

Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais



Dissertação de Mestrado

FRANCIELE TEIXEIRA FÉLIX

Síntese e caracterização de espumas híbridas de vidro bioativo/goma gelana para aplicação biomédica

Belo Horizonte 2019

Franciele Teixeira Félix

Síntese e caracterização de espumas híbridas de vidro bioativo/goma gelana para aplicação biomédica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do CEFET-MG, na área de concentração de Ciência e Desenvolvimento de Materiais, na Linha de Pesquisa em Biomateriais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Hermes de Souza Costa

Belo Horizonte Fevereito, 2019

Félix, Franciele Teixeira.

F316s Síntese e caracterização de espumas híbridas de vidro bioativo/goma gelana para aplicação biomédica / Franciele Teixeira Félix. – 2019. 69 f. : il.

Orientador: Hermes de Souza Costa

Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, Belo Horizonte, 2019. Bibliografia.

1. Biomateriais. 2. Polissacarídeos bacterianos. 3. Materiais compósitos. 4. Processo sol-gel. I. Costa, Hermes de Souza. II. Título.

CDD: 620.118

Ficha elaborada pela Biblioteca - Campus I – CEFET-MG Bibliotecário: Wagner Oliveira Braga CRB6 - 3261



CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO "Síntese e caracterização de espumas híbridas de vidro bioativo/goma gelana para aplicação biomédica"

Autor: Franciele Teixeira Félix Orientador: Prof. Dr. Hermes de Souza Costa

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Prof. Dr. Hermes de Souza Costa (ORIENTADOR) Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Prof^a. Dr^a. Angela de Mello Ferreira Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Prof^a. Dr^a. Agda Aline Rocha de Oliveira Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 18 de Fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Ao CEFET, e Capes pelo apoio financeiro;

Aos professores e técnicos que ajudaram na realização desse trabalho;

Aos colegas de laboratório pela companhia e auxílio;

Ao meu orientador Hermes de Souza Costa pelas explicações pacientes e correções precisas; Aos amigos pelo encorajamento;

Aos meus familiares; especialmente aos meus pais José Luiz e Maria Aparecida, e minha irmã Alessandra; por acreditarem mais em mim do que eu mesma, por vibrarem com cada pequena conquista como se eu tivesse escalado o Everest. Obrigada pelo amor, cuidado, paciência, bondade, correção e encorajamento; por serem exemplos diários do que significa ser família. A graça de Deus me constrange ao ter me dado infinitamente mais do que eu merecia.

Estendo esses agradecimentos ao meu cunhado Diego Alberto, quem ama e cuida da minha irmã tem minha gratidão. Obrigada por estar sempre por perto.

Á Igreja de Cristo, minha família da fé, pelos irmãos que me apoiam e cuidam de mim. Obrigada pela oportunidade de servir, pela graça de ser servida, pelo trabalho e edificação mútuas.

Á Deus pela vida e por guiá-la, pela correção e constante moldagem de caráter. Pela graça, misericórdia e salvação que dão significado a existência.

"Significado é o modo de ser de tudo o que foi criado. Este caráter universal de referir ou espressar, que é próprio de todo o nosso cosmo criado, estampa a realidade criada como significado, em conformidade com sua dependente natureza não auto suficiente. Significado é o ser de tudo o que foi criado e até mesmo a natureza de nossa individualidade. Isto tem uma raiz religiosa e uma origem divina."

Herman Dooyeweerd

RESUMO

A perda de tecido ósseo por traumas e doenças degenerativas constitui fator limitante para a qualidade e expectativa de vida da população em geral, onde o reparo de defeitos críticos requer uso de scaffolds biocompatíveis que estimulem a regeneração tecidual. O vidro bioativo (VB) é material cerâmico composto por frações de óxidos. Além do óxido de sílicio, SiO₂, são comumente usados CaO, P₂O₅, Na₂O e outros. Embora esses materiais sejam bioativos, são frágeis e pouco tenazes para aplicação óssea. A goma gelana (GG) é polissacarídeo aniônico, hidrofílico, biodegradável, produzido pela bactéria Sphingomonas elodea. Possui afinidade com Ca²⁺ e estabelece pontes iônicas entre suas cadeias para formar gel. É mineralizável com fosfatos de cálcio, o que confere bioatividade e resistência mecânica, entretanto seus valores são inferiores aos requeridos pelo osso. Esse trabalho consistiu na obtenção de híbridos associando a elasticidade da GG e a rigidez do VB, para possível reparação óssea. Embora a mistura de ambos os materiais já tenha sido estudada por GANTAR et al. (2014), o processo utilizado por eles envolveu a dispersão de VB em pó no sol de GG. O presente trabalho, no entanto, busca promover a percolação de ambas as fases no mesmo sol formando uma rede interconectada de ambos os materiais formadores da mistura. Para isso, foram preparadas misturas com diferentes proporções de VB e GG. Os materiais produzidos foram caracterizados por inspeção visual, morfológica, físico quimica, testados por meio de teste in vitro de degradação em meio aquoso, e foi investigada a precipitação de íons após imersão dos compósitos em fluido corporal simulado (SBF). Devido à natureza biocompatível e osteoreparadora dos materiais, este sistema se apresentou viável e promissor para obtenção de morfologia compatível para aplicações de regeneração óssea.

Palavras chave: Bioatividade, Espumas híbridas, Vidro bioativo, Goma Gelana, Compósitos.

