>(89)</sup>. Em outro trabalho, amostras de hidroxiapatita contendo íons cobalto e magnésio demonstraram aumento na expressão do HIF-1 $\alpha$  e de VEGF, resultando em melhores propriedades angiogênicas do material devido à liberação de cobalto <sup>(90)</sup>, mas também aprimorando a proliferação e diferenciação de osteoblastos, devido à dopagem com magnésio. Foi observada toxicidade quando a concentração de íons cobalto excedeu 0,45mM, porém a dupla dopagem da hidroxiapatita demonstrou ser uma eficaz ferramenta para melhorar as propriedades do biomaterial para engenharia de tecidos <sup>(90)</sup>.

Vidros bioativos dopados com cobalto, em especial aqueles sintetizados pela rota de fusão, também tem sido estudados nesses últimos anos. Trabalhos demonstram que os íons  $\text{Co}^{2+}$  podem estar presentes em vidros bioativos tanto na fase do ortofosfato, realizando o balanceamento de cargas, como na fase do silicato, podendo apresentar um papel duplo, sendo um modificador de rede, ou ainda substituindo ligações Si-O por Co-O na rede do vidro, interrompendo a rede do silicato e reduzindo a conectividade de rede <sup>(14,85)</sup>. Quando amostras de vidro bioativo contendo cobalto foram imersas em SBF, foi observado que uma parcela dos íons  $\text{Co}^{2+}$  se difundiram pela camada de  $\text{SiO}_2$  (pobre em cobalto) formada na superfície do material, e conseqüentemente substituíram outros íons na etapa posterior de formação da camada de fosfato de cálcio <sup>(14)</sup>. Além disso, a dissolução do vidro bioativo, liberação de íons em solução tampão, e formação da HAC apresentaram-se mais lentas pela inclusão do cobalto, de maneira dependente da concentração <sup>(85)</sup>. No entanto, o ajuste na composição do vidro bioativo leva à liberação controlada desses íons, dentro dos limites terapêuticos. Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a faixa de concentração fisiologicamente ativa de liberação desse íon está entre 50 e 250 $\mu\text{M}$  (3-15ppm) <sup>(14,91)</sup>.

Vidros bioativos derivados do processo sol-gel foram sintetizados contendo diferentes concentrações de cobalto e demonstraram capacidade de liberação controlada desse íon, além de suporte à fixação e crescimento de células estromais da medula óssea (BMSCs- *bone marrow stromal cells*), sem nenhuma citotoxicidade aparente <sup>(88)</sup>.

*Scaffolds* desses materiais foram preparados, e os resultados demonstraram que houve aumento significativo na secreção de VEGF, expressão de HIF-1 $\alpha$  e a expressão gênica de BMSCs quando comparados com o mesmo material sem a presença de cobalto <sup>(88)</sup>. Vidros bioativos contendo Cu e Co como agentes de indução da angiogênese foram associados a filmes de policaprolactona, demonstrando aumento na expressão de VEGF de fibroblastos e proliferação de células endoteliais da veia umbilical altamente dependente da composição do material <sup>(92)</sup>. Propriedades angiogênicas e osteogênicas também foram observadas em compósitos contendo micropartículas de vidro bioativo dopadas com cobalto, onde matrizes tridimensionais demonstraram capacidade de contornar o problema de vascularização normalmente visto no campo de engenharia de tecidos <sup>(15)</sup>. Portanto, vidros bioativos contendo cobalto e obtidos pelo processo sol-gel são promissores para a engenharia de tecidos, estimulando a angiogênese, fundamental para o reparo de tecidos.

### **2.3 Aplicações clínicas de vidros bioativos**

Devido às suas propriedades físicas, rigidez e capacidade de formação da camada de hidroxiapatita em sua superfície, os vidros bioativos foram propostos principalmente para uso em contato com tecidos duros calcificados, como o osso <sup>(5)</sup>. O primeiro produto clínico de vidro bioativo se tornou disponível em 1984, e foi utilizado para restaurar a audição de um paciente que se tornou surdo devido a uma infecção que degradou dois dos três ossos do ouvido médio <sup>(93)</sup>. Para tal fim, foi desenvolvida uma prótese do ouvido médio (MEP®) a partir do vidro bioativo 45S5, utilizada para substituir esse osso e permitir a transmissão do som do tímpano para a cóclea, restaurando a audição <sup>(3)</sup>. O segundo produto comercial de vidro bioativo foi lançado em 1988 (ERMI®), utilizado para reparar raízes dentárias e fornecer uma crista estável para dentaduras, sendo inserido em locais de extração de dente fresco. O material se mostrou extremamente estável, com melhoras significativas quando comparado com implantes de hidroxiapatita <sup>(3)</sup>. No entanto, nenhum desses produtos é amplamente utilizado clinicamente, já que cirurgiões possuem preferência por produtos que possam ser moldados, e não aqueles de formato fixo como o MEP® e o ERMI®.

Cirurgiões ortopédicos e dentistas normalmente possuem preferência pela utilização de partículas ou grânulos, que podem ser prensados facilmente em defeitos. O primeiro produto na forma de partículas de vidro bioativo 45S5 foi o PerioGlas®, lançado em 1993 como um enxerto sintético para reparo de defeitos na mandíbula de pacientes com doença periodontal. Esse material é hoje vendido em mais de 35



países, apresentando tamanho de partículas entre 90 e 710 $\mu\text{m}$ , e sendo utilizado para regenerar o osso ao redor da raiz danificada de dentes saudáveis, ou ainda para o reparo do osso da mandíbula, lhe conferindo uma qualidade óssea suficiente para ancorar implantes de titânio. Devido ao sucesso das partículas de vidro bioativo na regeneração óssea dentária, foi lançado em 1999 o NovaBone (*NovaBone Products LCC*) como um enxerto ósseo ortopédico para locais sem aplicação de carga. Os cirurgiões costumam misturar previamente essas partículas com o sangue do local do defeito, formando uma massa para mais fácil aplicação.

O Biogran® é outro enxerto ósseo derivado da composição 45S5, porém com diferente tamanho de partícula (300 a 360 $\mu\text{m}$ ). Diferentes composições também são comercializadas, como a S53P4 (BonAlive®), que foi aprovado para aplicação ortopédica na Europa em 2006. Implantes realizados com esses materiais têm demonstrado menor número de falhas mecânicas e menos infecções quando comparados com o autoenxerto<sup>(94)</sup>. Porém uma desvantagem da composição 45S5 e BonAlive® em comparação com outras biocerâmicas é a sua cristalização durante o processo de sinterização, não podendo ser transformados em *scaffolds* amorfos de vidro bioativo, e novas composições são necessárias<sup>(3)</sup>.

Desde 2004, micropartículas do vidro bioativo 45S5 foram também utilizadas para tratamento de hipersensibilidade dentinária, a qual estima-se afetar 35% da população mundial. As micropartículas do produto denominado NovaMin® possuem tamanho médio aproximado de 18 $\mu\text{m}$ , e são utilizadas em pastas dentais, aderindo-se à dentina e formando uma camada de hidroxiapatita carbonatada similar à composição do esmalte dos dentes, bloqueando os túbulos e aliviando a dor por períodos prolongados. O sucesso da aplicação levou a estudos de partículas obtidas pelo processo sol-gel para aplicações contra a hipersensibilidade dentinária, e também ao desenvolvimento de composições mais complexas de vidros bioativos para estimular a formação de fluorapatita na dentina, mais resistente ao ataque ácido que a hidroxiapatita carbonatada<sup>(69,95)</sup>.

Recobrimentos de implantes metálicos com vidros bioativos também têm sido utilizados, aumentando a estabilidade dos implantes pela ligação formada com o tecido ósseo. No entanto, são poucas as composições que produzem recobrimentos satisfatórios e também formam a camada de hidroxiapatita na superfície do material, como aqueles do sistema  $\text{SiO}_2\text{-CaO-MgO-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$  e a composição 1-98 (53%  $\text{SiO}_2$ , 6%  $\text{Na}_2\text{O}$ , 22%  $\text{CaO}$ , 11%  $\text{K}_2\text{O}$ , 5%  $\text{MgO}$ , 2%  $\text{P}_2\text{O}_5$ , 1%  $\text{B}_2\text{O}_3$ , % em peso)<sup>(3)</sup>.

Além disso, múltiplas camadas de diferentes composições de vidros bioativos podem ser necessárias para otimizar a dissolução do material e integração com o osso. Recobrimentos com elevada bioatividade podem degradar com o tempo, causando instabilidade do implante metálico, portanto a composição deve ser devidamente ajustada <sup>(3)</sup>.

Matrizes porosas tridimensionais (*scaffolds*) de vidros bioativos também têm sido consideradas para aplicação na engenharia de tecidos, podendo ser obtidas a partir de partículas de vidro bioativo por meio da técnica de réplica da esponja ou *freeze-drying*, por exemplo <sup>(5)</sup>, embora ainda com aplicação clínica limitada devido principalmente à sua alta fragilidade. Uma alternativa é a utilização de técnicas mais avançadas de produção, como a impressão 3D, que podem aprimorar as propriedades mecânicas desse material <sup>(96)</sup>, ou o recobrimento de *scaffolds* de vidros bioativos com materiais poliméricos biocompatíveis. Partículas de vidro bioativo também podem ser utilizadas para a síntese de compósitos <sup>(97)</sup>, permitindo o seu uso em diferentes aplicações na engenharia de tecidos.

Vidros bioativos também têm sido avaliados para aplicação clínica em contato com tecidos macios, demonstrando resultados animadores. A composição original 45S5 demonstrou capacidade de promover angiogênese *in vitro* e também *in vivo* (modelos de ratos). Vidros bioativos contendo Ag combinado com adesivos poliméricos para recobrimento de feridas cutâneas foram recentemente lançadas no mercado, permitindo o controle de infecções devido à liberação controlada de íons Ag antimicrobianos do vidro de fosfato <sup>(5)</sup>. Embora ainda em fase inicial de estudo, outras aplicações inovadoras dos vidros bioativo incluem a regeneração de tecido cardíaco, restituição epitelial da mucosa gástrica, regeneração do nervo periférico, reparo da córnea, entre outras <sup>(5,98,99)</sup>.

Vidros bioativos tem aumentado a qualidade de vida de milhões de pacientes, proporcionando uma regeneração mais rápida, e em alguns casos curando defeitos que não seriam recuperados por outros meios <sup>(100)</sup>. No entanto, novas composições de vidro bioativo devem ser avaliadas, de modo a aprimorar as propriedades do material e ampliar o seu campo de aplicação.

## CAPÍTULO 3. Objetivos

---

### 3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral a obtenção de novas composições de vidro bioativo pelo processo sol-gel, derivadas da composição 58S, a partir da incorporação de cobalto e manganês em sua estrutura, íons terapêuticos com potenciais propriedades angiogênicas e osteogênicas, respectivamente, e a avaliação do efeito da incorporação desses íons nas propriedades físico-químicas e biológicas dos materiais.

### 3.2 Objetivos específicos por capítulo

#### Capítulo 4:

- Obtenção de micropartículas de vidro bioativo contendo Mn derivados do processo sol-gel com até 5% MnO (%molar).
- Estudo do efeito da incorporação de Mn nas propriedades térmicas e texturais, estrutura e composição química.
- Avaliação da bioatividade e capacidade de liberação iônica dos materiais a partir de testes em fluido corporal simulado.
- Estudo da viabilidade celular de osteoblastos expostos ao produto iônico dos vidros bioativos por MTT e imunofluorescência (LIVE/DEAD®).

#### Capítulo 5:

- Obtenção de micropartículas de vidro bioativo contendo Mn a partir do precursor nitrato de manganês hidratado ( $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ).
- Avaliação das propriedades estruturais e texturais, além da composição química dos vidros bioativos obtidos pelo método sol-gel.
- Análise do perfil de dissolução dos vidros bioativos em meio de cultura DMEM (*Dulbecco modified eagle medium*).
- Estudo da viabilidade celular de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao produto iônico dos vidros bioativos.
- Avaliação da expressão de diferentes marcadores da diferenciação osteogênica e mineralização por células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana por 7, 14 e 21 dias após exposição ao produto iônico dos vidros bioativos.

**Capítulo 6:**

- Obtenção de vidros bioativos contendo 5% molar de CoO derivados da composição 58S pelo processo sol-gel utilizando diferentes precursores
- Avaliação da influência da utilização de diferentes precursores de cobalto na estrutura e propriedades dos vidros bioativos.
- Análise da composição química, e efeito da incorporação de Co nas propriedades térmicas e estruturais dos vidros bioativos.
- Avaliação do perfil de dissolução dos vidros bioativos em fluido corporal simulado e formação da camada de hidroxiapatita na superfície dos materiais.

**Capítulo 7:**

- Síntese de vidros bioativos contendo diferentes teores de CoO pelo processo sol-gel derivados da composição 58S utilizando cloreto de cobalto como precursor.
- Efeito da incorporação de Co na estrutura e propriedades texturais dos vidros bioativos.
- Análise do perfil de dissolução dos vidros bioativos em fluido corporal simulado e formação da camada de hidroxiapatita na superfície do material.
- Avaliação do efeito citotóxico do produto de dissolução dos vidros bioativos em células endoteliais de veias umbilicais humanas e em células-tronco adiposas humanas.
- Avaliação da resposta *in vivo* ao implante de pastilhas de vidro bioativo no dorso de ratos, a partir de análises histológicas e morfométricas.

## **CAPÍTULO 4. Estudo de vidros bioativos derivados do processo sol-gel com capacidade de liberação de manganês**

---

### **4.1 Introdução**

Dentre os diferentes íons que podem ser incorporados na estrutura de vidros bioativos, o manganês tem apresentado grande potencial devido a sua influência no remodelamento da matriz extracelular <sup>(76)</sup> e mineralização óssea <sup>(67)</sup>. Trabalhos anteriores mostraram que a incorporação de Mn em fosfato tricálcico afetou a taxa de mineralização óssea, enquanto que hidroxapatitas contendo esse íon apresentaram grande potencial de adesão e proliferação celular em ensaios *in vitro* utilizando osteoblastos (células MC3T3-E1) para ambos os materiais <sup>(11,67)</sup>. Estudos mostram que Mn pode influenciar a ativação de integrinas, uma família de receptores que influenciam as interações celulares com a matriz extracelular e com ligantes da superfície, consequentemente influenciando a adesão celular <sup>(72,76)</sup>. Vidros bioativos derivados do processo de fusão contendo Mn também têm sido explorados nos últimos anos. Miola e pesquisadores investigaram vidros bioativos baseados na composição  $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-MgO-Na}_2\text{O-K}_2\text{O}$  modificado com diferentes quantidades de  $\text{MnO}$ , e estudos *in vitro* demonstraram potencial para crescimento de osteoblastos e atividade osteogênica <sup>(13)</sup>. No entanto, a sua concentração na estrutura de vidros bioativos deve ser devidamente ajustada <sup>(76,83)</sup>. Apesar de vidros bioativos derivados do processo de fusão contendo esse íon já terem sido avaliados, vidros bioativos obtido pelo processamento sol-gel devem também ser estudados, podendo apresentar vantagens, como a sua alta área superficial e nanoporosidade, aprimorando o processo de dissolução e bioatividade.

Nesse contexto, esse trabalho tem como objetivo a obtenção de novas composições de vidro bioativo derivadas da 58S (60%  $\text{SiO}_2$  - 36%  $\text{CaO}$  - 4%  $\text{P}_2\text{O}_5$ , % molar), a partir da incorporação de Mn em sua estrutura, para obtenção de um material com capacidade de liberação controlada de íons em meio fisiológico, como uma potencial estratégia para a regeneração de tecidos. A influência da incorporação de Mn, em substituição parcial ao teor de cálcio, nas propriedades físico-químicas e biológicas, além da formação da camada de hidroxapatita na superfície do material foi investigada.

## 4.2 Materiais e Métodos

Foram utilizados reagentes da *Sigma-Aldrich*, salvo indicação em contrário. Vidros bioativos de composição 58S (60% SiO<sub>2</sub> - 36% CaO - 4% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, % molar) foram obtidos pelo processo sol-gel: TEOS (tetraetilortosilicato 98%) e TEP (trietilfosfato 99%) foram hidrolisados em meio ácido (ácido nítrico 2M) contendo água deionizada (taxa molar H<sub>2</sub>O/TEOS = 12) por 1 hora sob agitação magnética. Logo após, nitrato de cálcio (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O) foi dissolvido no sol, e a mistura agitada por mais uma hora. O gel obtido foi envelhecido a 60°C por 72 horas em recipiente fechado. Logo após, o recipiente foi aberto, e o material foi seco com aumento de 10°C a cada 24 horas, até se alcançar 120°C. O procedimento de tratamento térmico foi definido após resultados obtidos pelas análises térmicas: as amostras foram tratadas a 650°C, com taxa de aquecimento de 2°C.min<sup>-1</sup> por 3 horas. Após resfriamento, as amostras foram moídas e peneiradas para se obter partículas entre 38-150µm.

O cloreto de manganês (MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, *Synth*) foi utilizado como precursor de Mn. O respectivo sal foi adicionado previamente à etapa de adição do precursor do cálcio para cada composição contendo esse íon. Vidros contendo 1,0% MnO, 2,5% MnO e 5,0% MnO (%molar) foram obtidos em substituição parcial ao teor de CaO nos vidros bioativos derivados da composição 58S.

### 4.2.1 Caracterização das amostras de vidro bioativo

**Caracterização térmica e cristalização.** Nesse estudo foram realizadas análises térmicas e de difração de raios-X (DRX). A Análise termogravimétrica (TGA – *Thermogravimetric analysis*) e a calorimetria diferencial exploratória (DSC – *Differential scanning calorimetry*) foram realizadas em equipamento SDT Q600 (TA Instruments) nos vidros bioativos obtidos previamente ao processo de tratamento térmico. Amostras foram analisadas de 25 a 1100°C, com taxa de aquecimento de 5°C.min<sup>-1</sup> em atmosfera de nitrogênio (500mL.min<sup>-1</sup>). Resultados foram avaliados em software TA Analyzer. Uma amostra foi selecionada para estudo da cristalização das amostras, e espectros de DRX foram obtidos em amostras tratadas em diferentes temperaturas até 900°C. Os espectros de DRX foram coletados em equipamento Philips PW1700, utilizando radiação Cu K $\alpha$  a 40kV/40mA, entre 3,01 e 89,99° com passo de 0,02° e tempo de incidência de 1s.

**Análise estrutural.** Análises de DRX foram realizadas conforme descritos anteriormente para todas as amostras tratadas termicamente. Foi também realizada análise por FTIR (Infravermelho com transformada de Fourier), obtido em equipamento Thermo Scientific Nicolet iN10 equipado com acessório de reflectância difusa. Os espectros foram obtidos entre  $400 - 4000\text{cm}^{-1}$ , com 64 escaneamentos por espectro e resolução de  $4\text{cm}^{-1}$ . Já os espectros Raman foram obtidos em equipamento Jobin Yvon/Horiva LABRAM-HR 800 equipado com laser He-Ne (632,8nm) e microscópio Olympus NHX, detector CCD (Spectrum One) e tempo de aquisição entre 10 e 30s, dependendo da fluorescência da amostra. Para reduzir relações sinal/ruído, espectros foram adquiridos 5-10 vezes após fotobranqueamento de 5 a 20 minutos.

**Composição química.** Uma camada de 0,7g de metaborato de lítio foi preparada em um cadinho de grafite, no qual 0,1g de cada amostra foram posteriormente adicionados, formando uma segunda camada, a qual foi por fim sobreposta por outra camada de metaborato de lítio (0,7g). O cadinho foi levado à mufla ( $950^{\circ}\text{C}$ ) por 10 minutos, para fusão dos reagentes e da amostra. O cadinho foi removido da mufla, a mistura foi homogeneizada e fundida por mais 10 minutos. Logo após, a mistura foi transferida para um becker contendo 100mL de solução 10% v/v  $\text{HNO}_3$  e agitada por 20 minutos. A solução foi diluída 10 vezes, e as concentrações de Si, Ca, P e Mn foram analisadas por ICP-OES (Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente) Perkin-Elmer Optima 7300 DV, e as proporções de  $\text{SiO}_2$ , CaO,  $\text{P}_2\text{O}_5$  e MnO calculadas.

**Propriedades texturais.** Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio foram obtidas em equipamento Quantachrome NOVA 2200 ver. 6.11, à 77K. A área superficial específica (SSA - *specific surface area*) foi determinada por método Brunauer-Emmett-Teller (BET) utilizando os pontos de adsorção com pressão relativa entre 0.01 e 0.30, enquanto que o diâmetro e distribuição de poros foram calculados pelo método Barrett-Joyner-Halenda (BJH) aplicado às curvas de dessorção.

**Estudo de dissolução e bioatividade.** Um total de 0,045g de cada amostra foi imerso em 30mL de fluido corpóreo simulado (SBF - *Simulated Body Fluid*), preparada de acordo com método previamente descrito <sup>(56,102)</sup>, e mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1, 3 e 24 horas, e 3, 7 e 14 dias. Extratos obtidos em cada período de tempo foram filtrados ( $0,22\mu\text{m}$ ) e analisados por ICP-OES para obtenção da concentração de Si, Ca, P e Mn em solução. As micropartículas foram lavadas com acetona, secas e analisadas for

FTIR. Esse estudo foi realizado em triplicata, e o valor médio e desvio padrão são apresentados.

#### 4.2.2 Estudo da citotoxicidade

Produtos iônicos das amostras foram obtidos conforme descrito previamente <sup>(103)</sup>. Amostras foram suspensas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) a  $10000\mu\text{g.mL}^{-1}$ , mantido em agitação por 5 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , e posteriormente filtradas. O pH do meio contendo o produto de liberação iônica foi ajustado para 7. Uma segunda filtração foi realizada, e o meio iônico suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). Diluições foram realizadas utilizando DMEM suplementado com 10% FBS para se atingir concentrações finais de  $1000\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$  do produto iônico.

Neste trabalho, osteoblastos foram primeiramente expostos a todos os grupos experimentais para determinação da sua atividade metabólica mitocondrial utilizando-se brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, *Sigma-Aldrich*). A menor diluição de cada composição de vidro bioativo capaz de gerar um aumento na funcionalidade celular por MTT foi selecionada. Logo após, os osteoblastos foram expostos a estes grupos previamente selecionados e seu estado vital baseado na integridade da membrana plasmática/atividade da esterase foi avaliado utilizando o kit de viabilidade/citotoxicidade LIVE/DEAD® (*Molecular Probes, Eugene*). DMEM foi utilizado como controle negativo, e 1% Triton-X 100 (*Sigma-Aldrich*) como controle positivo.

Osteoblastos foram isolados da calvária de ratos neonatos Wistar, conforme previamente descrito <sup>(103)</sup>. Resumidamente, as calvárias foram dissecadas e libertadas dos tecidos moles, cortadas em pequenos pedaços e enxaguadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. Os tecidos foram incubados com 1% de tripsina-EDTA por 5 minutos, seguidos por quatro incubações sequenciais com 2% de colagenase a  $37^{\circ}\text{C}$  por 45 minutos cada. O sobrenadante da primeira incubação de colagenase foi descartado. As outras digestões geraram uma suspensão de células com uma alta fração de osteoblastos. Após centrifugação a  $1000g$  por 5 minutos, cada sedimento foi ressuspenso em DMEM suplementado com 10% FBS e 1% antibiótico-antimicótico. As células foram semeadas em frascos de cultura de tecidos de  $25\text{ cm}^3$  e mantidas numa incubadora a 5%  $\text{CO}_2$ , 95% de umidade e  $37^{\circ}\text{C}$ . Meio fresco foi aplicado a cada 3 dias até a confluência ser alcançada. Após a confluência, as células na passagem 2 foram utilizadas para os ensaios.



Para avaliação por MTT, os osteoblastos ( $10^4$ ) foram semeados em cada poço de uma placa com 96 poços contendo 200 $\mu$ L de DMEM suplementado com 10% FBS e 1% de antibiótico-antimicótico e mantidos por 24 horas. Logo após, as células cultivadas foram expostas por 72 horas aos produtos iônicos previamente preparados. Após o período inicial, o produto iônico foi removido e substituído por 60 $\mu$ L de meio DMEM suplementado. Logo após, foram adicionados 50  $\mu$ L de solução MTT (5mg.mL<sup>-1</sup>) e as células foram incubadas por 4 horas. Foram adicionados 40  $\mu$ L de solução SDS/4% HCl e incubados por 12 horas. Absorbância em 595nm foi quantificada em espectrofotômetro. Foram realizadas quatro diferentes medidas para cada amostra.

Para análise de LIVE/DEAD®, 3x10<sup>4</sup> de células osteoblásticas foram semeadas em lâminas de vidro em placas de 6 poços contendo 2mL de DMEM suplementado, mantidos por 24 horas. As células foram posteriormente expostas aos grupos selecionados, e mantidos por 72 horas. Após o período de exposição, o produto iônico foi removido, e as células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS), e seu estado vital foi avaliado utilizando o kit LIVE/DEAD® de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram analisadas em microscópio confocal fluorescente (Zeiss LSM 510) com excitação em 488nm e detecção de calceína em 505nm, enquanto que homodímero etídio 1 foi observado a 605nm e excitação a 555nm. Quatro análises de campo foram realizadas em cada amostra individual (N=3) utilizando software ImageJ para quantificar o número de células mortas (vermelhas) e vivas (verdes).

Todos os valores correspondentes aos testes de citotoxicidade foram normalizados de acordo com o controle e expressos em porcentagem da função celular (MTT) ou viabilidade celular (LIVE/DEAD®). O controle negativo (células funcionais ou vivas) foi considerado como 100%. Análises estatísticas foram realizadas pelo método One way/ANOVA/Bonferroni e diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$ .

### **4.3 Resultados e discussão**

#### **4.3.1 Caracterização térmica e cristalização**

A análise térmica foi realizada nas amostras obtidas após o processo de secagem até 120°C com o objetivo de avaliar a influência da incorporação de Mn no comportamento térmico do material, já que o controle da temperatura apresenta grande influência na

composição e estrutura final desses materiais <sup>(104)</sup>. A Figura 4.1 apresenta a curva de perda de massa (TGA) e a termogravimetria derivada (DTG), que corresponde à derivada primeira da curva de TGA, para as amostras de vidro bioativo.

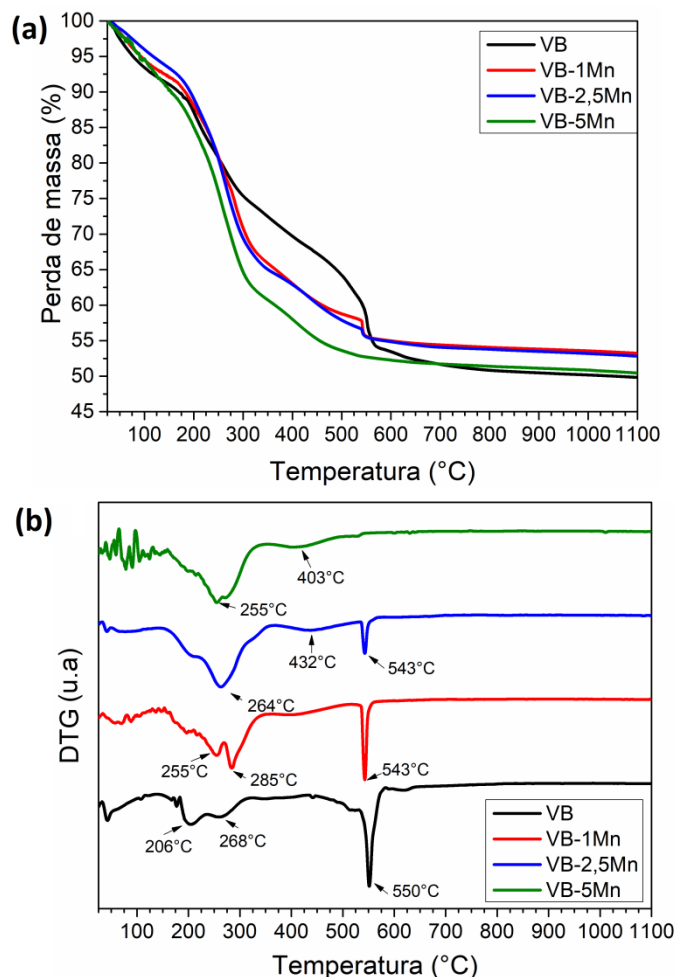


Figura 4.1: (a) Análise termogravimétrica (TGA) e (b) Termogravimetria derivada (DTG) das amostras de vidros bioativos.

Três estágios de perda de massa podem ser distinguidos quando as amostras foram aquecidas de 25 até 1100°C, conforme observados por TGA e DTG. O primeiro estágio de perda de massa foi observado entre 25 e 150°C, associado à remoção de água adsorvida no material <sup>(105)</sup> e à remoção de álcoois residuais do processo sol-gel <sup>(105,106)</sup>. Nesse estágio, aproximadamente 10% de perda de massa foi observada em todas as amostras. O segundo estágio é observado entre 150 e 450°C, com um máximo de 35% de perda de massa, podendo ser relacionado à volatilização de água quimicamente adsorvida e perda de grupos orgânicos remanescentes dos precursores, como os alcóxidos <sup>(107)</sup>, especialmente entre 250 e 290 °C. O terceiro estágio de perda de massa foi observado entre 450 e 590°C, sendo relacionado à decomposição de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) <sup>(107)</sup>. As curvas de DTG apresentam uma perda de

massa mais pronunciada com máximo em 545°C para as amostras VB-1Mn e VB-2,5Mn, e à 550°C para VB, relacionadas à decomposição de nitratos. Nitrato de cálcio foi utilizado como precursor de Ca no processamento sol-gel, mas parcialmente substituído por cloreto de manganês nas amostras contendo Mn. Portanto, o aumento no teor de Mn resulta em uma menor perda de massa nesse último estágio já que o teor de nitratos presentes no sistema também diminui. Após o terceiro estágio, a perda de massa se estabiliza, com um máximo de 50% de perda de massa sendo observado após aquecimento a 600°C, conforme observado por TGA e DTG.

Os resultados da análise de DSC são apresentados na Figura 4.2. Observa-se inicialmente uma transição endotérmica entre 260 – 290°C, relacionada à volatilização de água quimicamente adsorvida e perda de grupos orgânicos remanescentes dos precursores <sup>(107,108)</sup>. Essa transição foi observada na mesma faixa de temperatura do segundo estágio de perda de massa observado por TGA e DTG. Um segundo pico bem definido pode ser observado a 543°C para VB-1Mn e VB-2,5Mn e 550°C para VB, sendo uma transição endotérmica relacionada à eliminação de nitratos residuais <sup>(106)</sup>. No entanto, essa transição não foi observada para VB-5Mn, sendo consistente com os resultados obtidos por TGA e DTG, que não apresentaram grande perda de massa nessa faixa de temperatura. Uma larga transição exotérmica com início em 690°C e máxima entre 865 e 871°C foi observada em todas as amostras devido ao processo de cristalização do material <sup>(14,109)</sup>. Estudos têm demonstrado que vidros bioativos tendem a cristalizar quando tratados acima de 850°C <sup>(110)</sup>, no entanto esse processo pode reduzir sua bioatividade, já que a presença de fases cristalinas diminui a possibilidade de reações de troca iônica com o meio fisiológico <sup>(60)</sup>.

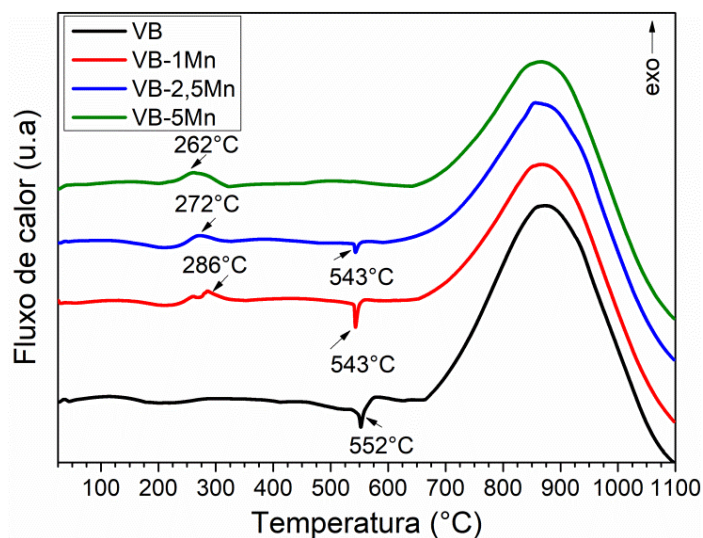


Figura 4.2: Calorimetria exploratória diferencial (DSC) de vidros bioativos

A Figura 4.3 apresenta os padrões de difração obtidos em função da temperatura final de processamento dos vidros bioativos. Com o objetivo de confirmar os resultados observados na análise térmica e o efeito da incorporação de Mn, foi selecionada a amostra VB-2,5Mn para essa avaliação. De acordo com os padrões de difração, evidência clara de cristalização foi observada somente após tratamento à 900°C, resultado consistente com os dados obtidos por DSC e com a literatura <sup>(110)</sup>. Picos mais pronunciados podem ser relacionados às fases cristalinas wollastonita ( $\text{CaSiO}_3$ ) <sup>(111)</sup>, silicato de cálcio <sup>(112)</sup> e apatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) <sup>(107)</sup>, que podem cristalizar na matriz do vidro durante o tratamento térmico. O nível de cristalinidade do vidro bioativo tende a aumentar de acordo com o aumento da temperatura de tratamento, e pode-se observar inicialmente a formação de um halo entre 15 – 31° (2 $\theta$ ) nas amostras tratadas à 200, 300 e 500°C, relacionado à uma estrutura amorfa rica em sílica <sup>(105)</sup>. À 700°C, um halo mais pronunciado pode ser observado entre 30 e 31° (2 $\theta$ ), indicando uma organização inicial da estrutura do material, provavelmente devido à cristalização de pequenos núcleos de apatita <sup>(107)</sup>, no entanto o caráter predominantemente amorfo foi mantido nessa temperatura.

A Figura 4.3 (a) também apresenta o difratograma do precursor de Mn utilizado ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ); picos cristalinos referentes a esse sal não foram observados durante o tratamento térmico realizado em diferentes temperaturas, o que pode ser um indicativo que o Mn foi incorporado na estrutura do material. Estudos demonstraram que quando cloreto de cálcio é utilizado para obtenção de vidro bioativo, Ca não é incorporado à estrutura do material, sendo observados picos cristalinos referentes ao sal precursor mesmo após tratamento em diferentes temperaturas <sup>(113)</sup>.

Baseando-se nas análises de TGA/DSC e DRX, a temperatura de tratamento térmico dos vidros bioativos foi ajustada para 650°C e mantida por 3 horas, suficiente para promover a completa eliminação dos íons nitrato residuais e favorecer a formação de um material vítreo, já que a cristalização foi observada somente em temperaturas mais elevadas.

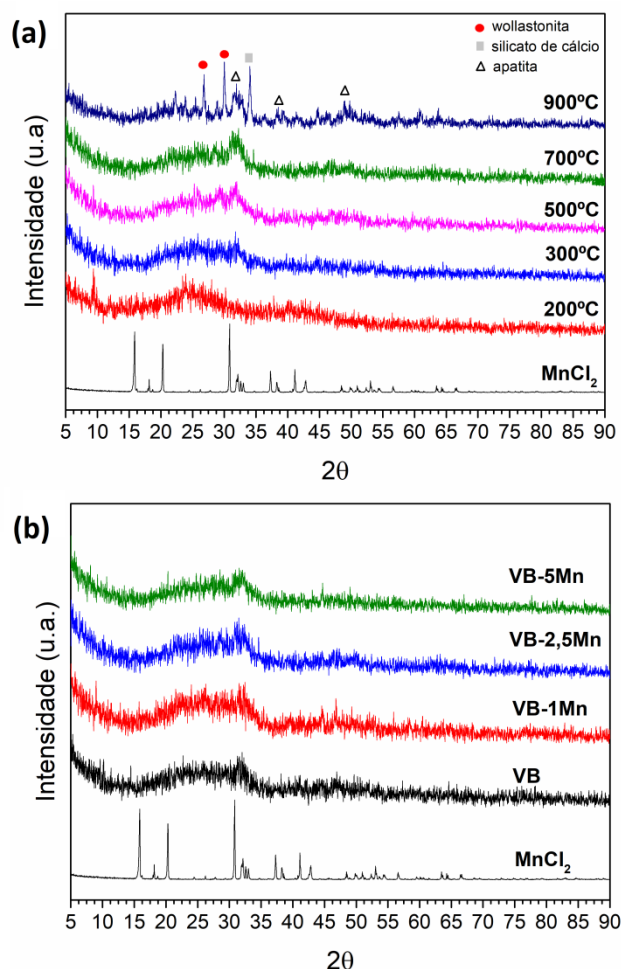


Figura 4.3: Padrões de Difração de Raios-X: (a) VB-2,5Mn em função da temperatura final de processamento e (b) amostras tratadas à 650°C e precursor do manganês.

A Figura 4.3 (b) mostra também os padrões de difração do precursor de manganês e de amostras de vidro bioativo com diferentes teores de Mn após tratamento térmico a 650°C. Os padrões de difração de diferentes amostras são similares, exibindo apenas uma banda de difração larga na faixa de 15 a 34° (2θ), característica de estruturas amorfas <sup>(114)</sup>, não sendo afetada pela incorporação de Mn. Materiais amorfos geralmente apresentam maiores taxas de dissolução, levando a um aumento na bioatividade quando comparados aos materiais cristalinos. Além disso, picos cristalinos referentes ao precursor de manganês não foram observados nos vidros bioativos, sendo um indicativo da incorporação desse íon na estrutura do material, sem presença de cristais do sal, ao menos no nível detectável por essa técnica.

