

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL EM
PROCESSAMENTO DE MATERIAIS – PPGPM

VERONICA CRISTINA PÊGO FIEBIG AGUIAR

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS HÍBRIDOS DE
PDLLA/VIDRO BIOATIVO**

***PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF HYBRID PDLLA/BIOACTIVE
GLASS SCAFFOLDS***

São José dos Campos, SP
2024

VERONICA CRISTINA PÊGO FIEBIG AGUIAR

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* HÍBRIDOS DE
PDLLA/VIDRO BIOATIVO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Processamento de Materiais, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Processamento de Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Regina de Oliveira

São José dos Campos, SP
2024

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Aguiar, Veronica Cristina Pêgo Fiebig
Produção e caracterização de scaffolds híbridos de
PDLLA/VIDRO BIOATIVO / Veronica Cristina Pêgo Fiebig Aguiar;
orientador, Ivone Regina de Oliveira. - São José dos Campos, SP,
2024.

79 p.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade do Vale do
Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em
Processamento de Materiais.

Inclui referências

1. Processamento de Materiais. 2. Scaffold. 3. Vidro bioativo
58S. 4. Poli(D,L-ácido láctico). 5. Degradação. I. Oliveira, Ivone
Regina de, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa
de Pós-Graduação em Processamento de Materiais. III. Título.

Eu, Veronica Cristina Pêgo Fiebig Aguiar, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 19 de Abril de 2024.

Veronica C.P.F. Aguiar

Autor(a) da Obra

Data da defesa: 07 / 03 / 2024

VERONICA CRISTINA PÊGO FIEBIG AGUIAR

**“PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS HÍBRIDOS DE PDLLA/VIDRO
BIOATIVO.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

Fernando dos S. Ortega	<i>Fernando S. Ortega</i>
Ivone R. de Oliveira	<i>Ivone R. de Oliveira</i>
Alessandro M. Hakme da Silva	<i>Alessandro M. Hakme da Silva</i>
Ana Luiza G. M. Massaguer	<i>Ana L.G. M. Massaguer</i>
Diogo P. Lauda	<i>Diogo Ponte Lauda</i>

Prof.^a Dr.^a Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 07 de março de 2024.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de aproveitar esta oportunidade para agradecer a todos aqueles que desempenharam um papel importante na construção dessa dissertação.

Agradeço profundamente aos meus professores, cuja orientação e sabedoria foram fundamentais para o sucesso deste projeto. Suas contribuições acadêmicas e paciência são inesquecíveis.

À minha dedicada orientadora, Ivone, cujo apoio incansável, conhecimento e paciência foram fundamentais para o sucesso deste projeto. Seu comprometimento e orientação foram imprescindíveis.

Aos meus amigos de turma, que compartilharam comigo os desafios e as alegrias desta jornada, agradeço a camaradagem e apoio constante.

Ao meu canga, Giovanni, cuja amizade e apoio foram essenciais durante toda a minha jornada, se tornando parte integrante deste capítulo da minha vida. Compartilhamos não apenas momentos acadêmicos, mas também risadas, desafios e vitórias ao longo dessa caminhada.

À minha amiga, Isabela, pela dedicação, habilidade e disposição em ajudar, tornando-se uma parceira valiosa. Além das experiências científicas, agradeço pela amizade genuína e pelo apoio constante.

À empresa Selaz, pelo suporte financeiro e recursos que tornaram este projeto viável. A parceria e o suporte da Karen, Rayssa e Kennedy foram fundamentais para o sucesso desta dissertação, fornecendo conhecimento e orientação.

Ao Tiago por compartilhar seu conhecimento e tempo, contribuindo de maneira significativa.

A toda a equipe da UNIVAP, com especial reconhecimento a Ângela, Priscila e Amanda, pela generosa colaboração nas análises, proporcionando um ambiente acolhedor, e pelas valiosas oportunidades de aprendizado.

À minha família, especialmente minha mãe, por seu amor incondicional e incentivo ao longo dos anos. Sem vocês, esta conquista não seria possível.

Ao meu esposo Juliano, cujo amor e compreensão me sustentaram durante os altos e baixos desta jornada acadêmica.

À minha querida filha Maitê, que é a minha maior fonte de inspiração e motivação.

Este projeto é o resultado do esforço coletivo de muitos, e sou profundamente grata por cada um dos contribuintes mencionados acima.

"Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas." Marie Curie

RESUMO

Os *scaffolds* híbridos desempenham um papel crucial na área de reparação e regeneração óssea, apresentando-se como uma promissora solução biomédica. Neste contexto, a pesquisa concentrou-se na produção e avaliação de *scaffolds*, cuja base foi um vidro bioativo sintetizado por meio da rota sol-gel e um biopolímero. Esses biomateriais foram desenvolvidos visando combinar as propriedades bioativas do vidro com as características mecânicas e de degradação controlada de um biopolímero, o poli(D,L-ácido láctico) (PDLA). O processo de fabricação dos *scaffolds* envolveu a incorporação do vidro bioativo, especificamente o vidro bioativo 58S, como partículas dispersas na matriz polimérica. A escolha desse vidro foi baseada em análises detalhadas, incluindo FTIR (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier), DRX (Difração de Raios-X), Espectroscopia Raman e MEV/EDS (Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Energia Dispersiva), que confirmaram a natureza amorfa do material e a presença de grupos como Si–O–Si, Si–O–NBO e fosfato (P–O), indicando a formação do vidro bioativo. O método de fabricação escolhido foi o TIPS (Separação de Fases Termicamente Induzidas), combinado com a liofilização, permitindo a obtenção de *scaffolds* híbridos com estruturas porosas. A distribuição das partículas de vidro bioativo na matriz de PDLA foi analisada por MEV, destacando a presença dessas partículas na superfície dos *scaffolds*, assim como a interconectividade dos poros. A porosimetria de mercúrio foi empregada para avaliar a porosidade, bem como a distribuição de tamanho de poros, fatores cruciais para facilitar a condução das células durante a regeneração óssea. Além das características estruturais, a pesquisa incluiu ensaios de degradação *in vitro* além dos testes de viabilidade celular, conteúdo de proteínas totais e produção de nódulos de mineralização. Os resultados destacaram características promissoras desses *scaffolds* híbridos para aplicações na regeneração óssea como distribuição homogênea das partículas bioativas do vidro na estrutura porosa e a degradação controlada do PDLA permitindo a produção de proteínas totais e a formação de nódulos de mineralização, aspectos que indicam influência positiva na cultura celular, sugerindo que esses biomateriais têm potencial para promover a regeneração óssea eficiente.

Palavras-chave: *Scaffold*; vidro bioativo 58S; sol-gel; poli(D,L-ácido láctico); degradação; *in vitro*; bioatividade.

ABSTRACT

Hybrid scaffolds play a crucial role in the field of bone repair and regeneration, emerging as a promising biomedical solution. In this context, research has focused on the production and evaluation of scaffolds, with a base consisting of a bioactive glass synthesized through the sol-gel route and a biopolymer. These biomaterials were developed with the aim of combining the bioactive properties of glass with the mechanical and controlled degradation characteristics of a biopolymer, poly(D,L-lactic acid) (PDLA). The scaffold manufacturing process involved incorporating the bioactive glass, specifically bioactive glass 58S, as dispersed particles in the polymeric matrix. The choice of this glass was based on detailed analyses, including FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), XRD (X-ray Diffraction), Raman Spectroscopy, and SEM/EDS (Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive Spectroscopy), confirming the amorphous nature of the material and the presence of groups such as Si–O–Si, Si–O–NBO, and phosphate (P–O), indicating the formation of bioactive glass. The chosen manufacturing method was TIPS (Thermally Induced Phase Separation), combined with freeze-drying, allowing the production of hybrid scaffolds with porous structures. The distribution of bioactive glass particles in the PDLA matrix was analyzed by SEM, highlighting the presence of these particles on the surface of the scaffolds, as well as the interconnectivity of the pores. Mercury intrusion porosimetry was employed to assess porosity, as well as pore size distribution, crucial factors for facilitating cell migration during bone regeneration. In addition to structural characteristics, the research included *in vitro* degradation tests along with cell viability tests, total protein content, and mineralization nodule production. The results emphasized promising features of these hybrid scaffolds for applications in bone regeneration, such as the homogeneous distribution of bioactive glass particles in the porous structure and controlled degradation of PDLA, allowing for total protein production and mineralization nodule formation. These aspects indicate a positive influence on cell culture, suggesting that these biomaterials have the potential to promote efficient bone regeneration.

Keywords: Scaffold; 58S bioactive glass; sol-gel; poly(D,L-lactic acid); degradation; *in vitro*; bioactivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da construção do osso	21
Figura 2 – Processo de formação da HCA durante a exposição ao SBF	23
Figura 3 – Representação das rotas de obtenção de BG	24
Figura 4 – Mecanismos para a difusão dos íons cálcio dentro da rede de sílica	26
Figura 5 - Processo de síntese de MBG por meio de modelagem de surfactante.....	28
Figura 6 – Estrutura porosa	31
Figura 7 – Diagrama de fases binário temperatura-concentração de uma solução polimérica	34
Quadro 1 – Técnicas de caracterização	40
Figura 8 – Análise termogravimétrica do BG-58S: (a) TEP+EtOH, (b) AF+EtOH, (c) TEP, (d)AF (e)TEP+EtOH+F-127, (f) AF+EtOH+F-127, (g) TEP+F-127 e (h) AF+F-127	48
Figura 9 – Composição AF+F-127 após calcinação a 600 °C por 24 horas usando (a) taxa de aquecimento de 3 °C/min e (b) taxa de aquecimento de 1 °C/min, com fluxo de ar sintético soprado para o interior do forno.	49
Figura 10 – Representação esquemática do método de síntese de automontagem induzida por evaporação (EISA) usado para obter MBGs	50
Figura 11 – Espectros de FTIR de pós de BG 58S sintetizado em diferentes condições	51
Figura 12 – Difractogramas DRX de pós de BG 58S sintetizado em diferentes condições	53
Figura 13 – Pó de BG 58S com AF	54
Figura 14 – Espectro Raman de pó BG-58S com AF.	55
Figura 15 – Micrografia de MEV-FEG da superfície dos pós BG-58S com AF com aumento de (a) 200x (b) 500x (c) 2000x (d) 20000x (e) 50000x (f) 100000x	56
Figura 16 – Espectros EDS de pó de BG 58S com AF	57
Figura 17 – Variação de (a) pH (b) Potencial zeta em função do tempo para pó de BG 58S com AF	58
Figura 18 – Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio do pó de BG 58S com AF	59
Figura 19 – Distribuição do tamanho das partículas de BG-58S com AF após processo de moagem	60

Figura 20 – <i>Scaffold</i> produzido com PDLLA/BG	61
Figura 21 – Micrografias de MEV do <i>scaffold</i> de PDLLA com aumento de (a) 200x (b) 500x (c) 1000x (d) 2000x (e) 5000x (f) 10000x.....	62
Figura 22 – Micrografias de MEV do <i>scaffold</i> híbrido de PDLLA/15BG com aumento de (a) 200x (b) 500x (c) 1000x (d) 2000x (e) 5000x (f) 10000x	63
Figura 23 – Micrografias de MEV do <i>scaffold</i> híbrido de PDLLA/20BG com aumento de (a) 200x (b) 500x (c) 1000x (d) 2000x (e) 5000x (f) 10000x	63
Figura 24 – Grupos funcionais presentes na estrutura do <i>scaffold</i> PDLLA e PDLLA/20BG pela técnica FTIR	64
Figura 25 – Distribuição de poros interconectados obtida por porosimetria para PDLLA e PDLLA/20BG.....	65
Figura 26 – Variação de (a) pH (b) Potencial zeta do BG, <i>scaffold</i> PDLLA e <i>scaffold</i> PDLLA/BG.....	66
Figura 27 – (a) Variação de massa e (b) Medição de pH do PDLLA e do PDLLA/20BG imerso em PBS por 2, 7, 30 e 60 dias.....	67
Figura 28 – Análise por GPC do <i>scaffold</i> PDLLA/BG 20 (a) <i>M_n</i> ; (b) <i>M_w</i> e (c) <i>M_n/M_w</i>	68
Figura 29 – (a) Teste de viabilidade celular (MTT) dia 3, (b) Absorbância de proteínas em células MG63 ao longo de 10 dias de cultura celular. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA 1 Fator, $p < 0.05$).....	70
Figure 30 – Fotomicrografias de nódulos de mineralização (a) cultura celular (controle negativo); (b) látex (controle positivo); (c) HA; (d) <i>Scaffold</i> PDLLA/20BG.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reagentes utilizados para a produção do BG-58S por sol-gel.	37
Tabela 2 – Temperaturas de calcinação aplicadas às diferentes amostras.	38
Tabela 3 – Rotas para a produção do BG-58S por sol-gel.	38
Tabela 4 – Área superficial, volume e tamanho de poros por BET da amostra AF+F-127 calcinada em diferentes condições.	50
Tabela 5 – Volume, diâmetro médio de poros e área superficial de pós de BG 58S.	53
Tabela 6 – Volume, diâmetro médio de poros e área superficial de pó BG-58S com AF	60
Tabela 7 – Valores de porosidade, densidade e diâmetro médio dos poros dos <i>scaffolds</i> obtidos por porosimetria.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Fosfato de cálcio amorfo
AF	Ácido fosfórico
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BG	Vidro bioativo (<i>bioactive glass</i>)
BJH	Barret-Joyner-Halenda
BTE	Engenharia de Tecido Ósseo (<i>Bone Tissue Engineered</i>)
CMC	Concentração Micelar Crítica
D	Dextrogiro
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
EISA	<i>Evaporation-Induced Self-Assembly</i>
EtOH	Etanol
F-127	Pluronic
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (<i>Food and drug Administration</i>)
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
HA	Hidroxiapatita
HCA	Hidroxiapatita carbonatada
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
ISO	Organização Internacional de Normalização
L	Levogiro
MBG	Vidro bioativo mesoporoso
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução
NBO	Oxigênio não ligados (<i>non-bridging oxygen</i>)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCL	Policaprolactona
PDLLA	Poli(D,L-ácido láctico)
PEG	Polietilenoglicol
PGA	Ácido poliglicólico
PGS	Poli (sebacato de glicerol)

PHA	Poli-hidroxialcanoato
PHB	Poli-hidroxibutirato
PLA	Ácido polilático
PLCL	Poli(lático-co- ϵ -caprolactona)
PLGA	Poli(lático-co-glicólico)
PS	Poliestireno
PU	Poliuretano
PVA	Álcool polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
PZ	Potencial Zeta
SBF	Fluido Corporal Simulado (<i>Simulated Body Fluid</i>)
TCP	Fosfato tricálcio
TEOS	Tetraetilortossilicato
TEP	Trietilfosfato
TGA	Análise termogravimétrica
TIPS	Separação de Fases Termicamente Induzidas
UATR	Reflexão total atenuada

LISTA DE SÍMBOLOS

M_n	Massa molecular média
M_w	Massa molecular média ponderada
M_w/M_n	Índice de polidispersão
T_g	Temperatura de transição vítrea (°C)
T_m	Temperatura de fusão (°C)
WL	Variação de massa (%)
W_i	Massa antes da imersão em PBS (g)
W_d	Massa pós incubação em PBS (g)
W_t	Quantidade relativa de elementos químicos (%)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	OBJETIVO GERAL	18
1.1.1	Objetivos Específicos	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	BIOMATERIAL	19
2.2	ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO	20
2.3	TECIDO ÓSSEO	21
2.4	VIDROS BIOATIVOS	22
2.5	VIDRO BIOATIVO MESOPOROSO	27
2.6	POLÍMEROS.....	29
2.7	<i>SCAFFOLDS</i>	31
2.8	TÉCNICAS PARA OBTENÇÃO DE <i>SCAFFOLDS</i>	33
2.9	<i>SCAFFOLD HÍBRIDO DE VIDRO BIOATIVO/BIOPOLÍMERO</i>	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	PREPARAÇÃO DP VIDRO BIOATIVO BG-58S.....	37
3.2	PREPARAÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS DE PDLLA E PDLLA/BG</i>	38
3.3	CARACTERIZAÇÃO DE PÓ DE BG-58S E DOS <i>SCAFFOLDS</i>	40
3.3.1	Espectroscopia Raman	40
3.3.2	Difração de Raios X (DRX).....	40
3.3.3	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	41
3.3.4	Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução (MEV-FEG).....	41
3.3.5	Análises térmicas	41
3.3.6	Propriedades texturais	41
3.3.7	Distribuição de tamanho de partícula.....	42
3.3.8	Porosidade	42
3.3.9	Degradação em solução tampão de fosfato (PBS).....	42

3.3.10	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	43
3.3.11	Potencial Zeta (PZ)	43
3.4	CULTURA CELULAR	44
3.5	TESTES <i>IN VITRO</i>	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOSs VIDROS BIOATIVOS BG-58S.....	47
4.1.1	Análise termogravimétrica (TGA)	47
4.1.2	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	51
4.1.3	Difração de Raios X (DRX).....	52
4.1.4	Análise de área superficial por BET	53
4.1.5	Espectroscopia Raman	54
4.1.6	Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução (MEV-FEG).....	56
4.1.7	Potencial Zeta (PZ)	58
4.1.8	Propriedades texturais	59
4.1.9	Distribuição de tamanho de partícula.....	60
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS DE PDLLA e PDLLA/BG	61
4.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	61
4.2.2	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	64
4.2.3	Porosidade	65
4.2.4	Potencial Zeta (PZ)	66
4.2.5	Degradação em solução tampão de fosfato (PBS).....	67
4.3	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	70
5	CONCLUSÃO	72
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	73
7	PUBLICAÇÕES RELACIONADAS COM O TRABALHO	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

O mercado global de implantes de enxerto ósseo foi avaliado em US\$ 3,57 bilhões em 2022, deve atingir US\$ 3,78 bilhões em 2023 e a projeção para 2030 é US\$ 5,74 bilhões, exibindo um aumento em torno de 6,2 % ao ano. Os substitutos de enxertos ósseos podem ser utilizados como alternativa aos tratamentos convencionais. O ocorrência de defeitos ósseos é devido à remoção de tumores, traumas, inflação ou má formações congênitas [1].

Existem várias abordagens para a reconstrução de defeitos ósseos, incluindo o uso de autoenxertos e aloenxertos. No entanto, esses tratamentos não estão isentos de riscos, como procedimentos adicionais de coleta, morbidade no local doador, risco de rejeição imunológica, transmissão de doenças e falta de propriedades osteogênicas, o que pode levar à falta de união entre o material enxertado e o tecido hospedeiro e falha na reparação [2].

Para lidar com estes problemas há necessidade de novas abordagens na qual a solução pode vir da Engenharia de Tecidos Ósseos (BTE), uma ciência interdisciplinar que combina os conhecimentos da química, física, engenharia, ciência de materiais, biologia e medicina que busca de forma inovadora combinar células e biomateriais para reparar e regenerar tecidos ósseos, superando as limitações do tratamento convencional. Os biomateriais são um elemento chave na abordagem BTE, pois fornecem condições ósseas adequadas para a regeneração celular. Para alcançar êxito, dependem da biocompatibilidade, biodegradabilidade, hidrofiliabilidade, osteogênese, propriedades mecânicas, tamanhos e formas [3–5].

Em tratamentos de lesão ou trauma envolvendo o tecido ósseo são utilizadas estruturas tridimensionais porosas como suporte (*scaffold*), criando assim um ambiente extracelular adequado para a sua regeneração. A porosidade desses *scaffolds* desempenha um papel fundamental nas características mecânicas, na promoção da formação do novo osso e na integração com o osso natural, devendo induzir a adesão e crescimento celular, permitindo o desenvolvimento e deslocamento das células, além de facilitar o transporte de nutrientes e oxigênio [2, 6].

Diversos tipos de materiais são empregados em aplicações biomédicas, e podem ser categorizados como cerâmicos, metálicos, vitrocerâmicos, polímeros sintéticos ou naturais, ou mesmo uma combinação destes. Esses materiais estão atualmente sob investigação para o desenvolvimento e fabricação de *scaffolds* destinados à engenharia e regeneração de uma ampla gama de tecidos [5, 7]. Nos últimos anos, tem havido um aumento significativo do interesse em materiais híbridos no campo biomédico. Ao contrário dos materiais monolíticos, os materiais

híbridos oferecem a vantagem de serem adaptáveis em termos de suas propriedades, o que os torna adequados para atender às complexas necessidades do corpo humano [8].

Particularmente, os polímeros sintéticos bioabsorvíveis têm despertado crescente interesse como estruturas de *scaffolds* para engenharia de tecidos. A utilização de polímeros sintéticos oferece inúmeras vantagens práticas devido ao controle preciso da composição do material e da estrutura, incluindo a porosidade. Isso possibilita a gestão das propriedades dos *scaffolds*, criando condições ideais à formação do tecido ósseo. Entre os polímeros sintéticos mais utilizados para aplicações em *scaffolds*, destacam-se os poliésteres, como o ácido polilático (PLA), o ácido poliglicólico (PGA) e o ácido poli(lático-co-glicólico) (PLGA). Esses polímeros têm demonstrado resultados positivos em uso clínico, como suturas, telas cirúrgicas reabsorvíveis e sistemas de liberação controlada de medicamentos, contando com a aprovação da Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos Estados Unidos para uso clínico [8].

Contudo, uma grande desvantagem destes materiais, uma vez implantados, é a liberação de subprodutos da degradação, que promove uma diminuição no pH podendo levar a um processo inflamatório. Outra limitação é a falta de bioatividade, o que significa que não há interação com o tecido biológico. Além de apresentar caráter hidrofóbico e não possuir a resistência mecânica necessária para atender às demandas de uma cirurgia ortopédica [8, 9].

Por outro lado, materiais cerâmicos, como a hidroxiapatita (HA), o fosfato tricálcio (TCP) e composições específicas de vidros de silicato e fosfato, bem como vitrocerâmicas, como o Bioglass®, interagem com fluidos corporais e estabelecem ligações com o tecido ósseo. No entanto, devido à sua fragilidade e resistência mecânica relativamente baixa à fratura, seu uso em aplicações de suporte de carga tem certas limitações [9, 10].

Nos últimos tempos, tem sido notado um crescimento expressivo no interesse por materiais híbridos que unem polímeros e cerâmicas. Esses materiais tornam-se atrativos para a produção de *scaffolds*, pois se assemelham a estrutura do tecido ósseo, promovendo o processo de adesão, proliferação e diferenciação celular além de aumentar a resistência mecânica. Para que se obtenha uma resposta biológica adequada, as características requeridas para estes *scaffolds* compreendem: porosidade controlada, a partir de 90%, interconectividade, diâmetros de poros de pelo menos 100 μm , resistência à compressão na ordem de 2-12 MPa e Módulo de Young na ordem de 20-500 MPa [11].