ABSTRACT

Bone tissue loss due to trauma or degenerative diseases is a limiting factor for the life quality and life expectancy of the general population, where the repair of critical defects requires the use of biocompatible scaffolds that stimulate tissue regeneration. Bioactive glass is ceramic material composed of oxides fractions. In addition to silicon oxide, SiO₂, are commonly used CaO, P₂O₅, Na₂O and others. Although these materials are bioactives, they are less tenacious for bone application. Gellan gum is anionic, hydrophilic, biodegradable polysaccharide produced by the bacterium Sphingomonas elodea. It has Ca^{2+} affinity and establishes ionic bridges between its chains to form a gel. It is mineralizable with calcium phosphates, which gives bioactivity and mechanical resistance, however their values are inferior to those required by bone. This work consisted in obtaining hybrids associating the gellan gum elasticity and bioactive glass rigidity, for possible bone repair. Although the mixture of both materials has already been studied by GANTAR et al. (2014), the process used by them involved the dispersion of VB powder into the GG sol. The present work, however, seeks to promote the percolation of both phases in the same sol forming an interconnected network of both materials forming the mixture. For this, mixtures with different ratios of VB and GG were prepared. The materials produced were characterized by visual, physical, chemical and morphological inspection, tested by in vitro degradation test in aqueous solution, and the ions precipitation on the composites after immersion in simulated body fluid was investigated. Due to the biocompatible and osteoreparative nature of the materials, this system presented viable and promising to obtain compatible morphology for bone regeneration applications.

Key words: Bioactivity, Hybrid Foams, Bioactive Glass, Gellan Gum, Composites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Histologia óssea	16
Figura 2 - Efeito do pH nos sistemas coloidas de sílica-água	27
Figura 3 - Estrutura química da goma gelana	
Figura 4 - Ilustração da formação de compósitos hidrogel/partículas inorgânicas	
Figura 5 - Fluxograma do projeto desenvolvido	
Figura 6 - Imagem macroscópica e microscópica dos híbridos	42
Figura 7 – Imagens de MEV dos híbridos	43
Figura 8 – TGA da GG em pó (0VB)	45
Figura 9 – TGA do híbrido 75VB	46
Figura 10 – TGA do híbrido 80VB	47
Figura 11 – TGA do híbrido 83VB	
Figura 12 – DSC das amostras de estudo	51
Figura 13 – Espectroscopia de infravermelho das amostras	53
Figura 14 – Difratogramas de raios X da amostra 0VB e compósitos	56
Figura 15 – Perda percentual de massa dos híbridos	
Figura 16 – Perfil de hidratação os híbridos	59
Figura 17 – EDS comparativo dos híbridos antes e após imersão em SBF	61
Figura 18 – Microscopia eletrônica de varredura dos híbridos	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado da TGA da GG em pó (0VB)	45
Tabela 2 – Resultado da TGA da amostra 75VB	46
Tabela 3 – Resultado da TGA da amostra 80VB	47
Tabela 4 - Resultado da TGA da amostra 83VB	48
Tabela 5 – Comparação do resultado da TGA das amostras	48
Tabela 6 - Análise da termogravimetria	50
Tabela 7 – Principais bandas de absorção de infravermelho para GG (0VB)	52
Tabela 8 – Principais bandas de absorção de infravermelho para os compósitos	54
Tabela 9 – Picos de difração presentes no DRX das amostras	56

SUMÁRIO

1. ()BJETIVOS	14
1.1.	Objetivo Geral	14
1.2.	Objetivos Específicos	14
2. F	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1.	Tecido ósseo	15
2.2.	Engenharia de tecidos no reparo ósseo	19
2.3.	Vidro bioativo	21
2.4.	Processo sol – gel	23
2	.4.1. Hidrólise e condensação de silicatos	24
2.5.	Goma gelana	27
2.6.	Hidrogéis	
2.7.	Compósitos de hidrogél com aditivo inorgânico	
2.8.	Espuma híbrida de GG e VB para aplicação biomédica	
3. N	/IATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1.	Etapas do desenvolvimento do trabalho	35
3	.2. Caracterização dos materiais	
5. (CONCLUSÕES	63
6. F	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

INTRODUÇÃO

Traumas e doenças podem levar a perda tecidual. Uma das formas de estimular a neoformação do tecido é implantar células do próprio paciente *in loco* da lesão. Entretanto, esse procedimento é limitado quanto a extensão porque a viabilidade celular após o implante depende da existência de fontes de nutrição próximas, e a reestruturação do tecido depende de organização celular em três dimensões.

Outra forma de sanar o problema é a utilização de enxertos. Entretanto, xenoenxertos, em que o material bilógico é proveniente de doador de outra espécie; e heteroenxertos, em que o doador é da mesma espécie, apresentam ao indivíduo receptor o risco de rejeição e de contaminação. Homoenxertos, cujo doador é o próprio paciente, por sua vez, são limitados quanto a disponibilidade de material, e levam a um novo dano no sítio da coleta. Portanto, há demanda de substitutos sintéticos.

A engenharia de tecidos visa produzir substitutos sintéticos que sirvam de suporte para a diferenciação, crescimento e proliferação celular. Dessa forma, tecidos podem ser reparados através da cultura de células do próprio paciente. Esse é um dos campos emergentes que utiliza ferramentas de controle de superfície dos materiais, células vivas e/ou fatores de reconhecimento e crescimento celular para formação e regeneração de tecidos. O uso de materiais biodegradáveis, isto é, cujos produtos de degradação são eliminados pelas rotas naturais do organismo, permite que o novo tecido cresça à medida que o sintético é eliminado.

No processo de engenharia de tecidos, células indiferenciadas são coletadas do indivíduo e cultivadas em laboratório; elas então crescem em matriz tridimensional porosa (*scaffold*) que contém fatores de crescimento e diferenciação. Tais células começam a secretar componentes de matriz extracelular e a se proliferar. O material é então implantado no paciente sem que haja resposta imune prejudicial a saúde do tecido ou à funcionalidade do implante.