#### 4.3.2 Análise da composição química

A composição química (%mol) dos vidros bioativos sintetizados pelo processo sol-gel e estabilizados a 650°C, determinados pelo método de dissolução por fusão de

metaborato de lítio [4] e análise por ICP-OES, estão apresentados na Tabela 4.1. A composição nominal máxima de 5,0% molar de MnO foi selecionada de acordo com trabalhos anteriores, no qual vidros bioativos contendo diferentes íons com propriedades terapêuticas foram obtidos, apresentando resultados promissores para a engenharia de tecidos <sup>(7,13,14,42)</sup>.

A análise química quantitativa de vidros bioativos é fundamental para compreender e correlacionar a sua estrutura com a sua composição. No entanto, diversos fatores podem levar à uma composição final imprecisa, como impureza dos precursores, precipitação de espécies, perdas durante processos de secagem, uso de meio muito diluído para análise de ICP, entre outros <sup>(110,115)</sup>. Observou-se que as composições determinadas por ICP-OES para os vidros bioativos estão relativamente próximas das composições nominais. O teor de SiO<sub>2</sub> e CaO nos vidros sintetizados observado está entre 0,5 e 3,5% da composição teórica calculada. A principal diferença observada foi na composição do P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. O TEP, que é o precursor do fósforo, foi adicionado em uma quantidade nominal muito menor quando comparado com o TEOS, e também reage mais lentamente <sup>(40)</sup>, o que poderia afetar sua inserção na rede dos vidros bioativos, reduzindo a fração de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> nos produtos finais. A análise química também confirma a presença de Mn nas amostras em três diferentes composições, com teores próximos ao nominal.

Tabela 4.1: Composição química nominal e determinada pelo método de fusão de metaborato de lítio e ICP-OES (%mol) de vidros bioativos contendo manganês estabilizados à 650°C.

Amostras	Composição nominal (% mol)				Composição ICP-OES (% mol)			
	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	CaO	MnO	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	CaO	MnO
<b>VB</b>	60,0	4,0	36,0	-	60,3	2,8	36,9	-
<b>VB-1Mn</b>	60,0	4,0	35,0	1,0	60,6	3,0	35,5	0,9
<b>VB-2,5Mn</b>	60,0	4,0	33,5	2,5	60,9	2,9	34,0	2,2
<b>VB-5Mn</b>	60,0	4,0	31,0	5,0	60,5	3,0	32,1	4,3

#### 4.3.3 Análise estrutural

A análise estrutural foi realizada por FTIR, e bandas de adsorção típicas de vidros bioativos foram observadas, conforme apresentado na Figura 4.4. A absorvância entre 450 e 470cm<sup>-1</sup> pode ser relacionada à deformação angular de ligações Si-O-Si de estruturas amorfas <sup>(106)</sup>. A absorvância entre 725 e 810cm<sup>-1</sup> é relacionada com o estiramento simétrico Si-O, enquanto que o estiramento assimétrico dessas ligações

pode ser atribuído à bandas na faixa entre  $1000 - 1200\text{cm}^{-1}$  <sup>(116)</sup>. Em  $965\text{cm}^{-1}$  observa-se uma absorbância de fraca intensidade, devido à ligações Si-O contendo um oxigênio não ligante (Si-O-NBO) por tetraedro de  $\text{SiO}_4$  <sup>(106,117)</sup>.

A deformação angular de ligações P-O de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  é atribuída à absorção entre  $550$  e  $630\text{cm}^{-1}$  <sup>(81)</sup> e provavelmente se deve a pequenas regiões ricas em fosfato que podem ser formadas durante o tratamento térmico <sup>(118)</sup>. O estiramento das ligações P-O pode ser observado em aproximadamente  $1180\text{cm}^{-1}$ , sobrepondo-se à absorbância relacionada ao modo de vibração transversal dos átomos de Si em espécies cíclicas de vidro bioativo em  $1200\text{cm}^{-1}$  <sup>(24)</sup>. A banda larga observada na faixa de  $1400 - 1550\text{cm}^{-1}$  pode estar relacionada com grupos carbonato adsorvidos <sup>(81)</sup>, enquanto a absorbância em  $1635\text{cm}^{-1}$  é atribuída a água molecular adsorvida na superfície do vidro <sup>(24)</sup>.

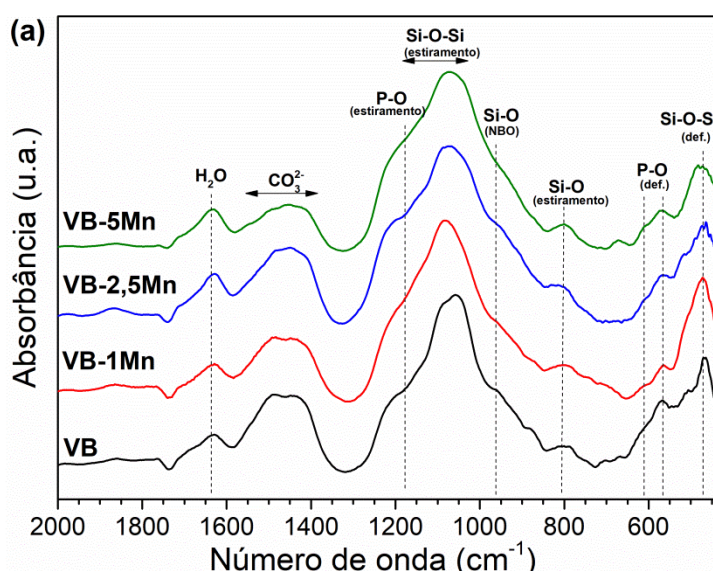


Figura 4.4: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras VB, VB-1Mn, VB-2,5Mn e VB-5Mn.

Não foram observadas diferenças significativas nos espectros de FTIR dos vidros contendo Mn quando comparados com o VB. No entanto, algumas diferenças notáveis foram observadas pela espectroscopia Raman (Figura 4.5). Bandas de  $800$  a  $1300\text{cm}^{-1}$  são geralmente atribuídas ao estiramento assimétrico do tetraedro de  $\text{SiO}_4$ , para o qual o número de onda preciso depende do número de oxigênio ligantes (BO – *bridging oxygen*) ou oxigênio não ligantes (NBO – *non-bridging oxygen*) que constituem a estrutura do vidro <sup>(119)</sup>. O estiramento assimétrico de Si-O é relatado na região entre  $1000$  a  $1200\text{cm}^{-1}$ , sendo atribuído às estruturas compostas principalmente de unidades BO <sup>(120,121)</sup>, em particular ao estiramento assimétrico de Si-O com três

unidades BO ( $Q^3$ ) em  $1080\text{cm}^{-1}$  <sup>(122)</sup>. A redução da intensidade do espalhamento Raman observada nesta região é um indicativo da formação de unidades  $Q^3$ , porém o estiramento assimétrico de ligações P-O pode também afetar o espalhamento Raman nessa região <sup>(123)</sup>. Por outro lado, vidros com uma rede menos polimerizada geralmente apresentam uma banda larga na faixa de  $900$  a  $980\text{cm}^{-1}$ , relacionada aos NBO <sup>(121)</sup>. Nesta região, o espalhamento Raman máximo observado em  $956\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuído a Si-O-Si em unidades  $Q^2$  (ligação Si-O-2NBO) <sup>(119,121)</sup>. A alta intensidade dessa banda em todas as amostras indica a formação de uma estrutura desorganizada, composta principalmente de NBO, típica de vidros bioativos amorfos contendo modificadores de rede.

Bandas de  $750$  a  $800\text{cm}^{-1}$  são relacionadas com a deformação angular de Si-O-Si, embora apresente fraca intensidade Raman <sup>(120,121)</sup>. Além disso, bandas em  $440\text{cm}^{-1}$  e  $500\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas à deformação angular e estiramento de ligações Si-O-Si, respectivamente <sup>(32,124)</sup>. As deformações assimétrica e simétrica das ligações O-P-O em ortofosfatos podem ser observadas em  $590$  e  $437\text{cm}^{-1}$ , respectivamente <sup>(32)</sup>.

O espalhamento Raman de ligações Mn-O em óxidos é atribuído na literatura à bandas entre  $500$  e  $900\text{cm}^{-1}$  <sup>(81)</sup>. Observa-se no Raman das amostras de vidro bioativo contendo Mn uma banda larga nessa região, que aumenta em intensidade com o teor de Mn, podendo ser atribuído à vibrações Mn-O na estrutura dos vidros <sup>(81,125)</sup>. Além disso, vibrações em  $531\text{cm}^{-1}$  são comumente relacionadas ao estiramento Mn-O em estruturas contendo cátions  $\text{Mn}^{2+}$  em óxidos de manganês <sup>(125)</sup>. Já o espalhamento Raman na região de  $352\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuído à estruturas MnOOH <sup>(125)</sup>. A Tabela 4.2 apresenta a correlação das bandas principais que aparecem nos espectros FTIR e Raman.



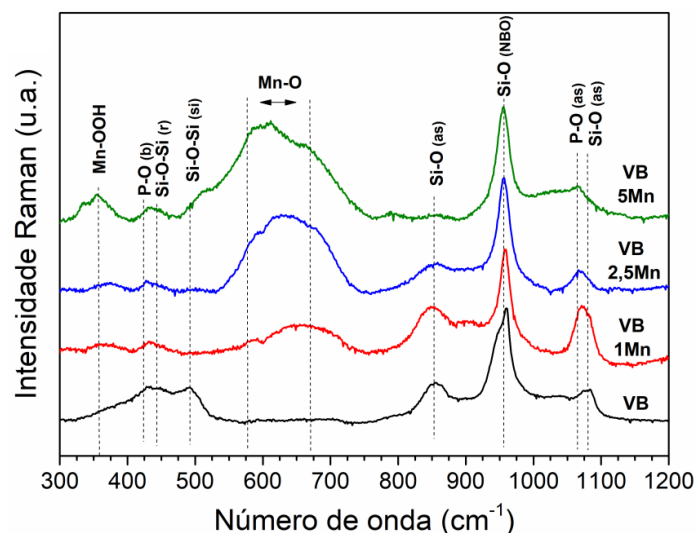


Figura 4.5: Espectroscopia Raman das amostras VB, VB-1Mn, VB-2,5Mn e VB-5Mn.

Bandas típicas de vidros bioativos foram observadas tanto pela análise de FTIR quanto Raman, e a incorporação de até 5% de MnO (% molar) gerou apenas pequenas modificações na estrutura final do material, o que é favorável para manutenção do potencial bioativo. A análise estrutural demonstrou que os vidros são compostos principalmente de unidades NBO, o que resulta em uma rede menos polimerizada, tendo um papel importante na bioatividade, uma vez que afeta o processo de dissolução dos vidros bioativos. Bandas típicas de MnO foram observadas por Raman, com aumento da intensidade de acordo com a elevação do teor de Mn. Análises indicam que o processo sol-gel foi eficiente na incorporação de íons manganês na estrutura do vidro em substituição ao teor de cálcio, mantendo a estrutura com alto teor de NBO, essencial para a bioatividade do vidro, embora análises adicionais devam ser realizadas utilizando técnicas como a  $^{29}\text{Si}$  RMN (ressonância magnética nuclear) para confirmar tais análises.

Tabela 4.2: Correlação entre as bandas principais observada por FTIR e Raman nas amostras de vidro bioativo contendo manganês.

Correlação	FTIR	Raman
Si-O-Si(Estiramento assimétrico)	1000 - 1200cm <sup>-1</sup> (24)	800 to 1300cm <sup>-1</sup> (119)
Si-O-Si (Estiramento simétrico)	725 - 810cm <sup>-1</sup> (14)	500cm <sup>-1</sup> (32,126)
Si-O (deformação angular)	450-470cm <sup>-1</sup> (117)	750 - 800cm <sup>-1</sup> (120,121)
P-O (estiramento)	1180cm <sup>-1</sup> (24,110)	963 - 965 cm <sup>-1</sup> (123,127)
P-O (deformação angular)	550 e 630cm <sup>-1</sup> (81)	437cm <sup>-1</sup> (32,128)
Si-O-NBO	965cm <sup>-1</sup> (106,117)	956cm <sup>-1</sup> (119,121)
Mn-O	-	500 - 900cm <sup>-1</sup> (81,129)

#### 4.3.4 Propriedades texturais

Para caracterizar as propriedades texturais dos vidros, foram realizadas análises de adsorção de N<sub>2</sub>. A Figura 4.6 mostra as isotermas de adsorção/dessorção e o perfil de distribuição de tamanho de poros obtido a partir das isotermas de dessorção de nitrogênio e método BJH. Todas as isotermas podem ser identificadas como tipo IV, característica de materiais mesoporosos<sup>(130)</sup>, em que as larguras dos poros variam de 2 - 50nm<sup>(131)</sup>. Durante a síntese sol-gel, nanopartículas primárias de sílica são formadas na etapa de condensação, e se aglomeram em partículas secundárias, formando logo após uma rede 3D, o gel<sup>(41)</sup>. Durante a secagem, nanoporos intersticiais são formados pela remoção de subprodutos de condensação do processo, aumentando a área superficial do material, podendo afetar a formação de hidroxiapatita carbonatada (HAC) e a ligação do tecido ósseo com os vidros bioativos. Além disso, histereses características de isotermas do tipo IV foram observadas, sendo relacionadas à condensação capilar que ocorre em estruturas mesoporosas<sup>(132)</sup>. Uma distribuição estreita de tamanho de poros pode ser observada pelas curvas derivadas da isoterma de dessorção, apresentando distribuição monomodal.

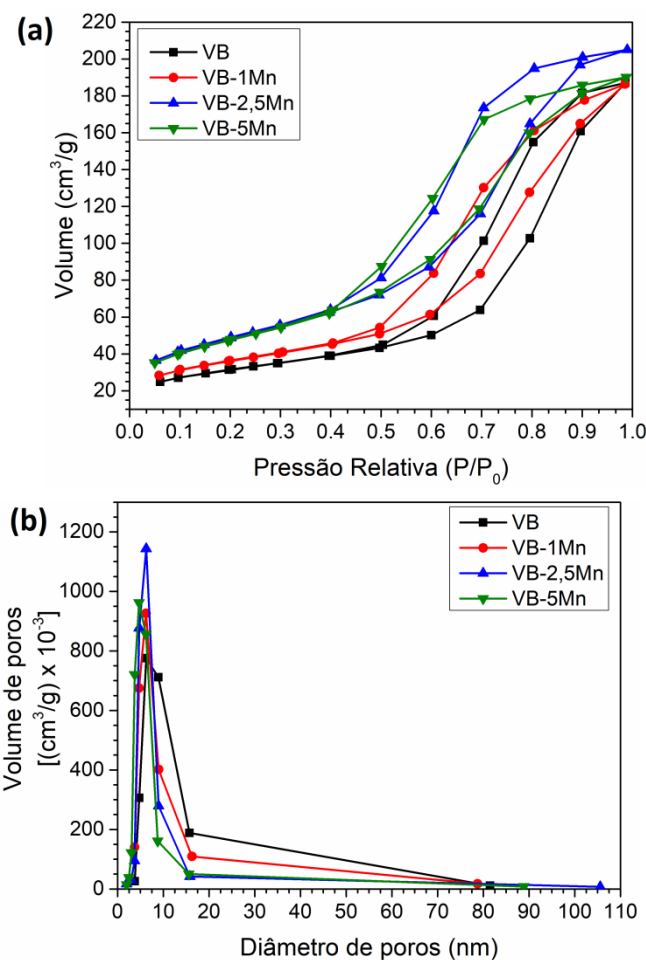


Figura 4.6: Isotermas de adsorção de nitrogênio e (b) distribuição de tamanhos de poros (algoritmo BJH derivado das curvas de dessorção) das amostras VB, VB-1Mn, VB-2,5Mn e VB-5Mn.

Resultados obtidos pela análise de adsorção de nitrogênio estão apresentados na Tabela 4.3. As amostras apresentaram aumento na área superficial específica e volume de poros para vidros contendo maiores teores de Mn, porém com redução no tamanho médio de poros. Tal observação pode ser relacionada à substituição de poros grandes por diversos poros menores, já que o volume total de poros variou apenas ligeiramente <sup>(130)</sup>. As diferenças observadas na análise de adsorção de nitrogênio podem estar relacionadas à modificação da rede dos vidros devido à inserção de Mn na estrutura de sílica em substituição ao Ca, já que a substituição de íons na rede de vidros bioativos pode prejudicar sua orientação durante a formação da rede, resultando em alterações da forma nas estruturas mesoporosas, além de causar defeitos estruturais potenciais <sup>(32)</sup>.

O diâmetro médio de poros observado está dentro da faixa mesoporosa. Trabalhos relatados na literatura mostram que vidros com estruturas mesoporosas apresentam

atrativas respostas bioativas, com grande potencial para diversas aplicações no campo biomédico <sup>(49)</sup>, já que essa estrutura permite a adsorção de agentes biológicos, aprimorando a resposta biológica <sup>(61)</sup>. Além disso, a estrutura mesoporosa e a elevada área superficial influenciam a taxa de nucleação e cristalização do HAC, conforme mostrado em estudos anteriores <sup>(133,134)</sup>. Vidros contendo poros menores que 2nm são menos eficazes na nucleação de HAC, uma vez que a difusão de íons pode ser restrita, mas a taxa de formação de HAC aumenta para estruturas contendo mesoporos <sup>(133)</sup>.

Tabela 4.3: Propriedades texturais obtidas pela adsorção de nitrogênio para VB, VB-1Mn e VB-2,5Mn.

Amostras	Área superficial específica (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	Volume de poros total (cm <sup>3</sup> .g <sup>-1</sup> )	Diâmetro de poros médio (nm)
<b>VB</b>	111,3	0,289	10,4
<b>VB-1Mn</b>	127,9	0,288	9,0
<b>VB-2,5Mn</b>	174,6	0,317	7,3
<b>VB-5Mn</b>	170,8	0,294	6,9

#### 4.3.5 Dissolução e bioatividade em SBF

A formação *in vitro* de uma camada de HAC na superfície de um material é um indicativo preliminar do seu potencial bioativo *in vivo* <sup>(40)</sup>. A taxa de formação da camada de HAC depende de diferentes fatores, como composição, estrutura, propriedades de superfície e geometria do vidro <sup>(135)</sup>. Neste trabalho, amostras de vidro bioativo foram imersas em SBF a 37°C por diferentes períodos de tempo para avaliar o perfil de dissolução e formação de HAC.

A Figura 4.7 apresenta os espectros de FTIR do vidro bioativo antes da imersão (0h) e após 1, 7 e 14 dias de imersão em SBF. A bioatividade das amostras foi evidenciada pelo surgimento de uma banda dupla entre 600 e 500cm<sup>-1</sup> já no primeiro dia de imersão em SBF, relacionados com a deformação angular P-O em grupos PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> de HAC <sup>(135,136)</sup>. As bandas se tornaram mais intensas e bem definidas com a progressão do ensaio, enquanto que a absorção referente à deformação angular de Si-O em 450cm<sup>-1</sup> teve sua intensidade reduzida, indicando um maior teor de HAC recobrando a superfície do material após períodos mais longos de imersão em SBF. Vibrações relacionadas ao estiramento de C-O em 800 e 890cm<sup>-1</sup> <sup>(110)</sup> também foram observadas,

sugerindo a formação de hidroxiapatita carbonatada <sup>(137)</sup>. Bandas típicas de vidros bioativos relacionadas com o estiramento assimétrico de Si-O (1000 a 1200cm<sup>-1</sup>), estiramento simétrico de Si-O (725 a 810cm<sup>-1</sup>) e estiramento de ligações P-O (1180cm<sup>-1</sup>) também foram observadas.

Indícios da formação da camada de HAC na superfície dos vidros bioativos foi observada mesmo após a incorporação de Mn em sua estrutura, já que bandas típicas relativas ao fosfato de cálcio e de carbonatos foram observadas em todas as amostras após imersão em SBF por diferentes períodos.

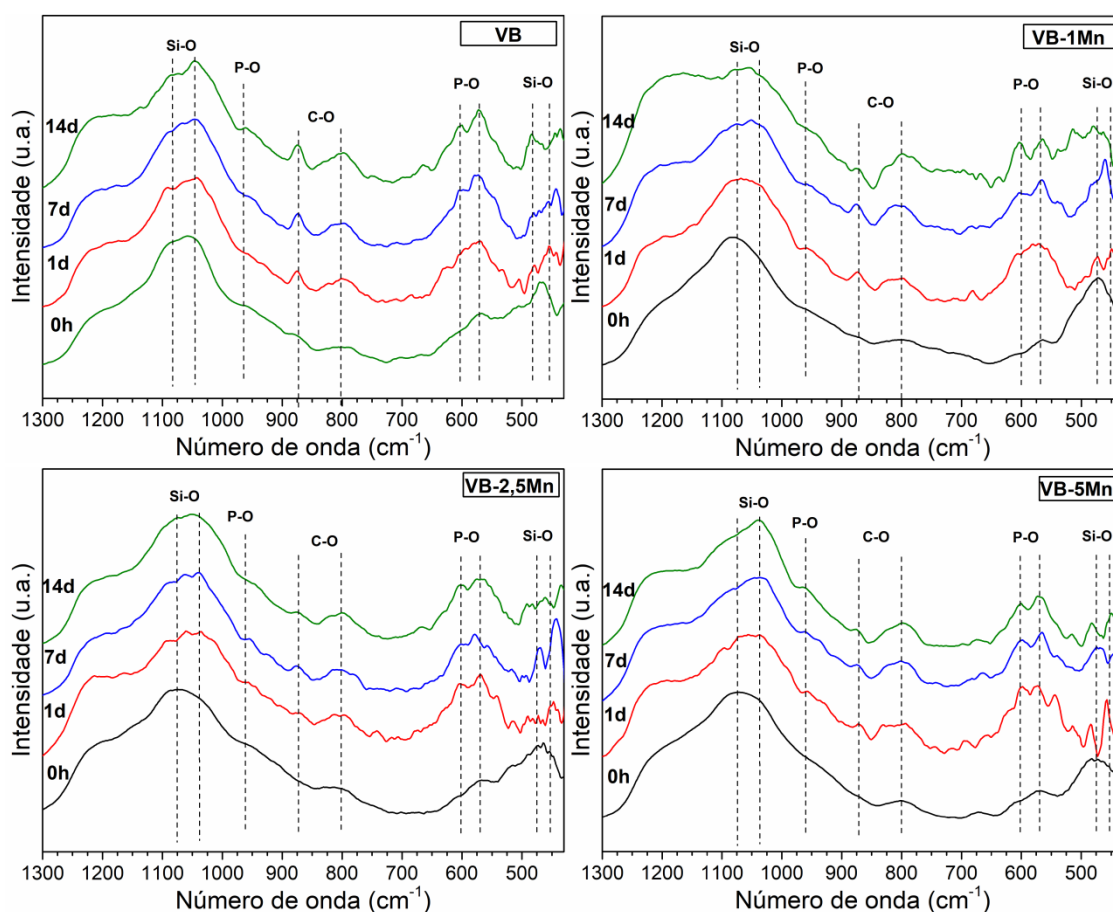


Figura 4.7: Espectro de FTIR das amostras de vidros antes (0h) e após imersão em SBF por 1, 7 e 14 dias.

Durante a avaliação da bioatividade *in vitro*, mudanças significativas na composição química da solução ocorrem em função do tempo, devido à acumulação dos produtos de dissolução do vidro bioativo <sup>(138)</sup>. As mudanças na composição da solução SBF podem ser utilizadas como um modo indireto para compreender os processos que ocorrem na superfície do material. Neste trabalho, o perfil de liberação iônica de Si e P dos vidros bioativos após diferentes períodos de imersão em SBF é apresentado na

Figura 4.8, enquanto que a liberação iônica de Ca e Mn são apresentados na Figura 4.9.

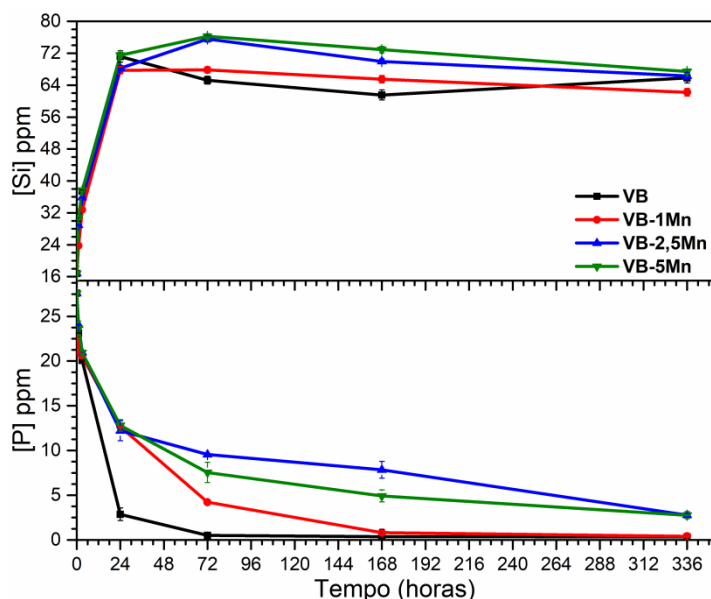


Figura 4.8: Variação da concentração de silício, e fósforo após diferentes períodos de imersão em SBF das amostras VB, VB-1Mn, VB-2,5Mn e VB-5Mn.

Observa-se uma maior concentração de Si em solução para VB-2,5Mn e VB-5Mn após 72 horas de ensaio, que podem ser atribuídos à maior área superficial específica e volume de poros <sup>(135)</sup>, conforme indicado na Tabela 4.3, o que facilita o processo de dissolução. Além disso, a estrutura contendo alto teor de NBO, conforme demonstrado pela análise Raman, gera uma rede mais aberta e conseqüentemente afeta o processo de dissolução do vidro, o que pode aumentar a bioatividade do material <sup>(120,139)</sup>. No entanto, após 7 dias (168 horas), a concentração de Si se estabilizou, mantendo-se entre 62 e 67ppm para todas as amostras avaliadas. A liberação de sílica pode favorecer a citocompatibilidade, e trabalhos anteriores demonstraram que a liberação de Si(IV) de biomateriais entre 0,1 e 100ppm apresentam efeitos estimulatórios em osteoblastos <sup>(140)</sup>. A liberação gradual de Si após imersão de vidros bioativos em SBF aumenta também a formação de grupos silanóis (Si-OH) em sua superfície, que apresentam um papel importante no processo de precipitação do fosfato de cálcio <sup>(110)</sup>.

Houve uma redução da concentração de P em SBF ao longo do tempo, confirmando a migração deste íon para a superfície do vidro, com conseqüente formação de uma camada rica em fosfato de cálcio em todas as amostras. No entanto, os íons fosfato permaneceram em solução por um período de tempo maior em amostras contendo

maior teor de Mn. Por exemplo, no caso do VB, a concentração de P caiu para próximo de zero após 72 horas, enquanto que para a amostra VB-1Mn essa redução foi observada somente após 168 horas. Já o VB-2,5Mn e VB-5Mn atingiram concentração próxima à 3ppm após 14 dias de ensaio. Estudos demonstraram que concentrações de fósforo acima de 30ppm podem resultar na redução da viabilidade celular, enquanto que concentrações menores induzem a biomineralização, sendo de interesse para aplicações em engenharia de tecidos <sup>(140)</sup>.

Mn foi incorporado na estrutura dos vidros bioativos em substituição parcial ao Ca, e apesar do teor de Ca ser menor para as amostras VB-2,5Mn e VB-5Mn, a Figura 4.9 mostra que a liberação de Ca foi maior para essas amostras após imersão em SBF. Este resultado pode estar relacionado com a incorporação de Mn na estrutura do vidro, formando uma rede mais fracamente ligada, aumentando a taxa de dissolução para as amostras contendo maior teor de Mn e também à uma taxa mais baixa de formação de apatita na superfície do vidro para as amostras com teor mais elevado de Mn <sup>(141)</sup>. Além disso, trabalhos anteriores mostram que o Mn pode substituir parcialmente o teor de Ca em cristais de hidroxiapatita ou seus precursores durante as diferentes etapas do processo de formação dessas estruturas <sup>(11,13)</sup>, alterando perfil de liberação desses íons. No entanto, estudos mais detalhados a partir de outras técnicas devem ser realizados para confirmar o efeito de Mn na mineralização da apatita durante o ensaio em SBF. A importância de cálcio no processo de mineralização óssea é bem estabelecida, e trabalhos relatam que a liberação de Ca pode também induzir a proliferação de osteoblastos, aprimorando o efeito terapêutico do material <sup>(142)</sup>.

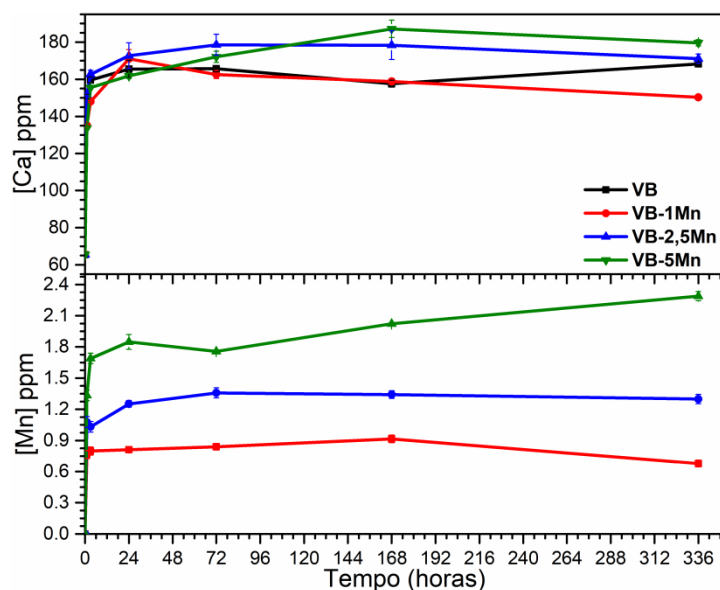


Figura 4.9: Variação da concentração de cálcio e manganês após diferentes períodos de imersão em SBF das amostras VB, VB-1Mn, VB-2,5Mn e VB-5Mn.

A Figura 4.9 mostra que, conforme esperado, a liberação de Mn em SBF foi maior para aquelas amostras contendo maior teor desse íon, apresentando uma liberação rápida nas primeiras horas de imersão, com posterior estabilização. Oscilações no perfil de liberação podem estar relacionados ao processo de dissolução e reprecipitação de sais contendo Mn na superfície do material, além de uma possível substituição de íons  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Mn}^{2+}$  no cristal de hidroxiapatita <sup>(143)</sup>, embora a presença de Mn na HAC não tenha sido confirmada neste trabalho.

Foi observada uma concentração máxima de 2,8ppm de Mn após 14 dias de imersão em SBF para a amostra VB-5Mn. A liberação de Mn pelos biomateriais deve ser cuidadosamente ajustada, com o objetivo de se evitar efeitos citotóxicos e manter as suas propriedades terapêuticas. Trabalhos anteriores mostram que a proliferação de osteoblastos foi inibida quando estas foram expostas a concentrações maiores que 0,1mM de  $\text{MnCl}_2$  (ou cerca de 5,49ppm de  $\text{Mn}^{2+}$ ), enquanto que concentrações menores apresentaram capacidade de proliferação e espalhamento de osteoblastos similar ou maior do que o controle <sup>(76)</sup>. Análises adicionais indicam também que o efeito dos íons Mn nas funções celulares é altamente dependente da sua concentração, reduzindo a expressão de marcadores osteogênicos para concentrações mais altas desse íon <sup>(13,76)</sup>. No entanto, para todas as amostras obtidas neste trabalho, a concentração máxima de Mn liberada no ensaio SBF está abaixo da concentração relatada que poderia prejudicar as funções celulares, sugerindo que a composição dos



vidros bioativos pode ser ajustada de forma a manter a liberação iônica dentro da faixa terapêutica.

Com relação aos resultados discutidos acima, pode-se inferir que a incorporação de Mn na rede de vidros bioativos reduziu a taxa de formação de HAC, já que foi também observada uma redução mais lenta na concentração de P em SBF, especialmente para os primeiros estágios do processo, em concordância com trabalhos anteriores<sup>(13)</sup>. No entanto, pela análise de FTIR pode-se observar indícios da formação da camada de HAC em menos de 24 horas para todas as amostras, o que podemos considerar como indicativo do caráter bioativo do material. De fato, trabalhos anteriores mostram que vidros bioativos com capacidade reduzida, que formaram a camada de HAC somente após 3 dias, também apresentam potencial para aplicações na engenharia de tecidos<sup>(136)</sup>. As amostras neste trabalho apresentaram bioatividade, o que é um indicador positivo para aplicação na engenharia de tecidos ósseos. Além disso, dados sugerem que a química do vidro bioativo pode ser ajustada para liberar uma quantidade apropriada de diferentes íons, como Mn, Si, Ca e P, dependendo da aplicação.

#### **4.3.6 Estudo da citotoxicidade**

Conforme apresentado na Figura 4.10 (a), a avaliação da citotoxicidade por MTT indicou que os osteoblastos expostos a produtos iônicos das amostras de vidro bioativo por 72 horas não alteraram significativamente sua atividade metabólica mitocondrial. Esses grupos experimentais apresentaram níveis de função celular acima de 70%. Adicionalmente, diluições de  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $1000\mu\text{g.mL}^{-1}$  produziram os níveis mais altos de atividade mitocondrial em osteoblastos para todas as composições de material.

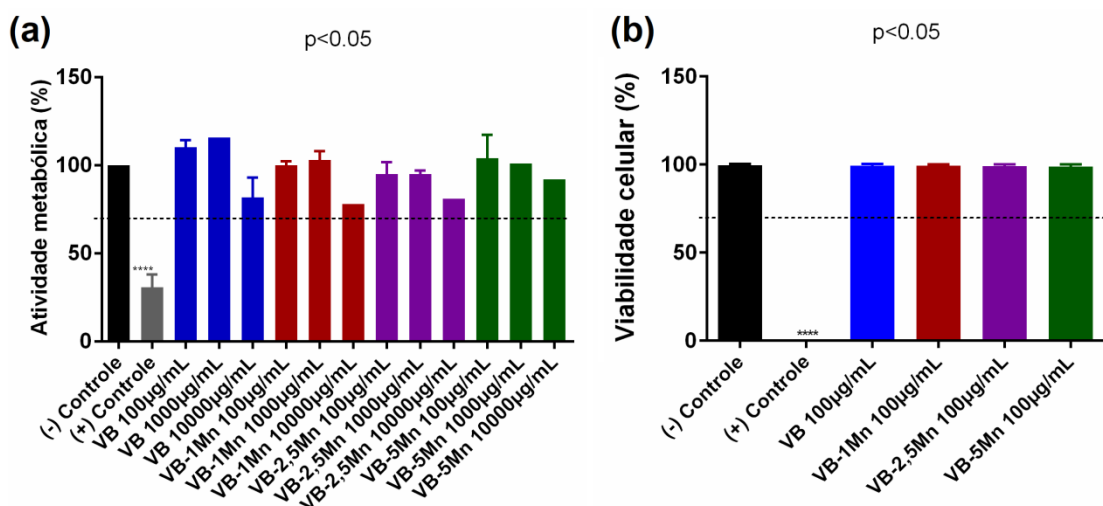


Figura 4.10: (a) Atividade metabólica de osteoblastos expostos ao produto iônico de amostras de vidros bioativos determinada por MTT e (b) avaliação da citotoxicidade de osteoblastos expostos a concentrações específicas de vidros bioativos determinada por LIVE/DEAD. Diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo controle negativo estão classificadas com asterisco (\*).

A viabilidade celular de vidros bioativos foi posteriormente avaliada por LIVE/DEAD, utilizando-se a diluição de  $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , que demonstrou maior viabilidade celular pelos resultados de MTT. Conforme apresentado na Figura 4.10(b), a avaliação da citotoxicidade por LIVE/DEAD® demonstrou que osteoblastos expostos ao produto iônico de vidros bioativos por 72 horas exibiram alto nível de viabilidade celular. Todas as amostras apresentaram resultados semelhantes ao controle, não causando efeito tóxico nos osteoblastos após exposição, e sem diferenças estatísticas quando comparado com o grupo controle negativo (-). No entanto, diferenças foram observadas quando os resultados foram comparados com o grupo controle positivo (+), já que tal grupo foi designado para causar efeito tóxico e destruição das células, levando a baixos níveis de viabilidade celular. A Figura 4.11 apresenta imagens dos osteoblastos expostos ao produto iônico dos vidros bioativos, nos quais células viáveis apresentaram fluorescência verde (primeira e terceira colunas) e células mortas apresentaram fluorescência vermelha (segunda e quarta colunas). Já a Figura 4.12 apresenta a fluorescência verde (células viáveis – primeira coluna), fluorescência vermelha (células mortas – segunda coluna) e imagens da transmissão de luz de osteoblastos (terceira coluna) expostos ao produto iônico de amostras de vidro bioativo. Células vivas (verdes) tratadas pelos produtos iônicos apresentaram morfologia celular similar às células de controle (Figura 4.11) e espalhamento típico (Figura 4.12), e danos na membrana celular não foram identificados.