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho envolve produzir suportes porosos, conhecidos como *scaffolds*, constituídos por estruturas tridimensionais, preparadas a partir de um biopolímero e vidro bioativo, com morfologia e microestrutura adequadas para serem utilizadas na área de engenharia de tecidos ósseos. Além disso, é esperado que essas estruturas apresentem comportamento bioativo e tenham a capacidade de estimular a formação de tecido ósseo facilitando o processo de regeneração.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Sintetizar e obter o vidro bioativo 58S – $58\text{SiO}_2\text{-}33\text{CaO-}9\text{P}_2\text{O}_5$ (% massa) utilizando o método sol-gel;
- Caracterizar os vidros bioativos 58S obtido quanto à distribuição de tamanho de partículas, cristalinidade e composição química; microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X, análises térmicas, espectroscopia por infravermelho e avaliação da porosidade.
- Produzir *scaffolds* de vidro bioativo/PDLLA pelo método de Separação de Fases Termicamente Induzidas (TIPS) seguida de Liofilização;
- Caracterizar os *scaffolds* após a sua preparação, para avaliar as propriedades estruturais e morfológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMATERIAL

Os biomateriais utilizados em aplicações biomédicas são materiais projetados para influenciar os processos de reparação dos tecidos no corpo, promovendo a recuperação. Os biomateriais podem ser desenvolvidos por meio de materiais metálicos, cerâmicos e poliméricos [12].

Em primeiro lugar, é fundamental considerar a compatibilidade dos materiais utilizados no substrato. Isso significa que o material não deve desencadear uma resposta inflamatória persistente, nem demonstrar citotoxicidade. Além disso, as propriedades mecânicas do suporte devem ser adequadas para evitar colapsos durante o manuseio e as atividades normais do paciente. Como acontecem com todos os materiais que entram em contato com o corpo humano, as estruturas teciduais devem ser facilmente esterilizáveis para prevenir infecções. Um requisito adicional para um *scaffold* é a capacidade de controlar a porosidade interconectada, a fim de orientar o crescimento celular na forma desejada. Uma porosidade típica de 90% e um diâmetro de poro de pelo menos 100 μm são necessários para a penetração celular e a adequada vascularização do tecido implantado [11].

Atualmente, materiais metálicos, como aço inoxidável, titânio e ligas de cromo-cobalto, são amplamente empregados como implantes temporários ou permanentes que restauram funções e oferecem suporte aos tecidos. No entanto, esses materiais contêm elementos de liga que prejudicam sua biocompatibilidade para aplicações de regeneração de tecidos. A utilização de implantes metálicos tem sido associada a inflamações e reações alérgicas graves devido à liberação de íons resultante da corrosão ou desgaste excessivo. Além disso, observou-se a destruição de tecidos nativos devido aos implantes metálicos [3].

Já os polímeros têm se mostrado adequados para tratamento de defeitos ósseos devido à sua facilidade de processamento e produtos de degradação absorvíveis. No entanto, os polímeros sozinhos não poderiam atender a todas as propriedades necessárias para a aplicação alvo, pois apresentam baixa bioatividade e uma taxa lenta de degradação, o que pode dificultar o processo de cicatrização. Portanto, um material de enchimento extra incorporado a ele pode fornecer propriedades e resistência mecânica suficientes [1, 13].

Nos últimos anos, a pesquisa científica tem se concentrado no emprego de materiais bioativos devido à sua capacidade de interagir eficazmente com o tecido facilitando a regeneração e cicatrização [12].

Na busca por biomateriais bioativos para a regeneração óssea, têm sido explorados outros materiais, principalmente biocerâmicos, como os fosfatos de cálcio, incluindo a hidroxiapatita, e cerâmicas de vidro, como a vitrocerâmica. No entanto, nenhum desses biomateriais apresentou uma resposta bioativa tão rápida quanto os vidros bioativos. Os vidros bioativos são uma classe de biomateriais cada vez mais relevante na medicina regenerativa devido às suas propriedades de bioatividade, osteoindução, osteocondutividade e à sua alta taxa de biodegradação, tanto *in vitro* como *in vivo*. Isso se deve à capacidade dos vidros bioativos de liberar quantidades significativas de íons quando em contato com fluidos corporais [13].

Atualmente, materiais híbridos de polímeros e cerâmicas estão sendo desenvolvidos com o objetivo de aumentar a estabilidade mecânica e melhorar a interação tecidual. Para cumprir tantos requisitos quanto possível, sistemas híbridos combinando vantagens de polímeros e cerâmica tem sido uma escolha promissora. A combinação de um polímero com uma cerâmica é uma destas estratégias haja visto que o osso possui tanto uma parte orgânica quanto inorgânica [6].

2.2 ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO

O osso, um tecido altamente vascularizado, possui a capacidade de regeneração, no entanto, em situações em que há defeitos de tamanho significativo devido a traumas ou doenças congênitas, a capacidade de autorregeneração fica comprometida, exigindo intervenção cirúrgica para restaurar o tecido danificado. Neste contexto surge a Engenharia de Tecidos Ósseos (BTE) que tem sido amplamente empregada para encontrar métodos alternativos [14].

A engenharia de tecidos ósseos é um processo complexo e dinâmico, que se inicia com a atração e deslocamento de células osteoprogenitoras, seguido por sua adesão, proliferação, diferenciação, levando a reconstrução tecidual. Lesões ósseas ocorrem quando há uma interrupção na integridade do osso, seja por trauma, má formação congênita ou intervenção cirúrgica. Em situações de defeitos críticos ou em certas condições médicas, como idosos, diabetes, osteoporose, entre outras, a intervenção cirúrgica se torna necessária para restaurar o tecido danificado [15].

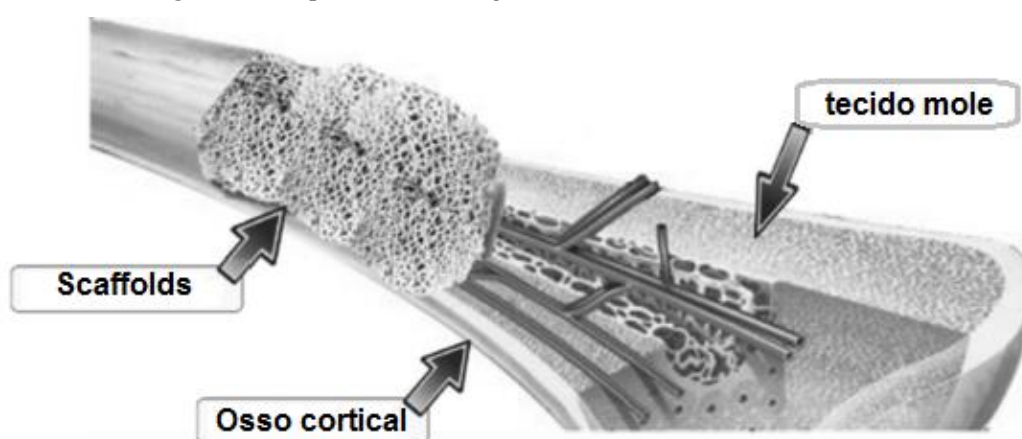
A primeira geração de materiais empregados na substituição de tecidos engloba aqueles que não interagem com o fluido corporal, tinham somente o propósito de serem bioinertes. Biomateriais convencionais, como metais resistentes à corrosão, biocerâmicas e materiais poliméricos insolúveis, todos considerados não tóxicos, foram escolhidos para compor essa categoria. Já a segunda geração de materiais utilizados surgiu no final da década de 60, devido

à incompatibilidade da interface entre o material e o tecido ósseo cuja ênfase passa a ser a produção de biomateriais ativos, capazes de induzir reações biológicas controladas e melhorar a interface entre o biomaterial e o corpo. Mais recentemente, a terceira geração combina materiais bioativos e bioabsorvíveis, capazes de estimular respostas específicas nas células para regenerar estruturas, funções e melhorar as propriedades mecânicas [14].

2.3 TECIDO ÓSSEO

O osso é uma construção natural híbrida. A representação do osso é mostrada na Figura 1. O tecido mole é conhecido como parte esponjosa do osso e o tecido duro (osso cortical) consiste em 10% de água, 30% de componente orgânico (colágeno, lipídios e proteínas) e 60% de uma matriz inorgânica composta principalmente por hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) [13].

Figura 1 – Representação esquemática da construção do osso.



Fonte: Adaptado de [13]

O osso é dividido em duas morfologias: o osso esponjoso ou trabecular, que desempenha funções metabólicas, e possui porosidade entre 50 e 90% e tamanho dos poros da ordem de 1 mm de diâmetro, e o osso cortical que está ao seu redor e tem uma estrutura sólida com 3 a 12% de porosidade, cuja função primordial é proporcionar as propriedades mecânicas e proteger o tecido ósseo [15].

No tecido ósseo, podem ser identificados quatro tipos de células predominantes, a saber:

- Osteoblastos - localizados na superfície dos ossos, essas células têm a função de secretar a matriz óssea mineralizada.

- Osteoclastos - encontrados na superfície dos ossos, essas células desempenham um papel crucial na reabsorção da matriz óssea mineralizada, auxiliando no processo de regeneração do tecido ósseo.
- Células mesenquimais - estas células são precursoras dos osteoblastos, desempenhando um papel fundamental na geração de novas células ósseas.
- Osteócitos - São osteoblastos maduros que estão imersos na matriz óssea mineralizada, sendo responsáveis pela manutenção e monitoramento dessa matriz.

O tecido ósseo apresenta uma estrutura e características altamente complexas. Variações na sua porosidade, tamanho dos poros, propriedades mecânicas e grau de mineralização estão intimamente ligadas à idade, estado de nutrição, atividade física e condições de saúde, o que representa um desafio significativo na criação de suportes (*scaffolds*) bem-sucedidos para aplicações na engenharia de tecido ósseo. Esses suportes devem ser adaptados para atender às necessidades específicas de reparação em diferentes pacientes [15].

2.4 VIDROS BIOATIVOS

Um material bioativo é definido como sendo aquele que estimula uma resposta benéfica no corpo. O termo “biocerâmica” é em geral usado para abranger vidros, vitrocerâmicas e cerâmicas que são utilizados como materiais de implante [7].

Os vidros bioativos (*bioactive glass* - BG) têm sido usados para diversas aplicações clínicas há pelo menos quatro décadas. O primeiro vidro bioativo, Bioglass® 45S5, obtido pelo método de fusão foi descoberto por Hench em 1969 seguido do produto obtido via processo sol-gel, também proposto por Hench em 1991. Os BGs desenvolvidos recentemente apresentam mesoporosidade que foi proposta por Vallet-Regi [16].

Os BGs podem ser considerados biocerâmicos com estruturas vítreas. Este grupo de materiais foi sintetizado pela primeira vez pelo professor Larry Hench na Universidade da Flórida em 1969, enquanto procurava encontrar materiais que substituíssem o osso, para tratar os veteranos da Guerra do Vietnã. Os estudos para o desenvolvimento BG começaram com a formulação de vidros $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$. Uma vez transplantado, o BG promove uma reação biológica na interface do material, que estimula a proliferação celular, a resposta gênica e a formação de uma ligação com tecidos vivos. Este por sua vez auxilia na formação de uma camada biologicamente ativa de HA na superfície do vidro em contato com o osso [7, 16].

Vidros bioativos (BGs) apresentam grande potencial na regeneração do tecido ósseo devido às suas notáveis propriedades de estimular a formação de osso (osteostimulação),

promover a condução do crescimento ósseo (osteocondutividade) e ter uma taxa de degradação adequada. Esses materiais consistem principalmente em elementos como sílica (SiO_2), cálcio (CaO) e fosfato (P_2O_5), proporcionando um ambiente propício para que células osteoblásticas humanas possam colonizar, proliferar e diferenciar-se, culminando na formação de um novo osso [17].

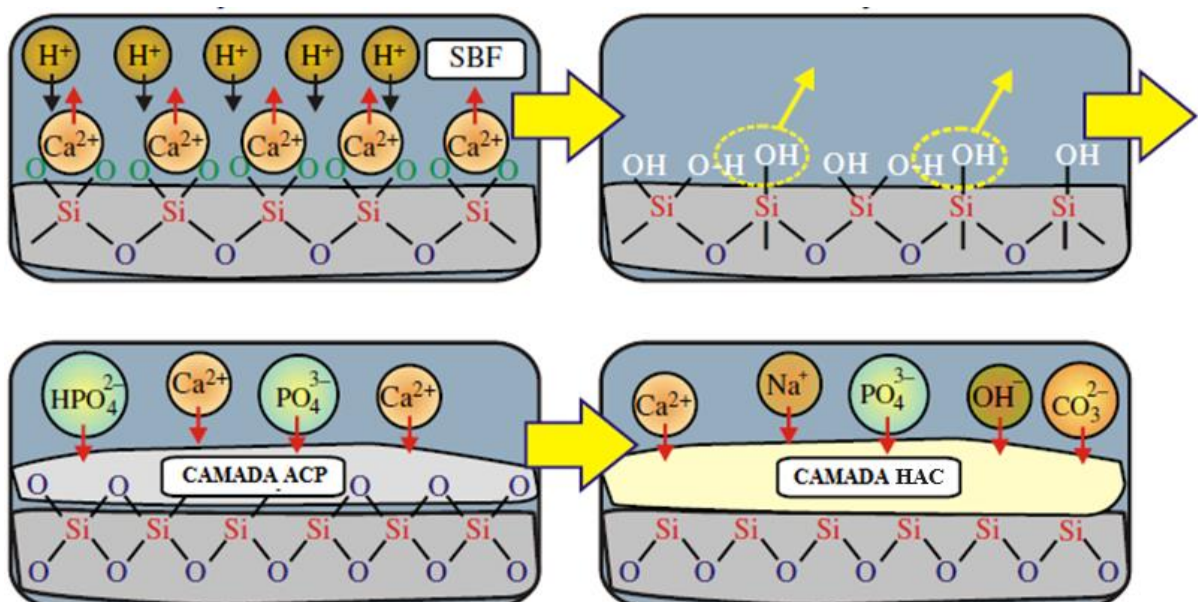
O silício (Si) é essencial para os processos metabólicos, formação e calcificação do tecido ósseo, o cálcio (Ca) é favorecido na proliferação osteoblástica e o fósforo (P) é um regulador chave na formação óssea [18].

Quando o vidro bioativo entra em contato com fluidos corporais, forma uma hidroxiapatita carbonatada (HCA) camada à qual o osso pode se unir. A taxa de formação da camada de HCA depende da composição e morfologia dos BGs que por sua vez dependem de seu método de síntese e condições [17].

A formação de HCA na superfície de BG obtido por fusão é apresentada na Figura 2 e as etapas envolvidas neste processo são:

- (1) troca iônica entre os íons de cálcio presentes na composição do BG e os íons H^+ existentes no Fluido Corporal Simulado (SBF);
- (2) rompimento das ligações Si-O-Si para a formação de grupos Si-OH ;
- (3) reação: $2 \text{Si-OH} \rightarrow \text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O}$;
- (4) formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfo (ACP)
- (5) formação da camada de HCA.

Figura 2 – Processo de formação da HCA durante a exposição ao SBF.

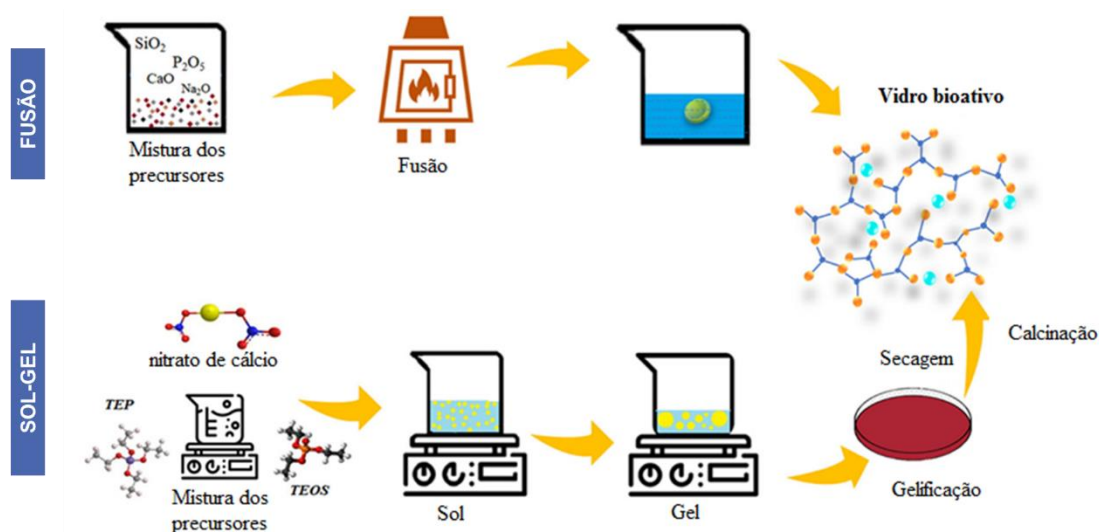


A ligação formada entre o BG e osso se mostra tão resistente que muitas vezes não pode ser removida. Produtos da dissolução do BG no organismo estimulam as células hospedeiras a produzir uma matriz óssea, devido à presença de íons de cálcio e sílica. Dentro do osso, os BGs podem atuar como agentes de osteocondução e osteoindução. A estrutura porosa interconectada de BGs é semelhante ao osso, fornecendo às células um molde temporário para se regenerarem [5, 7]. que forem entregues

Os dois principais processos de fabricação para obtenção do BG são: o processo de fusão e a rota sol-gel. O primeiro método é o mais antigo processo de obtenção de vidro e consiste na mistura dos óxidos precursores (SiO_2 , CaO e P_2O_5) seguido de fusão em altas temperaturas (acima de $1300\text{ }^\circ\text{C}$), sendo posteriormente resfriado e moído [7, 20]. Composição de diferentes tamanhos e formas podem ser produzidas por meio deste método. As aplicações clínicas dos BGs incluem próteses usadas nas áreas de cirurgia ortopédica e maxilofacial, grânulos e particulados também têm sido utilizados em substituição ao osso [5].

Diferentemente da fusão que trabalha em altas temperaturas, a rota sol-gel é conduzida em temperatura ambiente, na qual os precursores químicos sob certas condições de pH são misturados. Ela inicia-se com uma suspensão coloidal (sol), compostas por partículas coloidais dispersas no meio líquido. Em seguida ocorre a formação de ligações cruzadas às quais se transformam em um gel. Os géis formados são redes inorgânicas de sílica que posteriormente são aquecidas entre $600\text{--}700\text{ }^\circ\text{C}$ para se tornar um vidro e remover subprodutos, como os nitratos [7, 16, 21]. Representação esquemática das rotas de BG foram apresentados na Figura 3.

Figura 3 – Representação das rotas de obtenção de BG.



Fonte: Adaptado de [22]

Composições típicas de vidros bioativos sol-gel são aquelas do sistema ternário, por exemplo: 58S (58 SiO₂, 33 CaO, 9 P₂O₅, % em massa) e 77S (77 SiO₂, 14 CaO, 9 P₂O₅, % em massa), ou sistema binário, por exemplo: 70S30C (77 SiO₂, 30 CaO, % em massa). As diferenças dos vidros derivados de sol-gel em relação aos vidros preparados por fusão são que os vidros sol-gel resultam em partículas menores com nano porosidade, enquanto os vidros temperados por fusão são mais densos, apresentando partículas maiores [7].

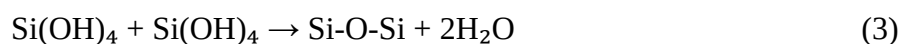
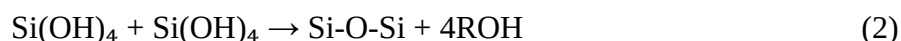
Os vidros sol-gel contêm porosidade inata e, como resultado tem uma área de superfície específica mais alta do que os vidros fundidos. A área de superfície melhorada dos vidros bioativos sol-gel leva a um aumento na liberação de íons resultando em bioatividade melhorada *in vitro* [17].

Um precursor típico de sílica empregado no processo sol-gel é o Tetraetilortossilicato (TEOS), Si(OC₂H₅)₄ que reage com a água (hidrólise) sob condições ácidas ou condições básicas para formar uma solução (sol) cuja partículas coloidais (diâmetros 2 nm) estão dispersas em um líquido. Em seguida, forma-se o gel, no qual estão presentes a água e o etanol produzido durante as reações de condensação. Como a água e o álcool evaporam durante a secagem, dão origem a uma rede de poros interconectados. Os poros são os interstícios e seu tamanho depende dos precursores usados, da composição química do vidro e do pH do meio [7].

A etapa inicial do processo sol-gel envolve as reações de hidrólise na qual ocorrem quando o precursor alcóxido (OR) reage com moléculas de água, resultando na formação de grupos hidroxila (OH). Essa hidrólise promove o crescimento coloidal das partículas sólidas dispersas na solução, formando a fase sol [28] de acordo com a reação:

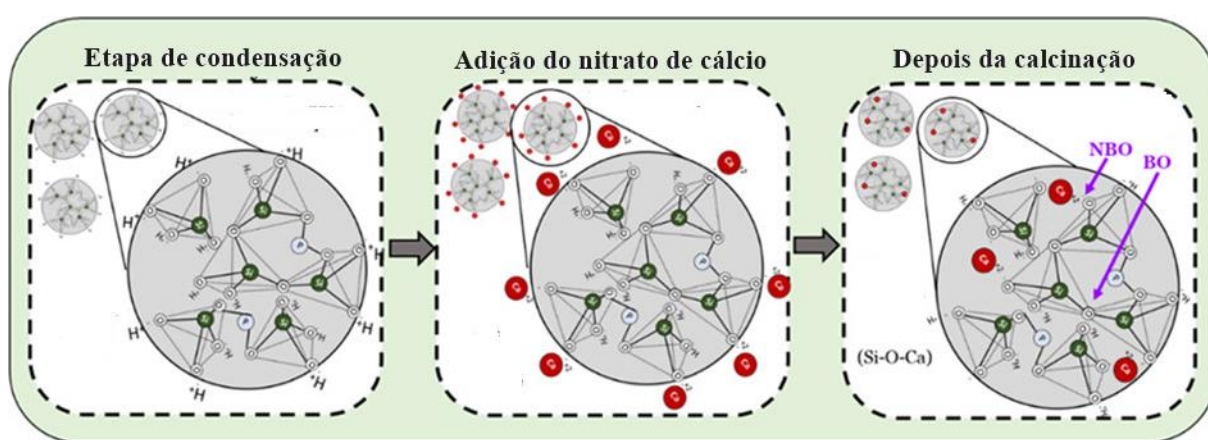


Durante a etapa de condensação, esses grupos silanóis interagem entre si (Si-OH), formando ligações siloxanas (Si-O-Si), além de liberar água ou álcool como subproduto. A reação de condensação permite a formação de uma rede tridimensional contínua [28, 29] podendo ser alcoólica ou aquosa:



Após a formação do gel ocorre a etapa de envelhecimento e durante esse tempo as reações de condensação continuam permitindo que a rede tridimensional se fortaleça e se desenvolva ainda mais. Em seguida, o gel deve passar por etapas de secagem, a fim de remover o excesso de solvente, e tratamento térmico, onde o gel é aquecido a temperaturas entre 600-650 °C, para garantir a eliminação total de resíduos orgânicos e nitratos, bem como a consolidação da estrutura vítrea e a difusão de íons de cálcio dentro da rede de sílica, conforme mecanismo representado na Figura 4.