Considerando o envelhecimento populacional, é sabido que a quantidade de pacientes que sofrem com a fragilidade óssea ocasionada pela osteoporose aumenta. Especialmente entre as mulheres cuja doença aparece ou é agravada após a menopausa. Nesses pacientes as fraturas ósseas tendem a reduzir drásticamente a qualidade de vida, levando a incapacidade motora

que intensifica os problemas de saúde do indivíduo devido ao sedentarismo. A prática de atividades físicas de auto impacto e alta performance que têm se popularizado nos ultimos anos também levam ao aumento da ocorrência de lesões ósseas. Adicionalmente, é notório que os acidentes de transito também lesionam muitos indivíduos. Portanto, a necessidade de restituição óssea é presente e significativa.

Vidros bioativos são excelentes biomateriais para engenharia de tecido ósseo porque se ligam facilmente aos tecidos adjacentes no local de implantação, e seus produtos de degradação exercem controle genético sobre os osteoblastos e ainda tem sido estudados como estimuladores de angiogênese. Podem ser fabricados porosos, fator importante para permitir a infiltração de células e de vasos sanguíneos que nutram as novas células. Quando em dimensões nanométricas são ainda mais bioativos devido a elevação da área superficial desse material.

A produção de compósitos de materiais poliméricos e cerâmicos permite sinergia entre as características de flexibilidade do material orgânico e resistência mecânica do material inorgânico.

O processo sol-gel é um método de produção desses compósitos, pois permite a incorporação de partículas inorgânicas em um gel polimérico. Essa rota é comumente usada no preparo de espumas que contenham porosidade inerente ao processo, com distribuição de fases em escala micrométricas ou nanométricas, sem a necessidade da aplicação de elevadas temperaturas no processo.

Como material polimérico formador de gel, a goma gelana é amplamente utilizada na indústria culinária e biomédica. A goma gelana é polissacarídeo aniônico linear de geleificação termoreversível em temperatura próxima a temperatura corporal. No entanto, a adição de agentes quelantes, como cátions bivalentes, permite a reticulação e formação de gel mais resistente e termicamente irreversível.

A mistura de vidro bioativo com goma gelana já foi explorada em 2014 por Gantar et al., no entanto, o grupo de pesquisa sintetizou o vidro bioativo pelo método sol gel obtendo um pó desse material. Posteriormente, essa amostra particulada foi dispersa no sol de goma gelana e ficou aprisionada na rede polimérica que se formou. De diferente forma, essa pesquisa buscou

a percolação simultânea do polimero e do vidro bioativo em um mesmo sol, visando obter uma melhor interação entre as fases.

No presente trabalho, portanto, foram desenvolvidos compósitos que são espumas híbridas de vidro bioativo / goma gelana em diferentes proporções de suas fases constituintes. O material foi caracterizado quanto à sua macro e microestrutura, composição química, ensaiados para avaliar sua degradação *in vitro* por perda de massa em meio aquoso, e foi investigada a precipitação de íons após imersão dos compósitos em fluido corporal simulado (SBF).

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral

Desenvolver matrizes híbridas tridimensionais de goma gelana e vidro bioativo pelo método sol-gel para aplicação biomédica.

1.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver metodologia de obtenção de espumas de goma gelana com vidro bioativo, através da rota sol-gel, com porosidade final adequada, bem como propriedades fisico químicas desejáveis a aplicação biomédica em regeneração óssea.
- Estudar as propriedades físico químicas de espumas de goma gelana/vidro bioativos através da variação das proporções dos componentes na mistura.
- Estudar a eficiência da imersão das espumas em solução de cloreto de cálcio para reticulação do sol, bem como incorporação de cálcio na composição do vidro bioativo.
- Caracterizar visualmente, morfológicamente, e físico químicamente as espumas produzidas através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), termogravimetria (TGA), calorimetria diferencial exploratória (DSC), espectroscopia de infravermelho (FTIR), difratometria de raio X (DRX), degradação entumescimento após imersão em água, análise elementar após imersão em fluido biológico simulado (SBF *Simulated Body Fluid*).
- Definir qual das três proporções em massa adotadas (75% VB, 80% VB, ou 83% VB) apresenta as melhores características para aplicação no reparo ósseo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tipo especializado da família do tecido conectivo, que também é composta pelos tecidos cartilaginoso, adiposo e muscular liso. Todos esses tecidos são formados a partir do precursor menos diferenciado, fibroblasto (ALBERTS et al., 2009).

O tecido ósseo atua juntamente com o tecido muscular na locomoção do indivíduo; oferece suporte e proteção de tecidos moles, bem como órgãos vitais; contém reserva de cálcio e fosfato importante no processo de homeostase mineral; e abriga a medula óssea (TOZZI et al., 2016; FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

O tecido pode ser definido como um material híbrido, denso e rígido constituído por duas fases: orgânica e inorgânica. A fase orgânica confere ao tecido flexibilidade e resistência à forças distensoras, é constituída em sua maioria por colágeno tipo I, e apenas cerca de 10% de sua massa seca corresponde à proteínas não colágenas, proteoglicanos e fosfolipídios. A fase inorgânica, por sua vez, confere ao tecido dureza, rigidez e resistência à forças compressoras. Essa última corresponde à 65% da massa seca do osso, é rica em apatitas e carbonatos e serve como reserva de Ca, Mg, Na e P. Além desses componentes, estão presentes em menores quantidades: bicarbonato, potássio, citrato, carbonato, fluoreto, zinco, bário e estrôncio. O principal componente inorgânico desta fase é a hidroxiapatita, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (TOZZI et al., 2016; FLORENCIO-SILVA et al., 2015; ALBERTS et al., 2009; GKIONI et al., 2010).

Quanto a porosidade, o osso possui uma camada externa (cortical ou compacta) com porosidade entre 5 e 30% de espaços vazios, e uma parte interna (trabecular ou esponjosa) com porosidade entre 30 e 90% de espaços vazios, cujos espaços vazios e interconectados são formados por trabéculas em uma estrutura semelhante a favo de mel (TOZZI et al., 2016).