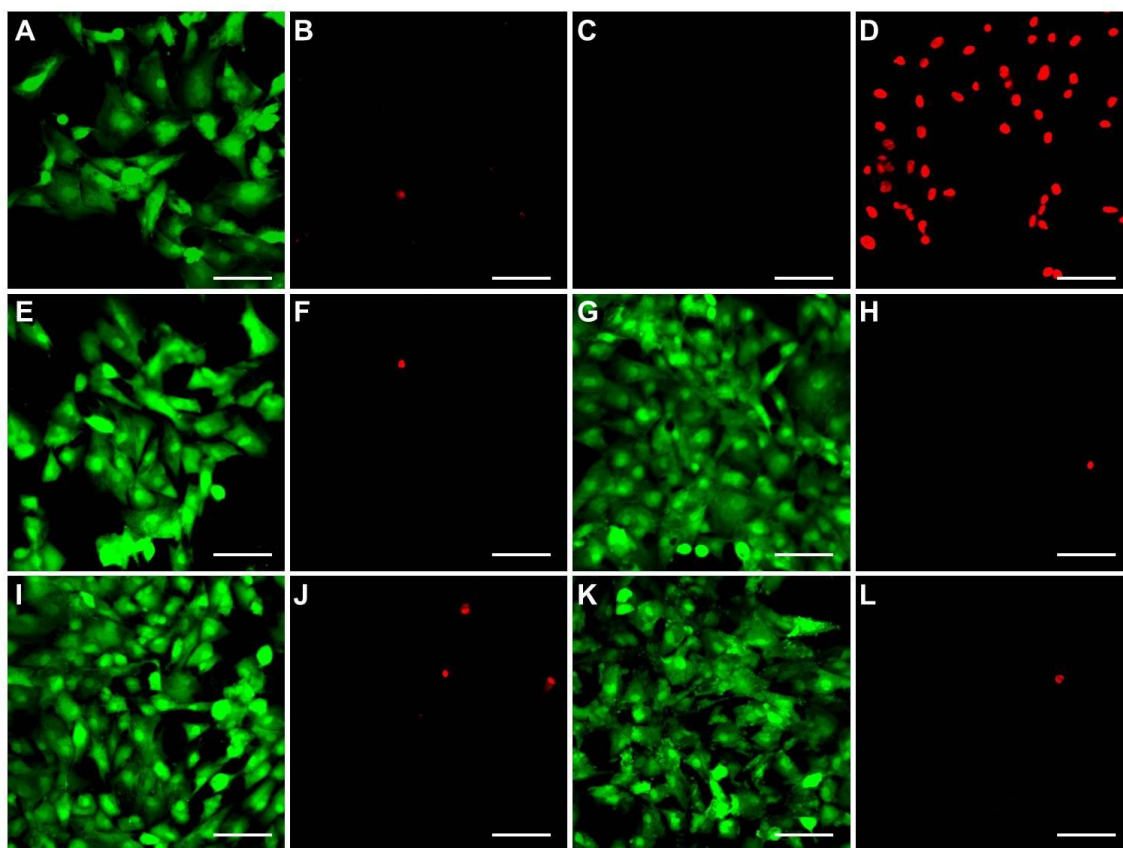


Figura 4.11: Imagens de osteoblastos expostos ao produto iônico de vidros bioativos, apresentando a fluorescência verde (células viáveis – primeira e terceira colunas) e fluorescência vermelha (células mortas – segunda e quarta colunas). Controle negativo (A e B), controle positivo (C e D), VB (E e F), VB-1Mn (G e H), VB-2,5Mn (I e J) e VB-5Mn (K e L). A barra representa escala de 100  $\mu\text{m}$ .

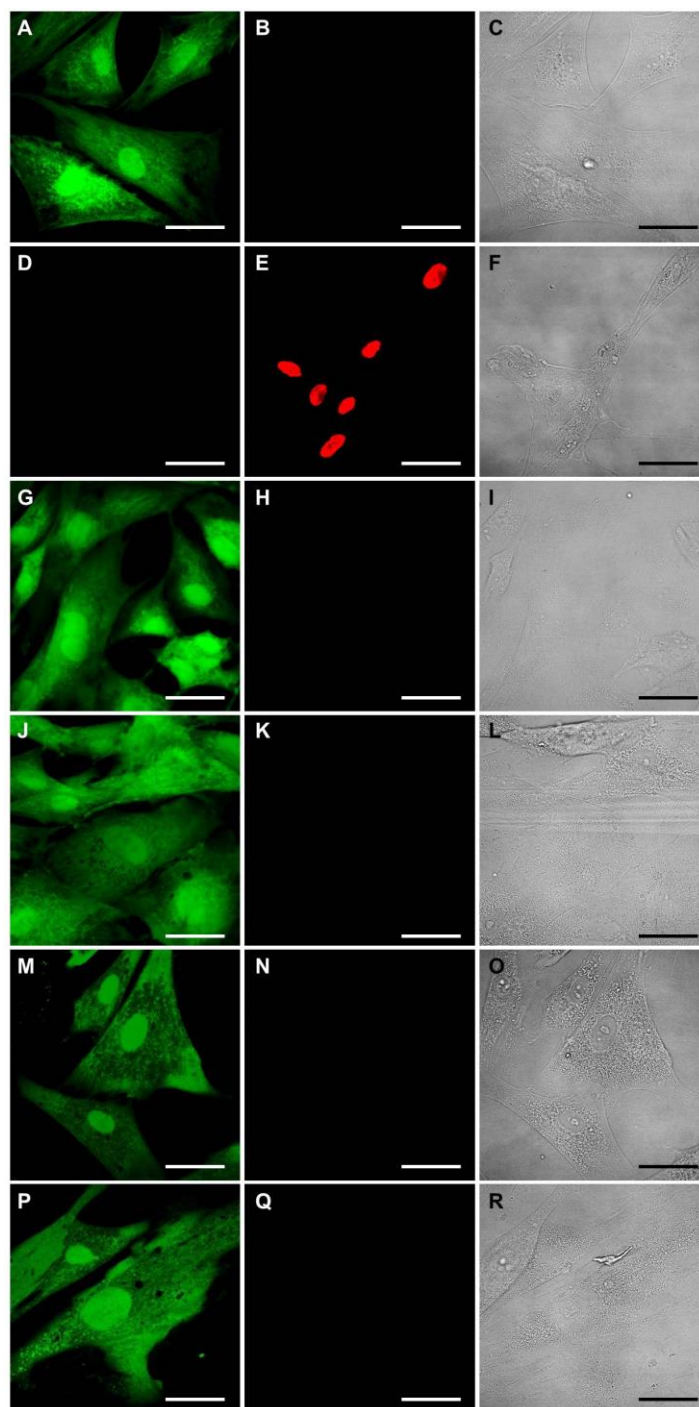


Figura 4.12: Fluorescência verde (células viáveis – primeira coluna), fluorescência vermelha (células mortas – segunda coluna) e imagens da transmissão de luz de osteoblastos (terceira coluna) expostos ao produto iônico de amostras de vidro bioativo. Controle negativo (A, B e C), controle positivo (D, E e F), VB (G, H e I), VB-1Mn (J, K e L), VB-2,5Mn (M, N e O) e VB-5Mn (P, Q e R). A barra representa escala de 10 $\mu$ m.

Não foram observados efeitos citotóxicos para diferentes concentrações de vidro bioativo contendo Mn, conforme resultados obtidos por MTT e LIVE/DEAD. No entanto, apesar do ambiente favorável para as células gerado pelo produto iônico dos materiais, um estudo detalhado da diferenciação osteogênica deve ser realizado para

confirmar os aspectos relevantes do potencial terapêutico dos vidros bioativos com capacidade de liberação de Mn em meio biológico.

#### **4.4 Conclusões**

Vidros bioativos contendo Mn foram produzidos pelo processo sol-gel em diferentes composições, conforme avaliado por ICP-OES, apresentando estrutura amorfa, alta área superficial específica e porosidade. A bioatividade *in vitro* foi confirmada pela formação da camada de HAC após imersão em SBF, e a análise dos produtos de dissolução mostrou que a composição do vidro pode ser ajustada para liberar quantidades específicas de Si, Ca, P e Mn, mantendo-se a concentração dentro dos limites terapêuticos. Não foi observada citotoxicidade quando osteoblastos foram expostos à diferentes concentrações do produto iônico dos vidros bioativos. Os resultados indicam que a incorporação de Mn é uma potencial estratégia para obtenção de materiais com propriedades superiores para a engenharia de tecidos, e os efeitos biológicos devem ser mais profundamente investigados.

## **CAPÍTULO 5. Avaliação do potencial osteogênico de vidros bioativos contendo manganês derivados do processo sol-gel**

---

### **5.1 Introdução**

Produtos baseados em vidros bioativos são utilizados em diversas aplicações ortopédicas e dentárias, devido à sua capacidade de formar uma forte ligação com o tecido ósseo <sup>(3)</sup>, além de estimular a expressão osteogênica a partir dos seus produtos de dissolução, levando à rápida regeneração óssea <sup>(8)</sup>. Recentemente, o desenvolvimento de novas formulações de vidros bioativos pela introdução de diferentes íons com potencial terapêutico, como Ag, Cu, Co e Mn, têm ampliado o seu campo de aplicação e aprimorado as suas propriedades <sup>(21)</sup>. Materiais contendo Mn têm sido explorados devido à capacidade desses íons de influenciar a ativação de integrinas, essenciais para diferentes processos celulares, como a adesão e proliferação, além das interações entre as células e a matriz extracelular <sup>(72,76)</sup>. Além disso, íons  $Mn^{2+}$  apresentam papel importante na manutenção da massa óssea, e a incorporação em vidros bioativos derivados do processo de fusão demonstrou efeito benéfico na expressão de proteínas morfogenéticas ósseas <sup>(13)</sup>. No entanto, vidros bioativos derivados do processo sol-gel contendo esses íons necessitam de avaliação adicional para confirmar o potencial do Mn no processo de diferenciação osteogênica e mineralização óssea.

Tendo isso em vista, esse capítulo tem como objetivo a obtenção de vidros bioativos derivados da composição 58S contendo Mn como potencial íon terapêutico. Nitrato de manganês foi selecionado como precursor de Mn, com o objetivo de verificar a possibilidade de utilização de um diferente precursor na incorporação desse íon na estrutura dos vidros bioativos e a sua influência nas propriedades do material. O efeito dessa incorporação na estrutura, perfil de liberação iônica e citotoxicidade dos vidros bioativos obtidos foi avaliado. Além disso, para confirmar o potencial terapêutico dos íons Mn na regeneração óssea, a resposta osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (hMSCs – *human bone marrow-derived mesenchymal stem cells*) ao produto iônico dos vidros bioativos, e a expressão de diferentes marcadores da diferenciação osteogênica foram estudados.

## 5.2 Materiais e métodos

Os estudos apresentados nesse capítulo foram realizados durante o período de doutorado sanduiche no Imperial College London. Reagentes, metodologias e equipamentos diferentes foram utilizados para sínteses e análises em relação ao capítulo anterior, o que ocasionou pequenas variações nos resultados em amostras semelhantes.

Foram utilizados reagentes da *Sigma-Aldrich*, salvo indicações ao contrário. Vidros bioativos de composição 58S (60% SiO<sub>2</sub> - 36% CaO - 4% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, % molar) foram obtidos pelo método sol-gel. Nesse processo, TEOS (tetraetilortosilicato 98%) e TEP (trietilfosfato 99%) foram hidrolisados em meio ácido (ácido nítrico 2M) contendo água deionizada (taxa molar H<sub>2</sub>O/TEOS = 12) por 1 hora sob agitação magnética. Logo após, nitrato de cálcio (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O) foi dissolvido no sol, e a mistura agitada por mais uma hora. O gel obtido foi envelhecido por 72 horas em recipiente fechado, seguido por secagem em recipiente aberto com aumento de 10°C por dia até se alcançar 120°C. Logo após, amostras foram tratadas a 650°C por 3 horas, com taxa de aquecimento de 2°C.min<sup>-1</sup>, moídas e peneiradas para se obter partículas menores que 150µm. Para amostras contendo manganês, foi utilizado como precursor o nitrato de manganês (Mn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.xH<sub>2</sub>O), sendo incorporado em parcial substituição ao teor de cálcio nas amostras. O sal de manganês foi adicionado previamente à etapa de adição do precursor do cálcio durante a síntese do material. Vidros contendo 2,5% MnO (2,5Mn-N) e 5,0% MnO (5Mn-N) (%molar) foram obtidos em substituição parcial ao teor de CaO nos vidros bioativos derivados da composição 58S (VB).

### 5.2.1 Caracterização dos vidros bioativos

**Composição Química.** A análise foi realizada por ICP-OES (espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado) em equipamento Thermo Scientific iCaP 6000series. Amostras foram preparadas pela digestão ácida, no qual 50mg de cada amostra foi misturada em um cadinho de platina com 250mg de metaborato de lítio anidro (80% p/p) e tetraborato de lítio (20% p/p), e então fundidos por 30 minutos à 1050°C. Após resfriamento, as amostras foram completamente dissolvidas em ácido nítrico 2M. As concentrações de Si, Ca, P e Mn em cada amostra foram determinadas por ICP-OES, e as proporções de SiO<sub>2</sub>, CaO, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e MnO foram calculadas.

**Análise Estrutural.** Foi realizada Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) em equipamento Thermo Scientific Nicolet iS10 contendo acessório de reflectância total atenuada. Os espectros foram obtidos entre 400 e 4000 $\text{cm}^{-1}$  (64 escaneamentos por espectro; resolução de 4 $\text{cm}^{-1}$ ). A Difração de Raios-X (DRX) foi realizada em equipamento Bruker D2, com passo de 0,02 entre 7 e 70° (2 $\theta$ ), sem giro, e utilizando-se fonte de radiação de CuK $\alpha$ . A Espectroscopia de Fotoelétrons excitados por Raios-X (XPS) foi realizada em um sistema Thermo Scientific k-Alpha<sup>+</sup> operando a uma pressão base de 2 x 10<sup>-9</sup>bar. Foi utilizada uma fonte monocromada de Raios-X AlK $\alpha$  ( $h\nu = 1486,6\text{eV}$ ), com um analisador hemisférico de dupla focagem a 180° contendo um detector 2D. A corrente de emissão da fonte de Raios-X foi de 6mA e tensão de polarização de 12kV. Para minimizar o efeito de carga foi utilizado um filtro de elétrons, e deslocamentos remanescentes da energia de ligação (BE – *binding energy*) devido a cargas das amostras foram corrigidas utilizando a linha C1s na BE de 285,0eV. Todos os dados foram avaliados utilizando software Advantage XPS, e espectros de alta resolução foram obtidos para Si 2p, O1s e Mn2p.

**Propriedades Texturais.** Amostras foram desgaseificadas por 24 horas a 200°C previamente à análise. Adsorção de nitrogênio foi realizada em equipamento Quantachrome Autosorb AS-6 multi-estações com 40 pontos de adsorção e 40 pontos de dessorção. Foi aplicado o método Brunauer-Emmett-Teller (BET) para avaliação da área superficial específica e Barret-Joyner-Halenda (BJH) em curvas de dessorção para a avaliação do tamanho e distribuição de poros.

**Dissolução em DMEM.** Vidros bioativos foram imersos em DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium, Gibco*) a uma razão de 1,5 $\text{mg.mL}^{-1}$ , e mantido em recipientes de polipropileno vedados em estufa à 37°C sob agitação (120rpm)<sup>(9)</sup>. Alíquotas de 1mL foram removidas após diferentes períodos de tempo (0, 4, 8, 24 e 72 horas) para avaliação da concentração iônica no meio, e substituídos por 1mL de DMEM para manter o conteúdo da solução. Amostras foram filtradas (0,22 $\mu\text{m}$ ), diluídas em 2M HNO<sub>3</sub> e analisadas por ICP-OES para obtenção da concentração de Si, Ca, P e Mn em solução.

### 5.2.2 Estudo da citotoxicidade

**Preparação do produto iônico.** Vidros bioativos foram incubados em  $\alpha$ -MEM a uma concentração de 1,5 $\text{mg.mL}^{-1}$ , utilizando uma incubadora com agitação à 37°C, 120rpm por 4 horas. Logo após, filtrou-se o meio através de um filtro esterilizado (0,22 $\mu\text{m}$ ). Em



seguida, foram adicionados 10% de soro bovino fetal (FBS) (v/v), 100 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina e 100 µg.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina.

**Viabilidade celular.** Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (hMSCs - ATCC® PCS-500-012™, EUA), foram expandidas em frascos de cultura T-125 (Corning®; *Sigma-Aldrich*, UK) em condição basal, e mantidas em meio de cultura α-MEM com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS), 100 U.mL<sup>-1</sup> de penicilina e 100 µg.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina (Gibco; *Thermo Fisher Scientific*, UK), a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e atmosfera totalmente umidificada. As passagens 2 e 3 de hMSCs foram utilizadas em todos os estudos a uma concentração de 5x10<sup>4</sup> células.mL<sup>-1</sup>. As hMSCs foram tratadas por diferentes períodos de tempo (2, 4 e 7 dias) com o produto iônico previamente preparado dos vidros bioativos. A viabilidade celular foi determinada utilizando um ensaio colorimétrico baseado na conversão de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) em formazan (Invitrogen, *Molecular Probes™*), determinado a 570nm utilizando um leitor de microplacas (SpectraMax M2<sup>e</sup> Molecular device). As células cultivadas na placa de cultura de tecidos (TCP) sem a presença do produto iônico dos vidros bioativos foram utilizadas como controle.

### 5.2.3 Produtos de liberação iônica na diferenciação de hMSCs

As hMSCs (5x10<sup>4</sup> células.mL<sup>-1</sup>) foram cultivadas numa placa de cultura com fundo plano de 24 poços e incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas, para permitir que as células fixassem na placa. Duas condições foram utilizadas para a cultura celular: α-MEM basal ou meio osteogênico, no qual α-MEM foi suplementado com 100µM de ácido L-ascórbico (*Sigma-Aldrich*), 10mM de β-glicerofosfato (*Sigma-Aldrich*) e 10nM de dexametasona (DEX, *Sigma-Aldrich*). As células em meio basal e osteogênico foram expostas ao produto de liberação iônica das amostras de vidro bioativo (VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N) preparado previamente, e o meio de cultura foi trocado duas vezes por semana. Os diferentes grupos foram avaliados mediante ensaio colorimétrico de atividade de fosfatase alcalina (ALP), avaliação histoquímica por coloração de Alizarina vermelha S e técnica de imunofluorescência para detectar colágeno tipo I, osteocalcina (OSC) e osteopontina (OSP).

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi avaliada mediante ensaio colorimétrico após 7, 14 e 21 dias de cultura em meio basal, utilizando kit de ensaio de fosfatase alcalina (Colorimetric, *Abcam*). As camadas de células foram lavadas com PBS e removidas da superfície das placas utilizando solução tampão de lise (*VWR Chemicals*). Após a

centrifugação, alíquotas da solução de lise foram coletadas para análise da atividade de ALP e do teor da proteína total. A atividade da ALP foi determinada em relação à liberação de p-nitrofenol a partir do substrato de p-nitrofenilfosfato. Cada reação foi iniciada pela adição de fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) à solução tampão de lise celular, e interrompida após 60 minutos pela adição de uma solução de terminação. A densidade óptica foi medida a 405nm por espectrofotômetro de microplacas (SpectraMax M2<sup>®</sup> Molecular device). Os valores da atividade ALP foram normalizados em relação ao volume total de lisado celular e tempo e expresso como unidades por mililitro de células.

Para os ensaios de imunofluorescência e de histoquímica, as células foram fixadas previamente com 4% de paraformaldeído em PBS. Foram avaliados todos os grupos controle, VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N, em meio basal e osteogênico. Para marcação de proteínas específicas de diferenciação osteogênica, as células foram permeabilizadas com um tampão de permeabilidade durante 30 minutos e depois bloqueadas com 1% BSA em PBS durante 5 minutos. As células foram incubadas com os anticorpos primários IgG de coelho anti-colágeno tipo I (*Abcam*), anti-osteocalcina (*Abcam*) e anti-osteopontina (*Abcam*) a 4°C durante a noite, e posteriormente expostas ao anticorpo secundário de cabra IgG H&L anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 455 (*Abcam*). Os núcleos celulares foram contrastados com dicloridrato de 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, *Thermo Fisher Scientific*). Para detectar a formação de nódulos calcificados, as células foram coradas com 1% de corante Alizarina vermelha S em PBS a pH 4,2. As imagens foram obtidas com microscópio de fluorescência.

### **5.3 Resultados e discussão**

#### **5.3.1 Análise da composição química**

A composição química final das micropartículas de vidro bioativo obtidas pelo processo sol-gel foi analisada pelo método de fusão do metaborato de lítio e ICP-OES, e os resultados estão apresentados na Tabela 5.1. As maiores diferenças foram observadas entre os teores nominais e calculados de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e CaO para as amostras VB e 2,5Mn-N, respectivamente. A imprecisão da composição final pode ser causada por diversos fatores no processamento sol-gel, como a impureza dos precursores, precipitação de espécies, perdas durante o processo, além da utilização de meios muito diluídos para análise em ICP e etapas de filtração necessárias, etc. <sup>(110)</sup>. No entanto, a presença de manganês foi confirmada em duas composições diferentes,

com teores próximos à composição nominal, e o nitrato de manganês se mostra como uma possível fonte de incorporação de Mn em vidros bioativos.

Tabela 5.1: Composição química nominal e determinada pelo método de fusão de metaborato de lítio e ICP-OES (%mol) das amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N.

	Composição nominal (% mol)				Composição ICP-OES (% mol)			
	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	CaO	MnO	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	CaO	MnO
<b>VB</b>	60,0	4,0	36,0	-	61,3 ± 0,9	3,2 ± 0,6	35,5 ± 0,9	-
<b>2,5Mn-N</b>	60,0	4,0	33,5	2,5	58,1 ± 1,6	4,0 ± 0,4	35,2 ± 2,0	2,7 ± 0,3
<b>5Mn-N</b>	60,0	4,0	31,0	5,0	59,0 ± 0,8	3,9 ± 0,4	32,7 ± 0,2	4,4 ± 0,5

### 5.3.2 Propriedades texturais

Foi realizada a avaliação das propriedades texturais dos vidros bioativos por adsorção de nitrogênio, e isothermas representativas da adsorção/dessorção de nitrogênio e a curva de distribuição de poros são apresentadas na Figura 5.1, enquanto que os valores da área superficial específica, volume e tamanho de poros obtidos por BET e algoritmo BJH estão apresentados na Tabela 5.2.

As diferentes amostras de vidros bioativos apresentaram isothermas de adsorção/dessorção e distribuição de tamanho de poros com comportamento similar. Foram identificadas isothermas do tipo IV com ciclo de histerese em todos os casos, típica de materiais contendo mesoporos<sup>(144)</sup>. Observa-se uma distribuição estreita e monomodal do tamanho de poros, conforme observado na Figura 5.1 (b), com faixa de tamanho apresentando pouca variação apesar da incorporação de Mn na estrutura dos vidros bioativos. As amostras apresentaram também elevada área superficial específica, e o volume de poros foi mais elevado para a amostra 5Mn-N, enquanto que o diâmetro médio de poros reduziu com o aumento do teor de Mn. A incorporação de íons adicionais na estrutura de vidros bioativos pode prejudicar a orientação do material durante o processo de formação da rede, tendo como consequência alterações na estrutura mesoporosa, podendo também gerar defeitos estruturais que afetam as propriedades texturais<sup>(32)</sup>.

O diâmetro médio de poros se encaixa na faixa mesoporosa, de interesse para aplicações biomédicas, já que esses poros permitem a adsorção de agentes biológicos que aprimoram a resposta do corpo ao material<sup>(61)</sup>. A nanoporosidade é inerente do processamento sol-gel, sendo obtida devido à remoção de subprodutos de

condensação presente na rede do gel <sup>(41)</sup>. Além disso, materiais com elevada área superficial e superfície mesoporosa influenciam a formação da camada de HAC, aprimorando os processos de dissolução e troca iônica e atuando como sítios de nucleação, consequentemente afetando a bioatividade do material.

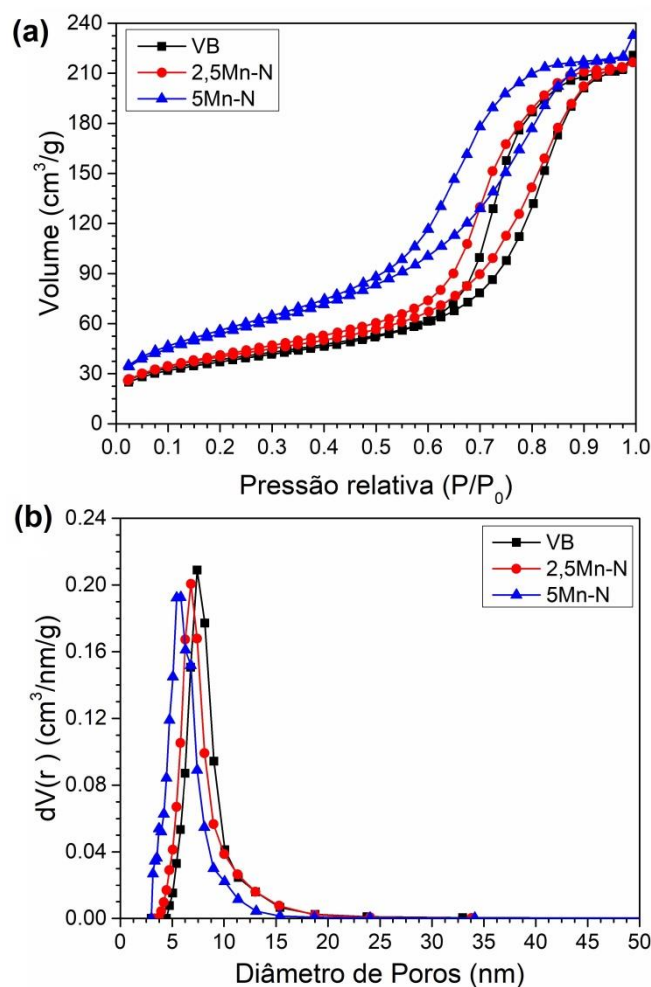


Figura 5.1: (a) Isotermas de adsorção de nitrogênio e (b) distribuição de tamanhos de poros (algoritmo BJH derivado das curvas de dessorção) das amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N.

Tabela 5.2: Parâmetros texturais obtidos pela adsorção de nitrogênio para as amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N.

Amostras	Área superficial específica (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	Volume de poros total (cm <sup>3</sup> .g <sup>-1</sup> )	Diâmetro de poros médio (nm)
<b>VB</b>	124,0 ± 11,8	0,365 ± 0,011	7,6 ± 0,4
<b>2,5Mn-N</b>	128,8 ± 15,2	0,297 ± 0,053	6,6 ± 0,4
<b>5Mn-N</b>	130,0 ± 14,2	0,459 ± 0,148	6,4 ± 0,2

### 5.3.3 Análise estrutural

A estrutura dos vidros bioativos foi avaliada por FTIR, e os espectros estão apresentados na Figura 5.2. A deformação angular de ligações Si-O-Si pode ser observada entre  $450$  e  $470\text{cm}^{-1}$ , tipicamente relacionada à vidros com estruturas amorfas <sup>(106)</sup>. Já a banda entre  $725$  e  $810\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao estiramento simétrico de ligações Si-O, enquanto que o estiramento assimétrico dessa ligação é observado como uma banda larga entre  $1000$  e  $1200\text{cm}^{-1}$  <sup>(24,116)</sup>. Ligações Si-O contendo um oxigênio não ligante (Si-O-NBO) dão origem a uma absorbância de fraca intensidade que pode ser observada a  $965\text{cm}^{-1}$  em todas as amostras <sup>(106,117)</sup>. A absorção entre  $550$  e  $630\text{cm}^{-1}$  pode ser relacionada a ligações P-O de grupos fosfatos <sup>(81)</sup>. Essa absorção pode estar relacionada a regiões ricas em fosfato e pequenos núcleos de hidroxiapatita que podem ser formados durante o tratamento térmico do material <sup>(118)</sup>. A incorporação de Mn pode ter dificultado a formação dessas regiões, reduzindo também a intensidade da absorbância nessa região. O estiramento de ligações P-O pode ser observada por volta de  $1180\text{cm}^{-1}$ , sobrepondo a absorbância relacionada ao estiramento assimétrico Si-O <sup>(24)</sup>.

Bandas de absorção típicas de vidros bioativos foram observadas em todas as amostras pela análise de FTIR, e a incorporação de diferentes teores de manganês, utilizando-se o nitrato de manganês como precursor não gerou modificações significativas na estrutura final do material, sendo favorável para a manutenção do potencial bioativo do material.

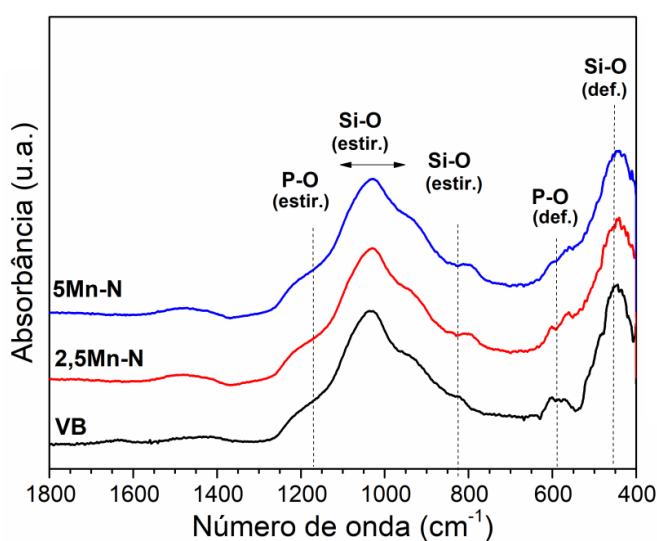


Figura 5.2: Espectros de FTIR obtidos para as amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N.

A Figura 5.3 apresenta os difratogramas das amostras de vidro bioativos, obtidos por análises de DRX. Observa-se comportamento similar em todas as amostras, com a presença de um halo amplo e difuso entre 15 e 25° ( $2\theta$ ), característicos de estruturas de sílica com caráter predominantemente amorfo <sup>(105)</sup>. Um halo de maior intensidade entre 31 e 33° ( $2\theta$ ) indica uma organização inicial da estrutura do material, podendo ser relacionado à formação de pequenos núcleos de apatita durante o tratamento térmico, conforme relatado em vidros obtidos anteriormente com composição similar <sup>(46)</sup>. Resultados indicam que a incorporação de manganês em vidros bioativos a partir do nitrato de manganês foi capaz de manter a estrutura predominantemente amorfa do material. Vidros bioativos com estrutura amorfa normalmente apresentam taxa de dissolução mais elevada, levando ao aumento da bioatividade quando comparado com materiais cristalinos, sendo desejáveis para aplicação como biomateriais.

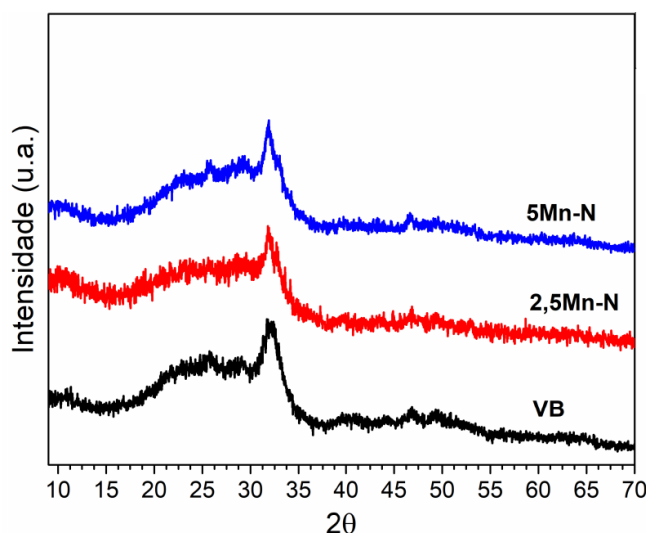


Figura 5.3: Padrões de Difração de Raios-X (DRX) obtidos para as amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N.

A estrutura dos vidros bioativos foi ainda avaliada por XPS, e o espectro de varredura é apresentado na Figura 5.4. Foram observadas linhas Auger e de fotoemissão do XPS típicas dos constituintes do vidro bioativo em todas as amostras. O pico C 1s, relacionado à absorção de impurezas de hidrocarbonetos pela superfície do vidro, foi utilizado como referência para calibração da energia de ligação (BE) devido ao efeito de carga das amostras, sendo ajustado para 285,0eV.

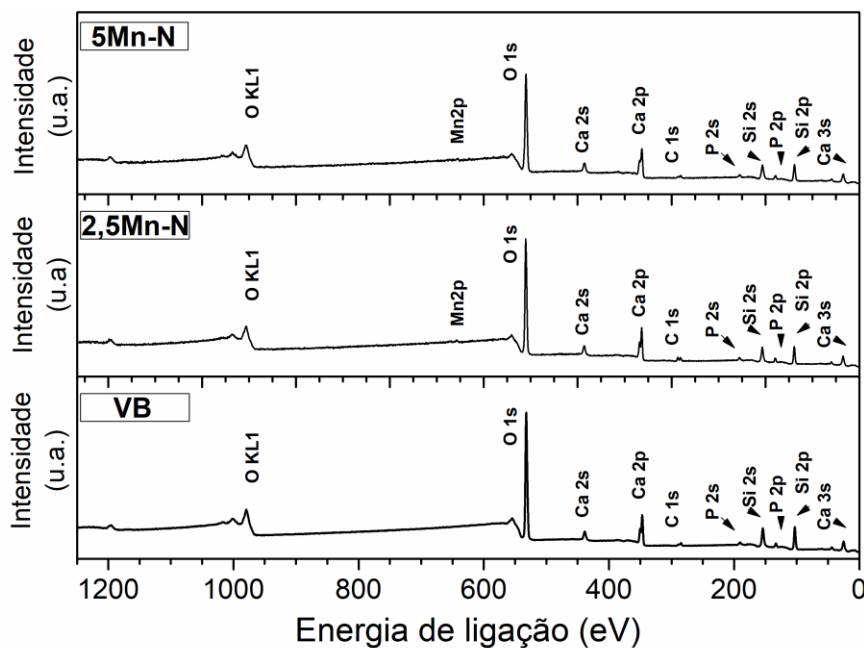


Figura 5.4: Espectroscopia de Fotoelétrons excitados por Raios-X (XPS) das amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N.

O espectro XPS de alta resolução Si 2p é apresentado na Figura 5.5, e uma banda larga pode ser observada em todas as amostras, com máximos em 103,5eV, 103,6eV e 103,6eV para VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N, respectivamente, se encontrando na faixa típica de vidros silicatos <sup>(145)</sup>.

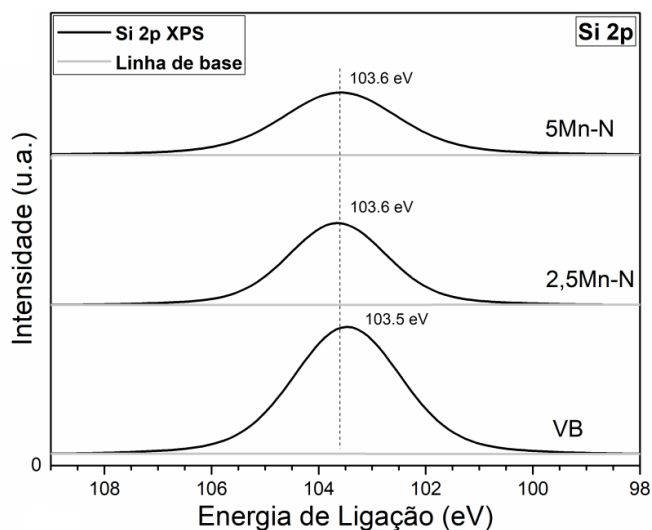


Figura 5.5: Espectro de XPS de alta resolução Si 2p para as amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N.

O espectro O 1s é apresentado na Figura 5.6, e a sua deconvolução indica a formação de dois componentes com máximo de energia de ligação em 531,1eV e 533,0eV para a amostra VB, deslocando-se ligeiramente para maiores valores de energia de ligação

quando o manganês foi incorporado. A banda de maior energia de ligação obtida por deconvolução do espectro O 1s pode ser relacionada ao oxigênio de silicatos, enquanto que a banda observada nos menores valores pode ser relacionada ao oxigênio em grupos fosfatos <sup>(144)</sup>. Resultados indicam que microdomínios de fosfato de cálcio podem estar presentes na estrutura do vidro, similares ao ambiente presente em hidroxiapatitas, o que pode conferir certa heterogeneidade ao material <sup>(144)</sup>. De fato, trabalhos anteriores mostram que o fósforo está presente na estrutura de vidros bioativos majoritariamente na forma de ortofosfatos, tendo a sua carga balanceada por cátions modificares de rede, e apenas pequenos teores de ligações Si-O-P são observados <sup>(48)</sup>.

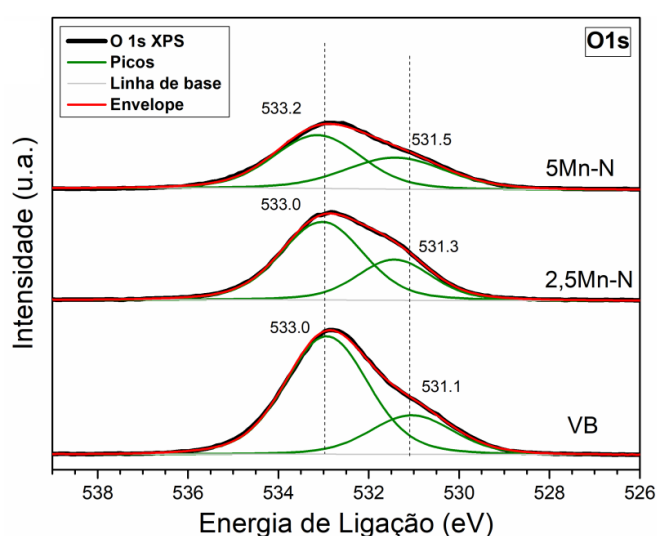


Figura 5.6: Espectro de XPS de alta resolução O 1s para as amostras VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N.

A Figura 5.7 apresenta o espectro de alta resolução XPS Mn 2p. Foram observados múltiplos picos, atribuídos ao desdobramento de multipletos Mn 2p<sub>3/2</sub> e Mn 2p<sub>1/2</sub> <sup>(145)</sup>, apresentando máxima em 642,8eV e 654,8eV, respectivamente. A presença de um pico satélite também pode ser observada cerca de 4eV acima do Mn 2p<sub>3/2</sub> em ambas as amostras, atribuído ao efeito “*shake-up*” <sup>(146)</sup>. O manganês apresenta seis estados de oxidação estáveis, os quais podem apresentar divisão de multipletos significativa e também faixas de energia de ligação sobrepostas, dificultando a sua identificação <sup>(147,148)</sup>. No entanto, os picos observados estão dentro da faixa relatada para compostos de manganês <sup>(147,149,150)</sup>. Além disso, a presença da estrutura satélite “*shake-up*” é típica de materiais em que o estado de oxidação Mn<sup>2+</sup> está presente <sup>(151)</sup>, sendo um indicativo da presença majoritária de Mn<sup>2+</sup> nas amostras de vidro bioativo. De fato, trabalhos anteriores mostraram que estados de oxidação como +4 e +7 são improváveis em sistemas silicatos, e que esse íon é normalmente presente como Mn<sup>2+</sup>



nessas estruturas, embora  $Mn^{3+}$  também possa ser observado, deslocando as bandas Mn 2p para valores mais elevados de energia de ligação <sup>(139,152,153)</sup>. O formato e posição dos espectros Mn 2p para as duas amostras apresentam similaridade, indicando que o ambiente do Mn foi mantido mesmo quando adicionado em diferentes teores na estrutura do vidro bioativo.