Figura 4 – Mecanismos para a difusão dos íons cálcio dentro da rede de sílica.



Fonte: Adaptado de [22]

O tratamento térmico é realizado para remover completamente a água e outros compostos orgânicos deixando uma rede de poros interconectados, promovendo a consolidação da estrutura do gel e a formação de uma estrutura vítrea [30]. O tamanho dos poros depende dos precursores usados, da composição química do vidro, do pH do meio, da razão molar entre a sílica e a água, dos catalisadores, dos solventes e da temperatura de reação [6].

As desvantagens da síntese sol-gel sobre o processo de fusão é a dificuldade em se obter monólitos de BG sem fissuras e com diâmetros acima 1 cm, isso porque monólitos com estas dimensões tendem a rachar durante processo de secagem. A rachadura é decorrente de dois motivos: a grande contração que ocorre durante a secagem e a evaporação do subproduto líquido (água e etanol) da reação de condensação [7].

A rota sol-gel envolve uma ampla gama de parâmetros de processo, incluindo a escolha do catalisador, ajuste do pH, controle da quantidade de solvente, seleção do precursor, gerenciamento do tempo de envelhecimento e otimização da temperatura de estabilização. Esses fatores podem ser ajustados de maneira a moldar a microestrutura do produto de acordo com as necessidades. [23].

Os BGs apresentam tanto propriedades de osteocondução (suportar o crescimento ao longo de uma superfície de contato) quanto de osteoindução (estimulação de células hospedeiras imaturas para se desenvolver em células osteogênicas) além de poder ser usado em uma variedade de aplicações, como enxerto ósseo, entrega de drogas, revestimentos e engenharia de tecidos moles. Apesar de possuir bioatividade satisfatória, os BGs apresentam desvantagens, tais como: baixa resistência mecânica, o que restringe o seu uso em aplicações que demandam esforços significativos [16].

2.5 VIDRO BIOATIVO MESOPOROSO

O atual desenvolvimento de BGs no que se refere à regeneração de tecidos ósseos consiste na incorporação de certos componentes em sua composição, com o intuito de aumentar a superfície de contato com o meio originando estruturas porosas denominadas mesoporos [12].

Vidros bioativos mesoporosos (MBG) são materiais que têm recebido muita atenção devido às suas propriedades bioativas, biocompatibilidade e capacidade osteocondutora. Esses materiais possuem composição semelhante aos vidros bioativos tradicionais, mas apresentam uma estrutura mesoporosa altamente ordenada, o que resulta em uma maior área de superfície específica e um volume de poros mais elevado [23, 24].

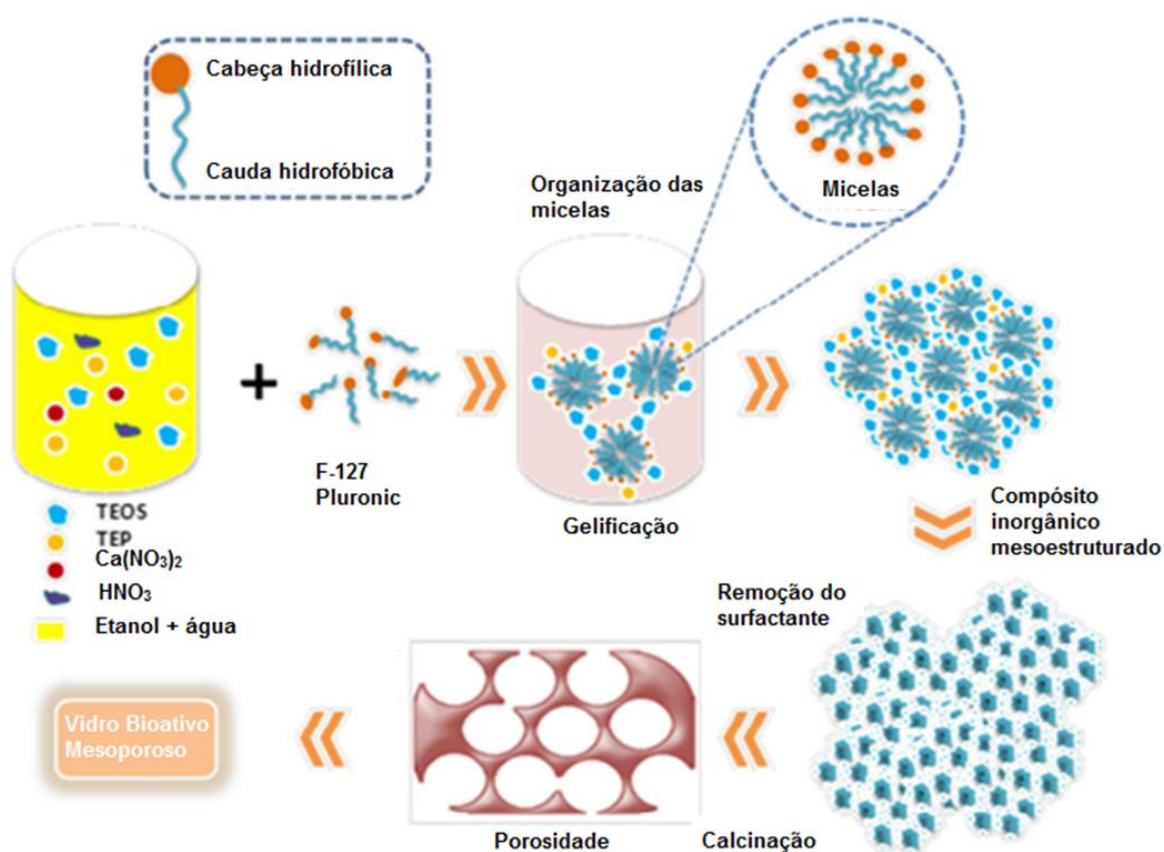
Devido à sua estrutura mesoporosa, os MBGs possuem uma grande quantidade de poros de tamanho controlado, que podem melhorar a interação com tecidos biológicos, promovendo a formação de uma camada de HCA na superfície do vidro quando em contato com fluidos biológicos. Essa camada de HCA é um componente-chave para a bioatividade dos vidros, pois é responsável pela ligação entre o material e o tecido ósseo [23, 24].

A presença de uma grande área de superfície específica e um alto volume de poros nos MBGs acelera a taxa de deposição da camada de HCA. Isso ocorre porque uma maior área de superfície proporciona mais sítios de nucleação e crescimento da HCA, enquanto um maior volume de poros permite uma maior difusão de íons e moléculas envolvidas na formação da camada de HCA [23, 24].

Para atingir tal objetivo utilizam-se nas composições, surfactantes a fim de permitir a formação de poros abertos, ou seja, a criação dos mesoporos a fim de aumentar a bioatividade dos BGs. Os surfactantes são compostos químicos cujas moléculas são anfifílicas, que apresentam uma região hidrofílica e outra hidrofóbica, e que por apresentarem estas características são capazes de orientar a formação dos mesoporos [18].

Tais MBGs são obtidos pela utilização dos surfactantes durante o processo de síntese, sendo os mais comuns, o Pluronic P123 e F127, que são de natureza anfifílica apresentando um bloco hidrofílico e outro hidrofóbico, de modo que ao serem adicionados ao meio reacional os blocos hidrofílicos têm uma grande interação com o solvente e o bloco hidrofóbico se movimenta de forma contrária. Quando o surfactante atinge a concentração micelar crítica, inicia-se então a formação das micelas de forma que o bloco hidrofóbico fica no interior da estrutura do MBG e o bloco hidrofílico permanece com uma forte interação com o solvente, permanecendo do lado de fora da estrutura. Ao final da síntese sol-gel, que dá origem ao MBG, as micelas do surfactante ficam aprisionadas no interior da estrutura, sendo então necessário submeter o material a um tratamento térmico a fim de remover o surfactante [23] conforme representação esquemática do processo de síntese de MBG por meio de modelagem de surfactante apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Processo de síntese de MBG por meio de modelagem de surfactante.



Fonte: Adaptado de [26]

A etapa de tratamento térmico é crucial para a finalização de um vidro bioativo, seja ele tradicional ou um MBG, pois é por meio deste processo que serão removidos os subprodutos

da síntese e, em especial no caso dos MBGs, a remoção do surfactante, permitindo deste modo a obtenção de uma estrutura porosa e aberta com poros na faixa de 2 – 50 nm e distribuídos de forma relativamente ordenada [23].

2.6 POLÍMEROS

Com o avanço da BTE, os pesquisadores estão estudando novos processos para criação de *scaffolds* desenvolvidos a partir de polímeros que sejam bioabsorvíveis e biocompatíveis além de possuírem: propriedades mecânicas adequadas, vários formatos e tamanhos para diversas aplicações médicas [13].

Os biopolímeros sintéticos de caráter biodegradáveis podem ser: ácido polilático (PLA), poli-hidroxibutirato (PHB), poli(lático-co-glicólico) (PLGA), ácido poliglicólico (PGA), poliestireno (PS), álcool polivinílico (PVA), polietilenoglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), poli-hidroxialcanoato (PHA), policaprolactona (PCL), poli(lático-co-ε-caprolactona) (PLCL), poliuretano (PU), poli(sebacato de glicerol) (PGS), e outros hidrogéis sintéticos. Entre os polímeros sintéticos mais utilizados para aplicações em *scaffolds*, destacam-se os poliésteres, como o ácido polilático (PLA), o ácido poliglicólico (PGA) e o ácido poli(lático-co-glicólico) (PLGA). Esses polímeros apresentam baixo custo em comparação aos polímeros biodegradáveis naturais além de desenvolvem estruturas sob medida, ou seja, facilidade de processamento sob diversos tamanhos e formas, propriedades mecânicas adequadas e mecanismo de degradação controlável, o qual desempenha um papel fundamental no projeto de um *scaffold* [6, 9, 10].

Dentre os biopolímeros sintéticos o ácido polilático (PLA) é um dos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*), sendo então o mais utilizado e promissor, devido as propriedades mecânicas, processabilidade e propriedades biológicas como biocompatibilidade e biodegradabilidade. Do ponto de vista clínico pode ser usado em suturas, implantes, *scaffolds*, dispositivos de fixação de fraturas e liberação controlada de fármacos, isso devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, transparência e propriedades térmicas e mecânicas adequadas o que garante sua aplicação nas áreas de odontologia, musculoesquelética e ortopédica [4, 25, 26].

O PLA foi sintetizado pela primeira vez por Carothers na década de 30, por aquecimento de ácido lático em vácuo, sendo posteriormente patenteado pela Empresa DuPont. Em 1972 a empresa Ethicon comercializou o PLA para a sutura bioabsorvível com o nome de VICRYL.

Outra rota de obtenção do PLA é ‘por meio da cana-de-açúcar e milho, fontes agrícolas renováveis [26].

O PLA é um polímero semicristalino que apresenta uma temperatura de transição vítrea (T_g) entre 50 – 60 °C e uma temperatura de fusão (T_m) de aproximadamente 180°C. As características térmicas do PLA podem ser modificadas por diversos fatores estruturais, tais como variações nas massas moleculares e composição [15].

Existem diferentes tipos de ácido láctico, cada um variando em pureza dependendo da sua aplicação. Os mais puros são utilizados no setor alimentício, farmacêutico e analítico. Os menos puros contêm sulfatos, metais, aminoácidos e vários carboidratos. Para o processo de polimerização a pureza do PLA tem grande influência, pois vestígios de hidratos de carbono e aminoácidos que permanecem mesmo em pequenos graus, promovem cor no processamento e até mesmo traços de cátions como o sódio levam a mistura racêmica, resultando no isômero menos desejado D(+) láctico [27].

A química do PLA envolve o processamento e a polimerização do monômero do ácido láctico. O ácido láctico é uma molécula quiral simples que existe como dois enantiômeros, ácido L-lático e D-lático, diferindo em seu efeito sobre a luz polarizada. A forma opticamente inativa D, L ou meso é uma equimolar (racêmica) mistura de isômeros D (dextrogiro) e L (levogiro) [26]. O L-lático confere ao polímero uma alta resistência mecânica e, portanto, tem uma vantagem sobre o D-lático [3].

O PLLA, um biomaterial semicristalino, exibe excelente biodegradabilidade, biocompatibilidade, elasticidade, bioestimulação e propriedades mecânicas. É um polímero adequado para entrega de fármacos devido à sua não toxicidade e rápida degradação (> 24 meses). Pode ser combinado com outros polímeros a fim de modular as suas propriedades [4].

O PDLA é um polímero semicristalino, que oferece uma degradação mais rápida do que o PLLA. Apesar de possuir baixa biocompatibilidade em relação ao PLLA, o polímero PDLA é aplicado na área biomédica, incluindo suportes de fixação óssea e suturas biodegradáveis, devido à sua alta resistência mecânica [3].

A mistura de PLLA com PDLA resultam no PDLLA, um polímero amorfo, que apresenta biocompatibilidade, hidrofobicidade e biodegradabilidade (12 – 16 meses). Este polímero é altamente adequado para construir *scaffolds* porosos e biocompatíveis para aplicações na BTE [3]. O PDLLA tem sido amplamente estudado como um material biomédico de revestimento ortopédico devido às suas notáveis propriedades que melhoram o desempenho de implantes. Além de sua elevada estabilidade mecânica, o PDLLA também exibe uma excelente biocompatibilidade *in vivo* e um considerável potencial osteocondutor. O PDLLA de menor

massa molecular pode ser combinado com substâncias terapêuticas, como fatores de crescimento e antibióticos, a fim de criar um sistema de administração local de medicamentos eficaz. Essas características desejáveis têm levado a um crescente interesse no uso do PDLLA como um material de suporte na engenharia de tecidos [15].

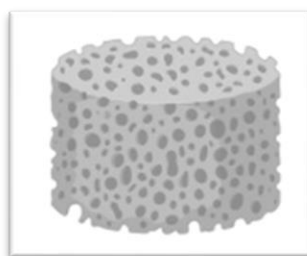
Não obstante as vantagens mencionadas, as membranas poliméricas frequentemente não tem função bioativa, ou seja, não induzem a regeneração óssea, além de liberar produtos ácidos resultante da degradação levando a uma resposta inflamatória além de exibirem propriedades hidrofóbicas, tornando necessária a melhoria de suas características para favorecer interações celulares [28, 29].

2.7 SCAFFOLDS

Scaffold é uma estrutura 3-D que atua como molde poroso, fornecendo suporte mecânico e vascularização sanguínea. Pode ser constituído de um biopolímero e uma biocerâmica de modo que juntos atuam para o preenchimento do defeito e estimulam a reparação óssea. Com o passar do tempo o *scaffold* se degrada favorecendo a formação do novo osso [7].

Deve ser composto por um material biocompatível e biodegradável com características mecânicas semelhantes ao tecido em que será implantado. Ele não se destina a ser um implante permanente, mas age como facilitador para as células hospedeiras se depositarem e ao longo do tempo substituí-lo. Sua estrutura deve ser porosa a fim de permitir a migração de células e nutrientes, conforme pode ser visto na Figura 6. Do ponto de vista cirúrgico, também é desejável que o material do *scaffold* seja facilmente manipulado em diferentes formas e tamanhos para permitir o tratamento *in situ* de defeitos ósseos do paciente [5].

Figura 6 – Estrutura porosa.



Fonte: [5]

As vantagens associadas aos *scaffolds* biodegradáveis são:

- Ser biocompatível e bioativo com o hospedeiro;
- Possuir uma estrutura porosa e interconectada para favorecer o processo de vascularização;
- Poder ser moldado em diversos formatos;
- Possuir taxa de degradação controlada;
- Ser capaz de compartilhar os esforços mecânicos com o tecido ósseo;
- Ter boa relação custo-benefício [7, 13].

Os *scaffolds* poliméricos podem ser aprimorados pela incorporação de materiais inorgânicos, como as biocerâmicas. As biocerâmicas mais comuns utilizadas pelos cirurgiões são sulfato de cálcio, fosfato tricálcio (TCP), hidroxiapatita sintética (HA), fosfato de cálcio bifásico (uma mistura de TCP e HA) e vidro bioativo que liberam íons ao interagir com os tecidos circundantes e estimulam as células hospedeiras a produzir uma matriz óssea. Esses *scaffolds* exibem regeneração devido à boa ligação do tecido, alta resistência à compressão, propriedades antimicrobianas e características de mudança de pH das cerâmicas bioativas. No entanto, essas biocerâmicas apresentam baixa ductilidade o que limita sua utilização no campo da regeneração tecidual. A formação desses materiais híbridos à base de biopolímeros e biocerâmicas ajuda a melhorar as características do *scaffold* e a interação tecidual, o que permite a degradação controlada, ou seja, reparam os tecidos biológicos, melhoram a biocompatibilidade e a resistência mecânica dos *scaffolds* [3].

Os *scaffolds* trazem direcionamento ao desenvolvimento de um novo tecido, assegurando-lhe estabilidade mecânica e viabilizando uma organização tridimensional das células. Isso, por sua vez, permite que haja adesão, proliferação e diferenciação, contribuindo assim para a regeneração do tecido ósseo [15].

A geometria e a estrutura dos *scaffolds* desempenham um papel crucial na formação do novo tecido. A porosidade, que representa a proporção de espaço vazio em um sólido, é essencial para facilitar o suprimento de nutrientes e oxigênio às células que estão ancoradas no suporte, além de permitir a migração adequada das células pela estrutura do suporte. O tamanho de poros afeta diretamente a adesão e a diferenciação do tecido. O tamanho mínimo de poro necessário para a regeneração de osso é geralmente considerado como 100 μm . No entanto, acredita-se que o tamanho de poro ideal para a osteogênese *in vitro* esteja na faixa de 100 a 300 μm . Entretanto, poros com dimensões entre 300 e 800 μm parecem ser mais adequados para a formação de osso e vascularização [15].

Estruturas com elevada porosidade tendem a favorecer o crescimento interno do tecido ósseo. No entanto, estruturas altamente porosas geralmente apresentam propriedades mecânicas deficientes, o que pode comprometer a integridade estrutural do suporte. Existe um limite para a porosidade e o tamanho dos poros em suportes, além do qual suas propriedades mecânicas são comprometidas. Em geral, os suportes devem possuir resistência mecânica suficiente para sustentar a proliferação celular, a deposição da matriz extracelular e o crescimento do tecido [15].

Os suportes fabricados para a engenharia de tecido ósseo devem ter uma resistência comparável à do tecido ósseo nativo, a fim de suportar as cargas fisiológicas e evitar o estresse excessivo. Embora a propriedade mecânica dos suportes seja prejudicada com uma maior porosidade ou maiores dimensões de poros, o uso de materiais com uma resistência mecânica intrínseca elevada pode representar uma solução para esse problema [15].

2.8 TÉCNICAS PARA OBTENÇÃO DE *SCAFFOLDS*

Para a preparação dos *scaffolds* é fundamental atender aos seguintes requisitos [30]:

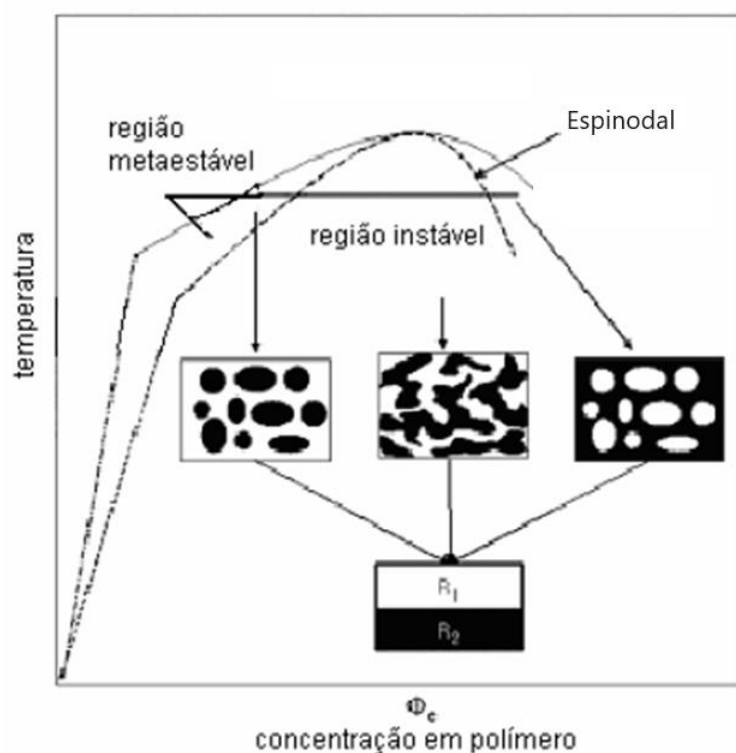
- A técnica deve ser altamente precisa, garantindo que o produto tenha propriedades desejáveis, incluindo porosidade, tamanho e distribuição dos poros, bem como a conectividade entre eles;
- É crucial assegurar a capacidade de reproduzir o processo de preparação de forma consistente.

Uma grande variedade de técnicas tem sido utilizada na obtenção de *scaffolds*, entre as mais utilizadas são: fundição com solvente e lixiviação, formação de espumas gasosas, liofilização, separação de fases. Atualmente com o avanço tecnológico, *scaffolds* podem ser produzidos por meio de técnicas de eletrofiação e tecnologia de impressão 3D. A escolha da técnica de preparação depende do tipo de aplicação [5].

Os *scaffolds* obtidos por meio da Separação de Fases Induzida Termicamente (TIPS), seguido de liofilização, consiste em induzir separação de fases de uma mistura polimérica homogênea em duas fases, a saber: uma fase “rica” em polímero e outra “pobre” em polímero. Essa separação está baseada na adição de um solvente (água) que não seja miscível nesta mistura polimérica, formando um sistema no qual está presente o polímero/solvente/não-solvente [31]. A temperatura para induzir a separação de fases deve ser inferior ao "ponto de nuvem". Este ponto é caracterizado como a temperatura que marca a transição da região em que a mistura é homogênea para a região em que há separação de fases [4].

A morfologia do *scaffold* em relação a sua porosidade é condicionada pela termodinâmica do sistema durante a separação de fases, conforme mostrado na Figura 7, na qual apresenta o diagrama de fases binário temperatura em relação a concentração de uma solução polimérica. A ocorrência da separação de fases líquido-líquido pode seguir diferentes mecanismos, dependendo da temperatura escolhida [4].