Quanto a morfologia, os ossos são classificados principalmente em longos, curtos, chatos (ou planos) e irregulares. Os ossos longos são ainda divididos em diáfise, epífise e metáfase; que são o eixo central, as extremidades, e a região intermediária respectivamente. No eixo central encontra-se a medula óssea vermelha – onde se dá a hematopoiese – e a medula óssea amarela – que funciona como estoque energético na vida adulta (TOZZI et al., 2016).

A classificação histológica, de maior relevância, divide os ossos em primário (imaturo) e secundário (maduro ou lamelar). O osso primário é o primeiro a ser formado no crescimento dos indivíduos e em casos de reparação óssea, ele é gradualmente substituído por osso secundário; permanecendo apenas em ossos do crânio e alvéolos dentários. Nele, as fibras colágenas e os osteócitos apresentam baixo padrão de organização. O osso secundário, por sua vez, apresenta elevada organização. A figura 1 mostra o endósteo e periósteo, superfícies interna e externa do osso que fornecem osteoblastos ao tecido. O endósteo reveste as cavidades do osso esponjoso, os canais de Havers e de Volkman. Esses canais, dispostos perpendicularmente e obliquamente entre si, permitem a passagem de vasos sanguíneos e nervos. Circundando os canais de Havers encontram-se lamelas ósseas formando estruturas denominadas ósteons. Em cada lamela. as fibras colágenas estão organizadas unidirecionalmente, e estão perpendiculares em relação a lamela adjacente formando uma distribuição helicoidal (ALBERTS et al., 2009; JUNQUEIRA, CARNEIRO; 2013).





Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013. (Adaptada)

São quatro os tipos principais de células que constituem esse tecido: osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células de revestimento (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Os osteoblastos correspondem de 4 a 6% do total de células ósseas. Secretam o osteóide, a matriz orgânica do osso, composta de proteínas colágenas – principalmente colágeno tipo I –, não colágenas e proteoglicanos. Posteriormente, de sua membrana são liberadas vesículas contendo osteóide às quais se ligam proteoglicanos e outros componentes orgânicos. Os proteoglicanos sulfatados são então degradados por enzimas secretadas pelos osteoblastos e, por terem carga negativa, imobilizam íons de cálcio que atravessam os canais presentes na membrana dessas vesículas. Osteoblastos também secretam fosfatase alcalina, que degrada compostos com fósforo, liberando íons fósforo dentro das vesículas. A presença desses íons leva à formação de cristais de hidroxiapatita que, quando em excesso, rompem essas estruturas vesiculares e se espalham para a matriz circundante (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Os osteócitos compreendem de 90 a 95% do total de células ósseas. São originados do osteoblasto, quando este é aprisionado em pequenas lacunas na própria matriz óssea mineralizada. Embora menos ativo, o osteócito continua a secretar matriz em pequenas quantidades em torno de si mesmo. Nessas lacunas existem túneis (canaliculi) pelos quais se dão os processos citoplasmáticos entre osteócitos, e entre osteoblastos e células de revestimento. Esse sistema lacunocanalicular facilita o transporte de moléculas de sinalização, permite a passagem de nervos e vasos sanguíneos, importantes para oxigenação e nutrição do tecido. Essa rede também detecta pressões e cargas mecânicas funcionando como mecanosensor importante no processo de remodelação óssea (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; ALBERTS et al., 2009).

Os osteoclastos são células que se aderem e corroem a superfície da matriz óssea. São células multinucleadas que se originam de monócitos liberados na corrente sanguínea. Atraídos por fatores químicos como àqueles liberados pela apoptose de osteócitos, migram aos locais de reabsorção óssea e se fundem formando uma célula multinucleada. São, portanto, da linhagem hematopoiética da medula óssea (SILVA et al. 2015; ALBERTS et al., 2009). Essas células apresentam uma borda de microvilosidades, também chamada de borda estriada, que cria pequenas lacunas no osso – lacunas de Howship – devido a secreção de prótons e enzimas. A consequente acidificação dessas lacunas dilui proteínas e cristais de hidroxiapatita cujos

produtos de degradação são então endocitados e posteriormente transmitidos ao domínio excretor da membrana. (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

As células de revestimento são osteoblastos quiescentes. Estes previnem o contato direto entre osteoclastos e matriz óssea quando a reabsorção não deve ocorrer (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

O osso é tecido vivo, em constante deposição e reposição de matriz. O desequilíbrio entre as taxas de absorção e formação óssea resulta em alterações na densidade mineral óssea e, consequentemente, influencia o funcionamento local e sistêmico dessa estrutura. A remodelação óssea é importante para reparo de feridas, homeostase de cálcio e adaptação do esqueleto ao uso mecânico. As forças de tração e compressão sofridas leva à melhor orientação de fibras colágenas e osteócitos, sendo que este último age como sensor mecânico que modula a ação de osteoblastos e osteócitos (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; ALBERTS et al., 2009).

Na neoformação tecidual, ao passo que osteoclastos absorvem matriz formando túneis de Howship, capilares sanguíneos crescem em direção ao centro da lacuna criada e levam osteoblastos ao sítio de remodelação. As células progenitoras então depõem camadas concêntricas de matriz ao redor do canal sanguíneo; sendo que algumas delas ficam aprisionadas após a calcificação da matriz e lá se diferenciam em osteócitos (ALBERTS et al., 2009).