A análise de XPS demonstrou que o manganês está presente na rede de vidros bioativos em sua maioria como  $Mn^{2+}$ , e não foram observadas modificações estruturais significativas devido à incorporação desse íon, já que os espectros O 1s e Si 2p apresentaram comportamento e energia de ligação similar, o que é de interesse para manter o potencial bioativo do material.

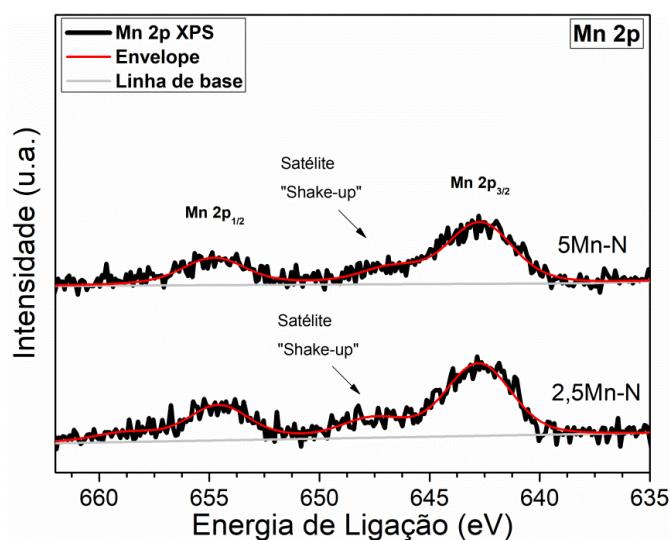


Figura 5.7: Espectros XPS de alta resolução Mn 2p das amostras 2,5Mn-N e 5Mn-N.

### 5.3.4 Dissolução em DMEM

O DMEM é geralmente utilizado como um ambiente de cultura celular, e a avaliação da degradação de vidros bioativos nesse meio é de grande interesse para se relacionar o perfil liberação iônica do material com os resultados obtidos em estudos *in vitro*. Amostras foram imersas em DMEM a 37°C sem células e com agitação por diferentes períodos de tempo durante 3 dias, e a concentração iônica em solução foi avaliada por ICP-OES (Figura 5.8). Uma amostra contendo apenas DMEM (sem a presença de vidro bioativo) foi também incubada nas mesmas condições e utilizada como controle.

O perfil de liberação de Si foi similar para todas as amostras, com liberação mais rápida durante as horas iniciais de estudo, estabilizando-se após 24 horas, embora a

concentração de Si liberada em DMEM tenha sido mais elevada para VB. A liberação de cálcio foi também mais elevada para VB, o que pode indicar a presença de uma rede mais aberta devido ao alto teor de oxigênio não ligantes, consequentemente afetando o perfil de dissolução do material. A liberação máxima de Si observada durante os três dias foi de aproximadamente 59ppm para VB, valor que se encontra na faixa relatada que apresenta efeitos estimulantes em osteoblastos (0,1 até 100ppm), de acordo com trabalhos anteriores <sup>(140,141,154)</sup>. Além disso, a liberação de Si influencia na formação da camada de hidroxiapatita em meio fisiológico a partir da formação de silanóis na superfície do material <sup>(110)</sup>. Já a importância da liberação de cálcio no processo de mineralização óssea é bem estabelecida, podendo induzir também a proliferação de osteoblastos, e consequentemente aprimorando o efeito terapêutico do material <sup>(140)</sup>.

Houve redução da concentração de P em DMEM durante o período em estudo, podendo estar relacionada à migração desse íon para a superfície do material e consequente formação de uma camada rica em fosfato de cálcio. As amostras contendo Mn apresentaram mais lenta redução no teor de P, indicando uma taxa mais lenta de formação da camada de rica de fosfato de cálcio quando Mn está presente. No entanto, a utilização de solução não tamponada DMEM não é indicada para a avaliação da bioatividade pelo crescimento de HAC na superfície de materiais, já que a fração orgânica do meio pode suprimir em parte a cristalização de fases, alterando o resultado final <sup>(155)</sup>. Observou-se também uma liberação rápida de Mn nas primeiras 4 horas de estudo, em uma maior concentração para a amostra contendo maior teor de Mn, conforme esperado, atingindo uma concentração máxima de 1,4ppm após 3 dias de imersão em DMEM. Trabalhos anteriores relatam que a proliferação de osteoblastos foi inibida quando foram expostas a concentrações maiores que 0,1mM de  $MnCl_2$ , ou cerca de 5,49ppm de  $Mn^{2+}$ , enquanto que a exposição de células a concentrações menores desse íon aprimorou a proliferação e espalhamento de osteoblastos <sup>(76)</sup>. Portanto, o perfil de liberação de Mn deve ser devidamente ajustado a fim de se manter a concentração dentro da faixa terapêutica.

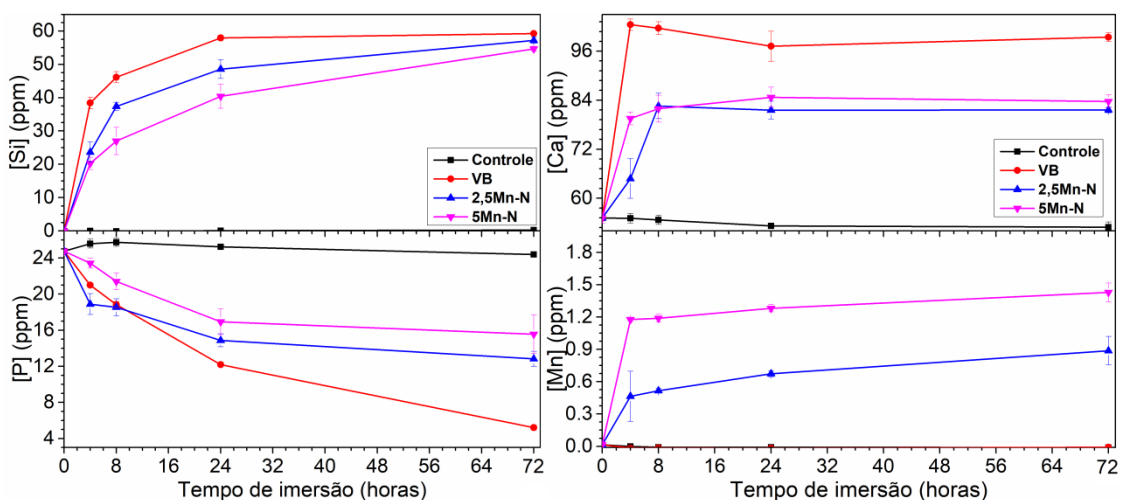


Figura 5.8: Perfil de liberação em DMEM de Si, P, Ca e Mn do grupo controle e das amostras VB, 2,5Mn-N, 5Mn-N.

A capacidade de liberação de íons com potencial terapêutico dos vidros bioativos foi confirmada a partir do estudo da dissolução em DMEM. A incorporação de Mn reduziu a taxa de dissolução, porém uma liberação controlada de Si, Ca, P e Mn foi observada. A estrutura amorfa obtida, com elevada área superficial e predominância de oxigênios não ligantes em sua estrutura, afeta o perfil de dissolução do material, mostrando que a química do vidro bioativo pode ser ajustada para liberar quantidades apropriadas dos diferentes íons, dependendo da aplicação.

### 5.3.5 Estudo da citotoxicidade

Células-tronco mesenquimais humanas possuem um importante papel na regeneração tecidual *in vivo*<sup>(156)</sup>, sendo recrutadas pelos locais de lesão, podendo se diferenciar em diferentes tipos de células, como ósseas, musculares, adiposas, etc<sup>(157)</sup>. Com isso, hMSCs são utilizadas extensivamente para um grande número de terapias celulares e diferentes estratégias na engenharia de tecidos. Trabalhos anteriores mostram que células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (hMSCs) podem ser estimuladas para a osteogênese quando em contato com vidros bioativos<sup>(158)</sup>. Além disso, hMSCs são precursores de osteoblastos, sendo um tipo celular relevante para avaliação da biocompatibilidade de materiais.

O efeito do produto iônico dos vidros bioativos na viabilidade celular de hMSCs foi avaliado por MTT, conforme apresentado na Figura 5.9. Materiais são considerados citotóxicos quando a viabilidade celular é reduzida mais de 30%, ou seja, quando apresenta uma viabilidade celular menor que 70% (ISO 10993-5)<sup>(8)</sup>. Não foram observados efeitos citotóxicos quando hMSCs foram expostas ao produto iônico de

todas as amostras deste trabalho por diferentes períodos de exposição. Para o período de 4 dias de análise, houve aumento na atividade mitocondrial de todas as amostras, porém não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre o grupo VB e as amostras contendo Mn durante todo o período de estudo. Estudos indicam que a exposição a produtos iônicos das amostras não alterou significativamente a sua atividade metabólica mitocondrial, apresentando níveis de função celular acima de 70% mesmo nas amostras contendo Mn, não sendo consideradas citotóxicas nas condições utilizadas.

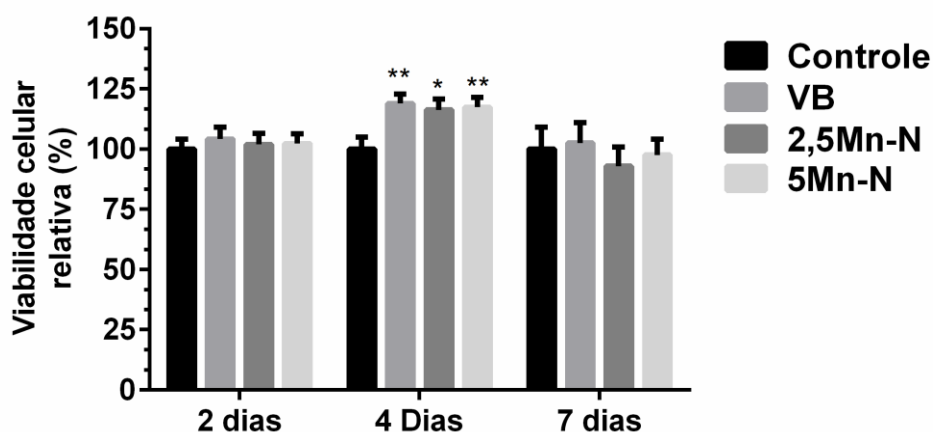


Figura 5.9: Viabilidade celular determinada por MTT em hMSCs para VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N. Viabilidade celular média normalizada pela viabilidade média do grupo controle.  $p < 0,05$  (\*) ou  $p < 0,01$  (\*\*) em relação ao controle conforme determinado por método One-way ANOVA seguida de teste Tukey post-hoc.

### 5.3.6 Produtos de liberação iônica na diferenciação de hMSCs

Vidros bioativos podem estimular a diferenciação osteogênica de pré-osteoblastos e células-tronco devido à liberação de íons durante o processo de dissolução<sup>(159)</sup>. Conforme os osteoblastos se proliferam e diferenciam a partir de células-tronco mesenquimais eles expressam várias proteínas, fatores de crescimento e fatores de transcrição, os quais apresentam padrões distintos de expressão de acordo com o tempo<sup>(160)</sup>. Em geral, após as células serem plaqueadas em meio osteogênico, três estágios de diferenciação se sucedem: proliferação, produção/maturação da matriz e mineralização. A fase proliferativa envolve a expressão de genes do ciclo celular e histona. Esta fase é seguida da expressão de genes associados com a formação da matriz óssea, como colágeno tipo I e atividade da fosfatase alcalina (ALP). No estágio final, genes associados com a mineralização, como a osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea são expressos nos níveis mais elevados<sup>(160)</sup>.

Para se avaliar a eficácia dos vidros bioativos contendo Mn e dos produtos de dissolução na diferenciação osteogênica, diferentes marcadores da formação óssea foram investigados. A Figura 5.10 apresenta a atividade da ALP na matriz extracelular de hMSCs tratadas com o produto iônico do VB, 2,5Mn-N e 5Mn-N após 7, 14 e 21 dias de cultura em meio basal, e o grupo controle. A ALP é um marcador do estágio inicial da diferenciação osteoblástica, além de desempenhar um papel importante na degradação do pirofosfato para liberar fosfatos para a mineralização<sup>(64)</sup>. Trabalhos anteriores relatam que a produção de ALP é estimulada pelo produto de dissolução dos vidros bioativos, porém reduzindo sua atividade quando as células se tornam confluentes e iniciam a mineralização, perfil que não foi observado nesse trabalho<sup>(161)</sup>. Como o estudo foi feito em meio basal (sem indução osteogênica), é esperado que a redução da fosfatase alcalina devido ao início da mineralização seja mais lenta. Porém, o aumento na expressão da ALP com o decorrer do tempo indica a progressão do processo de diferenciação celular, sendo estimulado pela presença do produto iônico dos vidros bioativos, e ainda ocorrendo mesmo após 21 dias de ensaio. Além disso, a mais elevada expressão de fosfatase alcalina observada para as amostras contendo manganês indica que a presença desse íon pode influenciar o processo de diferenciação de hMSCs.

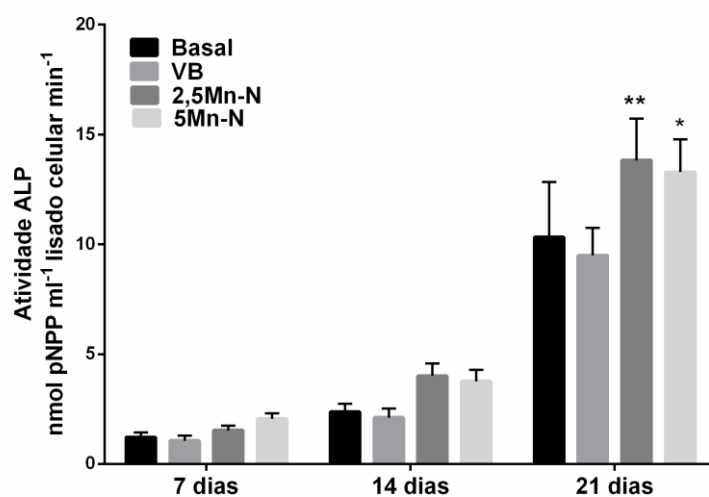


Figura 5.10: Expressão da fosfatase alcalina (ALP) após 7, 14 e 21 dias de exposição de hMSCs ao produto iônico dos vidros bioativos (\*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  relativa ao controle basal, Two-way ANOVA e teste Tukey de comparação múltipla).

Marcadores da diferenciação osteogênica, incluindo colágeno tipo I, osteocalcina (OSC) e osteopontina (OSP), também foram avaliados a partir da técnica de imunofluorescência. Núcleos celulares estão representados em azul (corante DAPI),

enquanto que a expressão de colágeno tipo 1, OSP e OSC são apresentadas em verde, conforme indicado nas figuras abaixo. A Figura 5.11 apresenta imagens de fluorescência nas quais a expressão de colágeno tipo I de hMSCs após 7, 14 e 21 dias de exposição ao produto iônico dos vidros bioativos foi avaliada.

O colágeno tipo I é, assim com o ALP, um marcador da etapa inicial da diferenciação de osteoblastos, porém associado à formação da matriz extracelular, sendo o seu maior componente orgânico <sup>(162,163)</sup>. Durante a diferenciação de osteoblastos em modelos *in vivo* e *in vitro*, a expressão de colágeno tipo I é relativamente alta, podendo ser produzido intrinsecamente por células, com posterior redução de acordo com o prosseguimento das etapas de diferenciação e mineralização <sup>(164)</sup>. Resultados deste trabalho mostram uma elevada expressão de colágeno tipo I em células expostas ao produto iônico dos vidros bioativos em meio osteogênico e basal. A expressão de colágeno tipo I foi observada já após o 7º dia, indicando que o produto iônico dos materiais apresenta papel importante na diferenciação osteogênica de hMSCs e formação da matriz extracelular. Resultados indicam a formação da matriz celular sem a necessidade de suplementos osteogênicos, já que uma elevada expressão foi observada também em meio basal, confirmando o efeito osteogênico do produto iônico dos vidros bioativos.



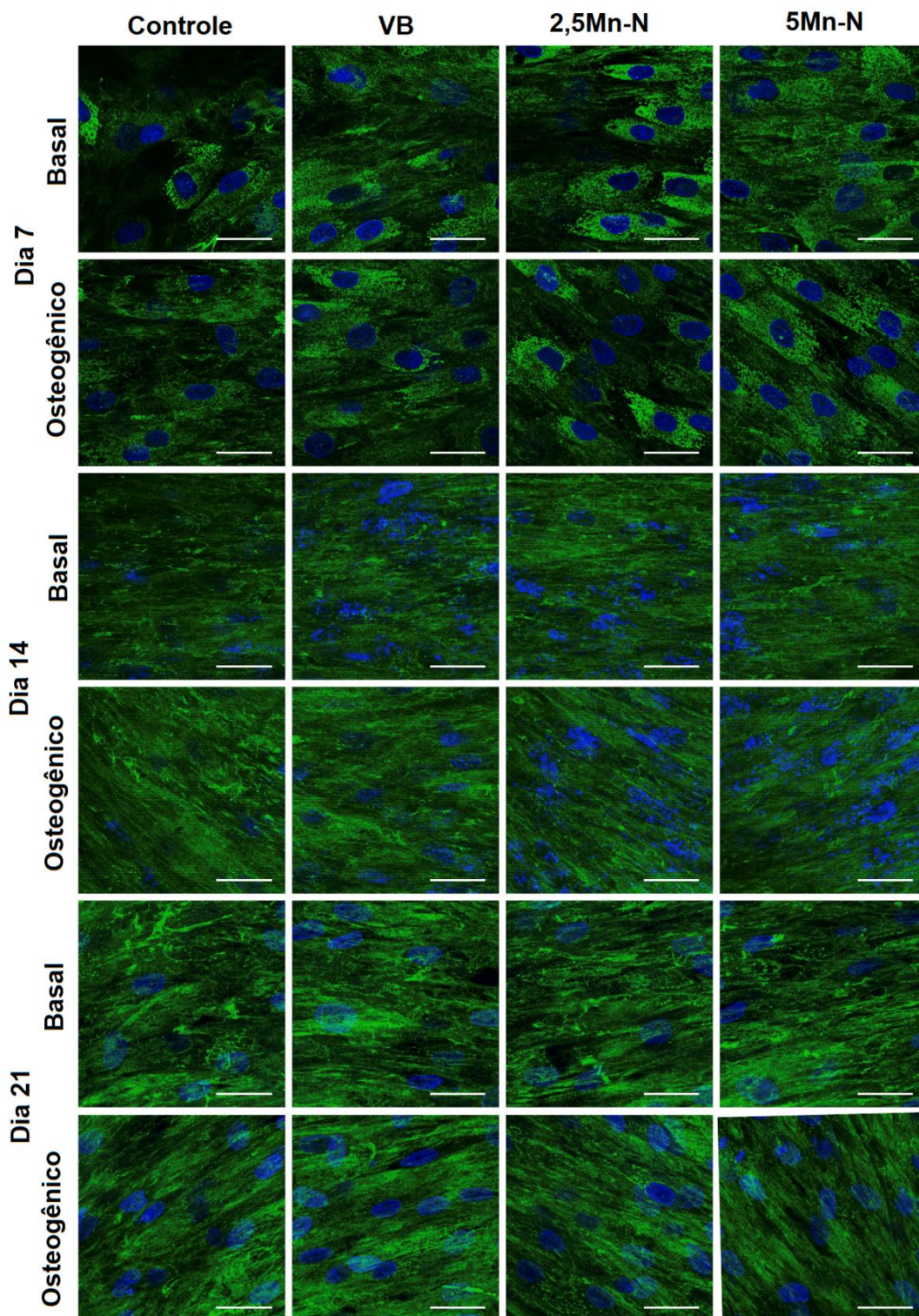


Figura 5.11: Imagens de fluorescência de hMSCs expostas ao produto iônico de vidros bioativos apresentando a expressão de colágeno tipo I em meio basal e osteogênico após 7, 14 e 21 dias. Corantes DAPI (fluorescência azul) e colágeno tipo I (fluorescência verde). A barra de escala representa 50 $\mu$ m.

Imagens de fluorescência nas quais a expressão de osteopontina de hMSCs após 7, 14 e 21 dias de exposição ao produto iônico dos vidros bioativos foi avaliada são apresentadas na Figura 5.12. A osteopontina é um reconhecido marcador osteogênico

que regula a formação de nódulos minerais e leva à osteogênese, e sua expressão é geralmente relacionada com a habilidade de mineralização <sup>(64)</sup>. Proteínas não colágenas como a osteopontina controlam a nucleação, crescimento, forma e tamanho dos cristais de hidroxiapatita, e ainda auxiliam na ligação entre a fração orgânica (colágeno) e inorgânica (hidroxiapatita) no tecido ósseo <sup>(165)</sup>. A expressão de osteopontina é observada anteriormente à osteocalcina no processo de diferenciação osteogênica, porém ambos apresentam expressão somente por osteoblastos completamente diferenciados <sup>(164)</sup>. Observa-se pela Figura 5.12 que houve expressão de osteopontina de hMSCs expostas ao produto iônico dos vidros bioativos em meio basal (após 21 dias) e osteogênico (após 14 dias). O resultado está de acordo com o observado para a atividade da ALP e colágeno tipo I, que possuem elevada expressão durante os períodos iniciais de diferenciação, porém sendo substituídos pela expressão osteopontina e osteocalcina devido ao início de uma nova etapa do processo de diferenciação. Resultados mostram também que a utilização de meio osteogênico pode acelerar o processo de diferenciação osteogênica e mineralização, porém não é necessário para que ocorra, já que a expressão do marcador osteopontina foi observada mesmo em meio basal.



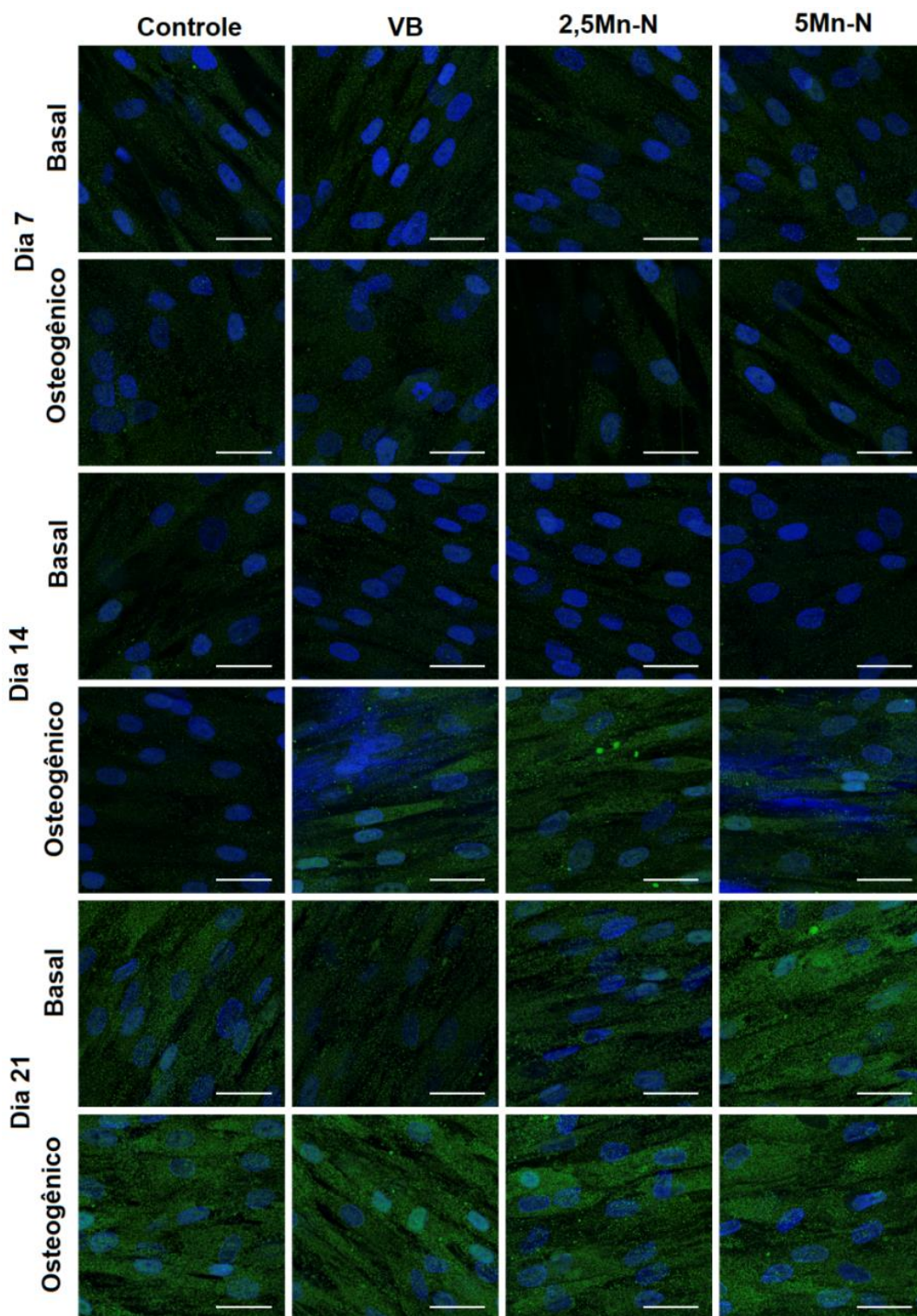


Figura 5.12: Imagens de fluorescência de hMSCs expostas ao produto iônico de vidros bioativos apresentando a expressão de osteopontina em meio basal e osteogênico após 7, 14 e 21 dias. Corantes DAPI (fluorescência azul) e osteopontina (fluorescência verde). A barra de escala representa 50 $\mu$ m.

Na sequência hierárquica de eventos que ocorrem durante a diferenciação e maturação dos osteoblastos, a biosíntese de colágeno tipo I e atividade da ALP são seguidas pela expressão de osteopontina, deposição de sialoproteína óssea, e

posteriormente pela síntese de osteocalcina <sup>(163,166)</sup>, outra proteína não colágena da matriz extracelular óssea, considerada o marcador mais específico para osteoblastos maduros, característica dos estágios finais da diferenciação <sup>(167,168)</sup>. Pela Figura 5.13 pode-se observar uma maior intensidade na expressão de osteocalcina após 21 dias de exposição ao produto iônico dos vidros bioativos, tanto em meio basal quanto em meio osteogênico, sugerindo um aprimoramento no desenvolvimento de um fenótipo típico de osteoblastos maduros devido à liberação iônica dos vidros. Células expostas ao produto iônico contendo manganês apresentaram mais elevada intensidade de expressão de osteocalcina quando comparados com o controle e VB, indicando que a presença de Mn foi favorável no processo de formação de osteoblastos maduros e mineralização óssea.

Já os depósitos de cálcio foram avaliados pela coloração alizarina vermelha S (Figura 5.14). No início do processo de mineralização óssea, proteínas como osteonectina e osteopontina são expressas, e assim que a mineralização é completada, depósitos de cálcio podem ser visualizados utilizando corante alizarina vermelha S <sup>(64)</sup>. A presença de depósitos de cálcio não foi observada nos 7 dias iniciais de estudo, já que o processo de diferenciação ainda estava na fase inicial, conforme observado pelos marcadores ALP, osteocalcina e osteopontina. No entanto, 14 dias após exposição das hMSCs ao produto iônico de vidros bioativos pode-se observar o aparecimento de nódulos de cálcio, com maior intensidade para os grupos em meio osteogênico, nos quais a presença de suplementos pode ter acelerado o processo de mineralização. Após 21 dias, observa-se a presença de nódulos de cálcio também nos grupos cultivados em meio basal, indicando a influência do produto de dissolução no processo de diferenciação e mineralização. Em meio osteogênico foi também observada uma maior intensidade de depósitos de cálcio após 21 dias de estudo quando o produto iônico dos vidros bioativos estava presente. Os resultados estão de acordo com o observado anteriormente para a expressão de osteocalcina e osteopontina, genes associados com a mineralização, e que apresentaram mais elevada expressão após 14 dias em meio osteogênico, e 21 dias em meio basal. Esse estudo confirma ainda que a utilização de agentes osteogênicos não é necessária para o processo de diferenciação e mineralização óssea, podendo ser estimulado pelo produto iônico dos vidros bioativos, porém o efeito sinérgico entre o produto de dissolução dos vidros bioativos e os suplementos osteogênicos podem favorecer o processo.

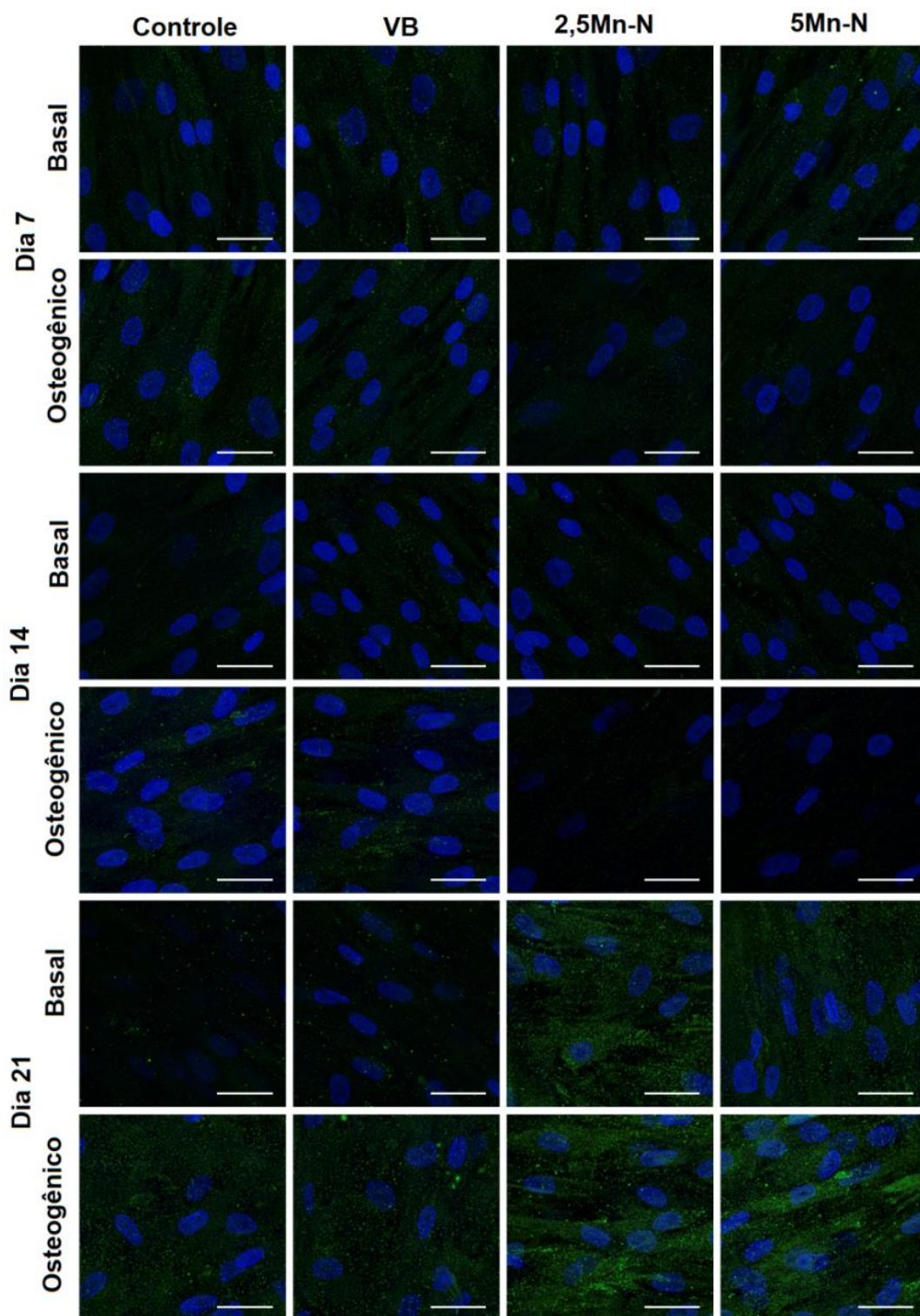


Figura 5.13: Imagens de fluorescência de hMSCs expostas ao produto iônico de vidros bioativos apresentando a expressão de osteocalcina em meio basal e osteogênico após 7, 14 e 21 dias. DAPI (fluorescência azul) e osteocalcina (fluorescência verde). Barra de escala de 50 $\mu$ m.



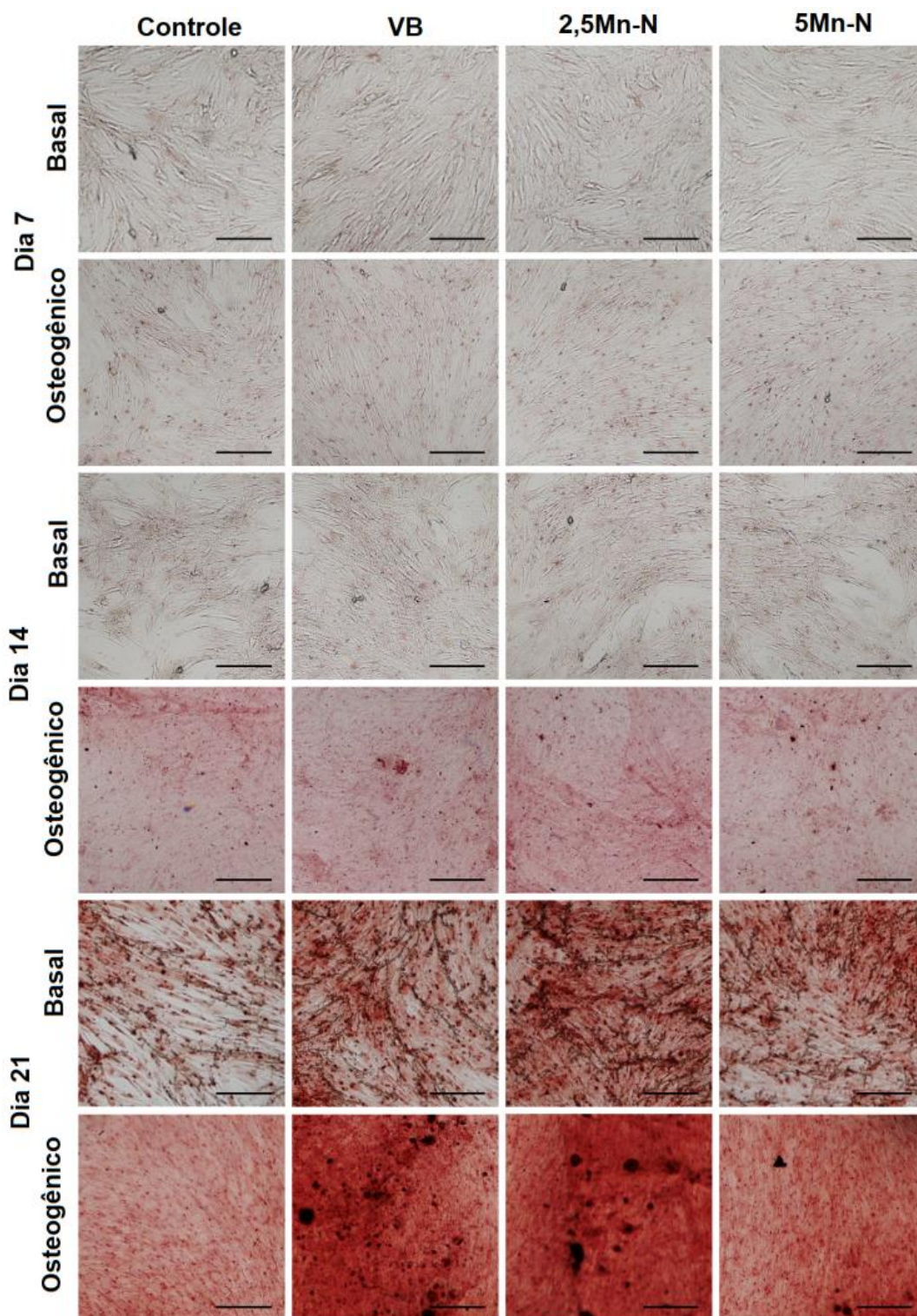


Figura 5.14: Mineralização da matriz de hMSCs após exposição ao produto iônico dos vidros bioativos por 7, 14 e 21 dias em meio basal e osteogênico. Células foram coradas com alizarina vermelha S para visualização de depósitos de cálcio formados. Barra de escala 100µm.

O estudo osteogênico indicou, de forma geral, que os produtos de dissolução dos vidros bioativos foram capazes de estimular todos os estágios da diferenciação de hMSCs e subsequente mineralização, em análise realizada durante 21 dias de cultura.

A fase inicial do processo de diferenciação foi demonstrada pela atividade ALP e expressão de colágeno tipo I, no qual a capacidade de diferenciação celular foi observada em todas as condições de culturas. O prosseguimento se deu pela expressão de osteopontina, regulador da formação de nódulos minerais, enquanto que o desenvolvimento de osteoblastos maduros foi indicado pela expressão de osteocalcina. Depósitos de cálcio foram também observados, indicando a finalização do processo de mineralização, com formação mais rápida em meio osteogênico. Resultados indicam que o produto de dissolução de vidros bioativos é capaz de estimular a diferenciação osteogênica de hMSCs mesmo sem a presença de suplementos osteogênicos, com o desenvolvimento de osteoblastos maduros <sup>(167)</sup>, os quais apresentaram maior expressão quando produtos de dissolução contendo manganês foram utilizados. A incorporação de Mn de vidros bioativos se mostra como uma potencial estratégia para aprimoramento da regeneração óssea.