Figura 7 – Diagrama de fases binário temperatura-concentração de uma solução polimérica.



Fonte: Adaptado de [4]

Para temperaturas na região entre as curvas o sistema é metaestável e ocorre a separação pelo mecanismo de nucleação e crescimento na qual há formação das gotículas e o crescimento destas é impulsionado pelo gradiente de concentração em direção a gota. Esse mecanismo resulta na criação de uma estrutura com pouca interconectividade, apresentando poros com formato esférico. Para temperaturas inferiores a curva espino, o sistema torna-se instável e ocorre a separação pelo mecanismo de decomposição espino.

Com base na literatura observa-se que concentrações de PDLA abaixo de 4,5% resultam em uma sedimentação rápida da fase “rica” em polímero e que a proporção em massa de dioxano/água de 87/13 é aquela que apresenta os resultados mais adequados. Vale salientar que o teor de água tem um impacto na solubilidade do polímero, pois o aumento no seu teor reduz a solubilidade do polímero no solvente, o que pode levar a uma sedimentação rápida da fase

“rica” em polímero. Por outro lado, um teor de água inferior a 13% aumenta a viscosidade da solução tornando o processo de separação de fases mais lento [4].

A técnica TIPS é combinada com a liofilização que consiste na remoção do solvente congelado que está no sistema, promovendo sua sublimação por meio da diminuição da temperatura e pressão [30].

O processo de liofilização opera com base no princípio da sublimação de um solvente, alcançando isso por meio de um controle adequado de temperaturas e pressões. O material inicialmente é dissolvido em um solvente apropriado. Em seguida, a mistura polimérica é congelada a uma temperatura inferior à sua temperatura de congelamento, resultando na solidificação do solvente. Em seguida, esse sistema é colocado em um liofilizador ajustado a uma temperatura muito abaixo do ponto de congelamento do solvente, sob pressões, extremamente inferiores às atmosféricas, o que desencadeia o processo de sublimação do solvente. Como resultado desse processo, espaços vazios são criados, formando uma estrutura porosa que frequentemente inclui canais interconectados. Esse método possibilita o controle preciso do tamanho dos poros e da anisotropia, permitindo a geração de estruturas com porosidade superior a 90 % [14].

O método é capaz de produzir suportes porosos altamente homogêneos, atingindo uma porosidade de aproximadamente 90 %, com uma morfologia tubular altamente anisotrópica e uma interconectividade de poros significativa. A morfologia dos poros varia dependendo do tipo de polímero, do solvente, da concentração do polímero, da temperatura de separação de fases e da solução utilizada. Os *scaffolds* gerados por esse processo costumam apresentar poros tubulares orientados, com macroporos (superior a 100 μm), e microporos (cerca de 10-50 μm) que conecta aos poros maiores [14].

Neste caso, para produzir materiais híbridos, há incorporação de materiais inorgânicos na mistura polimérica. Posteriormente, essa mistura é congelada e depois passa pelo processo de liofilização em um liofilizador, no qual o solvente é evaporado [32].

2.9 SCAFFOLD HÍBRIDO DE VIDRO BIOATIVO/BIOPOLÍMERO

Os materiais híbridos podem ser agrupados em duas categorias, dependendo da interface entre orgânicos e inorgânicos. A primeira categoria corresponde aos materiais de classe I, caracterizados por interações de baixa intensidade, forças de Van der Waals, interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio. A segunda categoria engloba os materiais de classe II, nos quais ocorrem interações mais fortes como ligações covalentes ou iônicas. Os materiais

híbridos orgânico-inorgânicos de classe I têm sido amplamente explorados para uma variedade de aplicações, pois apresentam melhor desempenho em termos de propriedades mecânicas e resistência à degradação, em comparação com os compósitos tradicionais [32].

A estratégia para o uso de materiais híbridos a base de PLA e BG reside no fato de aliar as qualidades presentes em cada um dos componentes onde o BG possui propriedades bioativas, porém baixa resistência mecânica, já o PLA geralmente não possui propriedades bioativas, o que significa que não promove a regeneração óssea, além de liberar produtos ácidos resultado de sua degradação, o que pode desencadear uma resposta inflamatória. No entanto, abordagens estratégicas, como a incorporação de carga inorgânica no polímero para criar materiais híbridos, possibilitam superar essas limitações. De fato, a capacidade de contrapor a degradação ácida dos polímeros biodegradáveis é citada como mais uma razão para a adoção de materiais híbridos [33].

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO DO VIDRO BIOATIVO BG-58S

O BG-58S foi sintetizado por meio da rota sol-gel, como apresentado na literatura, de forma a obter-se 10 g do referido material na forma de pó [34]. Foram utilizados reagentes conforme apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Reagentes utilizados para a produção do BG-58S por sol-gel.

	Reagente	Fórmula Química	Massa Molar (g/mol)	Densidade (g/cm ³)	Pureza (%)	Fornecedor
Fonte de sílica	Tetraetilortosilicato (TEOS)	Si(OC ₂ H ₅) ₄	208,33	0,933	98	Sigma-Aldrich
Fonte de cálcio	Nitrato de cálcio tetrahidratado	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236,15	1,90	99-103	Dinâmica
Fonte de fósforo	Trietilfosfato (TEP)	OP(OC ₂ H ₅) ₃	182,15	1,07	99,8	Sigma-Aldrich
	Ácido fosfórico (AF)	H ₃ PO ₄	98,00	1,71	85	Dinâmica
Solvente	Etanol absoluto	CH ₃ CH ₂ OH	46,07	0,789	99,8	Neon
Catalisador da hidrólise	Ácido nítrico	HNO ₃	63,01	1,380	65	Neon
Aditivo	Pluronic F-127	(C ₃ H ₆ O·C ₂ H ₄ O) _x	12600	-	-	Sigma-Aldrich

Fonte: o autor (2023)

A preparação do pó de BG-58S envolveu reações de hidrólise e policondensação de quantidades estequiométricas de TEOS, nitrato de cálcio e TEP ou AF, conforme determinado pela composição nominal 58S (58SiO₂, 33CaO, 9P₂O₅, % em massa). Oito diferentes composições foram preparadas nas quais foram variadas a fonte de fósforo (TEP ou AF), a adição ou não de solvente (etanol) e de agente porogênico (Pluronic F-127).

As soluções foram preparadas utilizando etanol, TEOS, água Milli-Q[®] e solução de ácido nítrico (2 mol/L) misturados em um béquer de plástico com agitação constante e temperatura ambiente por um período de 30 min. TEP ou AF foi então adicionado ao sol de sílica ácida e agitado por 20 min. Em seguida o Ca(NO₃)₂·4H₂O foi completamente dissolvido no sol. Em quatro destas rotas foram adicionados Pluronic (F-127) agitando até a gelificação. O gel obtido foi misturado com um bastão de vidro e mantido na estufa (Simétrica) a 60 °C por 24 horas para remover a água residual e o etanol. Os pós secos foram macerados em almofariz e

colocados em forno mufla (EDG 3000) a temperatura da ordem de 600-650 °C por 24 horas com taxa de aquecimento de 3 °C/min, conforme Tabela 2. As oito diferentes rotas foram denominadas: TEP+EtOH, AF+EtOH, TEP+EtOH+F-127, AF+EtOH+F-127, TEP, AF, TEP+F-127 e AF+F-127 sendo as quantidades de cada reagente apresentadas na Tabela 3.

Tabela 2 – Temperaturas de calcinação aplicadas às diferentes amostras.

Rotas	TEP+ EtOH	AF+ EtOH	TEP+EtOH+ F-127	AF+EtOH +F-127	TEP	AF	TEP+ F-127	AF+ F-127
T(°C)	650	650	600	600	650	650	600	600

Fonte: o autor (2023)

Tabela 3 – Rotas para a produção do BG-58S por sol-gel

Reagentes	TEP+Et OH	AF+EtO H	TEP+E tOH+F -127	AF+Et OH+F- 127	TEP	AF	TEP+F -127	AF+F- 127
Etanol (mL)	50	50	50	50	-	-	-	-
TEOS (mL)	22	22	22	22	22	22	22	22
TEP (mL)	2,2	-	2,2	-	2,2	-	2,2	-
H₂O (mL)	14	14	14	14	14	14	14	14
AF (mL)	-	0,9	-	0,9	-	0,9	-	0,9
HNO₃ (2 M) (mL)	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8
Ca(NO₃)₂.4H₂O (g)	14,04	14,04	14,04	14,04	14,04	14,04	14,04	14,04
Pluronic (g)	-	-	5,675	5,675	-	-	5,675	5,675

Fonte: o autor (2023)

Após o tratamento térmico, a amostra foi moída em moinho de alta energia (Fristsch Premium line Pulverisette 7) durante 5 min e 700 rpm e peneirada em peneira 400 mesh (38 µm).

3.2 PREPARAÇÃO DOS SCAFFOLDS DE PDLA E PDLA/BG

Foram preparados *scaffolds* à base de PDLA e materiais híbridos à base de PDLA/vidro bioativo por Separação de Fases Termicamente Induzida (TIPS) combinada com

a liofilização. Neste processo inicial foi utilizado somente o polímero a fim definir os parâmetros do processo, sendo estes: tempo de separação de fase, temperatura do “ponto de nuvem”, fração mássica dos componentes. Os *scaffolds* foram preparados com diferentes teores de partículas de vidro bioativo calculado em relação à fração polimérica com diferentes tempos de separação de fases e a proporção em massa de dioxano/água escolhida foi de 87/13.

Para a preparação dos *scaffolds* de PDLA, primeiramente o polímero foi pesado e dissolvido no solvente 1,4-dioxano P.A. (Neon) a 80 °C, sob agitação magnética durante aproximadamente 2 horas. Decorrido este tempo adicionou-se água ultrapura (Milli-Q®) previamente aquecida em torno de 80 °C. A adição da água foi feita após a completa dissolução do polímero em dioxano, devido a água ser um não-solvente para o PDLA. Em seguida foram acrescentadas as partículas de vidro bioativo, no caso dos *scaffolds* híbridos. O sistema foi submetido a ultrassom (Sonics Vibra-cell - X 500), durante 15 min a 37 °C.

Foi utilizada a concentração de PDLA de 5,5% (m/v) em relação ao sistema PDLA/dioxano/água.

A temperatura para induzir a separação de fases líquido-líquido deve estar abaixo do "ponto de nuvem", definido como a temperatura no qual ocorre a transição da região em que a solução é homogênea para a região em que as fases se separam. Para determinar a temperatura do “ponto de nuvem” foi realizada inspeção visual até que a solução se tornasse turva. Após a preparação da solução PDLA/dioxano/água conforme descrito anteriormente, a solução foi resfriada gradualmente, grau a grau, permitindo sua estabilização por 5 minutos em cada nova temperatura. A temperatura do “ponto de nuvem” assim determinada foi de 30 °C para os sistemas estudados. Os tempos de separação de fases estudados foram: 30, 60 e 120 min.

Para preservar as morfologias resultantes da separação de fases, as soluções foram congeladas a -23 °C por 72 h e posteriormente submetidas ao processo de liofilização uma temperatura de -54,3 °C. Esse processo teve como objetivo remover o solvente e a água, resultando nas estruturas porosas desejadas. A liofilização foi realizada em um equipamento modelo JJ Científica Linha: LJJ, durante 24 horas. Dessa forma, foram produzidos *scaffolds* de PDLA e *scaffolds* híbridos de PDLA/BG, preparados por separação de fases líquido-líquido termicamente induzida, contendo diferentes teores de vidro bioativo (0, 15, 20, 30 e 50 % (m/m)) e com tempos de separação de fases de 30, 60 e 120 minutos.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO PÓ DE BG-58S E DOS SCAFFOLDS

Os pós de vidros bioativos (BG) produzidos por rota sol-gel e os *scaffolds* híbridos (S) de PDLA/vidro bioativo foram caracterizados conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Técnicas de caracterização.

Caracterizações	BG	S	Objetivo
Espectroscopia Raman			Analisar a estrutura do material
DRX			Identificar a presença de fase cristalina
FTIR			Identificação de grupos funcionais presente na estrutura do material
BET			Determinar a porosidade
Tamanho de partícula			Determinar a distribuição de tamanho de partículas
MEV/EDS			Avaliar morfologia e composição química
TGA-DSC			Determinar a temperatura do tratamento térmico
Potencial Zeta			Determinar a carga superficial
Porosidade			Analisar a porosidade e a distribuição de tamanho de poros
Ensaio de degradação			Estimar o tempo de degradação
Testes <i>in vitro</i>			Avaliar a viabilidade celular, proliferação e diferenciação das células osteoblásticas e formação de nódulos de mineralização

Fonte: o autor (2023)

3.3.1 Espectroscopia Raman

As análises por Espectroscopia Raman foram executadas em um espectrômetro Raman modelo RFS-100/S Bruker, com comprimento de onda de 1064 nm a uma potência do laser de 100%.

3.3.2 Difração de Raios X (DRX)

As análises de DRX foram obtidas em um difratômetro de raios X, da marca Shimadzu, modelo XRD 6100, com fonte de radiação CuK α . O ensaio foi realizado a uma varredura 2 θ de

10 a 80°, a uma velocidade de 2 graus/min, a partir de uma fenda de 0,3 mm. O comprimento de onda utilizado foi de $\lambda=1,54$ Å, voltagem de 40,0 kV e corrente de 30,0 mA.

3.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas por meio de um espectrofotômetro no infravermelho, da marca Perkin-Elmer, modelo FT-IR/NIR Spectrometer Frontier, com um total de 20 varreduras na região espectral de 4000 a 600 cm^{-1} , utilizando o acessório reflexão total atenuada (UATR) a 80 N com cristal de ZnSe. Os espectros FTIR foram registrados na faixa de número de onda de 400 e 4000 cm^{-1} .

3.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução (MEV-FEG)

A morfologia das amostras foi verificada por MEV-FEG em um microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão por campo, da marca Tescan, modelo Mira 3, com análise de energia dispersiva de raios X (EDS). As amostras foram metalizadas com uma camada de ouro com auxílio de um equipamento Emitech K550X e preparadas a seco coladas em *stubs*, com o auxílio de uma fita adesiva condutora de carbono.

3.3.5 Análises térmicas

Os ensaios de termogravimetria (TGA) foram realizados pelo analisador da marca NETZSCH, modelo STA 449F3 Jupiter, sendo as amostras inicialmente pesadas (~ 6 mg) e inseridas em um porta amostras de alumina, e então aquecidas a uma temperatura ambiente até 1000 °C, a uma taxa de aquecimento de 23 °C/min, sob atmosfera inerte de Nitrogênio (N_2) com fluxo de 50 mL/min e ar sintético. E por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) foi realizada utilizando o equipamento DSC Q20 da marca TA Instruments.

3.3.6 Propriedades texturais

As isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio foram obtidas em equipamento da marca Quantachrome Instruments, modelo Nova 2200e (N22-25E). Para isso, os pós foram analisados conforme a adsorção física na superfície de cada um deles, com a utilização de gás

Nitrogênio (N_2), sendo a área superficial obtida por meio da quantidade de gás adsorvido na camada monomolecular de suas superfícies.

3.3.7 Distribuição de tamanho de partícula

Após a calcinação a amostra BG-58S com AF foi moída em moinho de alta energia (Fritsch Premium line Pulverisette 7) durante 5 min e 700 rpm na proporção pó/esfera de 1:6 utilizando esfera de zircônia (10 mm) e jarro de capacidade de 80 mL. Em seguida foi peneirada em peneira *mesh* 400 (38 μ m).

A determinação da distribuição granulométrica foi realizada em um analisador de tamanho de partículas (Microtrac - S3550), sendo a amostra submetida a ultrassom (Sonics Vibra-cell - X 500), durante 5 min.

3.3.8 Porosidade

Os *scaffolds* foram analisados pelo porosímetro por intrusão de mercúrio que permitiu analisar a porosidade, a distribuição dos tamanhos de poros e o diâmetro, bem como sua densidade. O princípio da técnica da porosimetria de mercúrio baseia-se no fato de este ser um líquido não molhante, sendo necessário aplicar pressão para que este penetre nos poros. Assim, através da medida da pressão efetuada e do volume de mercúrio que passa pelo poro, pode-se calcular o tamanho deste. Esta técnica mede o tamanho de poro no intervalo de aproximadamente 1-300 μ m. Foi utilizado um equipamento Autopore IV 9500, Micromeritics.

3.3.9 Degradação em solução tampão de fosfato (PBS)

O ensaio de degradação consiste em fornecer dados de pH do meio, variação de massa do produto e estimar um tempo de degradação total do produto. O ensaio permite identificar e/ou quantificar os produtos de degradação gerados. O estudo foi realizado de acordo com a norma ISO 10993-13:2010. As amostras foram dimensionadas para garantir uma relação 1:500 (m/v) sendo pesadas e depois adicionadas em uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) devidamente estabilizada com pH=7,4. Após a imersão de todas as amostras em solução, foram colocadas em uma incubadora com agitação a 37 °C e 100 rpm.

As propriedades foram calculadas pesando as amostras antes da imersão em PBS (W_i) e após secagem a 30 °C por 24h pós incubação (W_d). A variação de massa (WL, %) dos *scaffolds* foi calculada de acordo com a equação 1:

$$WL = \frac{(W_d - W_i)}{W_i} \cdot 100 \quad (1)$$

O comportamento de degradação dos *scaffolds* foi avaliado após imersão em PBS por 2, 7, 30 e 60 dias medindo a variação de massa e alterações de pH.

3.3.10 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A técnica de Cromatografia em Gel (GPC) é um método de separação de moléculas dissolvidas com base no seu tamanho, por meio de bombeamento em colunas especializadas e microporosas. Conforme a amostra foi separada e eluída na coluna, detectores foram capazes de caracterizar o polímero, proporcionando a massa molecular absoluta, o tamanho molecular e a viscosidade intrínseca, bem como outras informações estruturais. As condições para preparação da curva de calibração foram: razão de fluxo (vazão) de 1 mL/min em THF (tetraidrofurano) a 40°C, utilizando 4 colunas fenogel (500 a 10000 Å), volume de injeção 40 µL. O *scaffold* foi solubilizado em THF (5 mg/mL). Esta solução foi deixada em repouso por 24 h e depois foi analisada. O tempo total de análise por amostra foi 50 minutos.

As massas moleculares (média e média ponderada) e polidispersidade foram calculadas a partir do tempo de retenção medido usando curvas de calibração padrão de poliestireno monodisperso.

3.3.11 Potencial Zeta (PZ)

Os valores do potencial zeta e pH dos *scaffolds* foram obtidos usando equipamento de Particle Metrix (Stabino, GmbH). A carga superficial é caracterizada por meio da medida do potencial zeta. O experimento mediu e registrou os valores de pH e potencial zeta por 3 h. Para análise foi pesado 50 mg e adicionado 10 mL de água Milli-Q®.

O método utilizado para medição do potencial zeta consiste na rápida oscilação da suspensão por meio do movimento de um pistão, resultando em um cisalhamento periódico levando a uma polarização iônica no espaço entre o pistão e o cilindro de medição. A tensão de polarização iônica é proporcional ao potencial zeta, que é uma medida realizada a fim de

analisar o comportamento das partículas do material em um líquido de forma a determinar a magnitude da repulsão ou atração eletrostática.

3.4 CULTURA CELULAR

A amostra de células osteoblásticas humanas (MG63) foi obtida da Associação Técnico-Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, Brasil). As células foram cultivadas em frascos de cultura celular de 75 cm² (Sarstedt®, Numbrecht, Alemanha) com meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Cultilab, São Paulo, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, São Paulo, Brasil) e gentamicina (10 mg/mL) (Gibco™, São Paulo, Brasil). Os frascos foram mantidos em incubadora à temperatura de 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ até a confluência celular, caracterizada pela ocupação de mais de 80 % do frasco. Durante esse período, o meio de cultura foi totalmente substituído a cada 48 horas e o desenvolvimento celular foi avaliado em microscópio óptico (modelo Axioskop 40, Carl Zeiss, Alemanha). Após a confluência celular, o meio de cultura foi descartado e lavado com PBS (Gibco-Life Technologies). Posteriormente, adicionou-se tripsina a 0,25 % (Gibco-Life Technologies) para separar as células do frasco. O conteúdo foi então transferido para um tubo Falcon e centrifugado a 3.000 rpm por 5 minutos a uma temperatura de 25 °C (centrífuga Labnet – HERMLE Z 300K, NJ, EUA). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspenso em novo meio de cultura (DMEM) e depositado em novo frasco de cultura celular.

Após subcultura e expansão celular, foi realizado o plaqueamento celular, sendo necessária a repetição do procedimento de formação de *pellets* descrito acima. Porém, após a formação do *pellet*, as células foram quantificadas manualmente utilizando uma câmara de Neubauer (hemocitômetro) (Prolab, São Paulo, Brasil) e plaqueadas em placas de 96 poços (Kasvi®, Paraná, Brasil) a uma densidade celular de 10.000 células/poço e 200 µL de meio de cultura para teste de MTT e proteína total. Para o teste de nódulos de mineralização foi utilizada uma densidade de 20.000 células/poço. Todos os testes foram realizados seguindo a norma ISO 10993 – Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos – Parte 5 – Testes para in Vitro [35], com três repetições de experimentos n=5 para cada biomaterial testado.

Quatro grupos foram delineados. No grupo controle, as células MG63 foram plaqueadas nos poços da placa. No grupo hidroxiapatita (HA), as células MG63 foram plaqueadas em poços contendo HA comercial (referência 16030 Bioinnovation Biomedical Madrid, Espanha lote 073398). No grupo andaime, as células foram plaqueadas em poços contendo o andaime

PDLLA/20BG, e no grupo controle negativo, as células foram plaqueadas em poços contendo anéis de látex.

3.5 TESTES *IN VITRO*

O teste MTT foi realizado para medir a atividade metabólica celular. Após três dias, o meio de cultura de cada poço foi removido e foram adicionados 200 µL de solução MTT 0,05% de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Sigma Aldrich Chemical, St Louis, EUA).) foi adicionado. As células foram então incubadas durante 4 horas numa atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Posteriormente, a solução foi removida e foram adicionados 200 µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO, LGC Biotechnology). As placas foram mantidas em agitador de placas por 5 minutos. Em seguida, 100 µL de cada poço foram transferidos em duplicata para uma nova placa de 96 poços, e a absorbância foi então medida a 570 nm em um espectrofotômetro (Biotek Instruments, EL808IU, Winooski, EUA).