A matriz extracelular reforça o estado diferenciado das próprias células que a secreta por meio de estímulos físicos e químicos, tais estímulos também levam à diferenciação das células vizinhas (ALBERTS et al., 2009). As proteínas matriciais formam uma estrutura de suporte, *scaffold*, para deposição de hidroxiapatita que é responsável pela dureza e resitência desse tecido, sendo o colágeno a principal proteína que confere resistência ao tecido. As integrinas, no entanto, são a principal proteína de reconhecimento e regulação dos processos celulares. Expressas pelos osteoblastos, essas proteínas levam à fixação dos osteoblastos às proteínas matriciais; processo importante para diferenciação e proliferação celular. Expressas por osteoclastos, também levam à fixação dos osteoclastos à proteínas do osso e fibras colágenas; condição indispensável para o início da reabsorção óssea. Também atuam como mediadoras nas interações dos osteócitos com o tecido, sendo responsáveis pela ação mecanosensora dessas células (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

2.2. Engenharia de tecidos no reparo ósseo

A engenharia de tecidos estuda as estratégias de regeneração tecidual. Langer e Vacanti (1993) definem essa ciência como campo interdisciplinar que aplica princípios da engenharia e ciências da vida no desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm, e melhoram as funções de órgãos e tecidos. Em outras palavras, o objetivo principal é promover o crescimento, proliferação e diferenciação celular seguindo as rotas fisiológicas de cura, restaurando a funcionalidade original do tecido e reduzindo a necessidade de transplantes e substituições.

Doenças ósseas e injúrias causadas, entre outras razões, por acidentes automobilísticos e esportes de alto risco possuem ocorrência relevante. Entretanto, o envelhecimento populacional é a causa mais notável de fragilidade óssea, pois a ocorrência de osteoporose aumenta com a idade, e esta condição patológica comumente leva à fraturas. Como a funcionalidade óssea está diretamente relacionada a qualidade de vida do paciente, boas estratégias de reparo ósseo são necessárias (TOZZI et al., 2016).

A regeneração fisiológica desse tecido é possível, porém limitada quanto à extensão da lesão. Sendo estimado o limite máximo de 1 milímetro de separação entre as bordas fraturadas para que haja união adequada entre os tecidos. Caso contrário haverá uma depressão na área reparada podendo gerar defeitos funcionais e/ou estéticos ao indivíduo (FELIX et al., 2017).

O uso de enxertos é uma das estratégias utilizadas no reparo de feridas extensas. Implantes autógenos, cujo doador é o próprio paciente, são denominados "padrão ouro" pela sua elevada imunocompatibilidade. Entretanto, possuem limitações de disponibilidade óssea e aumentam os riscos pós-operatórios do paciente. Devido a essas limitações, e ao risco de transmissão de doenças associadas ao uso de materiais biológicos de outros humanos (alógenos) ou de outras espécies (xenógenos); enxertos sintéticos (aloplásticos) são amplamente pesquisados e comercializados. (FELIX et al., 2017; NOORI et al., 2017; TOZI et al., 2016).

Tozi et al. (2016) ressaltam que os dispositivos metálicos são os materiais mais comercializados devido às excelentes propriedades mecânicas que os fazem resistir aos esforços de tração e compressão submetidos ao tecido ósseo. No entanto, por não serem bioativos nem bioreabsorvíveis, sua falta de interação química com o tecido e seu desgaste

natural podem levar a reabsorção óssea, afrouxamento de próteses, e consequente cirurgia de revisão.

Uma alternativa valiosa é o uso de materiais cerâmicos devido à sua disponibilidade, compatibilidade e bioatividade. As cerâmicas mais utilizadas são a hidroxiapatita (HA), o trifosfato de cálcio (TCP), o vidro bioativo e as vitrocerâmicas bioativas. Entretanto, a baixa resistência à tração e elevada dureza estão entre as principais desvantagens desses materiais, levando-os a serem produzidos sob a forma de compósitos com materiais que lhes ofereçam maior resistência, flexibilidade e tenacidade. Tais híbridos podem ser produzidos com taxas de biodegradabilidade controláveis, levando a regeneração do tecido, ao invés de sua simples substituição. (TOZI et al., 2016; DUCHEYNE, QIU; 1999)

Uma forma de estimular o reparo do tecido lesionado é implantar células in loco da lesão. Entretanto, esse procedimento é limitado quanto a extensão. Em lesões grandes, superiores a 1mm de separação entre as bordas da fratura, o reparo fisiológico não ocorre com facilidade porque a viabilidade das células depende da proximidade dos vasos sanguíneos; e a reestruturação do tecido também depende de organização tridimensional das células. Os *scaffolds* são construídos visando sanar essa dificuldade. Esses constructos são matrizes tridimensionais que servem como estrutura guia para o desenvolvimento do tecido. Inicialmente, eles atuam como preenchedores ocupando o espaço da lesão; subsequentemente, o tecido em formação ocupa o espaço do *scaffold* à medida que o material dessa estrutura é reabsorvido pelo organismo (TOZI et al., 2016; HOERSTRUP; VACANTI, 2004).

Os tecidos do organismo são complexos, e por isso, os *scaffolds* também são materiais complexos que envolvem várias áreas do conhecimento científico em sua elaboração. A facilidade de produção, manuseio e esterilização são características adicionais desejáveis aos *scaffolds*. Normas éticas e regulamentações legais também devem ser observadas durante todo o processo de produção e uso desses dispositivos (UTECH; BOCCACCINI, 2016; HOERSTRUP; VACANTI, 2004; RATNER et al., 2004).

Entretanto, uma característica primária a todo o processo de elaboração do *scaffold* é a biocompatibilidade. Um material bioacompatível é aquele que não é tóxico ao organismo. Dessa forma, o processo inflamatório que ocorre após o seu implante é um processo natural, oriundo da lesão cirúrgica, não agravado pela natureza do material implantado nem a curto

nem a longo prazo. Os produtos de degradação desse material, portanto, não podem ser produtos que reagem com o tecido adjacente o danificando; são eliminados pelas rotas biológicas naturais do organismo (FELIX, 2017; NOORI et al., 2017; TOZI et al., 2016; SEO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2007).