#### **5.4 Conclusões**

Vidros bioativos derivados do processo sol-gel foram obtidos a partir da incorporação de Mn na sua estrutura, em diferentes composições, conforme avaliado por ICP-OES. Amostras apresentaram elevada área superficial específica e nanoporosidade inerente do processo. Análises estruturais demonstraram que a utilização de nitrato de manganês é eficaz na incorporação desse íon na estrutura de vidros bioativos. A incorporação de Mn não provocou alterações significativas na rede do material em comparação à composição 58S, e uma estrutura com caráter predominantemente amorfa foi obtida, sendo favorável para manutenção da bioatividade. Análises de XPS indicam a presença majoritária de  $Mn^{2+}$  na estrutura dos vidros bioativos, e capacidade de liberação iônica controlada em DMEM foi observada por ensaios de dissolução. O estudo de viabilidade celular indicou que as células hMSCs expostas ao produto iônico dos materiais apresentaram um aumento da atividade mitocondrial, demonstrando que eles não são tóxicos nas condições utilizadas. O produto de dissolução dos vidros bioativos, em especial aqueles contendo Mn, demonstrou ainda capacidade de estimular os diferentes estágios de diferenciação osteogênica de hMSCs e subsequente mineralização, mesmo na ausência de adição de fatores de indução osteogênica. O efeito do manganês no processo de diferenciação e mineralização óssea foram observados principalmente pela marcação da osteocalcina, em que uma maior expressão foi observada quando esse íon estava presente, indicando que a incorporação de Mn é uma potencial estratégia para obtenção de materiais superiores para a regeneração de tecidos.

## **CAPÍTULO 6. Influência da incorporação de cobalto e da seleção do precursor na estrutura e propriedades de vidros bioativos**

---

### **6.1 Introdução**

Um fator importante que deve ser avaliado quando se deseja obter novas composições de vidros bioativos é o efeito da utilização de diferentes precursores na estrutura e propriedades do material obtido <sup>(107)</sup>. Por exemplo, trabalho anterior relata que a utilização de diferentes precursores de fósforo (trietilfosfato, ácido fosfórico e pentóxido de fósforo dissolvido em etanol) resultou em tempos de gelificação e mineralização diferentes em vidros bioativos e vitro-cerâmicas do sistema  $\text{SiO}_2 - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{CaO}$ , embora ainda apresentando bioatividade <sup>(46,107)</sup>. Além disso, a avaliação da incorporação de cálcio, um modificador de rede, mostrou que esse íon entra na estrutura do vidro somente acima de  $400^\circ\text{C}$  quando nitrato de cálcio é utilizado como precursor, mas entra na rede em temperatura ambiente quando o metoxietóxido de cálcio é utilizado, e não é incorporado em nenhuma temperatura quando se utiliza o cloreto de cálcio como precursor <sup>(169)</sup>. De forma semelhante, o precursor do lítio também demonstrou influência na estrutura final do material, resultando em um material vitro-cerâmico denso quando nitrato de lítio foi utilizado para incorporação em vidros bioativos, enquanto que a utilização de citrato de lítio favoreceu a formação do vidro bioativo contendo lítio como modificador de rede <sup>(9)</sup>. Portanto, torna-se importante a avaliação dos diferentes precursores para a obtenção de novas composições de vidros bioativos contendo diferentes íons.

A incorporação de cobalto em biomateriais tem atraído atenção nos últimos anos, devido ao seu conhecido potencial angiogênico, aprimorando o reparo de tecidos <sup>(156,170)</sup>. Diferentes trabalhos relatam a sua incorporação em vidros bioativos derivados do processo de fusão <sup>(14,85)</sup>, com conseqüente promoção da neovascularização. Vidros bioativos contendo cobalto obtidos pelo processo sol-gel foram recentemente relatados por Wu e pesquisadores <sup>(88)</sup>, no qual foram avaliados *scaffolds* mesoporosos com capacidade de indução da hipóxia e efeito angiogênico. No entanto, não há relatos de estudos sobre a influência da utilização de diferentes precursores de cobalto para obtenção de vidros bioativos pela rota sol-gel, o que pode influenciar as propriedades e conseqüentemente o desempenho do material. Tendo isso em vista, este capítulo visa a obtenção de vidros bioativos contendo Co, derivados da composição 58S, como potencial estratégia para a liberação controlada de Co em meio fisiológico,

avaliando-se o efeito da incorporação desse íon e da seleção do precursor nas propriedades do material.

## 6.2 Materiais e Métodos

Os estudos apresentados nesse capítulo também foram realizados durante o período de doutorado sanduiche no Imperial College London. Reagentes, metodologias e equipamentos diferentes foram utilizados para sínteses e análises em relação ao capítulo subsequente, o que ocasionou pequenas variações nos resultados em amostras de composição similar.

Vidros bioativos foram sintetizados pelo método sol-gel, conforme relatado em trabalhos anteriores<sup>(57,171)</sup>, na composição 58S (60% SiO<sub>2</sub> - 36% CaO - 4% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, % molar). Foram utilizados reagentes da *Sigma-Aldrich*, salvo indicações ao contrário. TEOS (tetraetilortosilicato 98%) e TEP (trietilfosfato 99%) foram hidrolisados em meio ácido (ácido nítrico 2M) contendo água deionizada (taxa molar H<sub>2</sub>O/TEOS = 12) por 1 hora com agitação magnética. Logo após, nitrato de cálcio (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O) foi dissolvido no sol, e agitado por mais uma hora. O gel obtido foi seco por 72 horas em recipiente fechado, seguido por secagem com aumento de 10°C por dia até se alcançar 120°C. Logo após, amostras foram tratadas a 650°C, com taxa de aquecimento de 2°C.min<sup>-1</sup> por 3 horas, moídas e peneiradas para se obter partículas menores que 150µm.

Amostras contendo cobalto foram obtidas utilizando-se cloreto de cobalto (CoCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, *Acros Organics*) e nitrato de cobalto (Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O), sendo incorporados na estrutura dos vidros bioativos a partir da substituição parcial do teor de cálcio, para se obter 5,0% CoO (%molar). O respectivo sal de cobalto foi adicionado previamente à etapa de adição do precursor do cálcio para cada composição. Amostras foram denominadas VB (composição 58S), 5Co-N (obtida utilizando-se nitrato de cobalto) e 5Co-C (obtida utilizando-se cloreto de cálcio).

### 6.2.1 Caracterização das amostras de vidro bioativo

**Composição Química.** A análise foi realizada por ICP-OES (espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado) em equipamento Thermo Scientific iCaP 6000series. As amostras foram preparadas pela digestão ácida, no qual 50mg de cada amostra foi misturada em um cadinho de platina com 250mg de

metaborato de lítio anidro (80% p/p) e tetraborato de lítio (20% p/p), e então fundidos na mufla por 30 minutos à 1050°C. Após resfriamento, as amostras foram completamente dissolvidas em ácido nítrico 2M. As concentrações de Si, Ca, P e Co em cada amostra foram determinadas por ICP-OES, e as proporções de SiO<sub>2</sub>, CaO, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e CoO foram calculadas.

**Análise térmica.** A análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria diferencial exploratória (DSC) foram realizadas em equipamento Netzsch STA 449C, previamente ao processo de estabilização térmica das amostras. As análises foram realizadas de 30 a 1000°C, com taxa de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>, em ar. Um cadinho de platina vazio foi utilizado como referência.

**Análise Estrutural.** Foi realizada Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) em equipamento Thermo Scientific Nicolet iS10 contendo acessório de reflectância total atenuada. Espectros foram obtidos entre 400 e 4000cm<sup>-1</sup> (64 escaneamentos por espectro; resolução de 4cm<sup>-1</sup>). A Difração de Raios-X (DRX) foi realizada em equipamento Bruker D2, com passo de 0,02 entre 7 e 70° (2θ), sem giro, utilizando-se fonte de radiação de CuKα. A Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X (XPS) foi realizada em um sistema Thermo Scientific k-Alpha<sup>+</sup> operando a uma pressão base de 2 x 10<sup>-9</sup>bar. Foi utilizada uma fonte monocromada de raios-X AlKα (hv = 1486,6eV), com um analisador hemisférico de dupla focagem a 180° contendo um detector 2D. A corrente de emissão da fonte de raios-X foi de 6mA e tensão de polarização de 12kV. Para minimizar o efeito de carga foi utilizada um filtro de elétrons, e deslocamentos remanescentes da energia de ligação (BE) devido à cargas das amostras foram corrigidas utilizando a linha C 1s na BE de 285,0eV. Todos os dados foram avaliados utilizando software Advantage XPS, e espectros de alta resolução foram obtidos para Si 2p, O 1s e Co 2p.

**Propriedades Texturais.** As amostras foram desgaseificadas por 24 horas a 200°C previamente à análise. Análise de adsorção de nitrogênio foi realizada em equipamento Quantachrome Autosorb AS-6 multi-estações com 40 pontos de adsorção e 40 pontos de dessorção. Foi aplicado o método Brunauer-Emmett-Teller (BET) para avaliação da área superficial específica e Barret-Joyner-Halenda (BJH) em curvas de dessorção para a avaliação do tamanho e distribuição de poros.

**Estudo de dissolução.** Foram imersas 75mg de vidros bioativos em 50mL de solução SBF (*Simulated Body Fluid*), mantidos em recipiente lacrado e incubados à 37°C com



agitação de 120rpm por diferentes períodos de tempo (4, 8, 24, 72h, 1 semana e 2 semanas), conforme sugerido previamente <sup>(56)</sup>. SBF foi preparado conforme descrito por Kokubo e pesquisadores <sup>(55)</sup>. Em cada período de tempo, 1mL dos extratos foram removidos, e substituídos por 1mL de SBF para manter o conteúdo da solução. O extrato removido foi diluído em ácido nítrico (2M), filtrados (0,22 $\mu$ m) e a concentração de Si, Ca, P e Co em solução foram obtidas por ICP-OES.

As micropartículas utilizadas no ensaio foram filtradas após duas semanas de estudos, lavadas com acetona, secas à 60°C por 24 horas, e avaliadas por FTIR e DRX. A morfologia das amostras após ensaio em SBF foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), realizada em microscópio LEO 1525 contendo coluna de emissão GEMINI, operando a 5kV. Amostras foram recobertas com cromo previamente à análise.

### 6.3 Resultados e discussão

#### 6.3.1 Análise da composição química

A Tabela 6.1 apresenta a composição química nominal e a composição determinada por ICP-OES dos vidros bioativos após estabilização do material a 650°C. Foi observado um teor ligeiramente mais elevado de CoO para a amostra 5Co-N, enquanto que o teor de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> apresentou a maior diferença relativa entre a composição nominal e a composição determinada. No entanto, de acordo com os resultados obtidos, o precursor de cobalto não afetou a composição final dos vidros bioativos.

Tabela 6.1: Composição química nominal e determinada pelo método de fusão de metaborato de lítio e ICP-OES (%mol) das amostras VB, 5Co-C e 5Co-N.

	Composição nominal (% mol)				Composição ICP-OES (% mol)			
	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	CaO	CoO	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	CaO	CoO
<b>VB</b>	60,0	4,0	36,0	-	61,3 ± 0,9	3,2 ± 0,6	35,5 ± 0,9	-
<b>5Co-C</b>	60,0	4,0	31,0	5,0	58,1 ± 1,9	3,4 ± 0,5	33,2 ± 2,3	5,3 ± 0,4
<b>5Co-N</b>	60,0	4,0	31,0	5,0	58,9 ± 0,8	3,1 ± 0,4	32,5 ± 0,5	5,5 ± 0,3

#### 6.3.2 Análise térmica

Para avaliar a influência da incorporação de cobalto no comportamento térmico dos vidros bioativos, TGA e DSC foram realizados (Figura 6.1) nas amostras obtidas previamente ao processo de tratamento térmico. Observa-se pela curva de TGA

(Figura 6.1 (a)) três regiões de perda de massa, conforme o material foi aquecido de 30 até 1000°C. O estágio inicial, de 30 a 180°C, com 10% de perda de massa em todas as amostras, é relacionado principalmente à remoção de resíduos do processo sol-gel, como álcoois, e à dessorção endotérmica de água fisicamente adsorvida <sup>(105)</sup>. Conforme o aquecimento progrediu, observou-se um segundo estágio de perda de massa, entre 200 e 450°C, com adicionais 15 – 25% de perda de massa, relacionada à liberação de água quimicamente adsorvida e perda de grupos orgânicos dos precursores sol-gel <sup>(107)</sup>. O último estágio deu-se entre 450 e 600°C, com adicionais 10 – 15% de perda de massa, sendo relacionado à decomposição de nitratos (NO<sub>3</sub>) introduzidos na síntese como nitratos metálicos, e também à condensação adicional de hidroxilas na superfície do material. A diferença observada na perda de massa total entre as diferentes amostras pode ser relacionada ao excesso de subprodutos da síntese sol-gel e à adsorção de água pela superfície altamente reativa dos vidros. Observou-se estabilização da massa acima de 600°C.

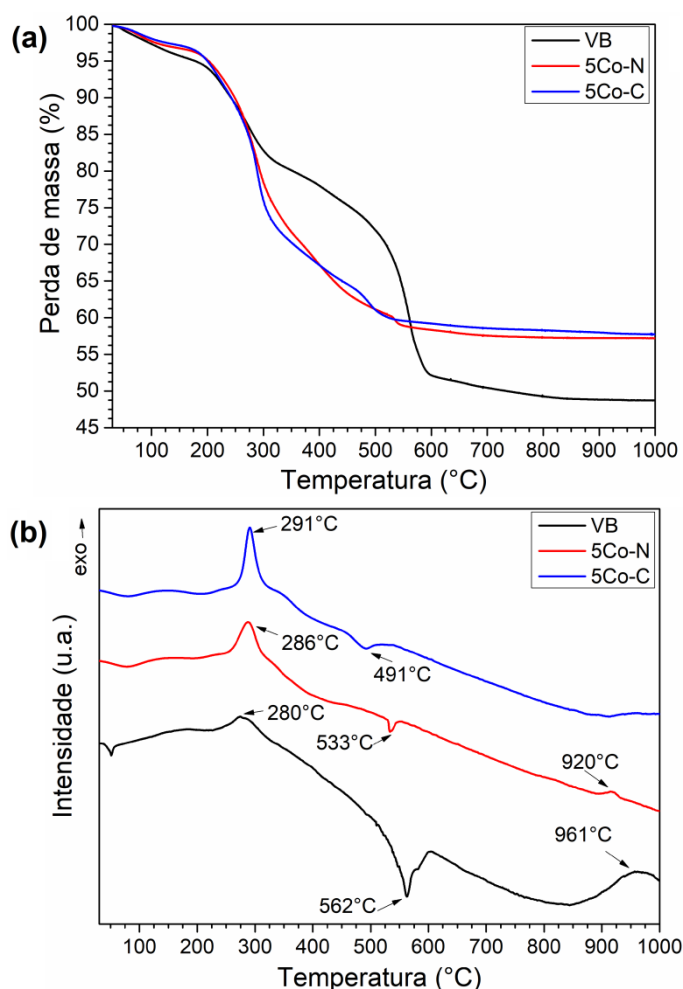


Figura 6.1: (a) Análise termogravimétrica (TGA) e (b) Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) de vidros bioativos obtidos por diferentes precursores de Co.

A análise por DSC (Figura 6.1 (b)) revelou uma transição exotérmica bem definida entre 278 e 286°C, relacionada à remoção de precursores remanescentes do processo sol-gel <sup>(107)</sup>. Uma transição endotérmica entre 490 e 570°C, relacionada à decomposição do nitrato também foi observada. Essa transição foi observada em menor intensidade para 5Co-C, já que nessa amostra o nitrato de cálcio foi parcialmente substituído por cloreto de cobalto. A presença de nitrato de cobalto também pode afetar a temperatura dessa transição, já que esse sal apresenta menor temperatura de degradação quando comparado com o nitrato de cálcio <sup>(172)</sup>. Observou-se também uma transição exotérmica acima de 900°C, relacionada à cristalização dos vidros. Fases cristalinas podem afetar a bioatividade do material, já que reduzem a possibilidade de reações de troca iônica com o meio fisiológico. Baseado na avaliação térmica das amostras de vidro bioativo, o programa de tratamento térmico foi configurado para 650°C por 3 horas, com taxa de aquecimento de 2°C.min<sup>-1</sup>, suficiente para remoção total dos nitratos presentes e mantendo a estrutura predominantemente amorfa.

### 6.3.3 Avaliação estrutural

A Figura 6.2 apresenta a avaliação estrutural das amostras obtidas por FTIR. Bandas típicas de vidros bioativos foram observadas, não sendo notadas bandas relativas aos grupos nitratos, confirmando que o programa de tratamento térmico foi adequado para a sua completa remoção. A deformação angular de grupos Si-O pode ser relacionada à absorção em 580cm<sup>-1</sup> <sup>(136)</sup>, relacionada à estruturas amorfas de sílica, enquanto que o estiramento simétrico Si-O é reportado em 810cm<sup>-1</sup> <sup>(106)</sup>. O estiramento assimétrico de ligações Si-O-Si é observado como uma banda larga entre 1000 e 1200cm<sup>-1</sup> <sup>(24)</sup>, com máxima intensidade em 1050cm<sup>-1</sup> para todas as amostras. A absorção máxima para essa vibração é normalmente observada em 1909cm<sup>-1</sup> em amostras de SiO<sub>2</sub>, mas desloca-se para valores mais baixos quando modificadores de rede estão presentes, aumentando o número de oxigênios não ligantes na estrutura do vidro <sup>(173)</sup>. Além disso, a absorvância em 965cm<sup>-1</sup> também pode ser relacionada à estruturas tetraédricas SiO<sub>4</sub> contendo oxigênio não ligantes <sup>(81)</sup>.

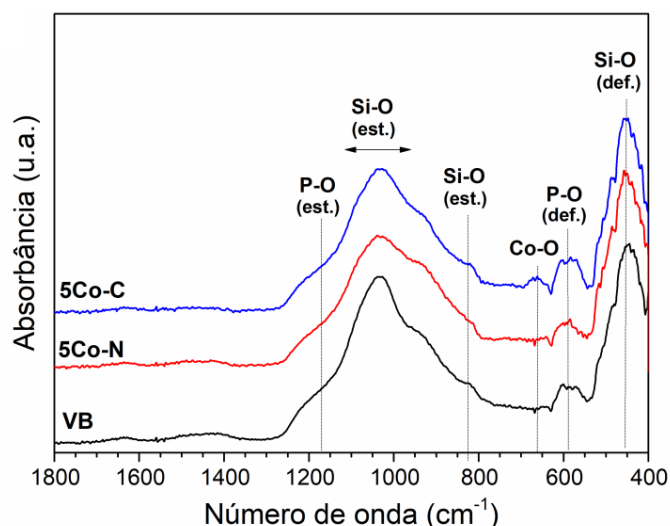


Figura 6.2: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras VB, 5Co-N e 5Co-C.

O estiramento simétrico ( $1160\text{cm}^{-1}$ )<sup>(110)</sup> e a deformação angular ( $500 - 600\text{cm}^{-1}$ ) de ligações P-O também foram observados. Duas bandas distintas, em  $570$  e  $670\text{cm}^{-1}$  são relatadas quando ligações Co(III)-O de estruturas cristalinas de  $\text{Co}_3\text{O}_4$  estão presentes<sup>(174-176)</sup>. Neste trabalho, observou-se a presença de uma banda de absorção em  $670\text{cm}^{-1}$  na amostra 5Co-C, que pode estar relacionada à essa ligação na estrutura do óxido de cobalto; no entanto, a banda em  $570\text{cm}^{-1}$ , também observada, pode estar sobreposta à deformação de ligações P-O na mesma região.

A análise de FTIR demonstrou a presença de bandas de absorção típicas de vidros bioativos em todas as amostras avaliadas, indicando que a estrutura química principal foi mantida apesar da incorporação de Co. Evidência de ligações Co(III)-O foram encontradas quando o cloreto de cobalto foi utilizado como precursor, porém análises adicionais são necessárias para confirmação da presença dessas estruturas.

Os padrões de DRX das amostras de vidro bioativo são apresentados na Figura 6.3. Um halo amplo e difuso entre  $15$  e  $35^\circ$  ( $2\theta$ ) foi observado em todas as amostras, sugerindo a formação de uma estrutura de sílica com caráter predominantemente amorfa<sup>(105)</sup>, embora a maior intensidade entre  $31$  e  $33^\circ$  ( $2\theta$ ) para a amostra VB indique uma organização inicial da estrutura do material, com possível formação de pequenos núcleos de apatita durante o tratamento térmico, conforme relatado anteriormente<sup>(46)</sup>. Picos cristalinos foram observados na análise da amostra 5Co-C, e são compatíveis com estruturas de óxido de cobalto (II,III) ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ , ICSD ref: 01-074-1656)<sup>(177)</sup>, enquanto que para as amostras obtidas utilizando o nitrato de cobalto não foram observados picos cristalinos. O  $\text{Co}_3\text{O}_4$  é um composto estável e pouco solúvel,

apresentando valência mista ( $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Co}^{3+}$ )<sup>(175)</sup>, e sua presença indica que o Co não foi totalmente incorporado na estrutura do material como um modificador de rede quando o cloreto de cobalto foi utilizado como precursor. Apesar das amostras apresentarem caráter predominantemente amorfo, regiões cristalinas podem resultar em uma taxa de dissolução lenta, conseqüentemente afetando a bioatividade do vidro.

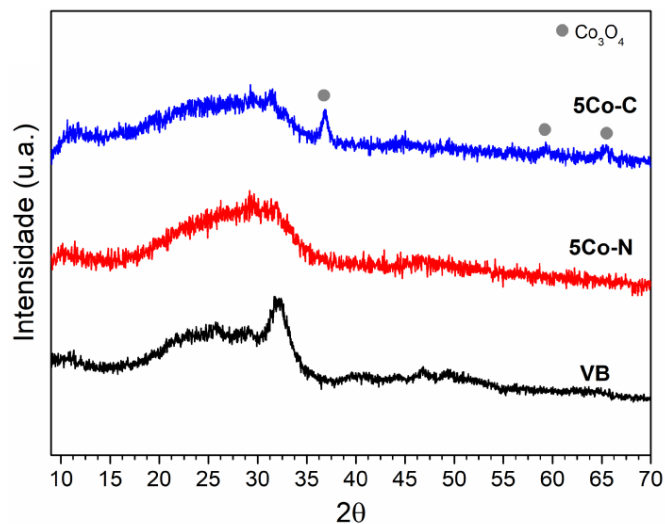


Figura 6.3: Padrão de difração de raios-X (DRX) das amostras VB, 5Co-N e 5Co-C.

Para confirmar o estado de oxidação das espécies e se obter mais detalhes sobre a estrutura dos materiais obtidos, análises de XPS foram realizadas. A Figura 6.4 apresenta o espectro de varredura das amostras de vidro bioativo. Linhas Auger e de fotoemissão do XPS típicas dos constituintes do vidro bioativo foram observadas, juntamente com o pico de C 1s, relacionado à absorção de impurezas de hidrocarbonetos pela superfície do vidro<sup>(117)</sup>. Esse pico foi utilizado como referência para a calibração da energia de ligação (BE – *binding energy*), sendo ajustado para 285,0eV com o objetivo de corrigir o efeito de carga das amostras.

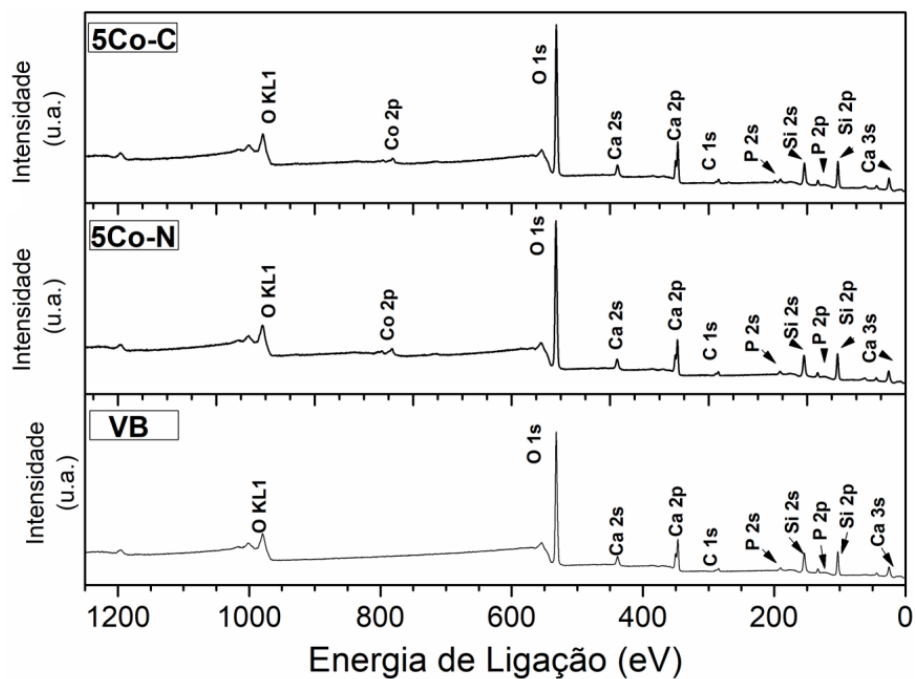


Figura 6.4: Espectro de XPS das amostras do VB, 5Co-N e 5Co-C

A Figura 6.5 (a) apresenta o espectro XPS de alta resolução Si 2p, sendo observada uma banda larga com máximo em 103,5eV para VB, deslocando para 103,4eV para 5Co-C, no entanto mantendo-se na faixa típica da energia de ligação do tetraedro de silício com quatro átomos de oxigênio ( $\text{SiO}_4^{4-}$ )<sup>(145)</sup>.

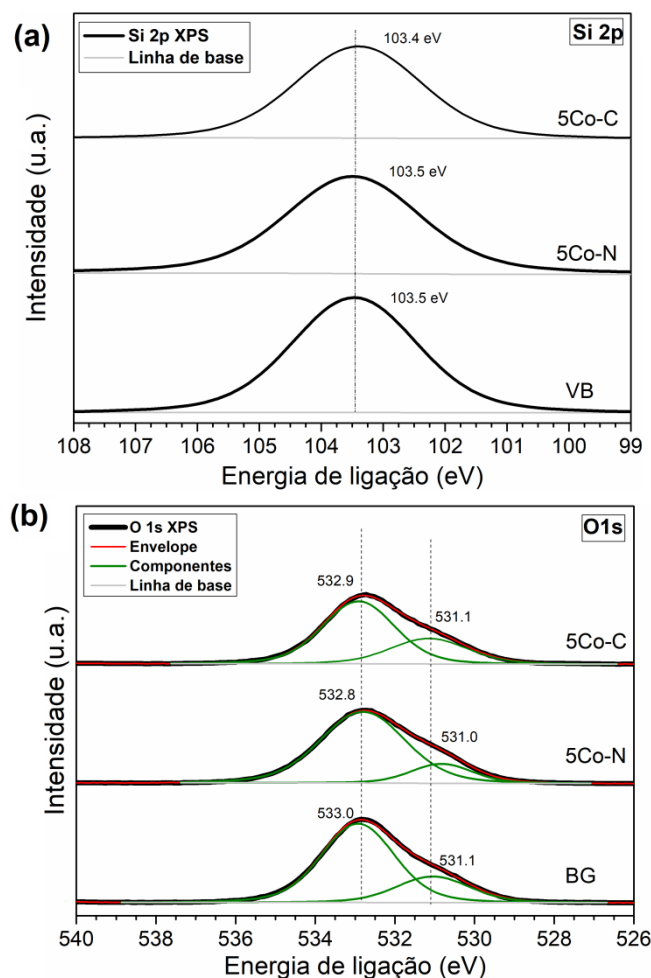


Figura 6.5: Espectro de alta resolução (a) Si 2p (b) O 1s para as amostras VB, 5Co-N e 5Co-C.

A deconvolução do espectro de XPS O 1s, apresentado na Figura 6.5 (b), indica a formação de dois componentes com máximo de energia de ligação em 531,1eV e 533,0eV. O pico com máximo em 533,0eV é relacionado com o oxigênio de silicatos, enquanto que o pico com menor energia de ligação pode ser associado ao oxigênio em fosfatos, sendo na mesma região da energia de ligação O 1s observada para a hidroxiapatita <sup>(144)</sup>. Trabalhos anteriores mostram que átomos de P estão presentes de forma majoritária como ortofosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) na estrutura de vidros bioativos <sup>(46)</sup>, tendo a sua carga balanceada por cátions modificadores de rede, e apenas pequenos teores de ligações Si-O-P são observados <sup>(48)</sup>. Não foram identificadas diferenças significativas entre o espectro Si 2p e O 1s do VB e das amostras contendo cobalto, indicando que a estrutura principal de sílica foi mantida mesmo após a incorporação de Co.

Cobalto pode ser encontrado na estrutura de vidros como  $\text{Co}^{2+}$  ou  $\text{Co}^{3+}$  <sup>(178)</sup>, e embora o XPS seja uma ferramenta utilizada para identificação do estado químico da maioria

dos elementos da tabela periódica, não é um processo simples para espectros de metais de transição, já que certos aspectos típicos desses elementos dificultam a avaliação do estado químico presente, como o desdobramento de multipletos (*multiplet splitting*) e o aparecimento de picos satélites (estruturas “*shake-up*”) <sup>(147)</sup>. No entanto, algumas características do espectro Co 2p podem ser consideradas para a definição do estado de oxidação do cobalto: (a) a energia de ligação Co<sup>2+</sup> (781 – 783eV) é ligeiramente maior que a observada para Co<sup>3+</sup> (779 - 780eV); (b) estruturas satélites “*shake-up*” são observadas no pico de maior spin de espécies Co<sup>2+</sup>; (c) Co<sup>3+</sup> normalmente apresenta menor diferença de energia de ligação entre os picos de diferentes spins (15,0 – 15,5eV) que o Co<sup>2+</sup> (15,7 – 16,0eV) <sup>(179,180)</sup>.

Os escaneamentos de alta resolução Co 2p são apresentados na Figura 6.6, e múltiplos picos podem ser observados entre 772 e 809eV para ambas as amostras contendo esse íon. Picos pares típicos do desdobramento de multipletos (Co 2p<sub>3/2</sub> e Co 2p<sub>1/2</sub>) foram observados em torno de 781 e 797eV <sup>(66,181)</sup>, assim como as estruturas satélites “*shake-up*”, observadas ao lado de maior energia de ligação de cada banda. Essas estruturas satélites “*shake-up*” observadas em ambas as amostras são típicas de espécies de spin alto Co<sup>2+</sup> <sup>(66,178)</sup>. A redução na intensidade dessa banda para 5Co-C pode estar ligada à presença de espécies com diferentes estados de oxidação <sup>(180,181)</sup>. Observou-se ainda que a diferença de energia de ligação entre o Co 2p<sub>3/2</sub> e o Co 2p<sub>1/2</sub> foi de 15,8eV para 5Co-N e ligeiramente menor para 5Co-C (15,5eV), indicando a presença de Co em um estado de oxidação mais alto na amostra 5Co-C <sup>(181)</sup>. Além disso, o espectro Co 2p<sub>3/2</sub> revela a formação de uma estrutura adicional na forma de um “ombro” em torno de 779 eV, que pode ser relacionado à formação de espécies Co<sup>3+</sup>, já que essas espécies são observadas em energia de ligação menores que Co<sup>2+</sup> <sup>(147,179)</sup>.

Resultados de XPS indicam que o cobalto está presente majoritariamente como Co<sup>2+</sup> na estrutura dos vidros, mas indícios da formação de espécies Co<sup>3+</sup> também foram obtidos quando o precursor utilizado foi o cloreto de cobalto. Tais resultados estão de acordo com a avaliação anterior feita por DRX, que mostrou a formação de estruturas Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> para a amostra 5Co-C, um composto formado pela mistura de Co<sup>2+</sup> e Co<sup>3+</sup>.



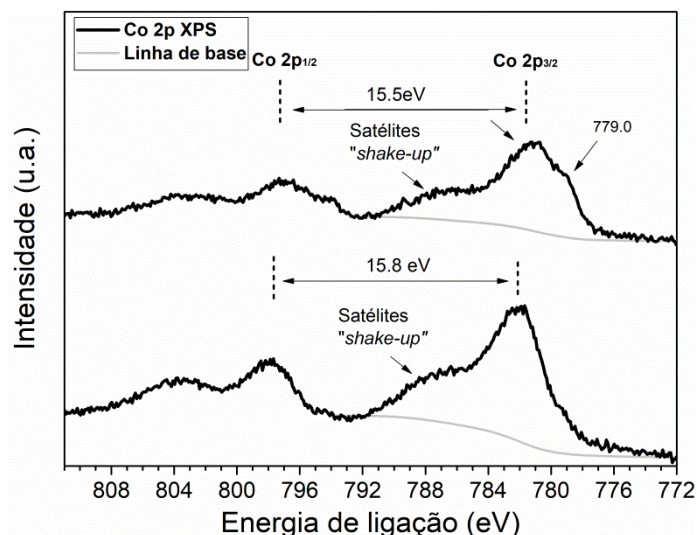


Figura 6.6: Espectro de alta resolução XPS Co 2p das amostras 5Co-N e 5Co-C.

### 6.3.4 Propriedades texturais

Análises de adsorção de nitrogênio foram realizadas para avaliar as propriedades texturais dos vidros bioativos. Isotermas representativas da adsorção/dessorção de nitrogênio e a curva de distribuição de poros derivadas da dessorção (modelo BJH) são apresentadas na Figura 6.7, e os valores obtidos por BET e algoritmo BJH são apresentados na Tabela 6.2. Foram identificadas isotermas do tipo IV com ciclo de histerese em todos os casos, característico de materiais com larguras de poros variando de 2 a 50nm (mesoporosos) <sup>(144)</sup>. Durante a etapa de secagem da rota sol-gel, a remoção de subprodutos de condensação presentes na rede resulta na formação de nanoporos, típicos destes materiais <sup>(41)</sup>. As amostras apresentaram também uma distribuição estreita e monomodal de tamanho de poros, conforme observado na Figura 6.7 (b), com ligeira redução no tamanho médio de poros após a incorporação de cobalto. Uma elevada área superficial específica foi observada, conforme apresentado na Tabela 6.2, e que estão de acordo com valores previamente relatados para materiais similares <sup>(110)</sup>. Houve redução do volume total de poros nas amostras contendo cobalto, conseqüentemente reduzindo também a área superficial específica, embora sem diferença estatística significativa.

A presença de poros dentro da faixa mesoporosa é favorável na indução da nucleação e cristalização de HAC, já que os poros podem atuar como sítios de nucleação. O número de sítios disponíveis e o tamanho dos poros controlam a taxa de nucleação e posterior cristalização de HAC na superfície do vidro <sup>(134)</sup>, conseqüentemente afetando a bioatividade, portanto vidros bioativos com alta área superficial e estrutura mesoporosa são de interesse para a engenharia de tecidos.

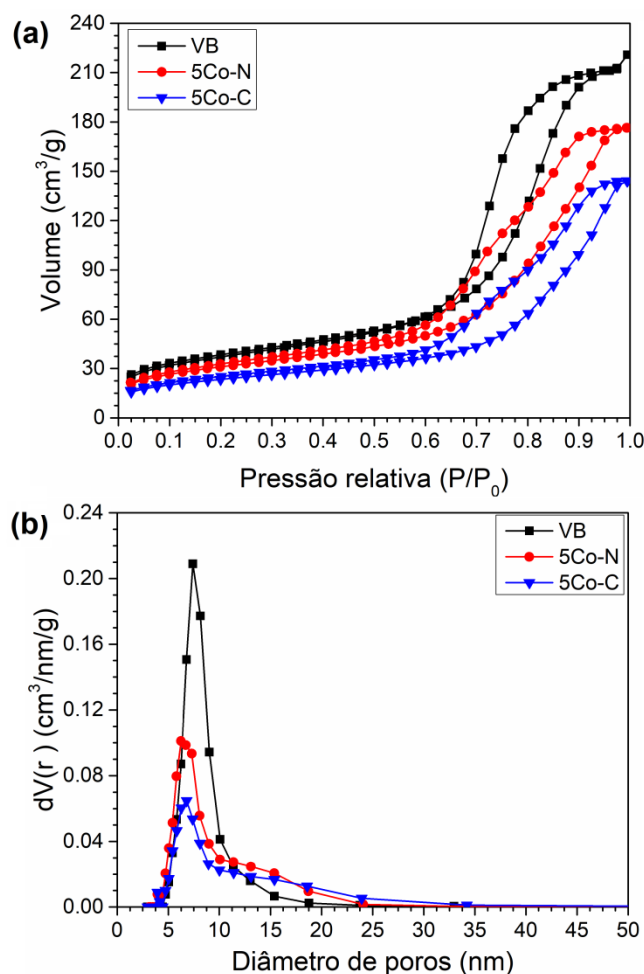


Figura 6.7: (a) Isothermas de adsorção de nitrogênio e (b) distribuição de tamanhos de poros (algoritmo BJH derivado das curvas de dessorção) das amostras VB, 5Co-C e 5Co-N.

Tabela 6.2: Propriedades texturais obtidas pelos métodos BET e BJH para as amostras VB, 5Co-N e 5Co-C.