Para o teste de conteúdo de proteína total após 10 dias, o meio de cultura de cada poço foi removido. Os poços foram lavados com PBS. Em seguida, foram adicionados 200 µL de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma Aldrich Chemical, St Louis, EUA). Para proteína total, 100 µL da solução de cada poço + 100 µL da solução Lowry (Sigma Aldrich Chemical, St Louis, EUA) foram transferidos para tubos de ensaio. Um tubo sem lisado celular, com água destilada, serviu como branco da reação. Em seguida, foram adicionados 50 µL de Folin (Sigma Aldrich Chemical, St Louis, EUA) e, após 30 minutos, 100 µL foram transferidos para uma nova placa de 96 poços, e a absorbância foi então medida a 680 nm em espectrofotômetro (Biotek Instruments, EL808IU, Winooski, EUA).

A formação de nódulos de mineralização foi avaliada após 12 dias de cultivo através da coloração com Alizarina Red S 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Brasil), pH 4,2. A quantificação das formações mineralizadas foi realizada conforme método descrito na literatura [16]. Em cada um dos poços foi adicionado ácido acético a 10% e incubado em temperatura ambiente, com agitação, por 30 minutos. Toda a solução foi transferida para tubos de microcentrífuga e agitada em vórtice (Vortex QL – 901) por 30 segundos. Os microtubos foram colocados em banho-maria (Banho Metabólico Dubnoff – MA095/CF) e aquecidos por 10 minutos a 87,5 °C, depois transferidos para uma geladeira e congelados por 5 minutos. Posteriormente, foram centrifugados (Centrífuga Labnet – HERMLE Z 300K) por 20 minutos, e 100 µL dos sobrenadantes foram transferidos para uma placa de 96 poços. Em cada poço foram adicionados

40 μL de hidróxido de amônio a 10% para neutralização do ácido e a absorbância foi então medida a 405 nm em espectrofotômetro (Micronal AJX 1900).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS VIDROS BIOATIVOS BG-58S

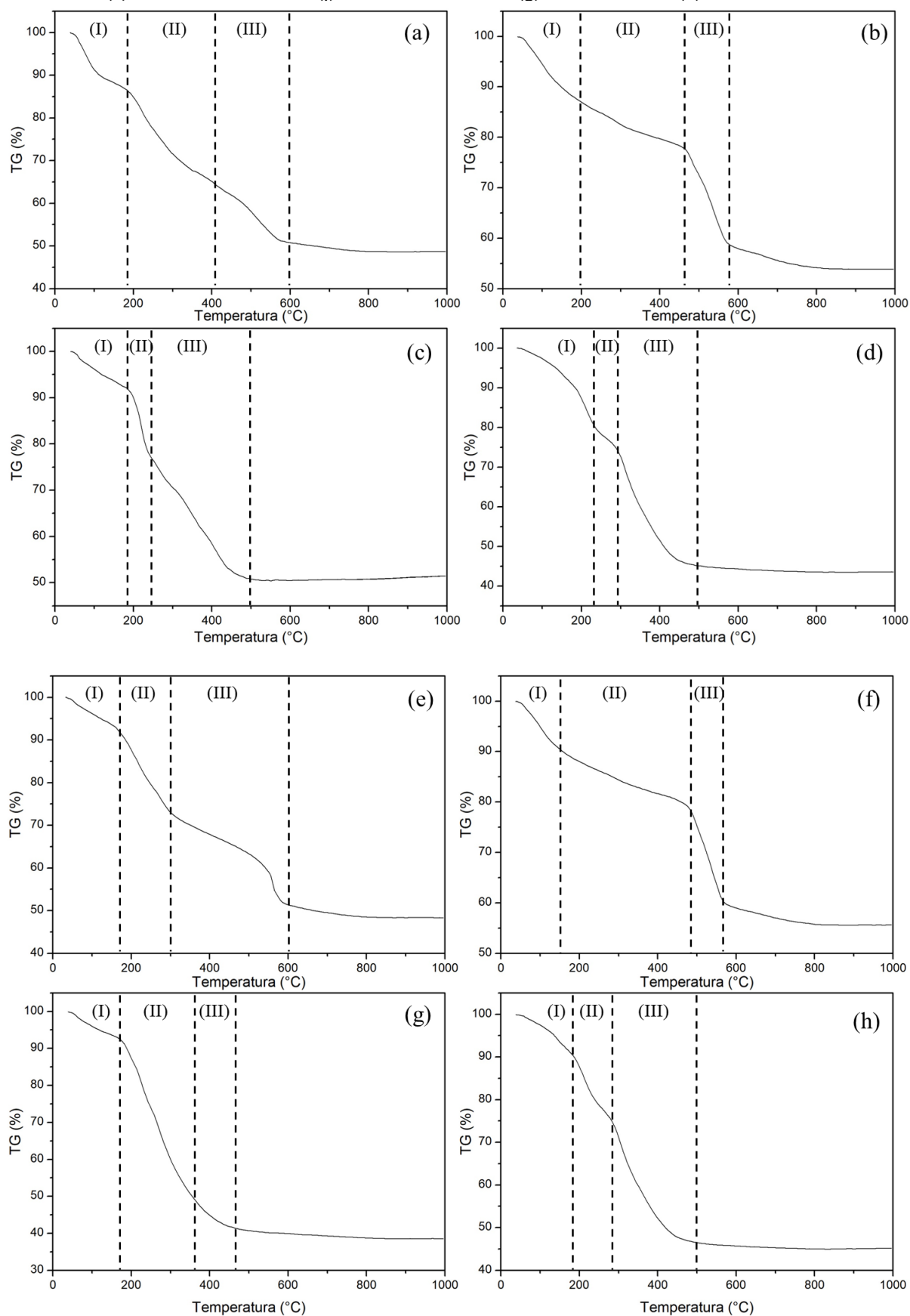
As amostras de pós de vidro bioativo foram caracterizadas usando análises para avaliar o efeito do precursor, adição do solvente e do surfactante em propriedades físicas como, estrutura cristalina e morfologia.

4.1.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A temperatura de calcinação é importante para a estrutura e composição final do vidro bioativo, assim análises de TGA foram realizadas para determinar a temperatura do tratamento térmico. A fim de garantir a eliminação total de resíduos orgânicos e nitratos, bem como a consolidação da estrutura vítrea e a difusão de íons de cálcio dentro da rede de sílica, a literatura indica temperaturas na ordem de 600 – 650 °C [36].

A Figura 8 apresenta os resultados TGA de pós BG-58S secos.

Figura 8 – Análise termogravimétrica do BG-58S: (a) TEP+EtOH, (b) AF+EtOH, (c) TEP, (d) AF, (e) TEP+EtOH+F-127, (f) AF+EtOH+F-127, (g) TEP+F-127 e (h) AF+F-127.

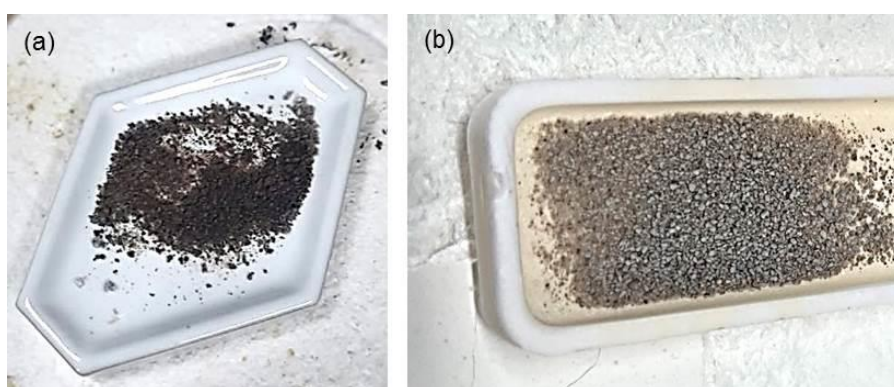


A partir da curva TGA, a variação de massa pode ser dividida em três regiões: a primeira variação de massa é devido a evaporação de água e etanol, o segundo processo, se refere ao pico da oxidação da parcela orgânica (grupo alcóxido) e com a decomposição de pluronic e o último associada aos precursores inorgânicos.

Na tabela 2 são apresentadas as temperaturas de calcinação empregada indicando a combustão total de resíduos orgânicos da síntese e nitratos bem como a consolidação da estrutura vítrea. Em temperaturas mais baixas do que as usadas neste trabalho ainda é observado bandas de FTIR relativas à presença de nitrato. A calcinação deve garantir a ausência de nitrato visto a sua toxicidade para uso do BG como biomaterial [37].

Outro fato relacionado a calcinação das composições é que as amostras com agente porogênico ficaram muito escuras sugerindo que a eliminação de compostos orgânicos não foi completa, necessitando de temperaturas mais altas de queima, entretanto isso levaria a cristalização das composições. Dessa forma, foi realizado um teste de calcinação a 600 °C usando taxa de aquecimento de 1 °C/min com fluxo de ar sintético soprado para o interior do forno, visando a remoção completa dos compostos orgânicos. Como resultado observou-se um clareamento da amostra calcinada com menor taxa de aquecimento e ventilação forçada, conforme pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 – Composição AF+F-127 após calcinação a 600 °C por 24 horas usando (a) taxa de aquecimento de 3 °C/min e (b) taxa de aquecimento de 1 °C/min, com fluxo de ar sintético soprado para o interior do forno.



Fonte: o autor (2023)

As amostras queimadas nas duas condições foram caracterizadas por BET, para verificar o efeito da condição de calcinação sobre a estrutura porosa. Os dados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Área superficial, volume e tamanho de poros por BET da amostra AF+F-127 calcinada em diferentes condições.

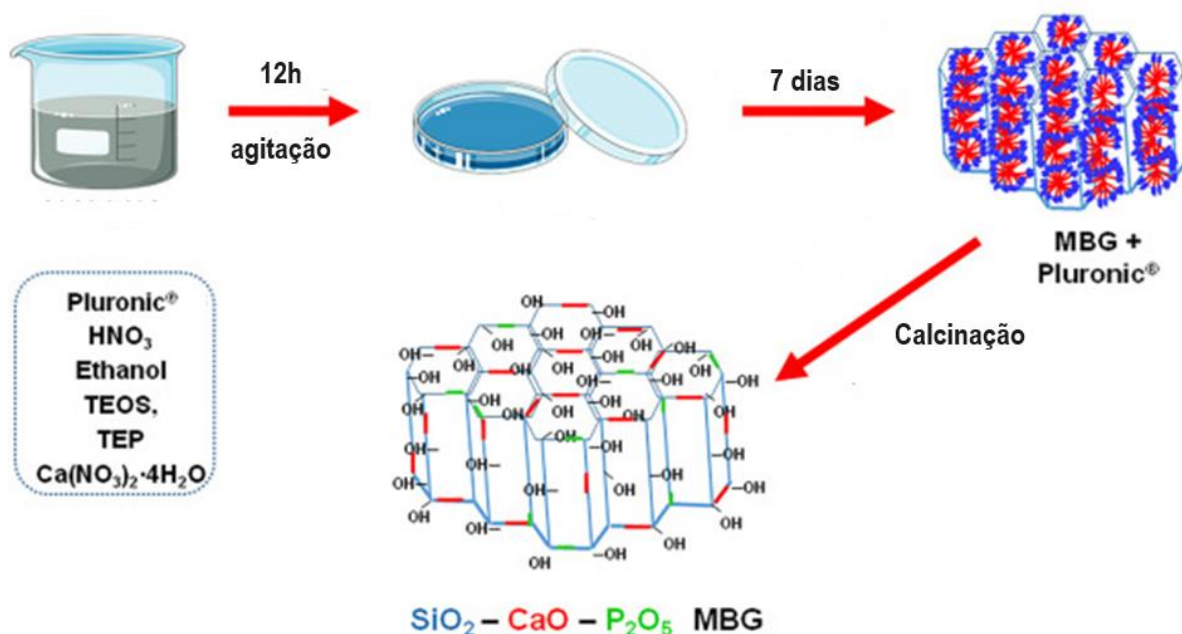
AF+F-127	Diâmetro médio do poro (nm)	Área superficial (m²/g)
3 °C/min	13,195 ± 0,132	19,798 ± 0,198
1 °C/min c/ ar sintético	11,411 ± 0,087	46,408 ± 0,262

Fonte: o autor (2023)

Os valores obtidos confirmam que a alteração no processo de calcinação foi benéfica, proporcionando um aumento de 133 % na área superficial, acompanhado de uma redução do diâmetro médio de poro de cerca de 14 %. Confirmando mais uma vez que os novos parâmetros de queima melhoram a condição final do vidro bioativo mesoporoso.

Como a síntese de MBGs é um sistema bastante complexo, outra estratégia é garantir uma solução homogênea de surfactante, sílica (TEOS) e outras reagentes iônicos (de sais solúveis atuando como precursores para óxidos modificadores no vidro) misturado em solvente álcool/água. A evaporação do etanol induz a deposição de um filme formado por um surfactante não volátil e espécies sílica/iônicas em água. Então, a concentração do surfactante aumenta progressivamente, garantindo a formação da CMC (concentração micelar crítica) impulsionando assim o processo de automontagem do surfactante, ou seja, propiciando a formação das micelas de forma organizada [43]. Esse processo é denominado EISA (*Evaporation-Induced Self-Assembly*) foi representado na Figura 10.

Figura 10 – Representação esquemática do método de síntese de automontagem induzida por evaporação (EISA) usado para obter MBGs.

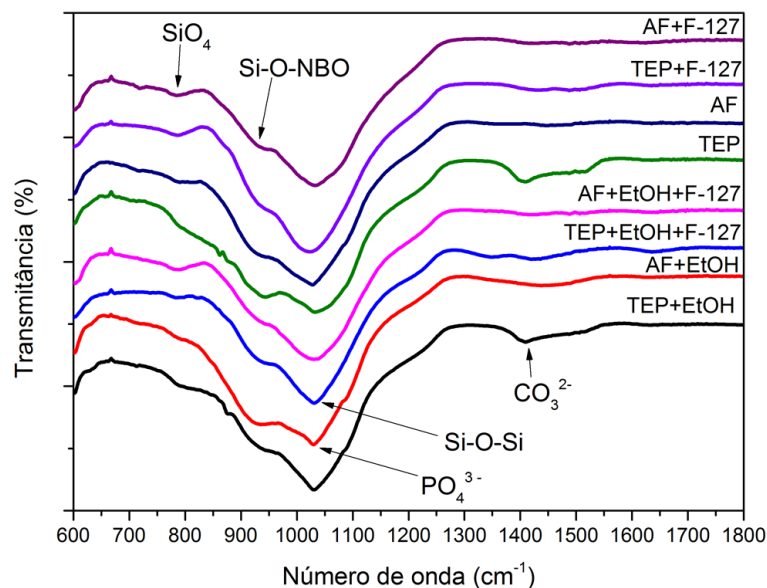


Fonte: Adaptado de [43]

4.1.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR de vidros bioativos sintetizados pela rota sol-gel foram feitos após a etapa de calcinação. A Figura 11 apresenta os espectros de FTIR obtidos pela técnica de UATR, onde se observa a presença de grupos Si-O-Si, Si-O-NBO e fosfato (P-O) nas amostras calcinadas, típicos de vidros bioativos.

Figura 11 – Espectros de FTIR de pós de BG 58S sintetizado em diferentes condições.



Fonte: o autor (2023)

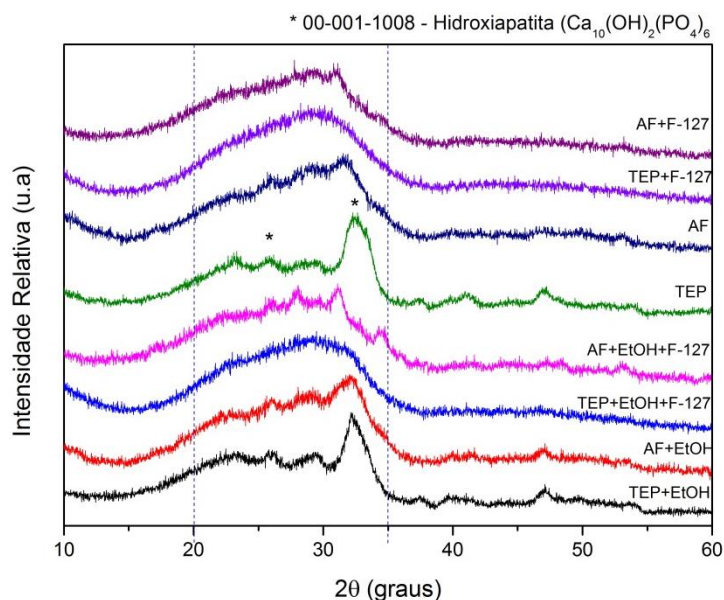
Vidros de sílica bioativos possuem em sua estrutura átomos que agem como modificadores de rede, rompendo ligações Si–O–Si e levando à formação de espécies de oxigênio não ligados, NBO, *non-bridging oxygen* (Si–O–NBO), reduzindo a continuidade da rede vítrea, esta banda é a evidência da presença de Si–O–Ca [8,18]. Após o tratamento térmico as amostras apresentam uma pequena banda na posição 700-850 cm^{-1} correspondente ao SiO_4 e banda a 950 cm^{-1} para as ligações NBO, que contribuem para uma maior bioatividade. A banda mais intensa no espectro (1000-1040 cm^{-1}) corresponde à vibração simétrica da ligação de oxigênio com o silício (Si–O–Si) [40]. As amostras também apresentam uma banda de sobreposição de PO_4^{3-} em 1030 cm^{-1} . Bandas características de CO_3^{2-} nos números de onda de 872 e 1420 cm^{-1} ocorrem devido à reatividade dos vidros derivados de gel com o CO_2 da atmosfera e oriundos da decomposição de componentes orgânicos [41].

4.1.3 Difração de Raios X (DRX)

A Figura 12 apresenta os difratogramas de raios X para as diferentes composições, após tratamento térmico. Os padrões de difração de todas as amostras exibiram um perfil amorfo com um halo entre 20° e 35°. Também foram observados picos alargados e de baixa intensidade em torno de 26° e 32° correspondendo a uma fase de hidroxiapatita (00-001-1008). A formação de diferentes fases cristalinas diminui a bioatividade do BG, pois à medida que parte do fosfato é cristalizada em apatita, a liberação de fósforo para a formação da camada de hidroxiapatita

carbonatada diminuir, podendo transformar um vidro bioativo em um material bioinerte [34, 42, 43].

Figura 12 – Difratomogramas DRX de pós de BG 58S sintetizado em diferentes condições



Fonte: o autor (2023)

4.1.4 Análise de área superficial por BET

Os dados da área superficial, volume e tamanho dos poros são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Volume, diâmetro médio de poros e área superficial de pós de BG 58S

	Volume poro (cm ³ /g)	Diâmetro médio do poro (nm)	Área superficial (m ² /g)
TEP + EtOH	0,196 ± 0,002	4,717 ± 0,047	167,083 ± 1,186
AF + EtOH	0,138 ± 0,001	15,582 ± 0,156	35,315 ± 0,110
TEP+EtOH+F-127	0,122 ± 0,001	10,285 ± 0,103	47,435 ± 0,474
AF+EtOH+F-127	0,184 ± 0,002	3,304 ± 0,033	223,254 ± 2,233
TEP	0,226 ± 0,002	6,992 ± 0,069	118,156 ± 2,802
AF	0,149 ± 0,013	17,885 ± 1,126	33,588 ± 5,932
TEP+F-127	0,291 ± 0,003	16,335 ± 0,163	71,208 ± 0,712
AF+F-127	0,133 ± 0,002	11,411 ± 0,087	46,408 ± 0,262

Fonte: o autor (2023)

Os pós obtidos pela rota sol-gel apresentam diâmetros de poros que variam de 2 a 50 nm [44]. Esses tamanhos podem ser ajustados durante o processo, controlando-se o pH do catalisador, a composição nominal e a temperatura final [42]. Conforme pode ser observado pelos resultados apresentados na Tabela 5, todas as amostras apresentaram diâmetro de poros dentro do esperado para um vidro bioativo produzido pelo método sol-gel.

Com relação ao volume dos poros, essa característica porosa é resultante do processo de formação do gel, no qual os precursores alcóxidos reagem com água, e as espécies hidrolisadas se combinam em uma reação de condensação que forma uma rede tridimensional. Os solventes do processo são retidos na rede e, após a secagem, dão origem a uma estrutura porosa. A depender das condições de processamento, o tamanho dos poros pode variar, podendo estarem ou não interconectados [45].

Os valores obtidos de área superficial confirmam a existência de porosidade interna, formada durante o processo de calcinação. Entretanto, vidros produzidos por meio do processo sol-gel podem alcançar valores de área superficial de cerca de 200 m²/g [45, 46]. O estado aglomerado das partículas é comumente observado em processos de síntese por via úmida em que valores mais elevados de área superficial são atingidos e, portanto, isso não justifica os baixos valores de área superficial obtidos no presente trabalho. Assim, os baixos valores de área podem estar relacionados à existência de porosidade fechada nas partículas, ou mesmo ao colapso da estrutura porosa durante a calcinação, devido a um início de um processo de sinterização. Destaca-se ainda que a adição do agente porogênico na síntese, visando à formação de micelas capazes de aumentar o volume de poros, não foi efetiva dentro das condições analisadas. Por conta desses fatores as amostras contendo pluronic não foram utilizadas para as demais análises.

4.1.5 Espectroscopia Raman

Com base nos resultados obtidos nas análises anteriores, foi selecionada para a continuidade do estudo a amostra produzida com ácido fosfórico AF (Figura 13), tendo em vista que apresentou estado amorfo, caracterizado pela banda de difração larga indicando a natureza vítrea desse material e o espectro de FTIR que evidenciou há presença de ligações NBO que favorecem o processo bioativo desse BG.

Figura 13 – Pó de BG 58S com AF.

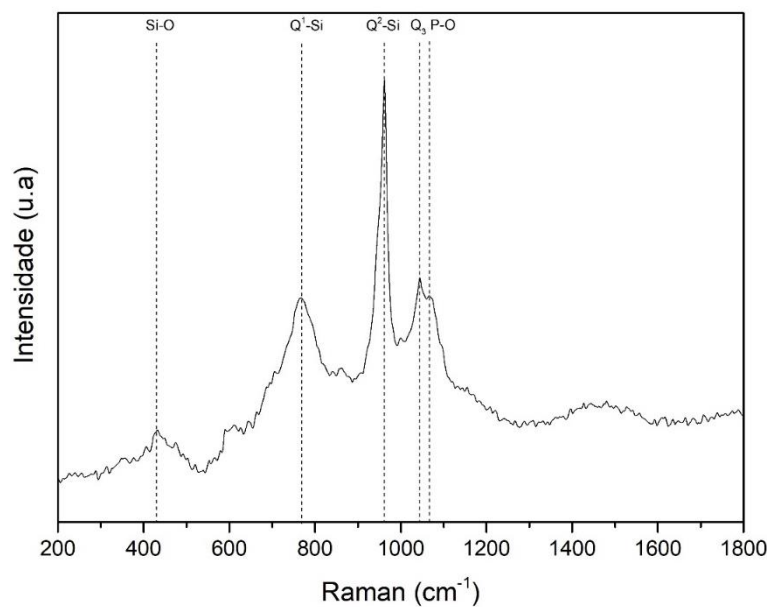


Fonte: o autor (2023)

A formação oxigênio não ligados, NBO, aumenta conforme ocorre a descontinuidade dos tetraedros de silício na estrutura vítrea. Essa descontinuidade resulta em unidades estruturais chamadas de Q^n , onde "n" representa o número de oxigênios ligantes nos vértices do tetraedro. Uma unidade Q^4 é caracterizada por um tetraedro completamente conectado à rede por meio de quatro oxigênios, enquanto uma unidade Q_0 refere-se a um tetraedro isolado sem oxigênios. Dessa forma, Q^0 , Q^1 , Q^2 , Q^3 e Q^4 , estão associadas às unidades do tetraedro de SiO_4 [28].