A presença de poros interconectados também é aspecto muito importante para que haja neovascularização permitindo a difusão de nutrientes e gases necessários à viabilidade celular. A essa formação de novos vasos sanguíneos que nutrirão o tecido recém formado dá-se o nome de angiogênese (BOSE et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2007). Bose et al., (2012) define que poros de 100µm são suficientes para a vascularização. Poros também são importantes para que haja infiltração celular no *scaffold*. Oliveira et al., (2007), no entanto, ressalta que para infiltração celular os poros devem ter dimensões de 200 a 350µm.

2.3. Vidro bioativo

Vidros Bioativos (VBs) são materiais amorfos, inorgânicos, com proporções de óxidos baseados na composição clássica descrita inicialmente por Hench, em 1971. Patenteado com o nome de Bioglass® 45S5, a composição inicial contém em peso: 45% sílica (SiO₂), 24,5% óxido de cálcio (CaO), 24,5% óxido de sódio (Na₂O), e 6% pentóxido de fósforo (P₂O₅). No processo de síntese adotado por Hench, os componentes em pó da óxidos eram sintetizados e cristalizados em um processo de fusão. Atualmente, no entanto, o nome 'vidros bioativos' engloba uma vasta gama de composições e proporções de óxidos que são adicionados ao SiO₂; e que também são fabricados por outras rotas diferentes da fusão de pós. (COHRS et al., 2017; TOZI et al., 2016; UTECH. BOCACCINI, 2016).

O VB em contato com o fluído biológico sofre dissoluções e precipitações simultâneas de íons em sua superfície, alterando o pH do meio e levando a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada. Esse material, por ser quimicamente e estruturalmente compatível à fase mineral óssea, interage quimicamente com fibras colágenas criando uma interface resistente e ativa entre o biomaterial e o tecido circundante. A esse processo dá-se o nome de bioatividade, que é a capacidade de interagir ativamente com o tecido circundante (BARRIONI et al., 2017; TOZI et al., 2016; UTECH. BOCACCINI, 2016; DOUGLAS et al., 2014; COSTA, 2010; OLIVEIRA et al., 2007).

Tal biocompatibilidade, já definida anteriormente, e bioatividade fazem com o que VB tenha a capacidade de induzir a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, estimular a vascularização, e a proliferação de osteoblastos (COHRS et al., 2017; TOZI et al., 2016; GANTAR et al., 2014).

Por já possuir rotas patenteadas e comercializadas, atualmente vêm sendo pesquisadas formas de melhorar o desempenho desses materiais no corpo do paciente, acelerando o processo de reparo tecidual. Para isso, pesquisam-se a sua síntese em formatos e dimensões variadas, com a adição de cargas com funções mecânicas e terapêuticas (COHRS et al., 2017; MIOLINO et al., 2017; DOUGLAS et al., 2014; COSTA et al., 2012).

Quanto a classificação dos vidros, Uttech e Boccaccini (2016) propõem a divisão dos VBs em três classes que se diferenciam quanto a capacidade de induzir a diferenciação de osteoblastos em células ósseas maduras (osteoprodutores) e a capacidade de induzir a proliferação celular e colonização da estrutura do *scaffold* (osteocondutoras). Na classe A se encontram os osteoprodutores e osteocondutores, estes mostram rápida reação superficial e dissolução de íons causando resposta intra e extracelular; na classe B estão os osteocondutores somente, devido à sua reação superficial lenta e à liberação mínima de íons, resultando em respostas extracelulares; na classe C estão os reabsorvíveis entre 10 e 30 dias devido à sua alta reatividade que é dependente da composição do material (UTECH; BOCCACCINI, 2016).

VBs nanométricos são interessantes devido à sua elevada área superficial, os efeitos das reações de superfície e da dissolução dos íons são mais pronunciados em comparação com os sistemas com partículas com dimensões em ordens de grandeza superiores. Além disso, eles podem ser dispersos em materiais poliméricos em micro e nanoescala, uma vantagem essencial para a fabricação de materiais compósitos, que possibilitou também a aplicação desses materiais cerâmicos em engenharia de tecidos moles (UTECH; BOCCACCINI, 2016).

Entretanto, usados isoladamente, são materiais frágeis, especialmente quando construídos com estrutura porosa. Apresentam baixa resistência mecânica e tenacidade – em valores inferiores aos do osso cortical e trabecular, restringindo sua aplicação à tecidos duros. Uma alternativa para se obter a resistência mecânica similar à do osso é a construção de compósitos de fase inorgânica – VB – em uma matriz polimérica flexível. Obtendo assim, propriedades impossíveis de serem adquiridas considerando os componentes separadamente, e

correspondentes às frações volumétricas de seus constituintes. O processo sol-gel é amplamente utilizado com essa finalidade por permitir a combinação dessas substâncias em escalas moleculares e nanométricas (GUPTA; SANTHIYA, 2017; TOZI et al., 2016; GANTAR et al., 2014; COSTA et al., 2012; MANSUR et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2007).

2.4. Processo sol – gel

O método sol-gel consiste na transformação de um sol em um gel. Um sol é uma suspensão de uma fase sólida de dimensões coloidais em uma fase líquida. Um coloide é uma partícula tão pequena (~1-1000nm) que as forças gravitacionais são desprezíveis sobre ela e as interações de curta distância dominam o sistema, mantendo-as em suspensão. As partículas apresentam movimento Browniano, um movimento aleatório conduzido pelos impulsos gerados pelas colisões intermoleculares (BLINKER; SCHERER, 1990).

O gel é definido como uma fase que contém um esqueleto sólido contínuo enclausurado em uma fase líquida contínua. Tal continuidade confere elasticidade ao gel. Em um sol polimérico, o gel é formado através de ligações covalentes na construção de uma macromolécula que se estende através da solução. Eu um sol particulado, o gel é formado através da união de partículas por forças de van der Walls. Géis gelatinosos são aqueles em que pequenas cadeias poliméricas se unem por *entanglements* (OLIVEIRA, 2007; BLINKER; SCHERER, 1990).