Amostras	Área superficial específica (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	Volume de poros total (cm <sup>3</sup> .g <sup>-1</sup> )	Diâmetro médio de poros (nm)
<b>VB</b>	124,0 ± 11,8	0,365 ± 0,011	7,6 ± 0,4
<b>5Co-N</b>	113,6 ± 8,7	0,297 ± 0,019	6,6 ± 0,6
<b>5Co-C</b>	96,6 ± 14,3	0,261 ± 0,44	6,4 ± 0,2

### 6.3.5 Dissolução e bioatividade em SBF

A Figura 6.8 apresenta a concentração de Si, Ca, P e Co em solução após imersão dos vidros bioativos em SBF por diferentes períodos de tempo, conforme avaliados por ICP-OES. Não foram observadas diferenças significativas no perfil de liberação de

silício entre os diferentes vidros bioativos, com estabilização da concentração após 24 horas de ensaio, mantendo-se na faixa de 62 a 70 ppm. Embora o Co tenha sido incorporado em substituição parcial ao teor de Ca nas amostras de vidro bioativo e, conseqüentemente, o teor de Ca seja menor nas amostras contendo Co, a concentração de cálcio em SBF foi maior para 5Co-N, enquanto que VB e 5Co-C apresentaram perfil de liberação de Ca similar. As diferenças observadas entre a liberação iônica das amostras 5Co-N e VB podem estar relacionadas à formação de uma rede menos interconectada devido à incorporação de Co, conseqüentemente aumentando a taxa de dissolução dessa amostra, especialmente durante as 8 horas iniciais de imersão <sup>(141)</sup>. A liberação de cálcio tem um papel importante no processo de biomineralização, podendo também induzir a proliferação de osteoblastos, aumentando o potencial terapêutico do biomaterial <sup>(142)</sup>.

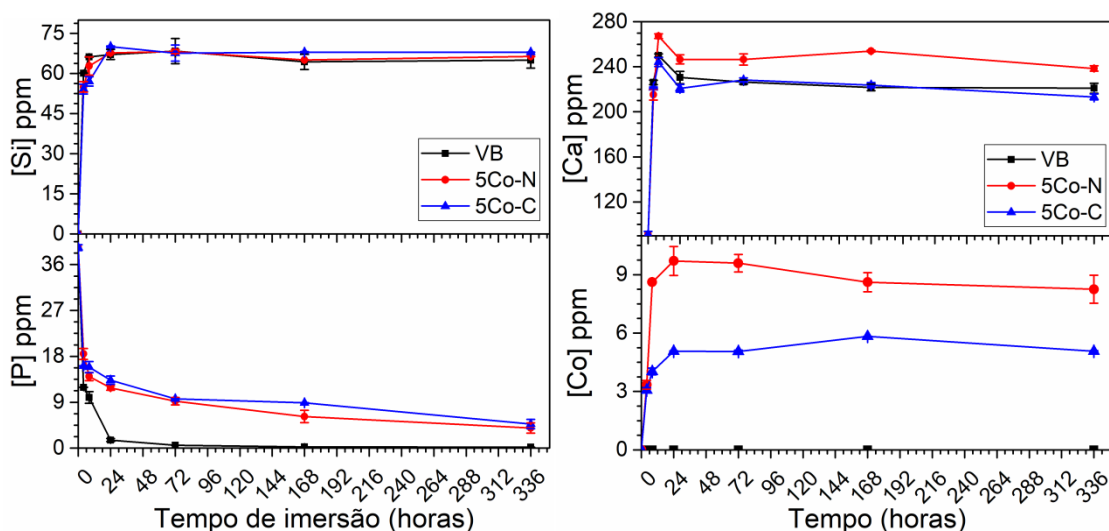


Figura 6.8: Concentração de Si, P, Ca e Co em SBF por diferentes períodos de tempo.

A concentração de P reduziu imediatamente após imersão das amostras em SBF, sendo relacionada à migração do  $\text{PO}_4^{3-}$  da solução para a superfície do vidro e formação de uma camada rica em fosfatos <sup>(135)</sup>. Para o VB, a concentração de fosfato caiu para próximo a zero em 24 horas, enquanto que para os vidros bioativos contendo Co essa redução foi mais lenta, atingindo um mínimo de aproximadamente 7ppm após 2 semanas. Tal observação pode estar relacionada à redução da taxa de precipitação de fosfatos na superfície dos vidros bioativos, com conseqüente redução na formação da camada de fosfato de cálcio e HAC. Portanto, os resultados indicam que a incorporação de Co reduziu a taxa de formação da camada de HAC durante as duas semanas de estudo.

Uma liberação rápida de Co foi observada durante as primeiras horas de ensaio, estabilizando-se após 24 horas e atingindo a máxima concentração de 10 e 6ppm para as amostras 5Co-N e 5Co-C, respectivamente. O uso de diferentes precursores afetou a liberação iônica, obtendo-se uma menor concentração final em solução para a amostra 5Co-C. A área superficial específica e a conectividade de rede podem afetar o perfil de dissolução de vidros, mas como o perfil de liberação de silício para as diferentes amostras foi similar, outros fatores podem estar influenciando o perfil de liberação. As diferenças na concentração de Co obtidas podem estar relacionadas ao óxido de cobalto (II,III) presente no 5Co-C, já que essa fase cristalina apresenta solubilidade baixa em meio aquoso <sup>(182)</sup>. Portanto, o cobalto liberado pode ser proveniente da fração de íons que não se cristalizaram, apesar de que cristais inteiros também podem ser liberados em solução.

Trabalhos anteriores mostram que concentrações de 13ppm podem induzir a resposta do fator de indução da hipóxia (HIF-1), estimulando a angiogênese <sup>(183)</sup>. Além disso, alta expressão de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e expressão de fosfatase alcalina (ALP) foi observada para teores de Co entre 3 e 12ppm, liberados de *scaffolds* de vidro bioativo e colágeno-glicosaminoglicano contendo esse íon <sup>(15)</sup>. Portanto, amostras desse trabalho apresentaram liberação iônica dentro da faixa da concentração biologicamente ativa que pode induzir a formação de novos vasos sanguíneos de acordo com estudos anteriores. No entanto, avaliações recentes realizadas em células-tronco mesenquimais humanas mostraram uma redução na diferenciação condrogênica altamente dependente do tempo e da concentração, embora o nível do HIF-1 $\alpha$  tenha aumentado significativamente <sup>(16)</sup>. Portanto, o perfil de liberação de íons cobalto deve ser devidamente avaliado e ajustado de acordo com a aplicação desejada.

Após as duas semanas de estudo, os vidros bioativos foram analisados por FTIR e DRX, apresentados na Figura 6.9. Não foram observadas diferenças significativas entre os espectros de FTIR das amostras após imersão em SBF. As bandas típicas relativas à rede do vidro foram observadas em 450cm<sup>-1</sup> (deformação Si-O), 965cm<sup>-1</sup> (estruturas SiO<sub>4</sub> contendo oxigênios não ligantes) <sup>(81)</sup>, e a banda larga com máximo em 1020cm<sup>-1</sup> (estiramento Si-O) <sup>(135)</sup>. O duplete característico da deformação de ligações P-O em grupos PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> de cristais de apatita foram observados em 562 e 602cm<sup>-1</sup> <sup>(64,135)</sup>, enquanto que a banda em 1060cm<sup>-1</sup> é atribuída ao estiramento de ligações P-O <sup>(135)</sup>. Bandas vibracionais em 808cm<sup>-1</sup> e 890cm<sup>-1</sup> referentes aos carbonatos também foram observadas <sup>(24)</sup>, indicando a presença de uma camada de hidroxiapatita carbonatada

em todas as amostras. Os resultados foram ainda confirmados por DRX (Figura 6.9 (b)) Os picos relacionados apresentam compatibilidade com a o padrão de difração da hidroxiapatita carbonatada (ICSD ref: 00-019-0272), confirmando sua formação na superfície dos vidros após imersão em SBF <sup>(184)</sup>. Um pico cristalino atribuído à calcita também foi observado, e sua formação pode estar relacionada à reação entre o cálcio liberado dos vidros bioativos e os carbonatos presentes na solução SBF <sup>(32)</sup>. Além disso, os picos cristalinos da amostra 5Co-C também foram observadas no padrão de DRX obtido após o estudo de dissolução em SBF, indicando que a estrutura do óxido de cobalto não foi totalmente dissolvida, estando de acordo com a menor taxa de liberação de Co dessa amostra, conforme discutido previamente.

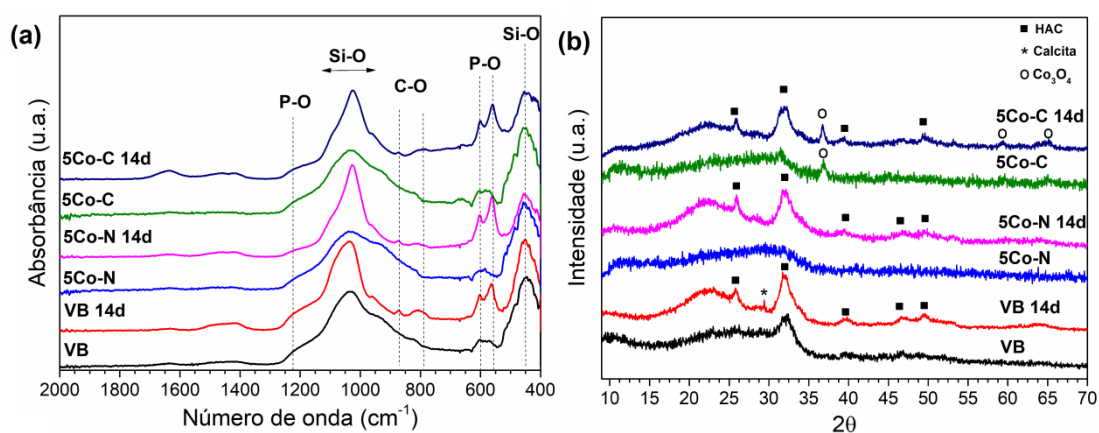


Figura 6.9: (a) Espectro de FTIR e (b) padrões de DRX de vidros bioativos imersos por duas semanas em SBF.

As imagens de MEV (Figura 6.10) demonstraram a formação de uma estrutura típica de cristais de apatita na superfície dos vidros bioativos após 14 dias de imersão em SBF devido à biomineralização <sup>(107,135)</sup>, confirmando resultados anteriores.

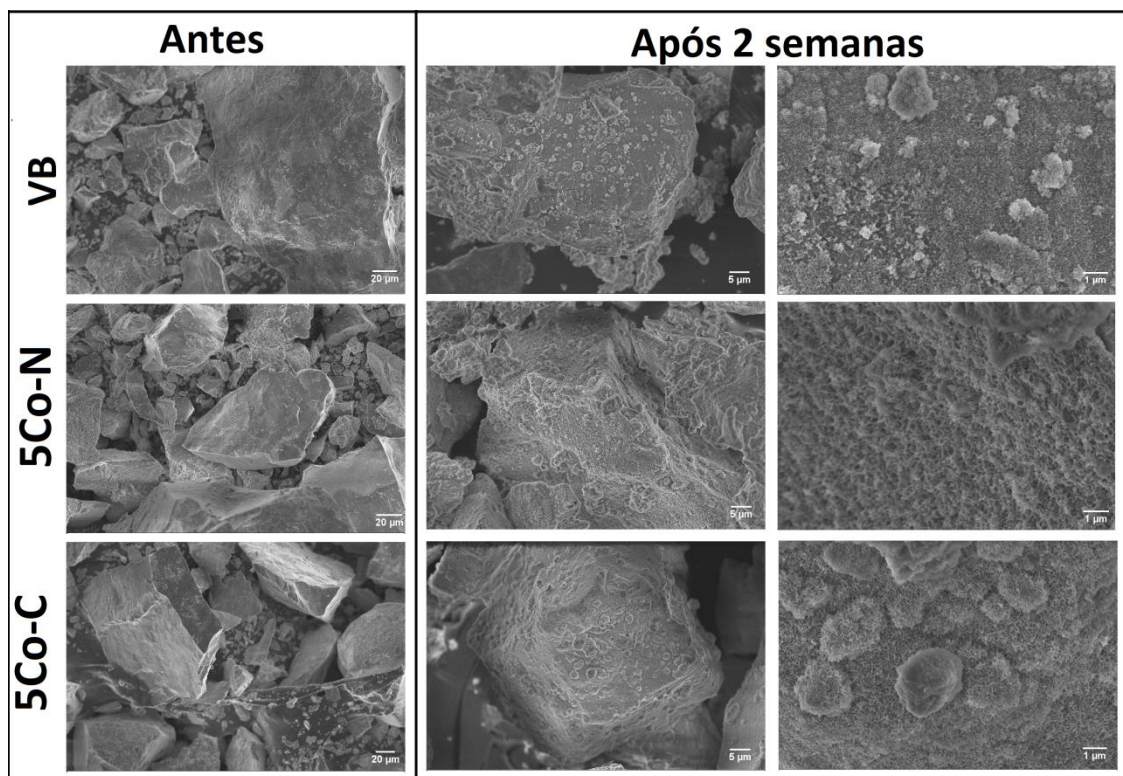


Figura 6.10: Imagens da superfície de vidros bioativos obtidas por MEV antes e após duas semanas de imersão em SBF das amostras VB, 5Co-N e 5Co-C.

O estudo de dissolução confirmou que a incorporação de Co na rede de vidro leva a uma redução na taxa de formação da camada de HAC, embora ainda mantendo a bioatividade do material. A taxa de liberação de Co foi reduzida quando o cloreto de cobalto foi utilizado como precursor, sendo principalmente relacionado à presença de cristais com baixa solubilidade em sua estrutura <sup>(182)</sup>. A liberação de Co obtida está dentro da concentração relatada capaz de induzir uma resposta angiogênica, e a composição do vidro bioativo pode ser ajustada para se obter níveis desejados de liberação iônica e formação de HAC de acordo com a aplicação específica.

#### 6.4 Conclusões

Neste capítulo, vidros bioativos contendo Co foram obtidos pelo processo sol-gel, e a influência da incorporação desse íon e da seleção do precursor na estrutura e nas propriedades do material foi avaliada. Quando cloreto de cobalto foi utilizado como precursor houve formação de óxido de cobalto (II,III) cristalino, indicando que os íons Co não foram completamente incorporados na estrutura do vidro bioativo como modificador de rede, enquanto que estruturas cristalinas não foram observadas quando o nitrato de cálcio foi utilizado como precursor. Esse íon encontra-se majoritariamente na forma de  $\text{Co}^{2+}$ , de acordo com análises de XPS, embora

indicativos da presença de espécies  $\text{Co}^{3+}$  também tenham sido encontrados. A incorporação de Co afetou o perfil de dissolução do vidro, reduzindo a taxa de formação de HAC durante o período avaliado, porém o teor de Co encontra-se dentro da concentração reportada que pode induzir angiogênese. A incorporação de Co utilizando o nitrato de cobalto torna-se mais indicada quando necessária uma maior taxa de liberação desse íon, porém trabalhos futuros devem avaliar a concentração ideal de Co que não leve à toxicidade do material. Este trabalho mostrou que a escolha do precursor pode apresentar um importante papel na definição da estrutura final do vidro bioativo e suas propriedades, devendo ser cuidadosamente avaliada.



## CAPÍTULO 7. Avaliação estrutural e da biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* de vidros bioativos contendo cobalto

---

### 7.1 Introdução

Biomateriais com capacidade de liberação de cobalto tem atraído grande atenção nos últimos anos, devido ao seu potencial angiogênico. Co é conhecido por simular condições hipóxicas, inibindo a degradação do fator de indução da hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ), responsável pela regulação e expressão de diferentes genes relacionados com a angiogênese, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)<sup>(185)</sup>, e consequentemente induzindo a formação de vasos sanguíneos. Trabalhos recentes demonstraram capacidade de ativação da via HIF-1 $\alpha$  e regulação de genes envolvidos na resposta angiogênica em vidros bioativos contendo Co, obtidos pelo processo de fusão<sup>(156)</sup>. Capacidades pró-angiogênicas e pró-osteogênicas foram também observadas em estruturas de vidro bioativo/colágeno-glicosaminoglicano contendo esse íon<sup>(88)</sup>. O processo sol-gel também pode ser utilizado para obtenção de vidros bioativos com capacidade de liberação de Co, sendo relatado o aumento da expressão de VEGF e expressão gênica de células estromais da medula óssea (BMSCs) em *scaffolds* de vidro bioativo contendo cobalto obtidos pelo processo sol-gel<sup>(88)</sup>. No entanto, outros trabalhos mostraram que a alta concentração ou exposição prolongada de células ao Co pode induzir citotoxicidade e estresse oxidativo<sup>(186)</sup>. Vidros bioativos (derivados do processo de fusão) demonstraram também redução na diferenciação condrogênica e proliferação de células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs), apesar da estabilização do HIF-1 $\alpha$ <sup>(16)</sup>. Existe, portanto, uma clara necessidade de pesquisas adicionais para compreender o efeito do Co na estrutura do vidro bioativo e nas propriedades biológicas resultantes.

Tendo isso em vista, nesse capítulo foram obtidas novas composições de vidros bioativos contendo Co pelo método sol-gel, e o efeito da incorporação desse íon na estrutura e propriedades do material foi avaliada. Devido ao importante papel das células endoteliais na formação de vasos sanguíneos, a viabilidade celular dos vidros bioativos em células endoteliais de veias umbilicais humanas (HUVECs – *human umbilical vein endothelial cells*) foi avaliada, assim como em células-tronco adiposas humanas (hASCs – *human adipose-derived stem cells*) – uma importante fonte de células multipotentes. A biocompatibilidade foi ainda avaliada por procedimento *in vivo*,



a partir de implantes do material no dorso de ratos, demonstrando resultados promissores para aplicações na engenharia de tecidos.

## 7.2 Materiais e métodos

Foram utilizados reagentes da *Sigma-Aldrich*, salvo indicação em contrário. Vidros bioativos foram obtidos pelo processo sol-gel: TEOS (tetraetilortosilicato 98%) e TEP (trietilfosfato 99%) foram hidrolisados em meio ácido (ácido nítrico 2M) contendo água deionizada (taxa molar  $H_2O/TEOS = 12$ ) por 1 hora com agitação magnética. Logo após, nitrato de cálcio ( $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ) foi dissolvido no sol, e agitado por mais uma hora. O gel obtido foi envelhecido por 72 horas em recipiente fechado, seguido por secagem em recipiente aberto com aumento de  $10^\circ C$  por dia até se alcançar  $120^\circ C$ . Logo após, amostras foram tratadas a  $650^\circ C$ , com taxa de aquecimento de  $2^\circ C \cdot min^{-1}$ , por 3 horas, moídas e peneiradas para se obter partículas entre 38 e  $150\mu m$ . Amostras contendo cobalto foram obtidas utilizando-se cloreto de cobalto ( $CoCl_2 \cdot 4H_2O$ , *Synth*), em substituição ao teor parcial de cálcio nos vidros 58S (VB), contendo composição molar de 1%CoO (VB-1Co), 2,5%CoO (VB-2,5Co) e 5%CoO (VB-5Co). O respectivo sal foi adicionado previamente à etapa de adição do precursor do cálcio para cada composição.

### 7.2.1 Caracterização dos vidros bioativos

**Análise estrutural.** Os espectros de Difração de Raios-X (DRX) foram obtidos em equipamento SHUMADZU 7000, com  $2\theta$  variando de 3 a  $60^\circ$ , passo de 0,03 e radiação  $CuK\alpha$ . FTIR foi obtido em equipamento Thermo Scientific Nicolet iN10 equipado com acessório de reflectância difusa. Os espectros foram obtidos entre  $400 - 4000cm^{-1}$ , com 64 escaneamentos por espectro e resolução de  $4cm^{-1}$ . Os espectros Raman foram obtidos em equipamento Jobin Yvon/Horiva LABRAM-HR 800, equipado com laser He-Ne ( $632,8nm$ ), microscópio Olympus NHX, detector CCD (Spectrum One) e tempo de aquisição entre 10 e 30s, dependendo da fluorescência da amostra. Para reduzir relações sinal/ruído, os espectros foram adquiridos 5 - 10 vezes após fotobranqueamento de 5 a 20 minutos

**Composição química.** Uma camada de 0,7g de metaborato de lítio foi preparada em um cadinho de grafite, no qual 0,1g de cada amostra foram posteriormente adicionados, formando uma segunda camada, a qual foi por fim sobreposta por outra

camada de metaborato de lítio (0,7g). O cadinho foi levado à mufla (950°C) por 10 minutos, para fusão dos reagentes e da amostra. O cadinho foi removido da mufla, a mistura foi homogeneizada e fundida por mais 10 minutos. Logo após, a mistura foi transferida para um becker contendo 100mL de solução 10% v/v HNO<sub>3</sub> e agitada por 20 minutos. A solução foi diluída em 10 vezes, e as concentrações de Si, Ca, P e Co foram analisadas por ICP-OES (Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente) Perkin-Elmer Optima 7300 DV, e as proporções de SiO<sub>2</sub>, CaO, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e CoO calculadas

**Propriedades texturais.** As isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio foram obtidas em equipamento Quantachrome NOVA 2200 ver. 6.11, à 77K. A área superficial específica (SSA – *specific surface area*) foi determinada por método Brunauer-Emmett-Teller (BET) utilizando os pontos de adsorção com pressão relativa entre 0,01 e 0,30, enquanto que o diâmetro e distribuição de poros foram calculados pelo método Barrett-Joyner-Halenda (BJH) aplicado às curvas de dessorção.

**Estudo de dissolução e bioatividade em SBF.** Um total de 0,045g de cada amostra foi imerso em 30mL de SBF (*Simulated Body Fluid*), preparada de acordo com método previamente descrito<sup>(56,102)</sup>, e mantidas a 37°C por 1, 3 e 24 horas, e 3, 7 e 14 dias. Os extratos obtidos em cada período de tempo foram filtrados (0,22µm), diluídos (10 vezes) e analisados por ICP-OES para obtenção da concentração de Si, Ca, P e Co em solução. As micropartículas foram lavadas com acetona, secas por 24 horas à 60°C e analisadas por FTIR. Os resultados apresentam uma média de 3 medidas e desvio padrão.

## 7.2.2 Análise da citotoxicidade celular e biocompatibilidade *in vivo*

**Isolamento e cultura de hASCs.** As hASCs foram isoladas de tecido adiposo humano colhido durante uma cirurgia estética para redução abdominal de pacientes saudáveis. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (CCAEE n° 21176413.9.0000.5149). O isolamento e cultura de hASCs foram realizados baseando-se em trabalhos anteriores<sup>(187)</sup>. Os lipoaspirados foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e digeridos com colagenase tipo I a 0,075% em PBS, a 37°C por 1 hora. A atividade da colagenase foi inibida com a adição de DMEM (*Gibco*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; *Gibco*) e o tecido digerido foi centrifugado a 252rpm por 10 minutos. As pastilhas foram suspensas e plaqueadas em frascos de cultura contendo DMEM, suplementados com

10% FBS e 1% antibióticos/antimicóticos (*Invitrogen*). As culturas foram mantidas em atmosfera umidificada de CO<sub>2</sub> a 5% e 37°C. O meio foi substituído a cada 2 - 3 dias. A população de células mesenquimais foi selecionada com base na sua capacidade de aderir à placa de cultura. A subcultura de hASCs foi posteriormente destacada da placa a 80 - 90% de confluência usando tripsina-EDTA (0,25%; *Gibco*) e células na terceira passagem.

**Cultura de células HUVECs.** As células foram cultivadas em meio com DMEM (47%; *Gibco*), DMEM F12 (47%; *Gibco*), FBS (5% v/v; *Gibco*) e penicilina/estreptomicina (1% v/v; *Invitrogen*). As células foram incubadas em uma atmosfera umidificada de CO<sub>2</sub> a 5% e 37°C e separadas da placa para os experimentos com 90% de confluência utilizando-se tripsina-EDTA (0,25%; *Gibco*).

**Preparação do produto iônico.** As micropartículas de vidro bioativo esterilizadas por radiação gama (12kGy) foram suspensas em solução PBS 1X a uma concentração de 10.000µg.mL<sup>-1</sup>, mantidas por 24 horas à 37°C e posteriormente filtradas (0,2µm) para obtenção do produto iônico do material. Diluições foram obtidas utilizando solução PBS 1X, a fim de se obter uma concentração final de 1000, 100 e 10 µg.mL<sup>-1</sup> do produto iônico.

**Biocompatibilidade/toxicidade celular.** Foi utilizado o método de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), conforme descrito em trabalhos anteriores <sup>(188)</sup>. O MTT quantifica a atividade mitocondrial baseada na redução do sal de tetrazólio para corantes formazan em células vivas. Nesse processo, 1x10<sup>5</sup> hASCs e 1x10<sup>4</sup> HUVECs foram semeadas por poço em placas de 48 poços (*Sarstedt*). Após cultura celular por 24 horas, as células foram tratadas com as diluições de 10, 100 e 1000 µg.mL<sup>-1</sup> de solução contendo o produto iônico dos vidros bioativos preparados em PBS 1X, além do controle negativo no qual somente PBS 1X foi adicionado. Após tratamento, os grupos celulares foram avaliados ao fim de diferentes períodos de tempo (24, 48 e 72 horas). O meio foi removido e uma solução contendo 130µL de DMEM e 100 µL de MTT (5 mg.mL<sup>-1</sup>) foi adicionada por poço. Após duas horas, cristais de formazan foram visualizados em um microscópio ótico e dissolvidos em 130µL de SDS a 10% em HCL 0,01M. Para todos os poços mencionados, as placas de cultura foram incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada de CO<sub>2</sub> (5%). Após 18 horas, 100 µL da solução foram transferidos para uma placa de 96 poços e uma

leitura da densidade ótica foi realizada a 595 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

**Biocompatibilidade *in vivo*.** Um total de 15 ratos Wistar, pesando entre 230 e 250g (8 semanas de idade) foram utilizados. Os experimentos descritos a seguir foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da UFMG (Protocolo nº 22/2018). As micropartículas de vidro bioativo foram utilizadas para se obter pastilhas (5mm diâmetro x 2mm espessura), utilizando uma prensa de parafuso (*Pike Technologies*). Os implantes subcutâneos foram realizados na região dorsal de ratos Wistar, os quais foram pesados e anestesiados com uma combinação de cloridrato de cetamina a 10% (*Syntec*) e cloridrato de xilazina a 2% (*Syntec*) na proporção de 0,1mL para cada 100g. A tricotomia foi realizada seguida de assepsia cutânea da região de implantação utilizando álcool iodado a 10% (*Rioquímica*). Subsequentemente, foi feita uma incisão transversal na região dorsal do animal, a pele foi divulsionada e os implantes foram inseridos na região subcutânea. Foram selecionados para os experimento as amostras VB e VB-2,5Co, e o material foi esterilizado por radiação gama (12kGy) previamente ao ensaio. Nos animais controle, o procedimento foi realizado exatamente conforme descrito acima, porém não houve inserção do implante. O procedimento foi completado com a sutura da pele do dorso<sup>(189)</sup>.

Após 28 dias, os ratos foram eutanasiados e a pele adjacente à região onde o implante estava localizado foi removida e fixada em solução de formalina tamponada neutra a 10%. No grupo controle, um fragmento da pele do mesmo tamanho foi removido na mesma região onde os implantes estavam localizados nos grupos experimentais. As amostras foram submetidas à microtomia para obtenção de cortes histológicos de 5µm de espessura. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) e examinadas qualitativamente em microscópio ótico para avaliar a alteração em relação ao controle, com a presença de infiltrado inflamatório e vasos neoformados. Um total de 30 imagens de tecido foram capturadas e analisadas com uma lente objetiva 40x, conforme trabalhos anteriores<sup>(190)</sup>. A análise quantitativa foi realizada pela contagem de número de núcleos celulares na região mais profunda da pele, próxima ao local de contato com o material, utilizando-se software HonestechTVR 2.5. A avaliação morfométrica foi realizada baseando-se em trabalhos anteriores<sup>(191)</sup>.

**Análise estatística.** Para o estudo da viabilidade celular, foi realizada análise estatística One-way ANOVA seguida de pós-teste Bonferroni, e para a avaliação morfométrica foi utilizado One-way ANOVA seguido de teste post-hoc de Tukey ou Holm-Sidak. Foi utilizado software GraphPad Prism 6 em todas as análises, e os valores relatados foram expressos como média e desvio padrão. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### 7.3 Resultados e discussão

#### 7.3.1 Análise da composição química

A composição química determinada pelo método de fusão de metaborato de lítio e ICP-OES é apresentada na Tabela 7.1. Diferentes composições foram obtidas, e a presença de cobalto confirmada nos vidros bioativos avaliados após o processo de estabilização térmica. O teor de  $P_2O_5$  foi o que apresentou maior variação, e pode estar relacionado à reduzida taxa de hidrólise do precursor sol-gel do fósforo (TEP) em relação ao TEOS, além de estar presente em pequena quantidade no meio de reação, dificultando a sua incorporação <sup>(40)</sup>.

Tabela 7.1: Composição química nominal e determinada pelo método de fusão de metaborato de lítio e ICP-OES (%mol) de vidros bioativos estabilizados à 650°C contendo cobalto.

Amostras	Composição nominal (% mol)				Composição ICP-OES (% mol)			
	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	CaO	CoO	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	CaO	CoO
VB	60,0	4,0	36,0	-	59,1	3,0	37,9	-
VB-1Co	60,0	4,0	35,0	1,0	60,6	2,9	35,2	1,3
VB-2,5Co	60,0	4,0	33,5	2,5	60,8	2,9	33,7	2,6
VB-5Co	60,0	4,0	31,0	5,0	59,5	3,0	32,1	5,4

#### 7.3.2 Análise estrutural

A Figura 7.1 apresenta resultados da análise estrutural dos vidros bioativos realizada por FTIR, e bandas de absorção típicas de vidros bioativos foram observadas em todas as amostras. A deformação angular Si-O-Si ( $450$  a  $470\text{cm}^{-1}$ ) <sup>(106)</sup>, o estiramento simétrico ( $725$  a  $830\text{cm}^{-1}$ ) e assimétrico ( $1000$  a  $1200\text{cm}^{-1}$ ) de ligações Si-O podem ser observados <sup>(118)</sup>. A absorvância observada em  $870$  e  $975\text{cm}^{-1}$  é relacionada com estruturas Si-O contendo oxigênios não-ligantes <sup>(32)</sup>. As absorções em  $550$  e  $600\text{cm}^{-1}$  são típicas da deformação angular de ligações P-O em grupos fosfatos, enquanto que a absorção em  $1160\text{cm}^{-1}$  é relacionada com o estiramento dessas ligações <sup>(106)</sup>. A

absorção entre  $1400$  e  $1550\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída à grupos carbonatos adsorvidos na superfície do vidro, enquanto que a absorbância em  $1635\text{cm}^{-1}$  é relacionada com a água molecular presente na superfície do material <sup>(24)</sup>. Observou-se a presença de uma pequena banda de absorção em  $670\text{cm}^{-1}$  para a amostra VB-5Co que pode estar relacionada à ligações Co-O em estruturas cristalinas de óxido de cobalto, embora seja normalmente acompanhada de outra absorção em  $570\text{cm}^{-1}$ , região sobreposta à deformação de ligações P-O, sendo difícil a sua identificação <sup>(174-176)</sup>.

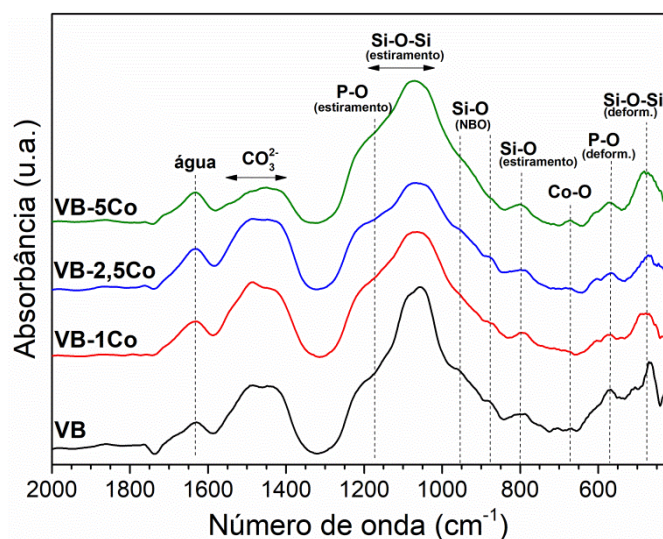


Figura 7.1: Análise estrutural por FTIR realizada para as amostras VB, VB-1Co, VB-2,5Co e VB-5Co.

A espectroscopia Raman é apresentada na Figura 7.2. O deslocamento Raman na região entre  $800$  e  $1300\text{cm}^{-1}$  é relacionado ao estiramento assimétrico do tetraedro de  $\text{SiO}_4$ , com variações no número de onda de acordo com o número de oxigênios ligantes e não ligantes na estrutura do vidro <sup>(119)</sup>. O estiramento assimétrico de ligações Si-O com estruturas de oxigênios ligantes é relacionado ao deslocamento Raman entre  $1000$  e  $1200\text{cm}^{-1}$ , com maior intensidade em  $1080\text{cm}^{-1}$  <sup>(121)</sup>. A banda larga entre  $900$  e  $980\text{cm}^{-1}$  é relacionada a estruturas de oxigênios não ligantes na estrutura da sílica, normalmente observada quando uma rede menos polimerizada é formada <sup>(121)</sup>. A banda com máximo em  $965\text{cm}^{-1}$  é relacionada ao estiramento Si-O em estruturas contendo 2 oxigênios não ligantes, indicando que os materiais obtidos neste trabalho são constituídos principalmente por essas estruturas, típicas de materiais amorfos contendo modificadores de rede <sup>(119,128)</sup>. Contribuições de ligações P-O (estiramento simétrico) podem também estar presentes na região entre  $935$  e  $965\text{cm}^{-1}$  <sup>(127)</sup>. O espalhamento Raman na região entre  $830$  e  $900\text{cm}^{-1}$  pode também ser relacionado com ligações Si-O contendo oxigênio não ligantes (unidades  $\text{Q}^0$  e  $\text{Q}^1$ ), e a sua redução de intensidade com o aumento do teor de Co é um indicativo da formação

de uma estrutura mais polimerizada, podendo o cobalto estar atuando como formador de rede ou ainda não incorporando-se totalmente em substituição ao teor de cálcio nas amostras, reduzindo conseqüentemente o número de modificadores de rede na estrutura.

Bandas adicionais devido a vibrações Si-O foram observadas em  $490\text{cm}^{-1}$  <sup>(192)</sup>, enquanto que a deformação angular de  $\text{PO}_4^{3-}$  pode ser observada entre  $400$  e  $450\text{cm}^{-1}$  <sup>(32)</sup>. Vibrações de diferentes óxidos de cobalto são normalmente relatadas entre  $450$  e  $700\text{cm}^{-1}$ , com diversas linhas de absorção nesta região <sup>(193)</sup>. Com o aumento no teor de Co, foram observadas vibrações em  $595$ ,  $620$  e  $689\text{cm}^{-1}$  que podem estar relacionadas a presença de óxidos de cobalto nas amostras, sendo consistente com investigações anteriores relacionadas à esse elemento <sup>(194)</sup>. A banda em  $689\text{cm}^{-1}$  pode também ser relacionada à vibrações Si-O-Co, sendo um indicativo da incorporação de Co na estrutura do vidro bioativo <sup>(195)</sup>.

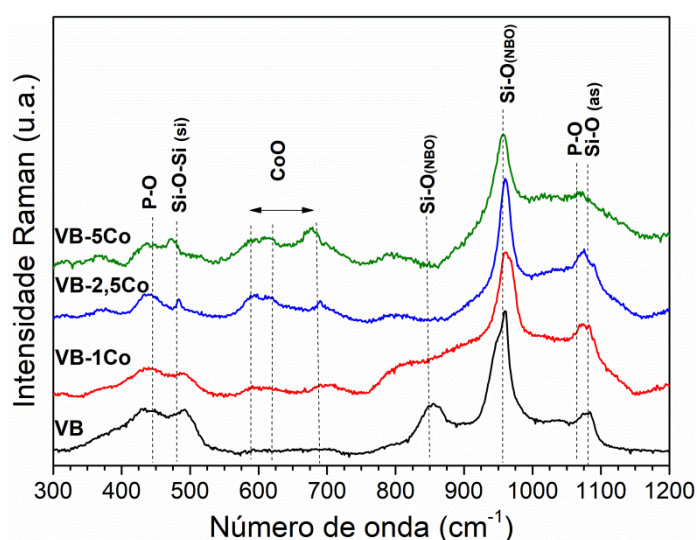


Figura 7.2: Análise estrutural por FTIR realizada para as amostras VB, VB-1Co, VB-2,5Co e VB-5Co.

Análises estruturais realizadas por FTIR e Raman mostraram que a estrutura principal dos vidros bioativos foi mantida, apesar da incorporação de Co. Uma estrutura composta majoritariamente por oxigênios não-ligantes foi observada, típica de vidros amorfos, favorável na manutenção da bioatividade, já que pode afetar o processo de dissolução em meio fisiológico. Evidências da incorporação de Co e formação de óxidos também foram observadas, e deve ser mais profundamente avaliada.

A Figura 7.3 apresenta o padrão de difração das amostras de vidro bioativo. Foi observada uma banda larga entre  $15$  e  $25^\circ$  ( $2\theta$ ) em todas as amostras, típica de

estruturas amorfas. Um halo mais pronunciado entre 30 e 33° (2 $\theta$ ) indica uma organização inicial da estrutura do material, podendo estar relacionada à formação de pequenos núcleos de apatita que podem ser formados durante o tratamento térmico <sup>(107)</sup>, especialmente para a amostra VB. A estrutura do vidro manteve o seu caráter predominantemente amorfo apesar da incorporação de Co. No entanto, embora não detectados para o VB-1Co e VB-2,5Co, foram observados picos cristalinos compatíveis com estruturas de óxido de cobalto (II, III) (Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) <sup>(177)</sup> no padrão de difração da amostra com maior teor de Co (VB-5Co). A presença desses picos indica que o cobalto não foi totalmente incorporado na estrutura do vidro como um modificador de rede quando maiores concentrações de Co foram utilizadas. O Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> é um composto estável e pouco solúvel, apresentando valência mista (Co<sup>2+</sup> e Co<sup>3+</sup>) <sup>(175)</sup>, e sua presença pode afetar a taxa de dissolução e conseqüentemente a bioatividade das amostras. Tal resultado está de acordo com a análise estrutural de FTIR, na qual foram observados picos que podem estar relacionados a vibrações Co-O em óxido de cobalto para o VB-5Co.