A banda centrada em torno de 440 cm^{-1} , foi atribuída a vibrações de flexão simétricas do Si–O–Si e/ou à deformação O–Si–O dos grupos de SiO_4 acoplados. Bandas de 750 a 800 cm^{-1} são relacionadas com a deformação angular de Si–O–Si. Em 960 cm^{-1} , pode ser associada a unidades Q^2 , onde ocorre uma ligação Si–O–NBO. A intensidade significativa dessa banda em todas as amostras sugere a formação de uma estrutura desordenada, predominantemente composta por NBO. Essa característica é típica de vidros bioativos amorfos que contêm modificadores de rede. A banda em 1050 cm^{-1} é uma manifestação das espécies Q^3 [47]. A Figura 14 apresenta o espectro Raman para a amostra AF.

Figura 14 – Espectro Raman de pó BG-58S com AF.

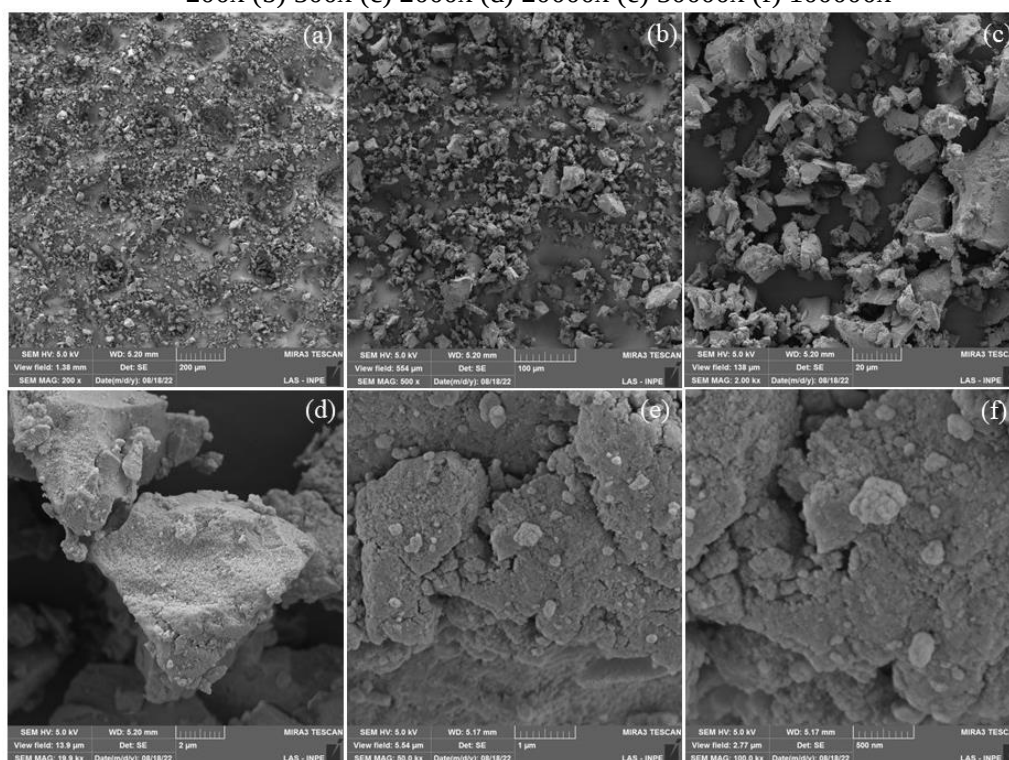


Fonte: o autor (2023)

4.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução (MEV-FEG)

Com base na Figura 15 as micrografias eletrônicas de varredura de alta resolução (MEV-FEG) revelaram que as partículas apresentam morfologia irregular e estão aglomeradas, fato este resultante das forças de atração de Van der Waals. A aglomeração é evidente na síntese de pós por via úmida [45, 46].

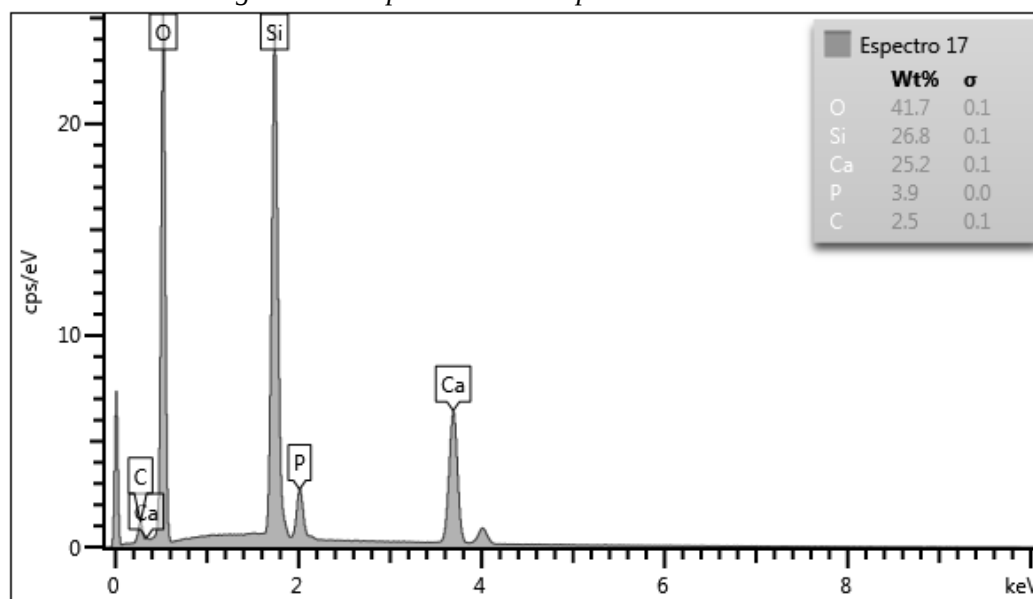
Figura 15 – Micrografia de MEV-FEG da superfície dos pós BG-58S com AF com aumento de (a) 200x (b) 500x (c) 2000x (d) 20000x (e) 50000x (f) 100000x



Fonte: o autor (2023)

Para confirmar a composição química desta estrutura, é apresentado na Figura 16, o espectro da análise química realizada por meio da energia dispersiva de raios-X (EDS). No espectro é apresentada a composição química do BG-58S com AF, onde pode ser observada a presença de Si (silício), O (oxigênio), Ca (cálcio) e P (fósforo), sendo os principais componentes do vidro bioativo.

Figura 16 – Espectros EDS de pó de BG 58S com AF.

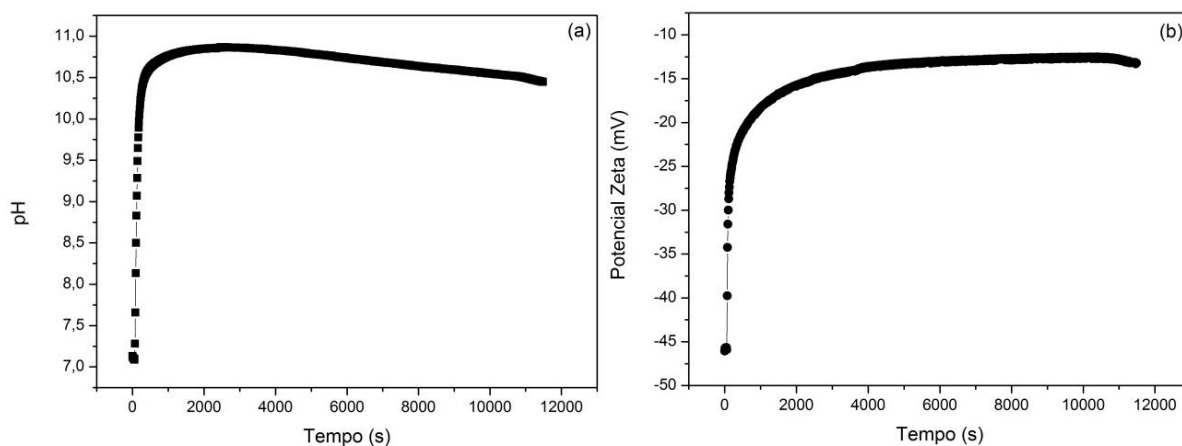


Fonte: o autor (2023)

4.1.7 Potencial Zeta (PZ)

A Figura 17 apresenta a variação da carga superficial do pó de BG 58S com AF medida pelo PZ. Variações do potencial foram monitorados ao mesmo tempo em que as medições de pH por 3 horas.

Figura 17 – Variação de (a) pH (b) Potencial zeta em função do tempo para pó de BG 58S com AF.



Fonte: o autor (2023)

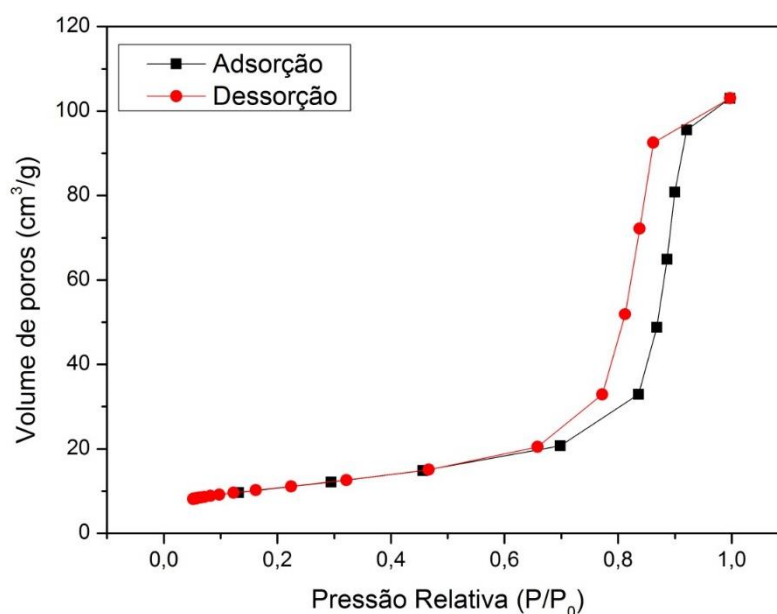
O resultado apresentado na Figura 14 mostra um aumento do pH e do PZ. Inicialmente, ocorre uma rápida troca de prótons (H_3O^+) da solução com os cátions presentes no BG, levando à formação de ligações de silanol ($SiOH$) na superfície. Este processo é acompanhado pela

quebra da ligação Si–O–Si e com formação de grupos silanol superficiais devido a um aumento no pH. Em sequência os grupos silanóis sofrem condensação e polimerização, resultando na formação de uma camada superficial “rica” em SiO₂. Por fim origina-se uma camada amorfa de fosfato de cálcio, facilitada pela migração de íons Ca²⁺ e PO₄³⁻ tanto do material quanto do meio circundante [48]. Conforme sugerido na literatura os valores negativos do PZ podem ter um efeito significativo tanto na fixação quanto na proliferação de células ósseas [49].

4.1.8 Propriedades texturais

Para caracterizar as propriedades texturais do pó BG 58S com AF, foram realizadas análises de adsorção de N₂. A Figura 18 apresenta as isotermas de adsorção e dessorção.

Figura 18 – Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio do pó de BG 58S com AF.



Fonte: o autor (2023)

Com base na Figura 18 é possível observar que as curvas com ciclo de histerese formam isotermas do tipo IV conforme definido pela IUPAC, características de materiais mesoporosos [56]. As isotermas estão na faixa do mesoporo (2 – 50 nm), o que é característico de poros cilíndricos abertos em ambas as extremidades.

A área superficial, o volume de poros e o diâmetro médio de poros estão presentes na Tabela 6. A área superficial foi determinada pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET), enquanto o volume e tamanho de poros foram calculados pelo método Barrett-Joyner-Halenda (BJH) aplicado às curvas de adsorção e dessorção.

Tabela 6 – Volume, diâmetro médio de poros e área superficial de pó BG-58S com AF.

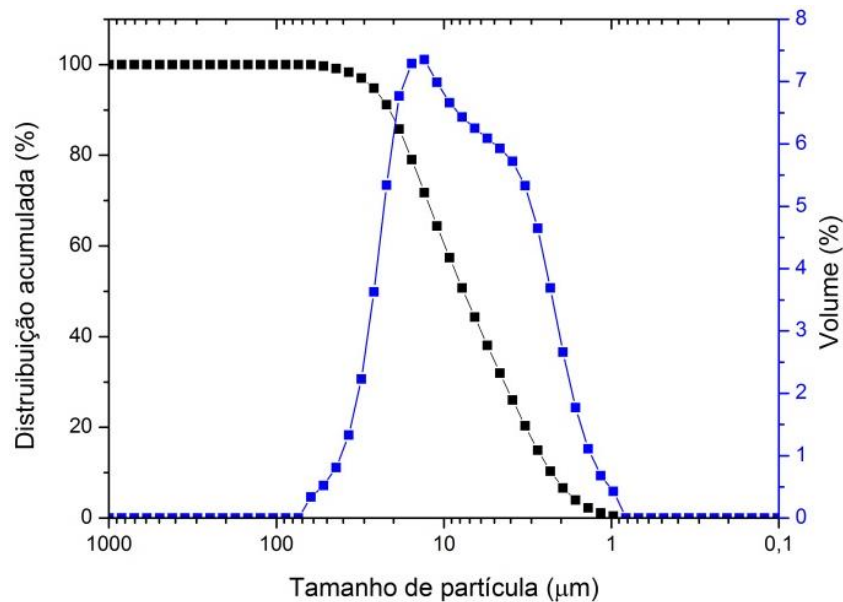
Volume poro (cm ³ /g)	Diâmetro médio do poro (nm)	Área superficial (m ² /g)
0,149 ± 0,013	17,885 ± 1,126	33,588 ± 5,932

Fonte: o autor (2023)

4.1.9 Distribuição de tamanho de partícula

O resultado quanto a distribuição de tamanho de partículas do pó de BG-58S com AF obtido é apresentada na Figura 19.

Figura 19 – Distribuição do tamanho das partículas de BG-58S com AF após processo de moagem.



Fonte: o autor (2023)

Analisando-se a Figura 17, pode-se perceber que o vidro bioativo obtido apresenta diâmetro médio $d_{50} \approx 8 \mu\text{m}$. O tamanho das partículas do material inicial exerce um impacto significativo na configuração dos poros dos *scaffolds* produzidos.

Com base na literatura, é conhecido que o tamanho de partícula do material possui grande influência sobre a porosidade dos *scaffolds*, de modo que a presença de partículas grandes ou aglomeradas possui efeito negativo nas propriedades finais do material produzido [51].

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS DE PDLA E PDLA/BG

Foram produzidos *scaffolds* de PDLA e scaffolds híbridos de PDLA/BG preparados por separação de fases líquido-líquido termicamente induzida a 30°C, com diferentes: frações mássicas de PDLA (5,5 %) tempos de separação de fases (30, 60 e 120 min) e teores de vidro bioativo (0, 15, 20, 30 e 50%).

A avaliação dos *scaffolds* produzidos com PLLA foi feita a nível macroscópico na qual foi possível observar que o tempo de 60 e 120 min e teores de vidro bioativo de 30 e 50 %, formam estruturas heterogêneas, nas quais a fase “rica” em polímero sedimenta e impede a formação de uma estrutura porosa à medida que vai sedimentando. Assim, a sedimentação também é acelerada pela presença do vidro bioativo.

Como a proporção de vidro bioativo no *scaffold* influencia na resposta celular permitindo a osteoindução foram testadas as composições de 15 % (PDLA/15BG) e 20 % (PDLA/20BG) de BG.

Os *scaffolds* (Figura 20) foram caracterizados usando análises para avaliar a porosidade e interconectividade em propriedades como, morfologia, degradação e teste *in vitro*

Figura 20 – Scaffold produzido com PDLA/BG.



Fonte: o autor (2023)

4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

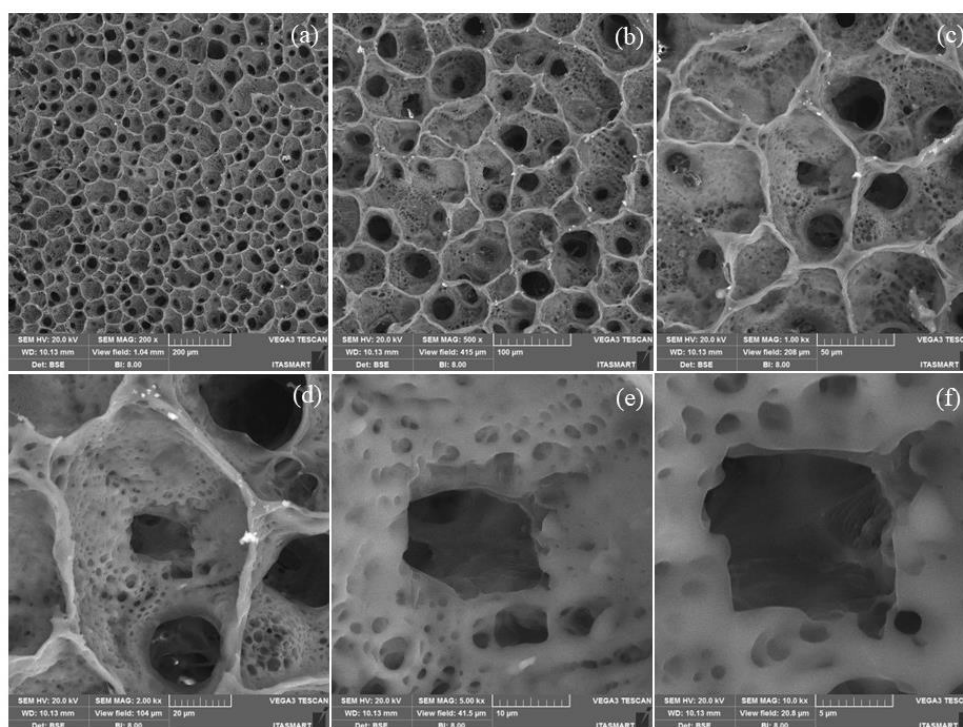
A caracterização morfológica dos *scaffolds* foi realizada por MEV. Por meio das micrografias obtidas, foi observada a presença de porosidade intercomunicante na estrutura produzida. Isso ocorre porque o sistema se separa em domínios, resultando, ao final do processo de separação de fases, em uma estrutura porosa e interconectada. O processo de separação de

fases líquido-líquido por meio do mecanismo de decomposição espinodal tem sido sugerido como uma técnica para a produção de estruturas porosas destinadas a engenharia de tecidos [4].

Tanto o tamanho dos poros e a presença de interconectividade são características necessárias para que haja transporte de nutrientes e oxigênio para as células cultivadas em um suporte estrutural. O tamanho dos poros tem um impacto direto na deposição de tecido e na diferenciação celular.

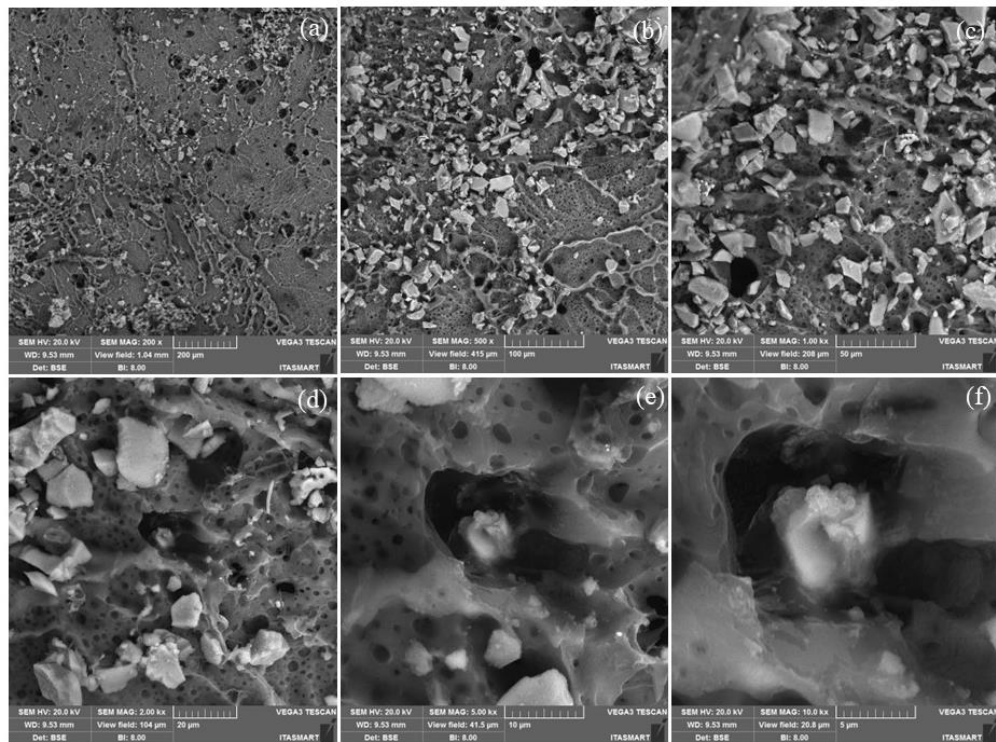
Os *scaffolds* híbridos apresentaram uma morfologia com fase heterogênea, com diferenciação entre as fases PDLA e BG, exibindo uma dispersão das partículas de vidro bioativo em sua estrutura, sendo incorporadas nas paredes dos poros ou posicionadas superficialmente. Isso foi devido ao BG ter mais afinidade com a água em relação ao solvente fazendo com que a sua presença seja majoritariamente superficial, ou seja, quando ocorre o processo da separação de fase o BG permanece na fase aquosa ao invés da orgânica. Consequentemente, os *scaffolds* híbridos apresentam poros com diâmetros menores em comparação com os *scaffolds* de PDLA sem vidro bioativo, conforme evidenciado pelas micrografias nas Figuras 21, 22 e 23. A adição da carga inorgânica reduz o tamanho dos poros devido à ocupação parcial do espaço poroso, além de diminuir a interconectividade da estrutura porosa devido ao aumento gradual da presença do vidro bioativo.