Em comparação a fundição, a rota sol-gel possibilita a obtenção de vitrosilicatos e a formação de híbridos em escalas moleculares ou nanométricas em baixas temperaturas – como a união de polímeros com silício, produzindo um hibrido orgânico-inorgânico (COSTA et al., 2012). Permite ainda a incorporação de agentes biologicamente ativos (LIU et al., 2017; DUCHEYNE; QIU, 1999); com elevada pureza (LIU et al., 2017); e com composições, tamanhos e morfologias variadas que auxiliam na ligação com os tecidos adjacentes (BARRIONI et al., 2017). Proporciona também propriedades biológicas superiores devido a porosidade inerente ao processo e, por consequência, elevada área superficial (BARRIONI et al., 2017).

Geometrias complexas podem ser obtidas ao verter o material no molde antes do processo de gelificação. Mudanças na estrutura e propriedades do material ainda podem ocorrer após a

gelificação devido a continuação de reações químicas de condensação, dissolução e precipitação de monômeros e oligômeros, também através de transformações de fases – a esse processo dá-se o nome de envelhecimento. No envelhecimento há aumento de resistência, dureza e contração da rede; alteração de tamanho médio de poros, porosidade e área superficial. A remoção do solvente ocorre na etapa de secagem e leva ao encolhimento da rede alterando as dimensões do material; ela pode ser feita de forma lenta através da evaporação do solvente; ou de forma acelerada através da extração deste (OLIVEIRA et al., 2007; BLINKER; SCHERER, 1990).

2.4.1. Hidrólise e condensação de silicatos

O material cerâmico produzido pelo método sol-gel possui elevada porosidade e área superficial, sendo ultil como catalizador, filtro, etc. A maioria dos géis formados são amorfos, mas podem ser cristalizados com aquecimento. Para produção de uma cerâmica livre de poros faz-se necessário o aquecimento do gel a temperaturas que levem a sinterização da estrutura. A presença de poros, no entanto, permite que durante o processo de sol, possam ser incorporadas partículas de reforço que ficarão aprisionadas após gelificação. Tais partículas exercem grande influência sobre as propriedades mecânicas finais do material (BLINKER; SCHERER, 1990).

Os alcóxidos metálicos são precursores populares no processo sol-gel porque se hidrolisam facilmente. Essa substância é formada retirando-se um próton da hidroxila de um alcool. Um alcooxido metálico é composto por um metal ou semimetal circundado por ligantes não metálicos, alcoxidos. Podem ser representados na forma [M(OR)n], onde M é o elemento inorgânico formador de rede e R é tipicamente um grupo alquila (COSTA, 2010; OLIVEIRA et al., 2007; BLINKER; SCHERER, 1990).

Os precursores mais utilizados na obtenção de vidros bioativos são o tetraetilortossilicato – TEOS (SiC₈H₂₀O₄) e o tetrametilortossilicato – TMOS (SiC₄H₁₂O₄). A reação de hidrólise do percursor é mostrada na equação 1, em que n é dependente na disponibilidade de moléculas de água na solução. Uma molécula parcialmente hidrolisada pode ainda se unir a outra molécula parcialmente hidrolisada (equação 2) ou a um novo alcoxido metálico (equação 3) (OLIVEIRA et al., 2007; BLINKER; SCHERER, 1990).

$$\operatorname{Si}(\operatorname{OR})_4 + \operatorname{nH}_2\operatorname{O} \to \operatorname{Si}(\operatorname{OR})_{4-n}(\operatorname{OH})_n \tag{1}$$

$$(OR)_3 Si - OH + HO - Si(OH)_3 \rightarrow (OR)_3 Si - O - Si - (OR)_3 + H_2O$$
 (2)

$$Si(OH)_4 + HO - Si(OH)_3 \rightarrow (OR)_3 - O - Si(OR)_3 + ROH$$
 (3)

Entretanto, monômeros com funcionalidades maiores de 2, como alcoxido de silício (f = 4), podem formar uma rede polimérica tridimensional de ramificações complexas, tendo a disponibilidade de monômeros como limite para o tamanho da molécula formada. O gel é formado quando a molécula percola a solução (BLINKER; SCHERER, 1990).

Três reações descrevem o processo sol-gel (equações 4, 5, 6). Os parâmetros de reação que influenciam a química do processo sol-gel são os solventes, os catalizadores, a razão entre os moles de silício e água, a temperatura e o pH da solução (COSTA, 2010). Devido a imiscibilidade de água e alcoxisilanos, alguns solventes ou agentes homogeneizadores como álcoois são adicionados ao sol, estes também participam da cinética de reação da hidrólise. Os catalizadores podem ser ácidos ou básicos. Catalizadores básicos favorecem a hidrólise através de reações nucleofílicas e levam a formação de cadeias mais ramificadas no início do processo. Catalizadores ácidos por sua vez favorecem a condensação através de reações eletrofílicas e levam a formação de cadeias mais longas e menos ramificadas. No entanto, o excesso de água favorece elevada densidade de ligações cruzadas mesmo em pH baixo. Embora a razão molar (r) entre silício e água igual a 2 é, teoricamente, suficiente para que a condensação ocorra, faz-se necessário que esse solvente esteja em excesso para que a condensação aquosa seja a reação preferencial. A temperatura, por sua vez, influencia na velocidade de reação. (OLIVEIRA, 2007; BLINKER; SCHERER, 1990).

hidrólise (4)
Si - OR + H₂O
$$\rightleftharpoons$$
 \equiv Si - OH + ROH
esterificação

$$\begin{array}{c} \text{condensação alcoólica} \\ \text{Si} - \text{OR} + \text{HO} - \text{Si} & \rightleftharpoons & \equiv \text{Si} - \text{O} - \text{Si} \equiv +\text{ROH} \\ & \text{alcoólise} \end{array} \tag{5}$$

$$\equiv Si - OH + HO - Si \qquad \rightleftharpoons \qquad interpretation in the second encoded and the second encoded and$$