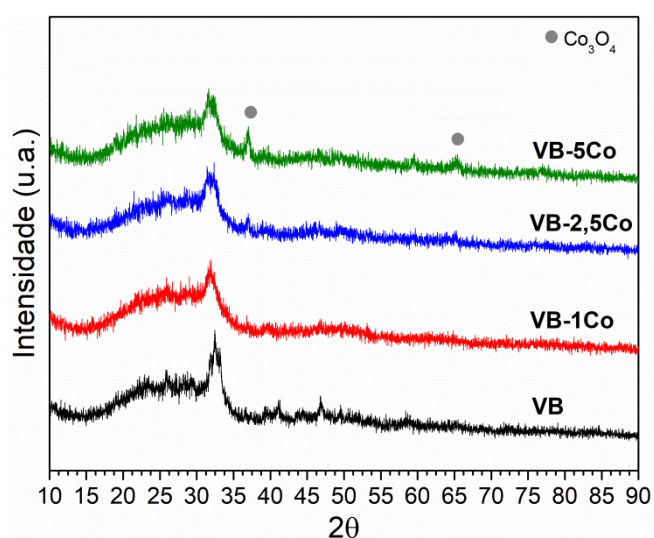


Figura 7.3: Padrão de Difração de Raios-X para as amostras VB, VB-1Co, VB-2,5Co e VB-5Co.

### 7.3.3 Propriedades texturais

A Tabela 7.2 apresenta a área superficial específica, volume total de poros e diâmetro médio de poros, conforme métodos BET e BJH, de acordo com análise realizada pela adsorção de nitrogênio. Vidros bioativos com alta área superficial específica foram obtidos, apresentando valores comparáveis ao obtido em trabalhos anteriores <sup>(40)</sup>. Observa-se uma variação no valor da área superficial específica com a incorporação de cobalto, que pode ser atribuída à ruptura na orientação da rede durante a formação



da estrutura como resultado da inserção desse íon adicional, o que poderia resultar em defeitos na estrutura do material e formação de mesoporos com diferentes formatos <sup>(32)</sup>. Os vidros bioativos apresentaram ainda poros com diâmetro dentro da faixa mesoporosa, favorável na indução da nucleação e cristalização de HAC <sup>(134)</sup>, conseqüentemente afetando a bioatividade do material. Vidros bioativos porosos e com alta área superficial foram obtidos, possuindo propriedades de interesse no campo biomédico.

Tabela 7.2: Propriedades texturais obtidas pelos métodos BET e BJH para as amostras VB, VB-1Co, VB-2,5Co e VB-5Co.

Amostras	Área superficial específica (m <sup>2</sup> .g <sup>-1</sup> )	Volume de poros total (cm <sup>3</sup> .g <sup>-1</sup> )	Diâmetro médio de poros (nm)
VB	111,3	0,289	10,4
VB-1Co	137,9	0,317	9,2
VB-2,5Co	119,8	0,318	6,6
VB-5Co	97,9	0,350	6,3

#### 7.3.4 Dissolução e bioatividade em SBF

As amostras foram imersas em SBF a 37°C durante diferentes períodos de tempo com o objetivo de se avaliar o perfil de dissolução e a formação da camada de HAC, sendo um indicativo preliminar do potencial bioativo do material. A estrutura do material após 14 dias de imersão foi avaliada por FTIR, e a concentração iônica em solução após diferentes períodos de tempo foi analisada por ICP-OES.

Bandas típicas de vidros bioativos foram observadas por após 14 dias de imersão em SBF para todas as amostras (Figura 7.4). A deformação de ligações Si-O pode ser observada entre 400 e 500cm<sup>-1</sup>, enquanto que o estiramento simétrico dessa ligação é relacionado com a absorbância entre 1000 e 1200cm<sup>-1</sup> <sup>(137)</sup>. A absorção atribuída à grupos P-O podem ser observadas em torno de 960cm<sup>-1</sup>, relacionadas ao estiramento simétrico, enquanto que o estiramento assimétrico P-O pode ser observado entre 1000 e 1050cm<sup>-1</sup>, sobrepondo-se à absorção de grupos Si-O. Bandas típicas da vibração de ligações P-O em grupos fosfato de HAC são observados na forma de banda dupla, sendo uma em 600 a 610cm<sup>-1</sup>, e outra entre 550 e 560cm<sup>-1</sup> <sup>(196)</sup>. A presença dessa banda dividida e bem definida é característica da formação de uma camada de fosfato de cálcio na superfície dos vidros. Além disso, a banda observada na região de 800 e 890cm<sup>-1</sup> é característica do estiramento de ligações C-O, sendo relacionada à

formação de apatita carbonatada na superfície dos vidros bioativos após ensaio. Portanto, análise estrutural por FTIR dos vidros bioativos após imersão em SBF indica a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada na superfície de todas as amostras, com bandas típicas dessa estrutura sendo observadas após 14 dias de ensaio.

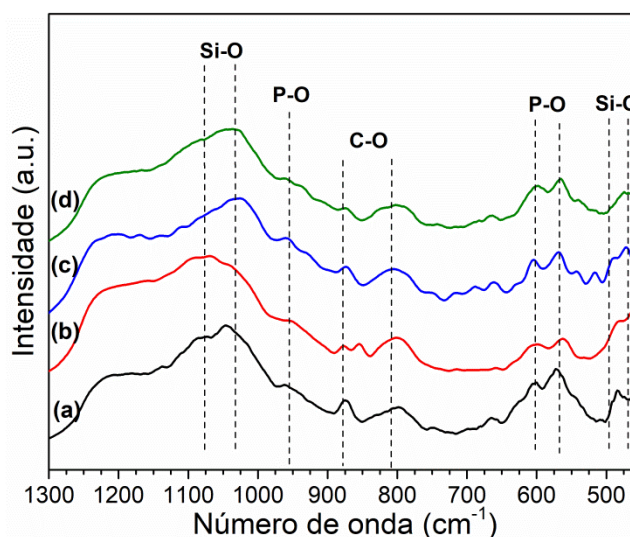


Figura 7.4: FTIR obtido 14 dias após imersão das amostras em SBF, na qual (a) VB, (b) VB-1Co, (c) VB-2,5Co e (d) VB-5Co.

Após imersão em SBF, tem-se início o processo de dissolução do vidro, e reações químicas na superfície do material levam a mudanças na composição química da solução com o tempo <sup>(28)</sup>, podendo ser utilizadas como um método indireto de se avaliar as reações ocorrendo na superfície dos vidros bioativos. Além disso, a liberação iônica dos vidros bioativos pode beneficiar respostas celulares, aprimorando o reparo tecidual; portanto, uma liberação controlada desses íons é desejada. O perfil de liberação iônica de Si, Ca, P e Co das amostras de vidro bioativo após imersão em SBF em diferentes períodos de tempo é apresentado na Figura 7.5.

O silício apresentou rápida liberação durante os primeiros dias de imersão, estabilizando-se após 72 horas. A liberação mais rápida de Si para a amostra VB e ligeira maior concentração pode ser relacionada a uma estrutura mais aberta, com maior número de oxigênios não ligantes, conforme demonstrado pela espectroscopia Raman. Trabalhos anteriores mostram que a liberação de silício de biomateriais pode favorecer a citocompatibilidade, já que esse íon pode apresentar efeitos estimulatórios em células, porém a concentração deve ser ajustada, mantendo-se abaixo de 100ppm <sup>(141)</sup>, compatível com a faixa de concentração obtida para as amostras deste trabalho.

Além disso, a liberação de silício favorece a formação de silanóis (Si-OH) na superfície do material, que apresenta importante papel no processo de formação da camada de HAC <sup>(110)</sup>.

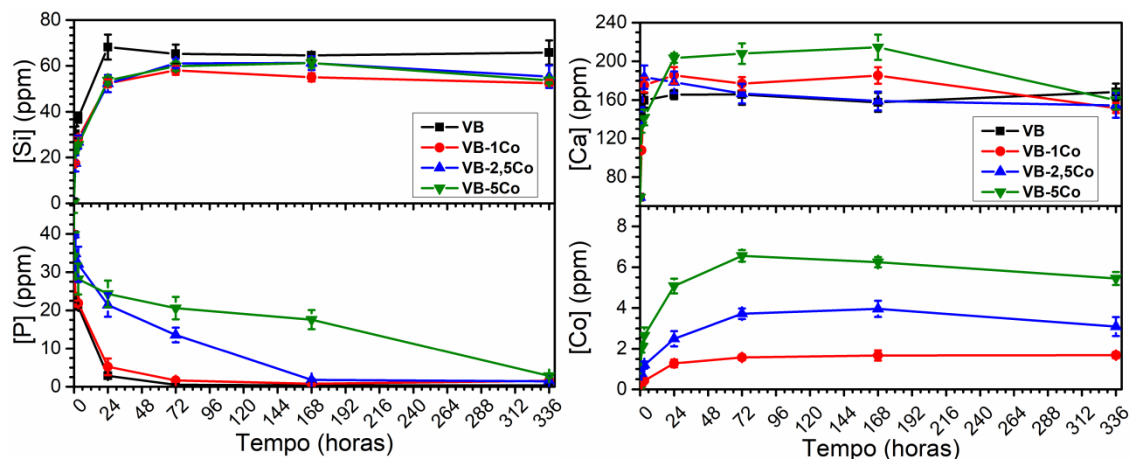


Figura 7.5: Variação da concentração de silício, cálcio, fósforo e cobalto com o período de imersão em SBF para VB e amostras contendo Co.n

O cálcio também apresentou uma rápida liberação inicial, estabilizando-se após 24 horas de ensaio. Apesar de o teor de Ca ser menor na amostra VB-5Co, a concentração de Ca em solução para essa amostra foi maior, o que pode estar relacionado a uma taxa de formação de HAC mais lenta, conseqüentemente mantendo mais íons cálcio livres em solução. A formação da camada de HAC é também indicada pela concentração de P ao longo do tempo de ensaio. Houve uma redução do teor de P logo após o início do estudo, confirmando a migração desses íons da solução para a superfície dos vidros bioativos para formação da camada rica em fosfato de cálcio. A concentração de P atingiu valores próximos à zero após 72 horas de ensaio para VB e VB-1Co, enquanto que para a amostra VB-2,5Co isso só ocorreu após 1 semana, e após 2 semanas de estudo para VB-5Co. Tais resultados indicam que a cinética de bioatividade pode ser reduzida pela incorporação de Co, embora evidência de formação da camada de HAC ainda seja observada.

Um perfil controlado de liberação de Co foi observado, com estabilização após 72 horas de ensaio. Observa-se também um aumento na concentração de Co em solução nas amostras contendo teor mais elevado desse íon. Trabalhos anteriores mostram que concentrações de Co entre 3 e 12ppm liberadas de *scaffolds* de vidros bioativos/glicosaminoglicanos estimularam um aumento na expressão de fosfatase alcalina e VEGF <sup>(15)</sup>. No entanto, concentrações de Co em torno de 7ppm podem reduzir a diferenciação condrogênica em hMSCs, conforme descrito em trabalhos

anteriores, embora ainda tenha sido observado aumento na expressão de HIF-1 $\alpha$  <sup>(16)</sup>. Portanto, é essencial uma liberação iônica controlada a fim de se obter os efeitos terapêuticos desejados, mantendo-se a citocompatibilidade do material. Amostras deste trabalho apresentaram liberação de íons Co dentro da faixa terapêutica com benefícios biológicos conforme descrito em trabalhos anteriores, podendo-se controlar a sua taxa de liberação a partir da alteração da composição química do material.

### 7.3.5 Biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*

Apesar do grande interesse em biomateriais com capacidade de liberação de cobalto devido ao seu potencial angiogênico, trabalhos recentes têm demonstrado que íons cobalto podem levar à redução da viabilidade celular, dependendo da sua concentração, devendo ser cuidadosamente avaliados. Diferentes trabalhos avaliaram o efeito de cobalto em células como osteoblastos MG-63 <sup>(186)</sup> e células-tronco mesenquimais humanas <sup>(16)</sup>, porém a avaliação do efeito da liberação de cobalto de biomateriais em células-tronco adiposas humanas (hASCs) não é relatada na literatura. Trabalhos prévios demonstraram que hASCs podem diferenciar em linhagens osteogênicas durante testes *in vitro* <sup>(197)</sup>, e tem sido utilizadas em procedimentos *in vivo* para regeneração óssea <sup>(120)</sup> como uma fonte de células com multipotência. Tendo isso em vista, a influência do produto iônico dos vidros bioativos na viabilidade de hASCs foi avaliada por MTT, e os resultados são apresentados na Figura 7.6.

hASCs foram expostas a diferentes diluições do produto iônico dos vidros bioativos (10 a 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), em três períodos de tempo. Não foram observadas alterações significativas na atividade metabólica mitocondrial de hASCs após exposição ao produto iônico dos vidros bioativos, e todos os grupos experimentais apresentaram função celular acima de 80%. O produto iônico dos vidros bioativos obtidos pelo processamento sol-gel gerou um ambiente favorável às células, mesmo em amostras com maior teor de cobalto, em diferentes concentrações do produto iônico dos vidros bioativos.

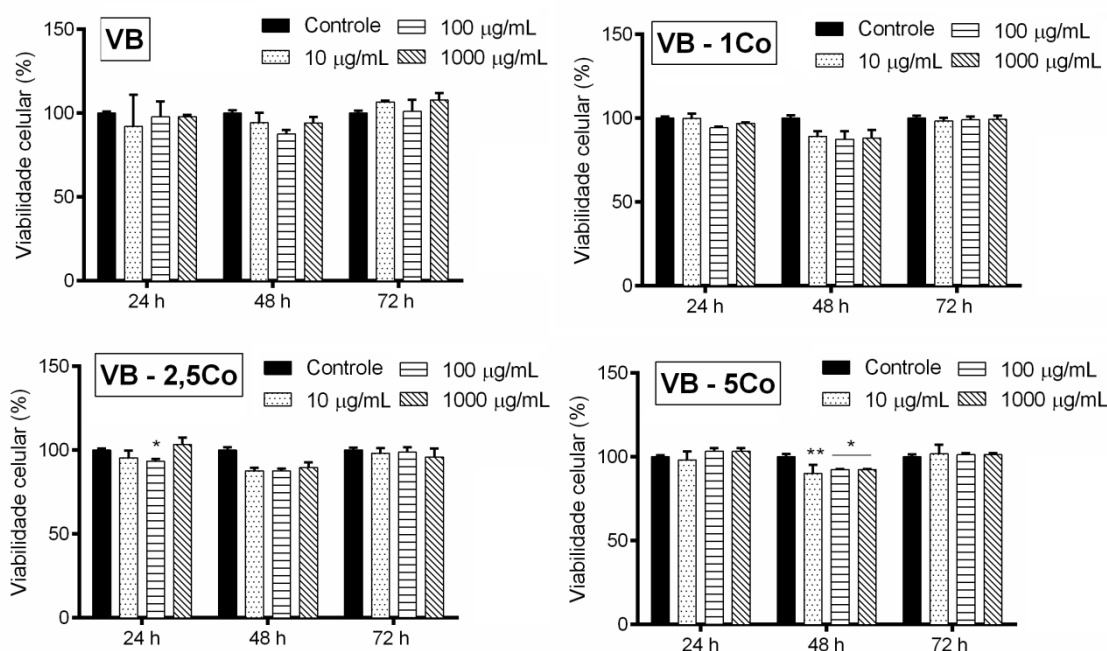


Figura 7.6: Viabilidade celular determinada por MTT em hASCs para VB, VB-1Co, VB-2,5Co e VB-5Co. Viabilidade celular média normalizada pela viabilidade média do grupo controle. Nível de significância estatística  $p < 0,05$  (\*) ou  $p < 0,01$  (\*\*) conforme determinado por método One-way ANOVA seguida de teste Tukey post-hoc.

A angiogênese é um processo complexo regulado por agentes pró e antiangiogênicos e é dependente de vários eventos, nos quais a migração de células endoteliais capilares é um componente crucial para a formação de novos vasos sanguíneos<sup>(198)</sup>. As células endoteliais podem formar rapidamente novos vasos sanguíneos em resposta a danos teciduais, falta de oxigênio e nutrientes e em diferentes condições patológicas, como câncer e inflamação<sup>(199)</sup>, sendo frequentemente utilizadas em ensaios *in vitro* para examinar diferentes aspectos do processo angiogênico<sup>(200)</sup>. No entanto, um importante passo inicial é a avaliação da viabilidade de células endoteliais ao biomaterial. Nesse trabalho, HUVECs foram expostas a diferentes concentrações do produto iônico de vidros bioativos por 24, 48 e 72 horas, e os resultados são apresentados na Figura 7.7. A amostra contendo maior teor de cobalto apresentou o menor valor de viabilidade celular, porém mantendo-se acima de 70% após 48 horas de exposição ao produto iônico, demonstrando que o aumento do teor de Co pode afetar a viabilidade de HUVECs. Para as demais amostras não foram observadas diferenças estatísticas significativas quando comparadas com o grupo controle. Não foi observada citotoxicidade para as demais amostras mesmo após 72 horas de exposição ao produto iônico. Análises de MTT em células hASCs e HUVECs mostraram que vidros bioativos com capacidade de liberação de cobalto podem ser

aplicados como uma potencial estratégia para estimular angiogênese, apresentando viabilidade celular, embora o teor de cobalto deva ser devidamente ajustado.

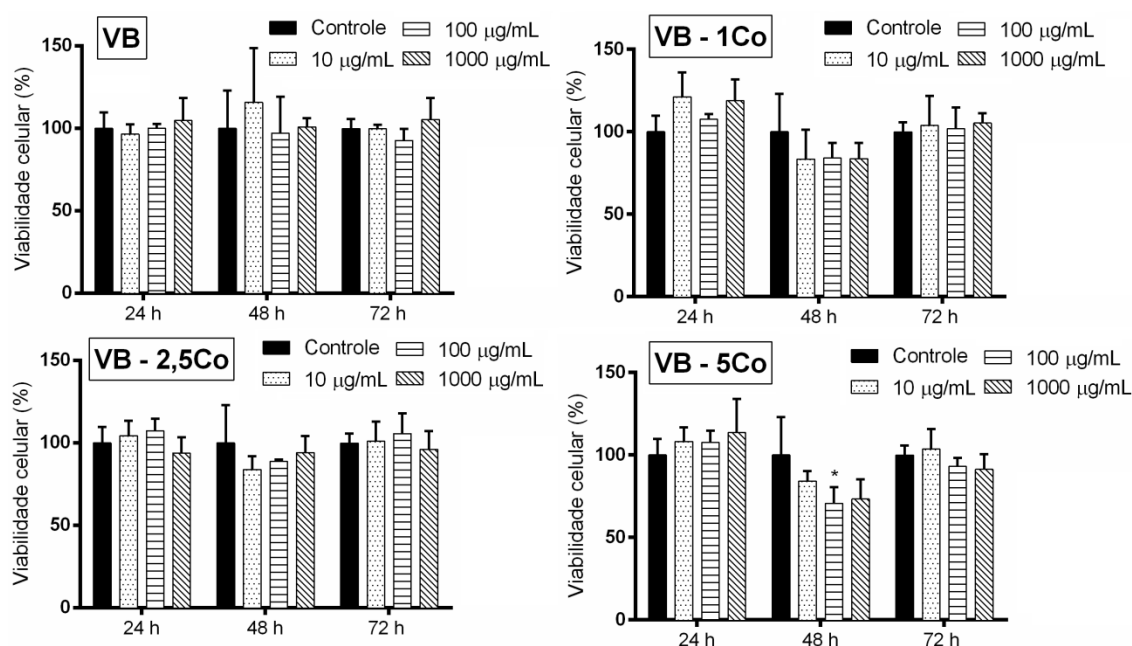


Figura 7.7: Viabilidade celular determinada por MTT em HUVECs para VB, VB-1Co, VB-2,5Co e VB-5Co. Viabilidade celular média normalizada pela viabilidade média do grupo controle. Nível de significância estatística  $p < 0,05$  (\*) ou  $p < 0,01$  (\*\*) conforme determinado por método One-way ANOVA seguida de teste Tukey post-hoc.

A biocompatibilidade pode também ser avaliada pela interação do material com o corpo, sendo um passo importante na caracterização de materiais para aplicação biomédica. Para este propósito, a análise de biocompatibilidade foi realizada pela avaliação da resposta do tecido ao implante subcutâneo de pastilhas de vidros bioativos no dorso de ratos por 28 dias. Para tal fim, foi selecionada a amostra VB-2,5Co, já que possui o teor mais elevado de cobalto que não foi capaz de alterar significativamente a atividade metabólica de células nos estudos de viabilidade celular por MTT, em diferentes concentrações do seu produto iônico e períodos de tempo. Para comparação, o estudo foi realizado também utilizando a amostra VB, e um grupo controle, no qual pastilhas do vidro bioativo não foram implantadas nos animais. Análises histológicas e morfométricas são apresentadas na Figura 7.8.

Pela avaliação histológica (Figura 7.8(A-C)) é possível observar o infiltrado inflamatório na região mais profunda do tecido adjacente aos implantes de VB e VB-2,5Co, apresentando maior intensidade da resposta inflamatória no grupo VB-2,5Co. Células com morfologia mononuclear típica foram observadas em todos os grupos, indicativo da inflamação crônica no local do implante<sup>(201)</sup>. Após o implante de biomateriais, tem-



se início uma resposta inflamatória aguda, geralmente reduzida após alguns dias, dependendo de vários fatores, como a extensão da lesão, conforme relatado em trabalhos na literatura <sup>(201)</sup>. Em seguida, observa-se uma inflamação crônica, relacionada à reação do corpo com a interface do material, e presença de células mononucleares no local do implante <sup>(201)</sup>, dando lugar posteriormente ao processo de cicatrização. Portanto, o processo de reparo tecidual está intimamente relacionado à reação inflamatória, e a presença do infiltrado após realização dos implantes indica o início do reparo tecidual.

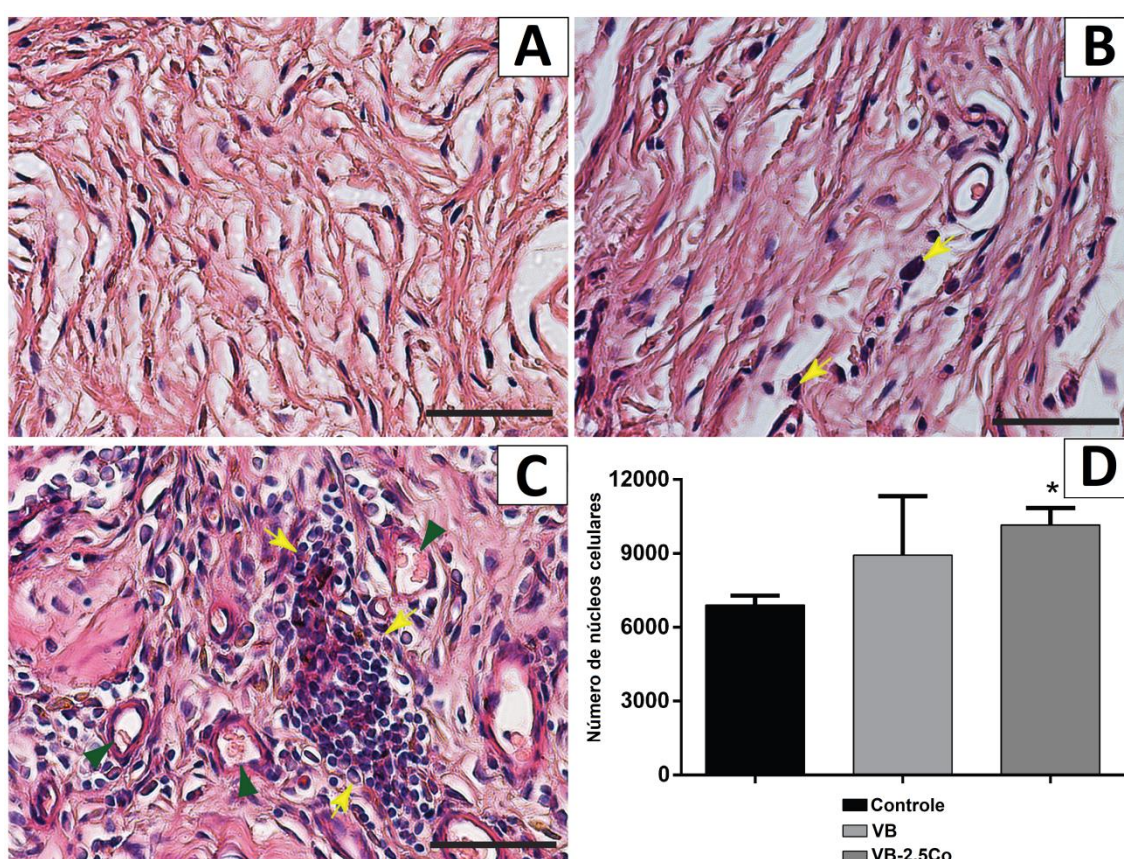


Figura 7.8: Avaliação histológica da resposta ao implante de vidros bioativos na derme profunda do dorso de ratos, onde (A) controle, (B) VB e (C) VB-2,5Co, e análise morfométrica do infiltrado (D). Setas amarelas destacam o infiltrado celular e a neoformação de vasos sanguíneos é realçada pelas cabeças de setas verdes. Análise estatística One-way ANOVA, seguida de teste post-hoc Holm-Sidak. (\*) para  $p < 0,05$  vs. Controle. Barra de escala =  $50\mu\text{m}$ .

Em adição ao infiltrado inflamatório, também foram observados vasos neoformados ao redor dos implantes, indicativos de angiogênese, com maior presença na amostra VB-2,5Co, podendo estar relacionado à liberação de Co dessa amostra. A presença de infiltrado inflamatório e vasos neoformados caracteriza o tecido de granulação <sup>(202)</sup>, que posteriormente pode evoluir para formação de uma cicatriz definitiva no processo de

reparação tecidual<sup>(203)</sup>. No entanto, a fim de se obter dados mais concretos a respeito da alteração induzida pelo Co, é necessária a avaliação quantitativa em trabalhos futuros de marcadores da angiogênese, como o VEGF e o HIF-1 $\alpha$ .

A análise morfométrica foi realizada com o objetivo de avaliar o infiltrado celular na região subcutânea, verificando a ocorrência de células com morfologia mononuclear no local do implante. Embora um número mais elevado de núcleos celulares tenha sido observado quando VB foi comparado com o grupo controle (Figura 7.8(D)), indicando maior efeito inflamatório devido ao implante, não foram observadas diferenças significativas. O grupo em que as pastilhas contendo Co foram implantadas demonstraram aumento no número de núcleos celulares, sugerindo uma inflamação crônica mais pronunciada, relacionada à propriedade angiogênica do cobalto, já que a via do HIF-1 recruta células inflamatórias, ajudando a coordenar a resposta do corpo à lesão<sup>(86)</sup>.

O teste da biocompatibilidade *in vivo* demonstrou que o corpo reage ao implante de pastilhas de vidro bioativo, levando a uma resposta inflamatória como um passo inicial no processo de cicatrização de feridas. Não foram observadas reações adversas ao implante, tais como hiperemia, constipação ou presença de necrose dos vasos sanguíneos. Os resultados indicam que, apesar da incorporação de cobalto na estrutura do vidro, o material ainda é biocompatível, sendo um potencial dispositivo para aprimorar a angiogênese na regeneração tecidual.

#### 7.4 Conclusões

Neste capítulo, diferentes composições de vidro bioativo foram obtidas pelo processamento sol-gel a partir da incorporação de cobalto em sua estrutura. Materiais nanoporosos e com alta área superficial foram obtidos, com caráter predominantemente amorfo, no entanto o aumento no teor de Co pode induzir a formação de regiões cristalinas no material. Estudos em SBF mostraram uma capacidade de liberação controlada desse íon, e evidência da formação de HAC foi encontrada, embora a uma taxa mais lenta quando maiores teores de Co foram utilizados. A biocompatibilidade foi avaliada por MTT, e um ambiente favorável ao crescimento de HUVECs e hASCs foi obtido, mesmo quando expostas à diferentes concentrações do produto iônico dos vidros bioativos, não apresentando efeito citotóxico apesar da incorporação do cobalto. Implantes foram realizados no dorso de ratos, e os ensaios histológicos e morfométricos mostraram que não houve indução de



respostas adversas durante o estudo *in vivo*, e a presença do infiltrado inflamatório e de vasos neoformados indica um alto nível de angiogênese, principalmente na amostra com capacidade de liberação de Co. A incorporação de Co se apresenta como uma potencial estratégia no desenvolvimento de materiais com propriedades aprimoradas para o reparo tecidual.

## CAPÍTULO 8. Considerações Finais

---

### 8.1 Conclusões gerais

Neste trabalho foi realizado o estudo de novas composições de vidros bioativos obtidos pelo processo sol-gel a partir da incorporação de cobalto e manganês, íons metálicos com potencial efeito terapêutico para aplicações na engenharia de tecidos. Os efeitos da incorporação desses íons na estrutura, comportamento térmico, propriedades texturais, capacidade de dissolução, bioatividade, biocompatibilidade, citotoxicidade, além dos efeitos angiogênicos e osteogênicos dos vidros bioativos derivados da composição 58S foram avaliados.

Vidros bioativos contendo até 5,0% molar de MnO foram obtidos, e a composição confirmada pelo método de fusão do metaborato de lítio e ICP-OES. Os materiais apresentaram área superficial específica elevada, com valores entre 111 e 171m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>, e capacidade de liberação controlada de Mn em SBF, atingindo um máximo de 2,8ppm durante os 14 dias de análise. Além disso, indícios da formação da camada de HAC foram observados já nas primeiras 24 horas de ensaio. Estudos de viabilidade celular em osteoblastos expostos ao produto iônico desses materiais demonstraram atividade metabólica acima de 70%, caracterizando-os como não tóxicos em uma larga faixa de concentração do produto iônico, e células com morfologia e espalhamento típicos foram observadas após exposição ao produto iônico dos materiais, sem danos na membrana, conforme análises obtidas por LIVE/DEAD®. Análises adicionais em diferentes composições de vidros bioativos contendo Mn foram realizadas no capítulo subsequente (Capítulo 5), no qual um diferente precursor de manganês foi avaliado (nitrato de manganês). Análises demonstraram que a estrutura amorfa, com elevada área superficial e nanoporosa foi mantida nos vidros bioativos sintetizados utilizando o nitrato de manganês como precursor do Mn, confirmando o seu potencial para incorporação desse íon nos vidros bioativos. Análises de XPS confirmaram a presença majoritária de espécies Mn<sup>2+</sup>, sem alterações significativas na rede do material devido à sua incorporação. O material demonstrou ainda capacidade de liberação iônica controlada em DMEM, atingindo um máximo de 1,4ppm após 72 horas de estudo, mantendo-se dentro da faixa terapêutica relatada. Foi observada uma elevada viabilidade celular, próximas ao grupo controle, quando hMSCs foram expostas ao produto iônico dos vidros bioativos contendo Mn, e capacidade de estimular todos os estágios da diferenciação de hMSCs e subsequente mineralização, em análise

realizada durante 21 dias de cultura. Vidros bioativos contendo Mn foram capazes de estimular a diferenciação osteogênica mesmo sem a presença de suplementos osteogênicos, confirmando o seu potencial para aprimoramento da regeneração óssea.

A influência da utilização de diferentes precursores para a incorporação de cobalto na estrutura dos vidros bioativos também foi avaliada. Quando o cloreto de cobalto foi utilizado como precursor, picos cristalinos foram observados por DRX, compatíveis com estruturas de óxido de cobalto (II,III), enquanto que a utilização de nitrato de cálcio manteve o caráter amorfo do material. Esses resultados foram confirmados por XPS, que indicou a presença majoritária de espécies  $\text{Co}^{2+}$  na estrutura dos vidros bioativos, porém com evidência da formação de espécies  $\text{Co}^{3+}$  principalmente quando o precursor utilizado foi o cloreto de cobalto. No entanto, ambas as amostras apresentaram capacidade de liberação desse íon em SBF, atingindo máxima concentração de cobalto entre 6 e 10ppm, além de indícios da formação da camada de HAC nos primeiros dias de estudo. Por fim, diferentes composições de vidro bioativo contendo cobalto foram obtidas no Capítulo 7, e uma estrutura composta majoritariamente por NBO foi observada, típica de vidros com caráter amorfo. A capacidade de liberação iônica controlada em SBF foi também confirmada para as diferentes composições de vidro bioativo contendo até 5,0% molar de  $\text{CoO}$ , com indícios da formação de HAC, embora a presença de teores mais elevados de Co tenha reduzido a taxa de formação dessa camada na superfície dos materiais. A biocompatibilidade dos vidros bioativos foi confirmada quando células hASCs e HUVECs foram expostas ao produto iônico do material em uma ampla gama de concentrações (10 a  $1000\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), apresentando níveis de viabilidade celular acima de 90%. Implantes subcutâneos em ratos foram realizados com as amostras de vidro bioativos contendo Co, e estudos morfológicos e histológicos mostraram que não houve indução de respostas adversas ao material, e a presença de infiltrado inflamatório e vasos neoformados indica um alto nível de angiogênese, confirmando o potencial desse íon para a regeneração de tecidos.

Vidros bioativos obtidos pelo método sol-gel apresentam diversas vantagens quando comparados com os vidros derivados do processo de fusão, como a sua elevada área superficial e a presença de nanoporos inerentes ao processo, além de alta versatilidade química, conferindo-lhes propriedades atrativas para a área de engenharia de tecidos. Este trabalho demonstrou que diferentes concentrações de íons metálicos podem ser incorporadas na estrutura dos vidros bioativos

A avaliação do processo de obtenção e da estrutura dos vidros bioativos se mostrou extremamente importante para se correlacionar com os resultados biológicos. Além disso, estudos mostraram que esses íons com propriedades terapêuticas podem ser liberados de maneira controlada a partir do ajuste da composição do material, importante fator para avaliação da sua toxicidade e interação com o tecido. A incorporação de Mn e Co, como potenciais agentes osteogênicos e angiogênico, respectivamente, são exemplos de estratégias promissoras para obtenção de materiais superiores para a engenharia de tecidos, sendo alternativas mais baratas e seguras em relação a terapias gênicas ou aplicação de fatores de crescimento, aprimorando o efeito biológico de biomateriais. A obtenção de novas composições de vidros bioativos contendo íons terapêuticos específicos se mostra como uma estratégia para ampliação do potencial desse material, e consequente aplicação em diferentes campos da engenharia de tecidos, devendo ser alvo de pesquisas intensas no futuro.

## 8.2 Sugestões para trabalhos futuros

- Caracterização estrutural dos vidros bioativos por  $^{29}\text{Si}$  NMR para melhor compreensão do papel de Co e Mn na rede do material.
- Avaliação quantitativa da expressão de OSC, OSP e colágeno tipo I de células expostas ao produto iônico dos vidros bioativos contendo Mn.
- Avaliação *in vivo* do potencial de regeneração óssea dos vidros bioativos contendo Mn a partir de implantes em defeitos ósseos por diferentes períodos de tempo.
- Confirmação do potencial angiogênico de vidros bioativos contendo Co pela expressão de VEGF e HIF-1 $\alpha$  *in vitro* e de limites de concentração iônica.
- Associação de Co e Mn em uma composição de vidro bioativo para avaliação do efeito sinérgico de angiogênese e osteogênese nesse material.
- Estudar o efeito da composição do vidro bioativo e incorporação de íons terapêuticos em sistemas contendo menos componentes para evitar influência de íons adicionais nas propriedades do material, como por exemplo sistemas  $\text{SiO}_2\text{-CoO}$ ,  $\text{SiO}_2\text{-MnO}$  ou  $\text{SiO}_2\text{-CaO-MnO}$ , variando-se as composições de cada componente.
- Associação de micropartículas de vidro bioativo contendo Mn e Co com materiais poliméricos biodegradáveis, como ácido polilático ou policaprolactona, para obtenção de compósitos e *scaffolds*.

- Síntese de nanopartículas de vidros bioativos contendo Mn e Co em diferentes composições para aplicações em sistemas injetáveis e nanocompósitos, aliando as propriedades específicas de nanopartículas com o potencial de liberação de íons terapêuticos.

### 8.3 Publicações relacionadas com o trabalho de Doutorado

#### Artigos publicados em periódicos científicos:

1. BARRIONI, B.R.; OLIVEIRA, A.C.; LEITE, M.F., PEREIRA, M.M.; “*Sol-gel-derived manganese-releasing bioactive glass as a therapeutic approach for bone tissue engineering*”. J. of Mat. Sci.,v.52, p.8904-8927, 2017

#### Capítulos de livro publicados:

1. BARRIONI, B.R.; OLIVEIRA, A.A.R; PEREIRA, M.M.; “*The Evolution, Control, and Effects of the Compositions of Bioactive Glasses on Their Properties and Applications*” Advanced Struc. Mat. 1 ed Springer Int. Publ., v.53, 2016

#### Artigos submetidos em periódicos científicos:

1. BARRIONI, B.R.; LAIA, A.G.S.;VALVERDE, T.M.; MARTINS, T.M.M.; CALIARI, M.V; SÁ, M.A.; GOES, A.M.; PEREIRA, M.M. “*In vitro and in vivo biocompatibility investigation and structural evaluation of cobalt-releasing sol-gel bioactive glass*”. Ceramics International. Submetido em: 27 de abril de 2018.
2. BARRIONI, B.R.; NORRIS, E.; JONES, J.J.; PEREIRA, M.M; “*The influence of cobalt incorporation and cobalt precursor selection on sol-gel derived bioactive glass structure and properties*”. J. of Sol-gel Science and Tech. Submetido em: 25 de maio de 2018.