Figura 21 – Micrografias de MEV do scaffold de PDLA com aumento de (a) 200x (b) 500x (c) 1000x (d) 2000x (e) 5000x (f) 10000x.



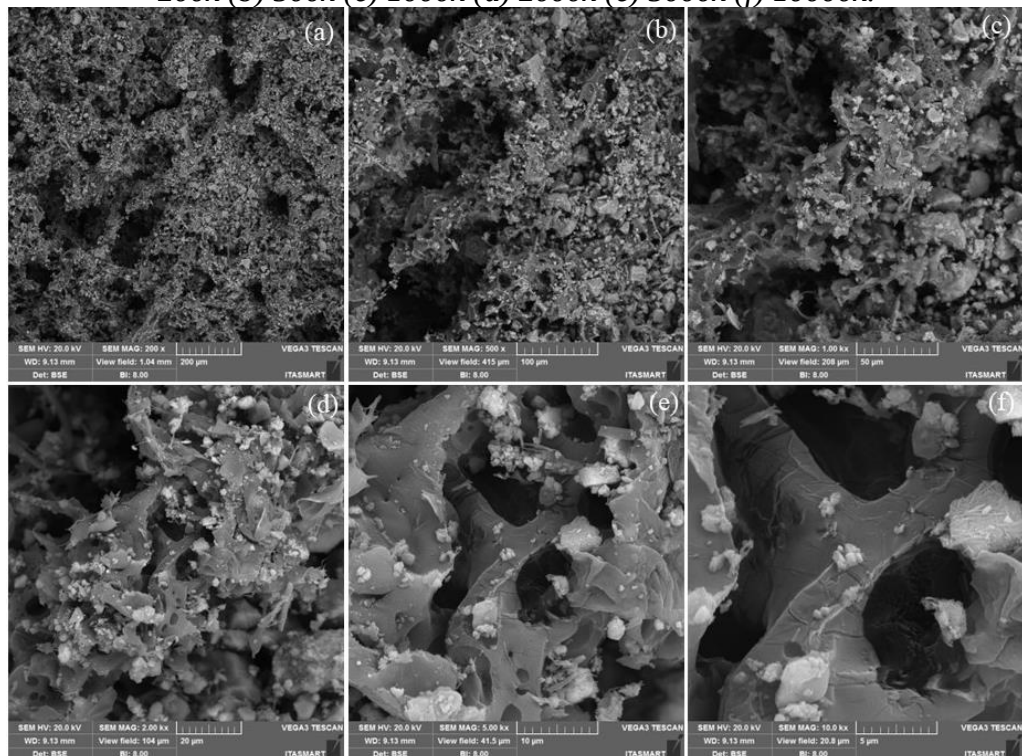
Fonte: o autor (2023)

Figura 22 – Micrografias de MEV do *scaffold* híbrido de PDLLA/15BG com aumento de (a) 200x (b) 500x (c) 1000x (d) 2000x (e) 5000x (f) 10000x



Fonte: o autor (2023)

Figura 23 – Micrografias de MEV do *scaffold* híbrido de PDLLA/20BG com aumento de (a) 200x (b) 500x (c) 1000x (d) 2000x (e) 5000x (f) 10000x.



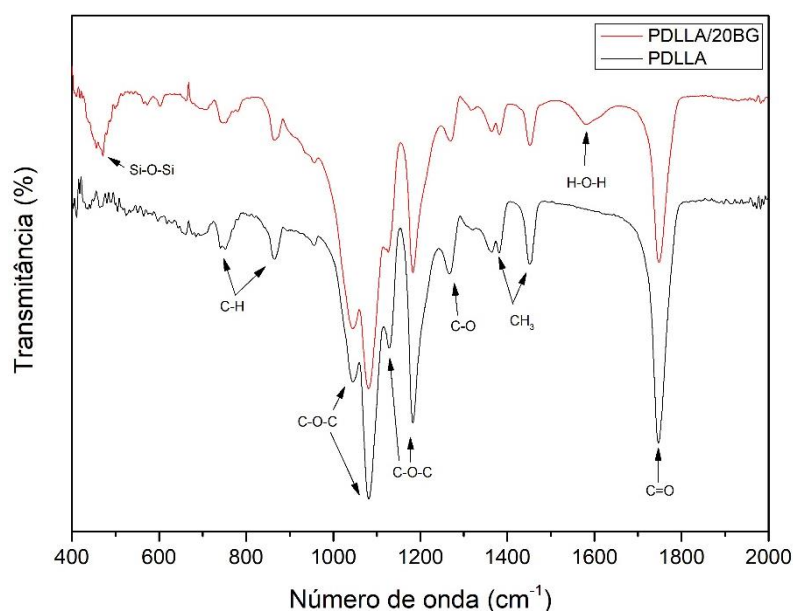
Fonte: o autor (2023)

Com o objetivo de assegurar uma bioatividade adequada, optou-se por utilizar o *scaffold* que contém um teor mais elevado de vidro bioativo (PDLLA/20BG), uma vez que poderá influenciar positivamente a resposta celular e potencialmente favorecer a osteoindução.

4.2.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada a fim de confirmar a presença de BG disperso na matriz polimérica de PDLLA (Figura 42).

Figura 24 – Grupos funcionais presentes na estrutura do *scaffold* PDLLA e PDLLA/20BG pela técnica FTIR.



Fonte: o autor (2024)

As bandas características do PDLLA estão localizadas em 750 e 865 cm^{-1} devido as ligações de C-H. Em 1042, 1081, 1130 e 1184 cm^{-1} (C-O-C), a banda de 1266 cm^{-1} refere-se ao modo de estiramento C-O, na região de 1360 a 1453 cm^{-1} existem bandas atribuídas ao grupo metila, a banda em 1745 cm^{-1} refere-se ao estiramento dos grupos de carbonila (C=O) [52, 53].

Pode-se observar uma banda em 460 cm^{-1} referente às ligações de dobramento de Si-O-Si enquanto em 1550 cm^{-1} é atribuída a água molecular presente no vidro bioativo [54] evidenciando a presença das partículas de BG dispersas na matriz. A incorporação do vidro bioativo não promoveu alterações na estrutura do polímero.

4.2.3 Porosidade

A Tabela 7 apresenta os resultados de densidade, porosidade e área superficial referente a amostras de *scaffolds*, aos quais foram analisados pela técnica de porosimetria de mercúrio.

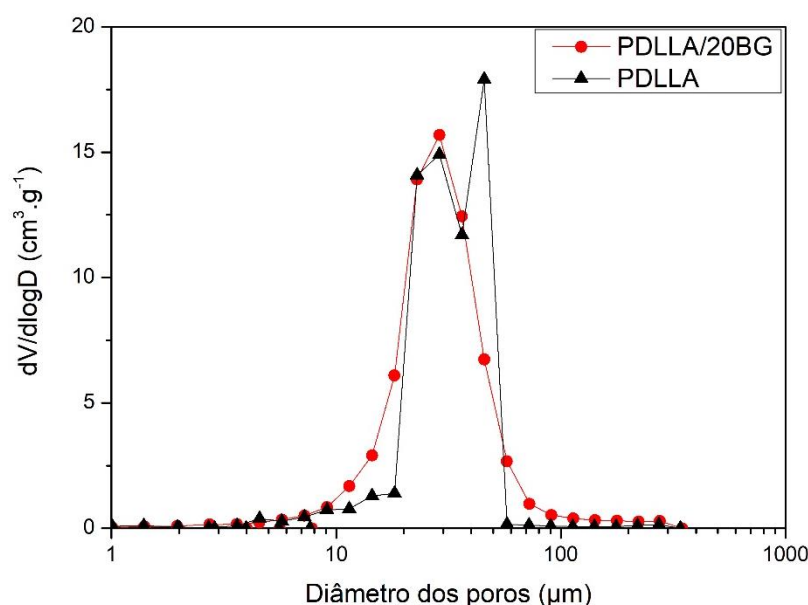
Tabela 7 – Valores de porosidade, densidade e diâmetro médio dos poros dos *scaffolds* obtidos por porosimetria.

Scaffold	Porosidade (%)	Densidade aparente (g/mL)	Diâmetro de poro médio (μm)
PDLLA	$88,2177 \pm 0,0882$	$1,1428 \pm 0,0011$	$34,9524 \pm 0,0349$
PDLLA/20BG	$86,5497 \pm 0,0865$	$0,9481 \pm 0,0009$	$31,5675 \pm 0,0316$

Fonte: o autor (2023)

A Figura 25 mostra a distribuição de poros interconectados. O eixo das ordenadas ($dV/d\log D$) é um diferencial do volume intrudido de mercúrio (V) em cada diâmetro de poro interconectado (D).

Figura 25 – Distribuição de poros interconectados obtida por porosimetria para PDLLA e PDLLA/20BG.



Fonte: o autor (2024)

Os *scaffolds* exibiram a formação de microporos (10–100 μm de diâmetro), como mostrado pelas curvas de distribuição de tamanho de poros na Figura 23. Uma curva bimodal é observada para o *scaffold* PDLLA, enquanto o *scaffold* PDLLA/20BG apresenta uma curva

modal, onde os microporos estão centralizados entre 10 e 100 μm . Segundo a literatura, os scaffolds para BTE devem apresentar macroporosidade interligada (100 a 1000 μm), promovendo a angiogênese. Além disso, a presença de microporosidade desempenha um papel crucial na capacidade osteogênica dessas estruturas [55].

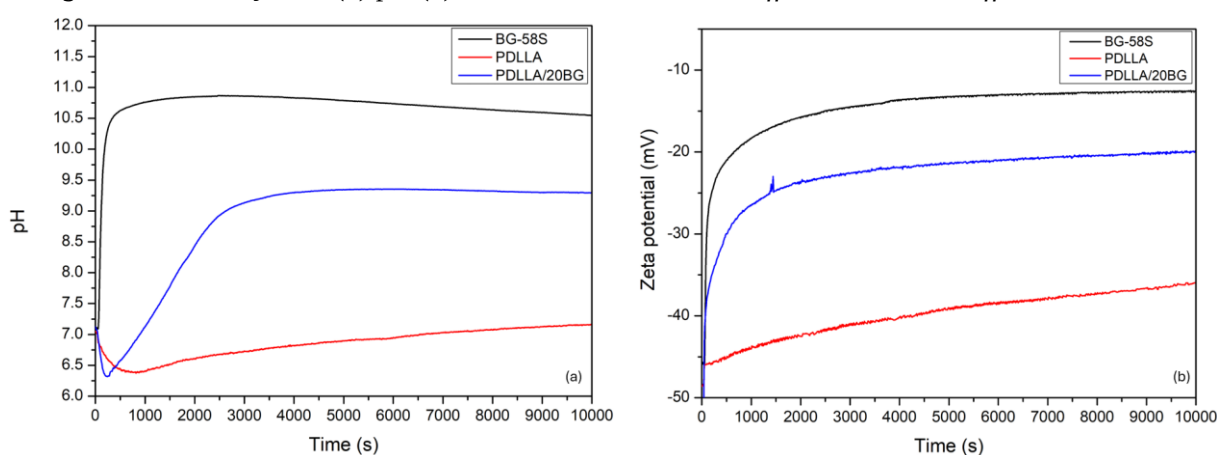
Pode-se observar que a porosidade diminui com a presença de BG-58S incorporado na matriz, levando a uma redução no tamanho dos poros. A porosidade nos *scaffold* diminui à medida que partículas inorgânicas são adicionadas. Isso se deve às partículas que ocupam o espaço poroso, com o tamanho diminuindo à medida que a porcentagem adicionada aumenta [56]. Além disso, de acordo com a literatura, os valores de porosidade dos *scaffold* preparados por TIPS são de aproximadamente 90% [57], e neste trabalho foi alcançado um valor muito próximo.

À medida que a quantidade de BG presente nos *scaffolds* aumenta, observa-se um aumento na massa e consequentemente, na sua densidade.

4.2.4 Potencial Zeta (PZ)

A Figura 26 apresenta uma comparação da variação da carga superficial medida pelo PZ do BG AF, *scaffold* PDLLA e *scaffold* PDLLA/20BG. Variações do potencial foram monitorados ao mesmo tempo em que as medições de pH por 3 horas.

Figura 26 – Variação de (a) pH (b) Potencial zeta do BG, *scaffold* PDLLA e *scaffold* PDLLA/BG.



Fonte: o autor (2023)

As alterações de pH e potencial zeta dos *scaffold* PDLLA e *scaffold* PDLLA/20BG após imersão em água são apresentados Figura 26a e 26b, respectivamente, comparado as curvas do BG. É possível observar que a incorporação do BG à matriz de PDLLA resulta em efeito

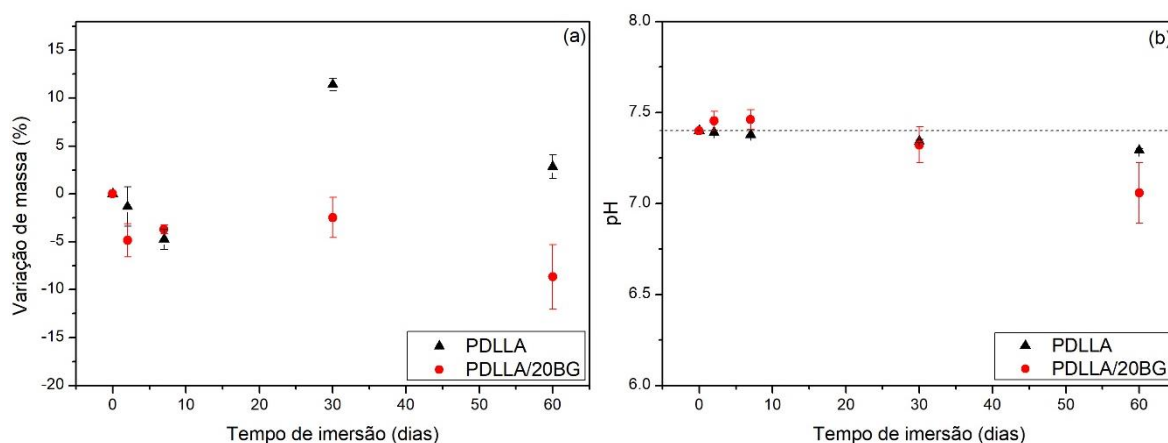
intermediário ao observado quando os materiais são expostos a água isoladamente. A liberação de íons alcalinos a partir da degradação do BG leva a um aumento no pH (superior a 10) e redução no potencial zeta o que pode resultar em uma citotoxicidade. Por outro lado, a degradação do polímero acarreta a diminuição do pH devido a liberação de subprodutos da degradação podendo originar um processo inflamatório [33]. Assim, no *scaffold* híbrido foi observado um menor aumento do pH estabilizando o valor da solução em torno de (~ 9).

4.2.5 Degradação em solução tampão de fosfato (PBS)

Como a biodegradabilidade é uma propriedade essencial no estudo dos *scaffolds*, a avaliação em função da variação de massa, pH do meio, massa molecular e FTIR.

A Figura 27 apresenta a variação de massa (WL) dos *scaffolds* de PDLLA e PDLLA/20BG após imersão em PBS após diferentes períodos. Os resultados de WL foram expressos com média e desvio padrão (DP) para $n = 6$. O *scaffold* de PDLLA/20BG apresentou uma degradação acelerada após 30 dias. Por outro lado, o *scaffold* de PDLLA apresenta uma taxa de degradação menor.

Figura 27 – (a) Variação de massa e (b) Medição de pH do PDLLA e do PDLLA/20BG imerso em PBS por 2, 7, 30 e 60 dias.



Fonte: o autor (2023)

O PDLLA degrada-se principalmente por hidrólise das ligações éster. Em geral, a taxa de degradação pode ser ajustada alterando a composição, grau de cristalinidade, porosidade, massa molecular, hidrofiliicidade e adição de compostos inorgânicos. Assim, a presença de vidro bioativo altera a cinética de degradação do polímero [11].

O perfil de degradação do *scaffold* de PDLLA ocorre em função da hidrólise química, regida pela acessibilidade da água às ligações ésteres da sua cadeia principal, no qual os grupos carboxílicos e hidroxila resultantes da hidrólise geram um microambiente ácido dentro da matriz polimérica, resultando em um aumento da massa entre os dias 7 e 30. Do dia 30 ao 60 observa-se uma perda de massa devido a degradação com a liberação de oligômeros [11].

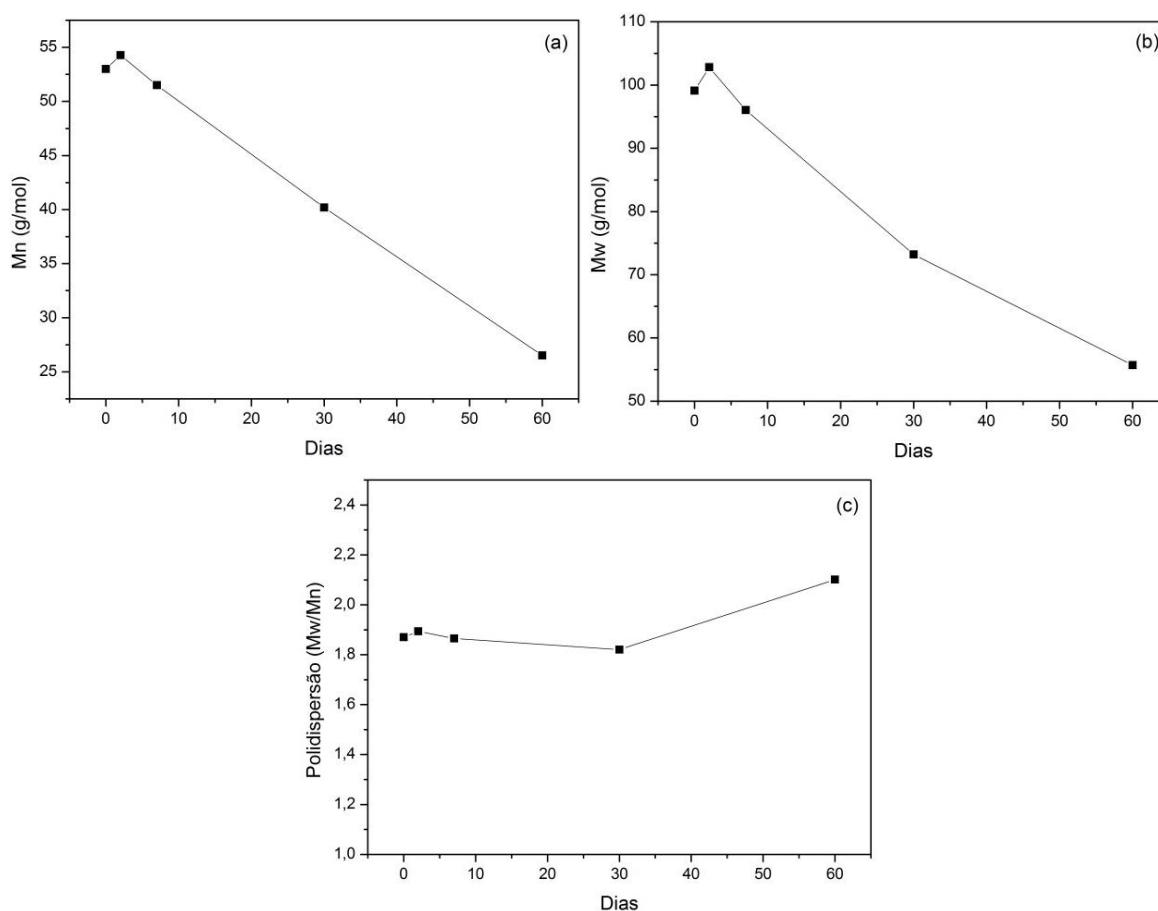
O *scaffold* de PDLLA/20BG no intervalo de 2 dias apresenta perda de massa. Entre 2 e 7 dias, ocorreu a formação de uma camada de apatita justificando o ganho de massa. No período de 7 a 30 dias a perda de massa permaneceu praticamente estável e a partir desse período o processo de degradação intensificou-se. Vale ressaltar que a taxa de degradação do PDLLA na presença de BG-58S pode ser acelerada devido o ambiente alcalino resultante das reações do vidro bioativo com o fluido circundante [58, 59].

A degradação dos *scaffolds* de PDLLA em PBS está associada à liberação de subprodutos, oriundos da hidrólise das ligações dos ésteres que podem alterar o pH do meio. O PDLLA se degrada liberando oligômeros, que diminuem o pH meio como apresentado na Figura 27. A degradação acontece de maneira desigual, sendo mais acelerada no interior da estrutura e mais lenta na superfície. Isso se deve à concentração dos grupos carboxílicos e à diminuição do pH no interior do material. Esta quebra dos grupos funcionais, com posterior liberação para o meio, torna a solução mais ácida. Por outro lado, os vidros bioativos se degradam liberando íons Ca^{2+} , que proporcionam o aumento do pH. Essas alterações de pH do meio têm um efeito significativo na viabilidade celular. Assim, é importante avaliar o pH do meio durante a degradação do biomaterial.

Dessa forma, a adição de vidro bioativo na matriz polimérica promove um efeito tampão de pH na superfície do polímero, modificando a degradação ácida do polímero e as suas propriedades de superfície devido ao aumento da hidrofiliabilidade, ou seja, há absorção de água pela matriz polimérica hidrofóbica, alterando assim a cinética de degradação [11].

Subsequentemente, as massas moleculares média (M_n) e média ponderada (M_w) foram medidas através de cromatografia de permeação em gel (GPC). As massas moleculares (média e média ponderada) bem como o índice de polidispersão (M_w/M_n) das amostras submetidas aos testes de degradação estão apresentadas na Figura 28.

Figura 28 – Análise por GPC do scaffold PDLLA/BG 20 (a) M_n ; (b) M_w e (c) M_w/M_n .



Fonte: o autor (2023)

A massa molecular dos biopolímeros está diretamente ligado ao seu tempo de degradação. Os polímeros de baixa massa molecular apresentam degradação mais rápida que polímeros de alta massa molecular ($M_n > 105$ g/mol). O PDLLA se degrada devido a cisão aleatória da cadeia principal que envolve a reação de hidrólise em meio fisiológico. Seus grupos ésteres são hidrolisados de acordo com a reação 4, o que leva à clivagem das cadeias poliméricas:



A taxa de degradação é inversamente proporcional à massa molecular, à cristalinidade e à hidrofobicidade. A clivagem da cadeia molecular acontece preferencialmente nas regiões amorfas, o que leva ao aumento da cristalinidade do polímero. Os grupos carboxílicos formados após a clivagem da cadeia catalisam a reação de hidrólise do PDLLA. Essa degradação acontece de forma heterogênea no material, sendo mais rápida no interior da estrutura e mais lenta na superfície, devido à concentração dos grupos carboxílicos e redução do pH no interior.