## CAPÍTULO 9. Referências Bibliográficas

---

1. Shafiee, A. & Atala, A. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. *Annu. Rev. Med.* 68, 29–40 (2017).
2. Hench, L. L., Splinter, R. J., Allen, W. C. & Greenlee, T. K. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 5, 117–141 (1971).
3. Jones, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 9, 4457–4486 (2013).
4. Gerhardt, L.-C. & Boccaccini, A. R. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials (Basel)*. 3, 3867–3910 (2010).
5. Baino, F. Bioactive glasses – When glass science and technology meet regenerative medicine. *Ceram. Int.* (2018). doi:10.1016/j.ceramint.2018.05.180
6. Brauer, D. S. Bioactive Glasses-Structure and Properties. *Angew. Chemie Int. Ed.* 54, 4160–4181 (2015).
7. Pires, E. G. *et al.* Silver-doped 58S bioactive glass as an anti-Leishmania agent. *Int. J. Appl. Glas. Sci.* 1, 52–61 (2017).
8. Naruphontjirakul, P., Porter, A. E. & Jones, J. R. In vitro osteogenesis by intracellular uptake of strontium containing bioactive glass nanoparticles. *Acta Biomater.* (2017). doi:10.1016/j.actbio.2017.11.008
9. Maçon, A. L. B. *et al.* Lithium-silicate sol-gel bioactive glass and the effect of lithium precursor on structure-property relationships. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* (2016). doi:10.1007/s10971-016-4097-x
10. Romero-Sánchez, L. B., Marí-Beffa, M., Carrillo, P., Medina, M. Á. & Díaz-Cuenca, A. Copper-containing mesoporous bioactive glass promotes angiogenesis in an in vivo zebrafish model. *Acta Biomater.* (2018). doi:10.1016/j.actbio.2017.12.032
11. Fujitani, W. *et al.* Synthesis of Hydroxyapatite Containing Manganese and Its Evaluation of Biocompatibility. *Nano Biomed.* 2, 37–46 (2010).
12. Rico, H. *et al.* Effects on bone loss of manganese alone or with copper supplement in ovariectomized rats A morphometric and densitometric study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 90, 97–101 (2000).
13. Miola, M. *et al.* In vitro study of manganese-doped bioactive glasses for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* 38, 107–118 (2014).
14. Hoppe, A. *et al.* Cobalt-releasing 1393 bioactive glass-derived scaffolds for bone tissue engineering applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6, 2865–2877 (2014).

15. Quinlan, E. *et al.* Hypoxia-mimicking bioactive glass/collagen glycosaminoglycan composite scaffolds to enhance angiogenesis and bone repair. *Biomaterials* 52, 358–366 (2015).
16. Littmann, E. *et al.* Cobalt-containing bioactive glasses reduce human mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation despite HIF-1 $\alpha$  stabilisation. *J. Eur. Ceram. Soc.* 38, 877–886 (2018).
17. Baino, F., Hamzehlou, S. & Kargozar, S. Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going? *J. Funct. Biomater.* 9, 25 (2018).
18. Hench, L. L. & Greenspan, D. Interactions between bioactive glass and collagen: A review and new perspectives. *J. Aust. Ceram. Soc.* 49, 1–40 (2013).
19. Hench, L. L. Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications. *New J. Glas. Ceram.* 3, 67–73 (2013).
20. Miguez-Pacheco, V., Hench, L. L. & Boccaccini, A. R. Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft tissues. *Acta Biomater.* 13, 1–15 (2015).
21. Hoppe, A., Güldal, N. S. & Boccaccini, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 32, 2757–2774 (2011).
22. Li, A. *et al.* Bioactive organic/inorganic hybrids with improved mechanical performance. *J. Mater. Chem. B* 3, 1379–1390 (2015).
23. Wagener, V., Boccaccini, A. R. & Virtanen, S. Protein-adsorption and Ca-phosphate formation on chitosan-bioactive glass composite coatings. *Appl. Surf. Sci.* 416, 454–460 (2017).
24. Moreira, C. D. F., Carvalho, S. M., Mansur, H. S. & Pereira, M. M. Thermogelling chitosan–collagen–bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 58, 1207–1216 (2016).
25. Montazerian, M. & Zanotto, E. D. A guided walk through Larry Hench's monumental discoveries. *J. Mater. Sci.* 52, 8695–8732 (2017).
26. Kaur, G. *et al.* A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 102, 254–274 (2014).
27. Hoppe, A. Bioactive Glass Derived Scaffolds with Therapeutic Ion Releasing Capability for Bone Tissue Engineering. (Universitat Erlangen-Nurnberg, 2014).
28. Jones, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater.* 9, 4457–4486 (2013).
29. Garg, T., Singh, O., Arora, S. & Murthy, R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 29, 1–63 (2012).

30. Zheng, K. & Boccaccini, A. R. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 249, 363–373 (2017).
31. Maçon, A. L. B., Lee, S., Poologasundarampillai, G., Kasuga, T. & Jones, J. R. Synthesis and dissolution behaviour of CaO/SrO-containing sol-gel-derived 58S glasses. *J. Mater. Sci.* 52, 8858–8870 (2017).
32. Atkinson, I. *et al.* Influence of ZnO addition on the structural, in vitro behavior and antimicrobial activity of sol-gel derived CaO–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>–SiO<sub>2</sub> bioactive glasses. *Ceram. Int.* 42, 3033–3045 (2016).
33. Arcos, D. & Vallet-Regí, M. Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 6, 2874–88 (2010).
34. De Oliveira, a. a R., Ciminelli, V., Dantas, M. S. S., Mansur, H. S. & Pereira, M. M. Acid character control of bioactive glass/polyvinyl alcohol hybrid foams produced by sol-gel. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 47, 335–346 (2008).
35. Gao, H. & Yang, J. Nanoscale Silicon Dioxide Prepared by Sol-Gel Process. *Science (80-. ).* 4, 152–156 (2010).
36. Vichery, C. & Nedelec, J.-M. Bioactive Glass Nanoparticles: From Synthesis to Materials Design for Biomedical Applications. *Materials (Basel).* 9, 288 (2016).
37. Rahman, I. A. & Padavettan, V. Synthesis of Silica nanoparticles by Sol-Gel: Size-dependent properties, surface modification, and applications in silica-polymer nanocomposites a review. *J. Nanomater.* 2012, (2012).
38. Brinker, C. & Scherer, G. Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing. (1990).
39. Hench, L. L. & West, J. K. The sol-gel process. *Chem. Rev.* 90, 33–72 (1990).
40. de Oliveira, A. A. R., de Carvalho, B. B., Sander Mansur, H. & de Magalhães Pereira, M. Synthesis and characterization of bioactive glass particles using an ultrasound-assisted sol-gel process: Engineering the morphology and size of sonogels via a poly(ethylene glycol) dispersing agent. *Mater. Lett.* 133, 44–48 (2014).
41. Lin, S., Ionescu, C., Pike, K. J., Smith, M. E. & Jones, J. R. Nanostructure evolution and calcium distribution in sol-gel derived bioactive glass. *J. Mater. Chem.* 19, 1276–1282 (2009).
42. Hoppe, A. *et al.* In vitro reactivity of Cu doped 45S5 Bioglass® derived scaffolds for bone tissue engineering. *J. Mater. Chem. B* 1, 5659 (2013).
43. Izquierdo-Barba, I., Salinas, A. J. & Vallet-Regí, M. Bioactive Glasses: From Macro to Nano. *Int. J. Appl. Glas. Sci.* 4, 149–161 (2013).
44. FitzGerald, V. *et al.* A Neutron and X-Ray Diffraction Study of Bioglass® with Reverse Monte Carlo Modelling. *Adv. Funct. Mater.* 17, 3746–3753 (2007).



45. Martin, R. a. *et al.* Characterizing the hierarchical structures of bioactive sol-gel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration. 1422–1443 (2012). doi:10.1098/rsta.2011.0308
46. Ting, H.-K. *et al.* Phosphate content affects structure and bioactivity of sol-gel silicate bioactive glasses. *Int. J. Appl. Glas. Sci.* (2017). doi:10.1111/ijag.12322
47. Elgayar, I., Aliev, a. E., Boccaccini, a. R. & Hill, R. G. Structural analysis of bioactive glasses. *J. Non. Cryst. Solids* 351, 173–183 (2005).
48. Fayon, F., Duée, C., Poumeyrol, T., Allix, M. & Massiot, D. Evidence of nanometric-sized phosphate clusters in bioactive glasses as revealed by solid-state <sup>31</sup>P NMR. *J. Phys. Chem. C* 117, 2283–2288 (2013).
49. Sepulveda, P., Jones, J. R. & Hench, L. Characterization of Melt-Derived 45S5 and sol-gel-derived 58S Bioactive Glasses. *J. Biomed. Mater. Res.* 58, 734–740 (2001).
50. Mercier, C., Follet-Houttemane, C., Pardini, A. & Revel, B. Influence of P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> content on the structure of SiO<sub>2</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioglasses by <sup>29</sup>Si and <sup>31</sup>P MAS-NMR. *J. Non. Cryst. Solids* 357, 3901–3909 (2011).
51. Chen, X. *et al.* Synthesis and characterization of novel multiphase bioactive glass-ceramics in the CaO-MgO-SiO<sub>2</sub> system. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 93, 194–202 (2010).
52. Ryu, H.-S. *et al.* Novel bioactive and biodegradable glass ceramics with high mechanical strength in the CaO--SiO<sub>2</sub>--B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> system. *J. Biomed. Mater. Res. A* 68, 79–89 (2004).
53. Arcos, D., Greenspan, D. C. & Vallet-Regí, M. Influence of the stabilization temperature on textural and structural features and ion release in SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sol-gel glasses. *Chem. Mater.* 14, 1515–1522 (2002).
54. Pereira, M. M., Clark, A. E. & Hench, L. L. Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 28, 693–698 (1994).
55. Kokubo, T. & Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27, 2907–2915 (2006).
56. Maçon, A. L. B. *et al.* A unified in vitro evaluation for apatite-forming ability of bioactive glasses and their variants. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26, 115 (2015).
57. Pereira, M. M., Clark, A. E. & Hench, L. L. Homogeneity of Bioactive Sol-Gel-Derived Glasses in the System CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>.pdf. *J. Mater. Synth. Process.* 2, 189–195 (1994).
58. Hench, L. L. The story of Bioglass. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17, 967–978 (2006).

59. Arcos, D., Greenspan, D. C. & Vallet-Regí, M. A new quantitative method to evaluate the in vitro bioactivity of melt and sol-gel-derived silicate glasses. *J. Biomed. Mater. Res. A* 65, 344–351 (2003).
60. Wallace, K. E., Hill, R. G., Pembroke, J. T., Brown, C. J. & Hatton, P. V. Influence of sodium oxide content on bioactive glass properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 10, 697–701 (1999).
61. Gunawidjaja, P. N. *et al.* Local structures of mesoporous bioactive glasses and their surface alterations in vitro: inferences from solid-state nuclear magnetic resonance. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 370, 1376–1399 (2012).
62. Kohli, N. *et al.* Bone remodelling in vitro : Where are we headed ? -A review on the current understanding of physiological bone remodelling and in fl ammation and the strategies for testing biomaterials in vitro. *Bone* 110, 38–46 (2018).
63. Hench, L. L. Bioglass: 10 milestones from concept to commerce. *J. Non. Cryst. Solids* 432, 2–8 (2016).
64. Houreh, A. B. *et al.* Influence of calcium and phosphorus release from bioactive glasses on viability and differentiation of dental pulp stem cells. *J. Mater. Sci.* (2017). doi:10.1007/s10853-017-0946-4
65. Hum, J. & Boccaccini, A. R. Bioactive glasses as carriers for bioactive molecules and therapeutic drugs: A review. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23, 2317–2333 (2012).
66. Kramer, E., Itzkowitz, E. & Wei, M. Synthesis and characterization of cobalt-substituted hydroxyapatite powders. *Ceram. Int.* 40, 13471–13480 (2014).
67. Torres, P. M. C. *et al.* Effects of Mn-doping on the structure and biological properties of  $\beta$ -tricalcium phosphate. *J. Inorg. Biochem.* 136, 57–66 (2014).
68. Marie, P. J. The calcium-sensing receptor in bone cells: A potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone* 46, 571–576 (2010).
69. Carolina, C. E., Agda, A. A., Gonzalez, I., A. A. Macedo, W. & M. Pereira, M. Structural analysis of fluorine-containing bioactive glass nanoparticles synthesized by sol-gel route assisted by ultrasound energy. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 1–7 (2017). doi:10.1002/jbm.b.33846
70. Bari, A. *et al.* Copper-containing mesoporous bioactive glass nanoparticles as multifunctional agent for bone regeneration. *Acta Biomater.* 55, 493–504 (2017).
71. Rahimnejad Yazdi, A., Torkan, L., Stone, W. & Towler, M. R. The impact of gallium content on degradation, bioactivity, and antibacterial potency of zinc borate bioactive glass. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 1–10 (2017). doi:10.1002/jbm.b.33856

72. Sopyan, I., Ramesh, S., Nawawi, N. a., Tampieri, a. & Sprio, S. Effects of manganese doping on properties of sol–gel derived biphasic calcium phosphate ceramics. *Ceram. Int.* 37, 3703–3715 (2011).
73. Li, Y., Widodo, J., Lim, S. & Ooi, C. P. Synthesis and cytocompatibility of manganese (II) and iron (III) substituted hydroxyapatite nanoparticles. *J. Mater. Sci.* 47, 754–763 (2012).
74. Miguez-pacheco, V. & Greenspan, D. Bioactive glasses in soft tissue repair. *Am. Ceram. Soc. Bull.* 94, 27–31 (2015).
75. Baino, F., Novajra, G., Miguez-Pacheco, V., Boccaccini, A. R. & Vitale-Brovarone, C. Bioactive glasses: Special applications outside the skeletal system. *J. Non. Cryst. Solids* (2015). doi:10.1016/j.jnoncrysol.2015.02.015
76. Lüthen, F. *et al.* Influence of manganese ions on cellular behavior of human osteoblasts in vitro. *Biomol. Eng.* 24, 531–536 (2007).
77. Bae, Y. J. & Kim, M. H. Manganese supplementation improves mineral density of the spine and femur and serum osteocalcin in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 124, 28–34 (2008).
78. Beattie, J. H. & Avenell, a. Trace element nutrition and bone metabolism. *Nutr. Res. Rev.* 5, 167–188 (1992).
79. Landete-Castillejos, T. *et al.* Do drastic weather effects on diet influence changes in chemical composition, mechanical properties and structure in deer antlers? *Bone* 47, 815–825 (2010).
80. Landete-Castillejos, T. *et al.* Does nutrition affect bone porosity and mineral tissue distribution in deer antlers? The relationship between histology, mechanical properties and mineral composition. *Bone* 50, 245–254 (2012).
81. Paluszkiwicz, C. *et al.* Synthesis, structural properties and thermal stability of Mn-doped hydroxyapatite. *J. Mol. Struct.* 976, 301–309 (2010).
82. Bracci, B. *et al.* Effect of Mg<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup> on the chemico-physical and in vitro biological properties of calcium phosphate biomimetic coatings. *J. Inorg. Biochem.* 103, 1666–1674 (2009).
83. Pabbruwe, M. B., Standard, O. C., Sorrell, C. C. & Howlett, C. R. Bone formation within alumina tubes: Effect of calcium, manganese, and chromium dopants. *Biomaterials* 25, 4901–4910 (2004).
84. Nawaz, Q. *et al.* Synthesis and characterization of manganese containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 5, (2018).
85. Azevedo, M. *et al.* Synthesis and characterization of hypoxia-mimicking bioactive glasses for skeletal regeneration. *J. Mater. Chem.* 20, 8854–8864 (2010).

86. Wan, C. *et al.* Activation of the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  pathway accelerates bone regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 686–691 (2008).
87. Semenza, G. L. Life with oxygen. *Science* 318, 62–64 (2007).
88. Wu, C. *et al.* Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering. *Biomaterials* 33, 2076–2085 (2012).
89. Ignjatović, N. *et al.* Nanoparticles of cobalt-substituted hydroxyapatite in regeneration of mandibular osteoporotic bones. *Changes* 29, 997–1003 (2012).
90. Kulanthaivel, S. *et al.* Improving the osteogenic and angiogenic properties of synthetic hydroxyapatite by dual doping of bivalent cobalt and magnesium ion. *Ceram. Int.* 41, 11323–11333 (2015).
91. Buttyan, R. *et al.* Acute intravesical infusion of a cobalt solution stimulates a hypoxia response, growth and angiogenesis in the rat bladder. *J. Urol.* 169, 2402–2406 (2003).
92. Dziadek, M., Zagrajczuk, B., Menaszek, E., Dziadek, K. & Cholewa-Kowalska, K. A simple way of modulating in vitro angiogenic response using Cu and Co-doped bioactive glasses. *Mater. Lett.* 215, 87–90 (2018).
93. Rust, K. R., Singleton, G. T., Wilson, J. & Antonelli, P. J. Bioglass middle ear prosthesis: long-term results. *The American journal of otology* 17, 371–374 (1996).
94. Hench, L. L., Jones, J. R., El-fiqi, A. & Jones, J. R. Bioactive Glasses : Frontiers and Challenges. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3, 1–12 (2015).
95. Brauer, D. S. *et al.* Fluoride-containing bioactive glass-ceramics. *J. Non. Cryst. Solids* 358, 1438–1442 (2012).
96. Zhang, J. *et al.* Three-dimensional printing of strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomater.* 10, 2269–2281 (2014).
97. Gentile, P. *et al.* Bioactive glass/polymer composite scaffolds mimicking bone tissue. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 100 A, 2654–2667 (2012).
98. Barabadi, Z. *et al.* Fabrication of hydrogel based nanocomposite scaffold containing bioactive glass nanoparticles for myocardial tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C* 69, 1137–1146 (2016).
99. Ma, A. N. *et al.* Local protective effects of oral 45S5 bioactive glass on gastric ulcers in experimental animals. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24, 803–809 (2013).
100. Jones, J. R., Brauer, D. S., Hupa, L. & Greenspan, D. C. Bioglass and Bioactive Glasses and Their Impact on Healthcare. *Int. J. Appl. Glas. Sci.* 7, 423–434

- (2016).
101. Srivastava, A. K., Pyare, R. & Singh, S. P. In Vitro Bioactivity and Physical–Mechanical Properties of MnO<sub>2</sub> Substituted 45S5 Bioactive Glasses and Glass-Ceramics. *J. Biomater. Tissue Eng.* 2, 249–258 (2012).
  102. Kokubo, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials* 12, 155–163 (1991).
  103. 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, 2941–2948 (2004).
  104. Huang, K. *et al.* Sol–gel derived mesoporous 58S bioactive glass coatings on AZ31 magnesium alloy and in vitro degradation behavior. *Surf. Coatings Technol.* 240, 137–144 (2014).
  105. Saboori, a. *et al.* Synthesis, characterization and in vitro bioactivity of sol-gel-derived SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO bioglass. *Mater. Sci. Eng. C* 29, 335–340 (2009).
  106. El-Kady, A. M. & Ali, A. F. Fabrication and characterization of ZnO modified bioactive glass nanoparticles. *Ceram. Int.* 38, 1195–1204 (2012).
  107. Siqueira, R. L. & Zanotto, E. D. The influence of phosphorus precursors on the synthesis and bioactivity of SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> sol-gel glasses and glass-ceramics. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24, 365–379 (2013).
  108. Gu, Y. *et al.* Biodegradable borosilicate bioactive glass scaffolds with a trabecular microstructure for bone repair. *Mater. Sci. Eng. C* 36, 294–300 (2014).
  109. Fredholm, Y. C., Karpukhina, N., Law, R. V. & Hill, R. G. Strontium containing bioactive glasses: Glass structure and physical properties. *J. Non. Cryst. Solids* 356, 2546–2551 (2010).
  110. de Oliveira, A. A. R. *et al.* Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications. *Biomed. Mater.* 8, 025011 (2013).
  111. Ma, J., Chen, C. Z., Wang, D. G., Meng, X. G. & Shi, J. Z. Influence of the sintering temperature on the structural feature and bioactivity of sol-gel derived SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioglass. *Ceram. Int.* 36, 1911–1916 (2010).
  112. De Barros Coelho, M. & Magalhães Pereira, M. Sol-gel synthesis of bioactive glass scaffolds for tissue engineering: Effect of surfactant type and concentration. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 75, 451–456 (2005).
  113. Yu, B., Poologasundarampillai, G., Turdean-Ionescu, C., Smith, M. E. & Jones, J. R. A New Calcium Source for Bioactive Sol-Gel Hybrids. *Bioceram. Dev. Appl.*

- 1, 1–3 (2011).
114. Balamurugan, A. *et al.* Synthesis and characterisation of sol gel derived bioactive glass for biomedical applications. *Mater. Lett.* 60, 3752–3757 (2006).
  115. Hasan, M. S., Werner-Zwanziger, U. & Boyd, D. Composition-structure-properties relationship of strontium borate glasses for medical applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 103, 2344–2354 (2015).
  116. Lusvardi, G., Malavasi, G., Menabue, L. & Shrutti, S. Gallium-containing phosphosilicate glasses: Functionalization and in-vitro bioactivity. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 3190–3196 (2013).
  117. Serra, J. *et al.* FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses. *J. Non. Cryst. Solids* 332, 20–27 (2003).
  118. Pirayesh, H. & Nychka, J. a. Sol-gel synthesis of bioactive glass-ceramic 45S5 and its in vitro dissolution and mineralization behavior. *J. Am. Ceram. Soc.* 96, 1643–1650 (2013).
  119. Agathopoulos, S. *et al.* Structural analysis and devitrification of glasses based on the CaO-MgO-SiO<sub>2</sub> system with B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>O, CaF<sub>2</sub> and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> additives. *J. Non. Cryst. Solids* 352, 322–328 (2006).
  120. Haimi, S. *et al.* Characterization of zinc-releasing three-dimensional bioactive glass scaffolds and their effect on human adipose stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *Acta Biomater.* 5, 3122–3131 (2009).
  121. Marsich, L., Moimas, L., Sergo, V. & Schmid, C. Raman spectroscopic study of bioactive silica-based glasses: The role of the alkali/alkali earth ratio on the Non-Bridging Oxygen/Bridging Oxygen (NBO/BO) ratio. *Spectroscopy* 23, 227–232 (2009).
  122. Sharma, K. *et al.* Morphology and structural studies of laser treated 45S5 bioactive glass. *J. Non. Cryst. Solids* 440, 43–48 (2016).
  123. Morikawa, H., Lee, S., Kasuga, T. & Brauer, D. S. Effects of magnesium for calcium substitution in P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO-TiO<sub>2</sub> glasses. *J. Non. Cryst. Solids* 380, 53–59 (2013).
  124. Omar, S. *et al.* Sol-gel hybrid coatings with strontium-doped 45S5 glass particles for enhancing the performance of stainless steel implants: Electrochemical, bioactive and in vivo response. *J. Non. Cryst. Solids* 425, 1–10 (2015).
  125. Julien, C. M., Massot, M. & Poinignon, C. Lattice vibrations of manganese oxides: Part I. Periodic structures. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 60, 689–700 (2004).
  126. Wang, H. *et al.* Influence of Cu doping in borosilicate bioactive glass and the properties of its derived scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* 58, 194–203 (2016).

127. Anand, V., Singh, K. J. & Kaur, K. Evaluation of zinc and magnesium doped 45S5 mesoporous bioactive glass system for the growth of hydroxyl apatite layer. *J. Non. Cryst. Solids* 406, 88–94 (2014).
128. Balamurugan, A. *et al.* Development and in vitro characterization of sol-gel derived CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>-ZnO bioglass. *Acta Biomater.* 3, 255–262 (2007).
129. Mironova-Ulmane, N., Kuzmin, A. & Grube, M. Raman and infrared spectromicroscopy of manganese oxides. *J. Alloys Compd.* 480, 97–99 (2009).
130. Valliant, E. M., Turdean-Ionescu, C. A., Hanna, J. V., Smith, M. E. & Jones, J. R. Role of pH and temperature on silica network formation and calcium incorporation into sol–gel derived bioactive glasses. *J. Mater. Chem.* 22, 1613 (2012).
131. Thommes, M. Physical adsorption characterization of nanoporous materials. *Chemie-Ingenieur-Technik* 82, 1059–1073 (2010).
132. Sing, K. S. W. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). *Pure Appl. Chem.* 57, 603–619 (1985).
133. Pereira, M. M. & Hench, L. L. Mechanisms of hydroxyapatite formation on porous gel-silica substrates. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 7, 59–68 (1996).
134. Pereira, M. M., Clark, A. E. & Hench, L. L. Effect of Texture on the Rate of Hydroxyapatite Formation on Gel-Silica Surface. *J. Am. Ceram. Soc.* 78, 2463–68 (1995).
135. Bejarano, J., Caviedes, P. & Palza, H. Sol–gel synthesis and in vitro bioactivity of copper and zinc-doped silicate bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomed. Mater.* 10, 025001 (2015).
136. Jones, J. R., Ehrenfried, L. M. & Hench, L. L. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 964–973 (2006).
137. Mozafari, M. *et al.* Development of macroporous nanocomposite scaffolds of gelatin/bioactive glass prepared through layer solvent casting combined with lamination technique for bone tissue engineering. *Ceram. Int.* 36, 2431–2439 (2010).
138. Mozafari, M. & Moztarzadeh, F. Synthesis, characterization and biocompatibility evaluation of sol-gel derived bioactive glass scaffolds prepared by freeze casting method. *Ceram. Int.* 40, 5349–5355 (2014).
139. Pascuta, P. *et al.* The structural role of manganese ions in some zinc phosphate glasses and glass ceramics. *J. Alloys Compd.* 504, 479–483 (2010).
140. Goel, A., Rajagopal, R. R. & Ferreira, J. M. F. Influence of strontium on structure, sintering and biodegradation behaviour of CaO-MgO-SrO-SiO

- 2-P                      2O                      5-CaF                      2 glasses. *Acta Biomater.* 7, 4071–4080 (2011).
141. Gentleman, E. *et al.* The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. *Biomaterials* 31, 3949–3956 (2010).
  142. Murphy, S., Boyd, D., Moane, S. & Bennett, M. The effect of composition on ion release from Ca-Sr-Na-Zn-Si glass bone grafts. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20, 2207–2214 (2009).
  143. Medvecký, Ľ. *et al.* Influence of manganese on stability and particle growth of hydroxyapatite in simulated body fluid. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 281, 221–229 (2006).
  144. Perez-Pariente, J., Balas, F. & Vallet-Regi, M. Surface and chemical study of SiO<sub>2</sub>.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.CaO.(MgO) bioactive glasses. *Chem. Mater.* 12, 750–755 (2000).
  145. Toufiq, A. M., Wang, F., Javed, Q. & Li, Y. Influence of SiO<sub>2</sub> on the structure-controlled synthesis and magnetic properties of prismatic MnO<sub>2</sub> nanorods. *Nanotechnology* 24, 415703 (2013).
  146. Gostynski, R., Conradie, J. & Erasmus, E. Significance of the electron-density of molecular fragments on the properties of manganese(III) β-diketonato complexes: an XPS and DFT study. *RSC Adv.* 7, 27718–27728 (2017).
  147. Biesinger, M. C. *et al.* Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni. *Appl. Surf. Sci.* 257, 2717–2730 (2011).
  148. Cerrato, J. M., Hochella, M. F., Knocke, W. R., Dietrich, A. M. & Cromer, T. F. Use of XPS to identify the oxidation state of Mn in solid surfaces of filtration media oxide samples from drinking water treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* 44, 5881–5886 (2010).
  149. Nesbitt, H. W. & Banerjee, D. Interpretation of XPS Mn(2p) spectra of Mn oxyhydroxides and constraints on the mechanism of MnO<sub>2</sub> precipitation. *Am. Mineral.* 83, 305–315 (1998).
  150. Poinsignon, C., Berthomé, G., Prélôt, B., Thomas, F. & Villiéras, F. Manganese Dioxides Surface Properties Studied by XPS and Gas Adsorption. *J. Electrochem. Soc.* 151, A1611–A1616 (2004).
  151. Bulavchenko, O. A. *et al.* Reduction of mixed Mn-Zr oxides: in situ XPS and XRD studies. *Dalt. Trans.* 44, 15499–15507 (2015).
  152. Gaddam, A., Fernandes, H. R., Tulyaganov, D. U., Pascual, M. J. & Ferreira, J. M. F. Role of manganese on the structure, crystallization and sintering of non-stoichiometric lithium disilicate glasses. *RSC Adv.* 4, 13581 (2014).
  153. Regan, E. *et al.* Surface and bulk composition of lithium manganese oxides.



- Surf. Interface Anal.* 27, 1064–1068 (1999).
154. Christodoulou, I. *et al.* Dose- and time-dependent effect of bioactive gel-glass ionic-dissolution products on human fetal osteoblast-specific gene expression. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 74, 529–537 (2005).
  155. Rohanová, D. *et al.* Is non-buffered DMEM solution a suitable medium for in vitro bioactivity tests ? *J. Mater. Chem. B* 2, 5068–5076 (2014).
  156. Azevedo, M. M. *et al.* Hypoxia Inducible Factor-Stabilizing Bioactive Glasses for Directing Mesenchymal Stem Cell Behavior. *Tissue Eng. Part A* 00, 1–8 (2014).
  157. Caplan, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* 213, 341–347 (2007).
  158. Labbaf, S. *et al.* Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells in vitro. *Biomaterials* 32, 1010–1018 (2011).
  159. Hu, N. & Boccaccini, A. R. ZnO quantum dots modified bioactive glass nanoparticles with pH-sensitive release of Zn ions , fluorescence , antibacterial and osteogenic properties †. 7936–7949 (2016). doi:10.1039/C6TB02053D
  160. Safadi, F. F., Barbe, M. F., Abdelmagid, S. M., Rico, M. C. & Aswad, R. A. Bone Structure , Development and Bone Biology : Bone Pathology. in *Bone Pathology* (2009). doi:10.1007/978-1-59745-347-9\_1
  161. Khorami, M., Hesaraki, S., Behnamghader, A., Nazarian, H. & Shahrabi, S. In vitro bioactivity and biocompatibility of lithium substituted 45S5 bioglass. *Mater. Sci. Eng. C* 31, 1584–1592 (2011).
  162. Wu, C. *et al.* Europium-Containing Mesoporous Bioactive Glass Scaffolds for Stimulating in Vitro and in Vivo Osteogenesis. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 11342–11354 (2016).
  163. Isaac, J. *et al.* Effects of strontium-doped bioactive glass on the differentiation of cultured osteogenic cells. *Eur. Cells Mater.* 21, 130–143 (2011).
  164. Effah Kaufmann, E. a, Ducheyne, P. & Shapiro, I. M. Evaluation of osteoblast response to porous bioactive glass (45S5) substrates by RT-PCR analysis. *Tissue Eng.* 6, 19–28 (2000).
  165. Turner, P. J. *et al.* Osteopontin deficiency increases bone fragility but preserves bone mass. *Bone* 46, 1564–1573 (2010).
  166. Heersche, C. G. B. S. M. R. J. N. M. Expression of mRNAs for type-I collagen , bone sialoprotein , osteocalcin , and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1 , 25 dihydroxyvitamin D 3. 249–259 (1999).
  167. Xynos, I. D. *et al.* Bioglass ®45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: Implications and applications for bone tissue

- engineering. *Calcif. Tissue Int.* 67, 321–329 (2000).
168. Strobel, L. A. *et al.* Novel strontium-doped bioactive glass nanoparticles enhance proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Nanopart Res* 15, (2013).
  169. Yu, B. *et al.* Effect of Calcium Source on Structure and Properties of Sol–Gel Derived Bioactive Glasses. *Langmuir* 28, 17465–17476 (2012).
  170. Peters, K. *et al.* Paradoxical effects of hypoxia-mimicking divalent cobalt ions in human endothelial cells in vitro. *Mol. Cell. Biochem.* 270, 157–166 (2005).
  171. Li, R., Clark, A. E. & Hench, L. L. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *J. Appl. Biomater.* 2, 231–239 (1991).
  172. Yuvaraj, S., Fan-yuan, L., Tsong-huei, C. & Chuin-tih, Y. Thermal Decomposition of Metal Nitrates in Air and Hydrogen Environments. 1044–1047 (2003). doi:10.1021/jp026961c
  173. Catauro, M., Dell, A. & Vecchio, S. Synthesis , structural , spectroscopic and thermoanalytical study of sol – gel derived SiO<sub>2</sub> – CaO – P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> gel and ceramic materials. *Thermochim. Acta* 625, 20–27 (2016).
  174. Hazra, S., Ghosh, A. & Chakravorty, D. Gel to glass conversion in the cobalt silicate system. *J. Mater. Sci. Lett.* 13, 589–591 (1994).
  175. Ortega-Zarzosa, G., Araujo-Andrade, C., Compeán-Jasso, M. E., Martínez, J. R. & Ruiz, F. Cobalt Oxide / Silica Xerogels Powders: X-Ray Diffraction , Infrared and Visible Absorption Studies. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 24, 23–29 (2002).
  176. Vasconcelos, D. C. L. *et al.* Structural investigation of cobalt-doped silica derived from sol – gel synthesis. *J. Non. Cryst. Solids* 378, 1–6 (2013).
  177. Musat, V., Fortunato, E., Botelho, A. M. & Monteiro, R. Sol – gel cobalt oxide – silica nanocomposite thin films for gas sensing applications. 516, 1499–1502 (2008).
  178. Mekki, A. & Salim, M. XPS study of transition metal doped silicate glasses. *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena* 101, 227–232 (1999).
  179. Elkabouss, K., Kacimi, M., Ziyad, M., Ammar, S. & Bozon-Verduraz, F. Cobalt-exchanged hydroxyapatite catalysts: Magnetic studies, spectroscopic investigations, performance in 2-butanol and ethane oxidative dehydrogenations. *J. Catal.* 226, 16–24 (2004).
  180. Chuang, T. J., Brundle, C. R. & Rice, D. W. Interpretation of X-Ray Photoemission Spectra of Cobalt Oxides and Cobalt Oxide Surfaces. *Surf. Sci.* 59, 413–429 (1976).
  181. Mekki, A., Holland, D., Ziq, K. & Mcconville, C. F. XPS and magnetization studies of cobalt sodium silicate glasses. *J. Non. Cryst. Solids* 3, 267–279

- (1997).
182. Uboldi, C. *et al.* Poorly soluble cobalt oxide particles trigger genotoxicity via multiple pathways. *Part. Fibre Toxicol.* 13, 5 (2015).
  183. Minchenko, a & Caro, J. Regulation of endothelin-1 gene expression in human microvascular endothelial cells by hypoxia and cobalt: role of hypoxia responsive element. *Mol. Cell. Biochem.* 208, 53–62 (2000).
  184. Fredholm, Y. C. *et al.* Influence of strontium for calcium substitution in bioactive glasses on degradation , ion release and apatite formation Influence of strontium for calcium substitution in bioactive glasses on degradation , ion release and apatite formation. (2011).
  185. Zhang, M. *et al.* Preparation, characterization and in vitro angiogenic capacity of cobalt substituted  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics. *J. Mater. Chem.* 22, 21686 (2012).
  186. Fleury, C. *et al.* Effect of cobalt and chromium ions on human MG-63 osteoblasts in vitro: Morphology, cytotoxicity, and oxidative stress. *Biomaterials* 27, 3351–3360 (2006).
  187. Carvalho, J. L. De *et al.* Production of human endothelial cells free from soluble xenogeneic antigens for bioartificial small diameter vascular graft endothelization. *Biomed Res. Int.* 2015, (2015).
  188. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63 (1983).
  189. Ribeiro Neto, W. A. *et al.* Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery. *Polym. Degrad. Stab.* 120, 61–69 (2015).
  190. Ferreira Júnior, M. *et al.* Infection with CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites is associated with more severe gastric lesions in experimentally infected Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Eur. J. Histochem.* 59, 137–146 (2015).
  191. Sá, M. A. *et al.* Carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate restore bone repair in diabetic rat sockets. *Oral Dis.* 19, 484–493 (2013).
  192. Mosbahi, S. *et al.* Risedronate adsorption on bioactive glass surface for applications as bone biomaterial. *Appl. Surf. Sci.* 367, 205–213 (2016).
  193. Bouzourâa, M. *et al.* Optical study of annealed cobalt–porous silicon nanocomposites. *J. Lumin.* 143, 521–525 (2013).
  194. Li, Y. *et al.* Identification of Cobalt Oxides with Raman Scattering and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* 120, 4511–4516 (2016).

195. Lu, X., Liang, G., Sun, Q. & Yang, C. The influence of silica matrix on the crystal structure and high frequency performance of cobalt nanoparticles. *J. Solid State Chem.* 183, 1555–1560 (2010).
196. Dessou, N. S. *et al.* Influence of strontium for calcium substitution on the glass–ceramic network and biomimetic behavior in the ternary system SiO<sub>2</sub>–CaO–MgO. *J. Mater. Sci.* (2017). doi:10.1007/s10853-017-0914-z
197. Zuk, P. A. *et al.* Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295 (2002).
198. Lamalice, L., Le Boeuf, F. & Huot, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ. Res.* 100, 782–794 (2007).
199. Vandekerke, S., Dewerchin, M. & Carmeliet, P. Angiogenesis Revisited: An Overlooked Role of Endothelial Cell Metabolism in Vessel Sprouting. *Microcirculation* 22, 509–517 (2015).
200. Haro Durand, L. A. *et al.* In vitro human umbilical vein endothelial cells response to ionic dissolution products from lithium-containing 45S5 bioactive glass. *Materials (Basel)*. 10, (2017).
201. Anderson, J. M., Rodriguez, A. & Chang, D. T. Foreign body reactions to biomaterials. *Semin. Immunol.* 20, 86–100 (2008).
202. Sinha, M. *et al.* Direct conversion of injury-site myeloid cells to fibroblast-like cells of granulation tissue. *Nat. Commun.* 9, 1–19 (2018).
203. Mari, W. *et al.* Novel Insights on Understanding of Keloid Scar: Article Review. *J. Am. Coll. Clin. Wound Spec.* 7, 1–7 (2015).