A figura 26 apresenta um aumento inicial devido a difusão da água para interior do polímero e a subsequente diminuição decorrente da quebra de ligações de éster por hidrólise. A diminuição da massa molecular é por causa da liberação dos produtos da degradação.

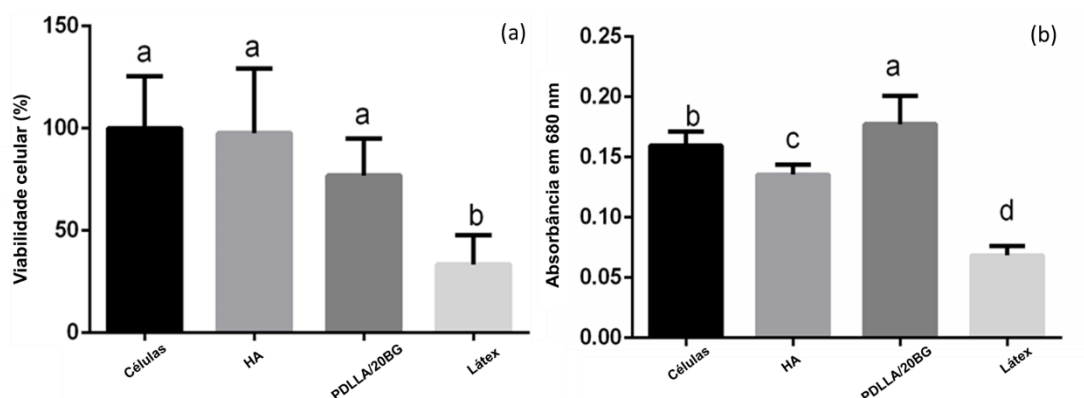
4.3 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

O teste de citotoxicidade compreende uma propriedade importante a ser identificada nos materiais para enxerto ósseo. O biomaterial que apresenta caráter citotóxico, não deve ser classificado como biocompatível, pois a citotoxicidade causa morte celular. Conforme a norma ISO 10993 os biomateriais que apresentam viabilidade celular menor que 70% não devem ser utilizados [35].

Desta forma o ensaio de citotoxicidade foi aplicado para comparar quantitativamente a viabilidade celular tanto no *scaffold* PDLLA/20BG quanto na hidroxiapatita comercial.

A Figura 29 apresenta os valores do percentual de viabilidade celular após execução do teste de citotoxicidade nos diferentes grupos estudados.

Figura 29 – (a) Teste de viabilidade celular (MTT) dia 3, (b) Absorbância de proteínas em células MG63 ao longo de 10 dias de cultura celular. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA 1 Fator, $p < 0.05$).



Fonte: [60]

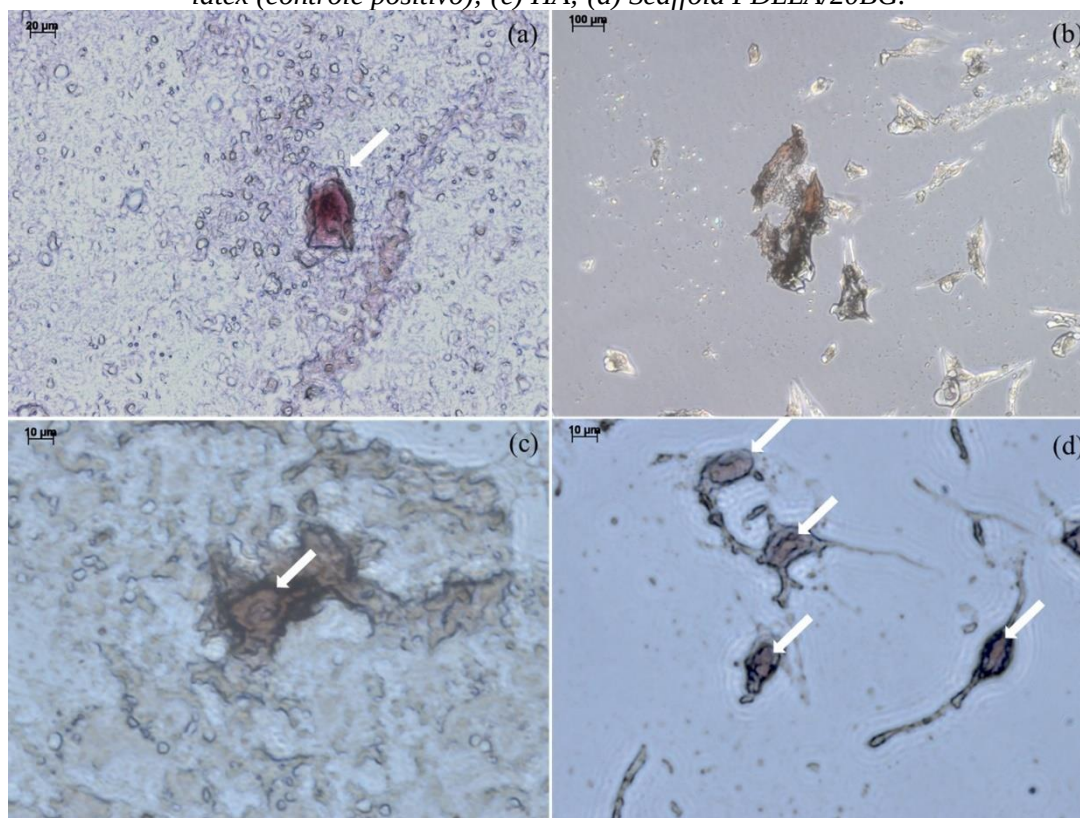
Na figura 29(a) tanto a hidroxiapatita quanto o *scaffold* PDLLA/20BG, não apresentaram efeito citotóxico na linhagem celular de osteoblastos MG63 em relação ao grupo controle negativo, uma vez que não foi observada diferença estatística entre estes grupos. Já em relação ao látex este exibiu diferença significativa fato que o define como um material citotóxico.

O teste do conteúdo de proteína total permite identificar o processo da osteogênese [61]. A Figura 29(b) apresenta o resultado do conteúdo de proteína total in vitro, após 10 dias de

cultura celular e os resultados referentes ao plaqueamento celular com células MG63 mostraram que o grupo *scaffold* PDLA/20BG expressou maior produção de proteína total, seguido pelo grupo de células, hidroxiapatita e látex, sugerindo assim que o referido material possui potencial para aplicações ósseas *in vivo*.

A Figura 30 apresenta a formação de nódulos de mineralização nos grupos ensaiados após 14 dias de cultura celular. Os nódulos foram corados com vermelho de alizarina e estão circundados por células.

Figure 30 – Fotomicrografias de nódulos de mineralização (a) cultura celular (controle negativo); (b) látex (controle positivo); (c) HA; (d) Scaffold PDLLA/20BG.



Fonte: [60]

A Figura 30 apresenta a estrutura dos nódulos de mineralização mais evidente para o grupo de hidroxiapatita e *scaffold* PDLLA/20BG, frente ao grupo de células e látex, pois evidenciou-se a coloração sob os poços dos grupos ensaiados o que indica a presença dos nódulos mineralizados confirmando assim o estímulo do biomaterial, fato esse não observado nos grupos de células e látex.

Com base nos resultados obtido pode-se sugerir que o *scaffold* PDLLA/20BG apresenta viabilidade celular devida à presença de diferenciação osteoblástica e formação de nódulos de mineralização *in vitro*, portanto um biomaterial com potencial para aplicações ósseas *in vivo*.

5 CONCLUSÃO

O trabalho realizado concentrou-se na síntese do vidro bioativo 58S por meio da rota sol-gel, seguida de sua caracterização. A produção dos *scaffolds* de PDLA/20BG também foi realizada, evidenciando a composição e estrutura do vidro bioativo por meio de análises de FTIR, DRX, Raman e MEV, bem como pela identificação dos elementos característicos Si, Ca e P por meio do espectro de EDS.

Os resultados obtidos, oriundos das técnicas empregadas, não apenas confirmaram a obtenção do vidro bioativo 58S pela rota sol-gel, mas também validaram sua incorporação no polímero PDLA para a produção dos *scaffolds*, utilizando a técnica TIPS combinada com a liofilização. A análise por porosimetria de mercúrio evidenciou uma estrutura com porosidade intercomunicante, proporcionando dimensões adequadas para a condução eficiente das células. Além disso, os ensaios de degradação, quando imersos em PBS, corroboraram sua natureza biodegradável.

O *scaffold* de PDLA exibe uma morfologia homogênea com macroporos interligados por uma estrutura microporosa. O *scaffold* híbrido apresenta uma morfologia com fase heterogênea, exibindo uma dispersão das partículas de vidro bioativo em sua estrutura, sendo incorporadas nas paredes dos poros ou posicionadas superficialmente o que reduz o tamanho dos poros. *Scaffold* híbrido também promove um efeito tampão de pH na superfície do polímero. A incorporação do BG-58S em *scaffolds* de PDLA modifica a degradação ácida do polímero favorecendo o comportamento celular como observado no ensaio *in vitro* devido a adequada viabilidade celular, aumento da produção de proteínas, além da diferenciação celular observada por meio da produção dos nódulos de mineralização.

Os resultados desses testes ratificaram a viabilidade da produção de *scaffolds* porosos, biocompatíveis e biodegradáveis pela técnica de TIPS. Destaca-se, sobretudo, a eficácia dos *scaffolds* híbridos de PDLA com 20% de partículas osteocondutoras de BG-58S, revelando promissoras aplicações como material biodegradável em procedimentos de preenchimento de lesões para enxertos ósseos.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos no presente trabalho revelaram a necessidade de novos estudos, sendo sugerido como trabalhos futuros:

- O estudo da adição do surfactante (pluronic), utilizado como agente porogênico, para produzir vidro bioativo mesoporoso 58S.
- Ajustar os parâmetros da produção do *scaffold*, a fim de obter uma porosidade mais adequada para aplicações em regeneração óssea.
- A realização de ensaios mecânicos, a fim de analisar a resistência a compressão dos *scaffolds* produzidos.

7 PUBLICAÇÕES RELACIONADAS COM O TRABALHO

Aguiar, V.C.P.F., Gonçalves, I.S., Ortega, F.S., Costa, K.J.S.G., Lauda, D.P., Oliveira, I.R.: Síntese e Caracterização de Vidro Bioativo (BG-58S) pela Rota Sol-Gel sem e com a Presença de Solvente e Agente Porogênico, (2023).

Aguiar, V.C.P.F., Bezerra, R. do N., Santos, K.W. dos, Gonçalves, I. dos S., Costa, K.J.S., Lauda, D.P., Campos, T.M.B., Prado, R.F. do, de Vasconcellos, L.M.R., de Oliveira, I.R.: Development and Characterization of Ceramic-Polymeric Hybrid Scaffolds for Bone Regeneration: Incorporating of Bioactive Glass BG-58s into PDLA Matrix.

REFERÊNCIAS

- [1] SCHÄTZLEIN, E. *et al.*, 3D-Printed PLA-Bioglass Scaffolds with Controllable Calcium Release and MSC Adhesion for Bone Tissue Engineering. **Polymers**, v. 14, n. 12, 2022.
- [2] SULTAN, S. *et al.*, The Design of 3D-Printed Polylactic Acid–Bioglass Composite Scaffold: A Potential Implant Material for Bone Tissue Engineering. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7214, 2022.
- [3] ARIF, Z. U. *et al.* Recent advances in 3D-printed polylactide and polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 218, n. 10, p. 930–968, 2022.
- [4] BARROCA, N. *et al.* Tailoring the morphology of high molecular weight PLLA scaffolds through bioglass addition. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 9, p. 3611–3620, 2010.
- [5] TURNBULL, G. *et al.* 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 3, p. 278–314, 2018.
- [6] LU, W. *et al.*, Bone tissue engineering by using a combination of polymer/Bioglass composites with human adipose-derived stem cells. **Cell and Tissue Research**, v. 356, n. 1, p. 97–107, 2014.
- [7] JONES, J. R. Reprint of: Review of bioactive glass: from hench to hybrids. **Acta Biomaterialia**, v. 23, Suppl., p. S53–S82, 2015.
- [8] VERRIER, S. *et al.* PDLA/Bioglass® composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: an in vitro cell biology assessment. **Biomaterials**, v. 25, n. 15, p. 3013–3021, 2004.
- [9] MAQUET, V. *et al.* Preparation, characterization, and in vitro degradation of bioresorbable and bioactive composites based on Bioglass®-filled polylactide foams. **Journal of Biomedical Materials Research**, part A, v. 66, n. 2, p. 335–346, 2003.
- [10] ROETHER, J. A. *et al.* Novel bioresorbable and bioactive composites based on bioactive glass and polylactide foams for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, n. 12, p. 1207–1214, 2002.
- [11] REZWAN, K. *et al.* Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 18, p. 3413–3431, 2006.
- [12] GHIȚULICĂ, C. D. *et al.* Synthesis and characterization of zno(Mgo)-cao-sio2-p2o5 bioglass obtained by sol-gel method in presence of surfactant agent. **Gels**, v. 7, n. 4, p. 187, 2021. Doi: 10.3390/gels7040187
- [13] PRASAD, A. State of art review on bioabsorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Today: Proceedings**, v. 44, part 1, p. 1391–1400, 2021.
- [14] MEDEIROS, E. L. G. *et al.* Scaffolds de vidros bioativos: desenvolvimento de estruturas

bioativas nanoestruturadas. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 12, n. 3, p. 152–167, 2017.

[15] TEIXEIRA, B. N. 3D Printed-Poly(Lactic Acid) Scaffolds with improved bioactivity for bone tissue engineering. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

[16] MONTAZERIAN, M.; ZANOTTO, E. D. History and trends of bioactive glass-ceramics. **Journal of Biomedical Materials Research**, part A, v. 104, n. 5, p. 1231–1249, 2016.

[17] SHAH, A. T. *et al.* A study of the effect of precursors on physical and biological properties of mesoporous bioactive glass. **Journal of Materials Science**, v. 50, n. 4, p. 1794–1804, 2015.

[18] VALLET-REGI, M.; SALINAS, A. J. Mesoporous bioactive glasses for regenerative medicine. **Materials Today Bio**, v. 11, n. 6, p. 100–121, 2021.

[19] 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. A Math. Phys. Eng. Sci.**, v. 370, n. 1963, p. 1376–1399, 2012.

[20] MAXIMOV, M. *et al.* Bioactive glass: an extensive study of the preparation and coating methods. **Coatings**, v. 11, n. 11, p. 1–28, 2021.

[21] FONSECA, G. F. *et al.* Scaffolds of PCL combined to bioglass: synthesis, characterization and biological performance. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 31, n. 5, p. 41, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10856-020-06382-w>

[22] PAJARES-CHAMORRO, N.; CHATZISTAVROU, X. Bioactive glass nanoparticles for tissue regeneration. **ACS Omega**, v. 5, n. 22, p. 12716–12726, 2020.

[23] FERNANDO, J. D. L. **Novel mesoporous bioactive glasses (MBGs) as fillers in dental adhesives “Synthesis, Physico-chemical and biological evaluation**. 2018. Tese (Doutorado) Université Claude Bernard, Lyon,

[24] DEKA, J. R.; SONG, Y.; YANG, Y. C. The influence of isothermal aging, surfactant and inorganic precursors concentrations on pore size and structural order of mesoporous bioactive glass. **Solid State Sciences**, v. 84, n. 7, p. 104–111, 2018.

[25] HOSSAIN, K. M. Z. *et al.* Mechanical, crystallisation and moisture absorption properties of melt drawn polylactic acid fibres. **European Polymer Journal**, v. 53, n. 1, p. 270–281, 2014.

[26] GUPTA, B.; REVAGADE, N.; HILBORN, J. Poly(lactic acid) fiber: an overview. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, n. 4, p. 455–482, 2007.

[27] HENTON, D. E. *et al.* Polylactic acid technology. Natural fibers, biopolymers, and biocomposites, Boca Taton, Florida: CRC Press, 2005. p. 527–577.

- [28] DUARTE, C. M. F.; *et al.* Surface energy changes involved in apatite formation in copper-containing bioactive glasses. **Materials Research**, n. 25, 2022.
- [29] BOCCACCINI, A. R. *et al.* Bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams filled with and coated by Bioglass® particles for tissue engineering applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n. 5, p. 443–450, 2003.
- [30] TAVARES, D. S. C., **Fabricação e caracterização de scaffolds compósitos de polímero-hidroxiapatite e polímero-vidro para engenharia de tecidos ósseos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade Católica Portuguesa. Escola Superior de Biotecnologia, Aveiro, Portugal, 2014.
- [32] SACHOT, N.; ENGEL, E.; CASTANO, O. Hybrid organic-inorganic scaffolding biomaterials for regenerative therapies. **Current Organic Chemistry**, v. 18, n. 18, p. 2299–2314, 2014.
- [33] KAUR, G. *et al.* Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: state-of-the-art review and future challenges. **Materials Science and Engineering**, v. 104, n. 6, p. 109895, 2019.
- [34] XIA, W.; CHANG, J. Preparation and characterization of nano-bioactive-glasses (NBG) by a quick alkali-mediated sol-gel method. **Materials Letters**, v. 61, n. 14/15, p. 3251–3253, 2007.
- [35] ISO. **ISO 1099**: Biological evaluation of medical devices/part 5 – tests for in vitro, p. 41, 2018.
- [36] ARCOS, D.; GREENSPAN, D. C.; VALLET-REGÍ, M. Influence of the stabilization temperature on textural and structural features and ion release in SiO₂-CaO-P₂O₅ sol-gel glasses. **Chemistry of Materials**, v. 14, n. 4, p. 1515–1522, 2002.
- [37] SUN, Y. Sen; LI, A. L.; REN, H. H. *et al.* Removal of residual nitrate ion from bioactive calcium silicate through soaking. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, n. 4, p. 579–582, 2016.
- [38] BUI, X. V.; DANG, T. H. Bioactive glass 58S prepared using an innovation sol-gel process. **Processing and Application of Ceramics**, v. 13, n. 1, p. 98–103, 2019.
- [39] KALAMPOUNIAS, A. G. IR and raman spectroscopic studies of sol: gel derived alkaline-earth. **High Temperature**, v. 34, n. 2, p. 299–303, 2011.
- [40] NARIYAL, R. K.; KOTHARI, P.; BISHT, B. FTIR measurements of SiO₂ glass prepared by sol-gel technique. **Chemical Science Transactions**, v. 3, n. 3, p. 1064–1066, 2014.
- [41] WU, C.; ZHANG, Y.; KE, X. *et al.* Bioactive mesopore-glass microspheres with controllable protein-delivery properties by biomimetic surface modification. **Journal of Biomedical Materials Research - part A**, v. 95, n. 2, p. 476–485, 2010.
- [42] SIQUEIRA, R. L.; ZANOTTO, E. D. The influence of phosphorus precursors on the

synthesis and bioactivity of SiO₂-CaO-P₂O₅ sol-gel glasses and glass-ceramics. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 2, p. 365–379, 2013.

[43] EREIBA, K. M.; RABOH, A. S. A.; A.G., M. Characterization of some bioactive glasses based on SiO₂-CaO-P₂O₅-SrO quaternary system prepared by sol-gel method. **Nature and Science**, v. 46, n. 7, p. 922–930, 2014.

[44] BAINO, F., FIUME, E., MIOLA, M., *et al.* Bioactive sol-gel glasses: processing, properties, and applications. **International Journal of Applied Ceramic Technology**, v. 15, n. 4, p. 841–860, 2018.

[45] SEPULVEDA, P.; JONES, J. R.; HENCH, L. L. Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 58, n. 6, p. 734–740, 2001.

[46] MENDES FILHO, A. A. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita e compósitos a partir de matéria prima reciclada**. 2006. 204 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2006. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/2483>

[47] BARRIONI, B. R., **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 (Doutorado em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG., 2018.

[48] MEDEIROS, G. S. *et al.* A perfect pair: niobium- and gallium-doped ceramic biomaterial enabled by coupled synthesis method with potential application for bone regeneration and cancer-targeted therapy. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 599, n. 1, p. 121962, 2023.

[49] DOOSTMOHAMMADI, A. *et al.* Bioactive glass nanoparticles with negative zeta potential. **Ceramics International**, v. 37, n. 7, p. 2311–2316, 2011.

[50] 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.**, v. 57, n. 4, p. 603–619, 1985.

[51] SANTOS, D. M. M. *et al.* Freeze-cast composite scaffolds prepared from sol-gel derived 58S bioactive glass and polycaprolactone. **Ceramics International**, v. 45, n. 8, p. 9891–9900, 2019.

[52] WAN, Y. *et al.* Biodegradable polylactide/chitosan blend membranes. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 4, p. 1362–1372, 2006.

[53] OLIVEIRA, T.; BOTELHO, G.; ALVES, N. M. *et al.* Inclusion complexes of α -cyclodextrins with poly(d,l-lactic acid): structural, characterization, and glass transition dynamics. **Colloid and Polymer Science**, v. 292, n. 4, p. 863–871, 2014.

[54] BARRIONI, B. R. *et al.* Osteogenic potential of sol-gel bioactive glasses containing manganese. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 7, p. 86, 2019.

Doi: <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6288-9>

[55] GÓMEZ-CEREZO, M. N. *et al.* Multiscale porosity in mesoporous bioglass 3D-printed scaffolds for bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 120, n. 1, p. 111706, 2021.

[56] BEJARANO, J. *et al.* Effect of Cu-and Zn-doped bioactive glasses on the in vitro bioactivity, mechanical and degradation behavior of biodegradable PDLA scaffolds. **Materials**, v. 13, n. 13, p. 2908, 2020.

[57] BLAKER, J. J.; KNOWLES, J. C.; DAY, R. M. Novel fabrication techniques to produce microspheres by thermally induced phase separation for tissue engineering and drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 2, p. 264–272, 2008.

[58] QIU, Q. Q.; DUCHEYNE, P.; AYYASWAMY, P. S. New bioactive, degradable composite microspheres as tissue engineering substrates. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 1, p. 66–76, 2000.

[59] NAVARRO, M. *et al.* In vitro degradation behavior of a novel bioresorbable composite material based on PLA and a soluble CaP glass. **Acta Biomaterialia**, v. 1, n. 4, p. 411–419, 2005.

[60] AGUIAR, V. C. P. F. *et al.* Development and Characterization of Ceramic-Polymeric Hybrid Scaffolds for Bone Regeneration: Incorporating of Bioactive Glass BG-58s into PDLA Matrix. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, p. 1–18, 2024. Doi: <https://doi.org/10.1080/09205063.2024.2334981>.

[61] BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. **Brazilian Dental Journal**, v. 16, n. 2, p. 156–161, 2005.