O pH 2 é o ponto isoelétrico, onde a carga elétrica líquida da molécula é zero, o que faz com que o tempo de gelificação seja longo. Abaixo do pH 2, a velocidade de polimerização é proporcional a concentração de H⁺. A formação e agregação de partículas ocorre simultaneamente através de colisões randômicas. A adição de HF e, por consequência, a disponibilidade de F⁻ diminui o tempo de gelificação. As equações 7 e 8 descrevem as reações nessa faixa de pH (BLINKER; SCHERER, 1990).

$$\equiv \mathrm{Si} - \mathrm{OH} + \mathrm{H}_3\mathrm{O}^+ \to \equiv \mathrm{Si}^+ + \mathrm{H}_2\mathrm{O} \tag{7}$$

$$\equiv \mathrm{Si}^{+} + \mathrm{HO} - \mathrm{Si} \rightarrow \equiv \mathrm{Si} - \mathrm{O} - \mathrm{Si} = +\mathrm{H}^{+}$$
(8)

Na faixa de pH de 2 e 7 a taxa de condensação é proporcional a concentração de OH⁻. Os silanols mais ácidos são os que contém a maioria das espécies condensadas pela reação rápida. Essas espécies reagem preferencialmente com espécies neutras formando dímeros, trímeros e tetrâmeros de forma mais lenta. A partir daí a reação de ciclização é rápida devido à proximidade das pontas de cadeia e a queda na concentração de monômeros. Espécies condensadas são então agregadas para formação de cadeias e redes. A medida que o pH se aproxima de 2 o crescimento e segregação de partículas ocorre simultaneamente e a partícula para de crescer quando atinge 2-4 nm devido à baixa solubilidade da sílica nesse pH. As equações 9 e 10 descrevem as reações nessa faixa de pH (BLINKER; SCHERER, 1990).

$$\equiv \mathrm{Si} - \mathrm{OH} + \mathrm{OH}^{-} \xrightarrow[\mathrm{rápida}]{} \equiv \mathrm{Si} - \mathrm{O}^{-} + \mathrm{H}_{2}\mathrm{O}$$
(9)

$$\equiv \mathrm{Si} - \mathrm{O}^{-} + \mathrm{HO} - \mathrm{Si} \xrightarrow[\mathrm{lenta}]{} \equiv \mathrm{Si} - \mathrm{O} - \mathrm{Si} \equiv +\mathrm{OH}^{-}$$
(10)

Acima do pH 7 há formação de espécies iônicas. O SiO $(OH)_3^-$ é formado, mas é um ácido fraco, portanto, para formação de SiO $_2(OH)_2^{2-}$ é necessário pH superior a 12. A reação de polimerização dos monômeros ocorre da mesma forma que aquela entre o pH 2 e 7. Entretanto, as partículas formadas são ionizadas e se repelem mutuamente, assim sendo, o crescimento só ocorre por adição de monômeros aos núcleos formados. O crescimento desses núcleos depende principalmente da temperatura, o aumento da temperatura aumenta a solubilidade da sílica permitindo a formação de partículas maiores. A adição de sal é

indispensável para união das partículas e redução do tempo de gelificação. A Figura 4 mostra o efeito do pH no sistema coloidal sílica-água (BLINKER; SCHERER, 1990).



Figura 2 - Efeito do pH nos sistemas coloidas de sílica-água

Fonte: BLINKER; SCHERER, 1990. (Adaptado).

2.5. Goma gelana

A goma gelana é polissacarídeo aniônico linear produzido pelo processo de fermentação aeróbica de carboidratos pela bactéria *Sphingomonas elodea* (AKKINENI et al., 2016; UTECH; BOCCACCINI, 2016; DAMODARAN et al., 2010; DOUGLAS et al. 2014; GANTAR et al., 2014; POSADOWSKA et al. 2015). É polímero bioinerte e facilmente processável em água devido ao seu caráter hidrofílico (GANTAR et al., 2014). É também biodegradável, liberando açúcares naturais de acordo com sua constituição tetrassacarídica formada por unidades de β -D-glucose, β -D-ácido glucurônico e α -L-ramnose em uma razão

molar 2:1:1; distribuídas conforme mostra a figura 2 (DAMODARAN et al., 2010; DOUGLAS et al. 2014; GANTAR et al., 2014).

Esse polímero é bom candidato para a formulação de *scaffolds* biocopatíveis devido a sua atoxicidade, biodegradabilidade e natureza hidrofílica (que facilita a infiltração da matriz adjacente) (TOZZI et al., 2016)

Na sua forma nativa há dois grupos acila (acetil e glicosil) ligados a unidade D-glucose adjacente a unidade de ácido D-glucurônico (BARBOSA, 2016); possuindo em média um acetil em cada mero, e um glicosil a cada dois meros do polímero (figura 2a). Essa composição química dá origem a um gel de baixa viscosidade e elástico. No entanto, esses agrupamentos podem ser extraídos através de tratamento alcalino (figura 2b), dando origem a um produto formador de gel menos viscoso e frágil quanto maior for o seu grau de desacilação (DAMODARAN et al., 2010).





Estrutura química a da goma gelana a) altamente acilada e b) pouco acilada. Fonte: BARBOSA, 2016. (Adaptada)

A GG é muito utilizada na indústria alimentícia e cosmética como agente gelificante. Utech e Boccaccini (2016) ressaltam que a GG se dissolve em água facilmente. As cadeias poliméricas de GG encontram-se estiradas e desorganizadas quando a solução é aquecida acima de 40°C; nessa temperatura a solução é fluida, pouco viscosa. No entanto, a partir da solução aquecida, quando a GG é resfriada, as cadeias poliméricas assumem forma helicoidal e ocorre aumento da viscosidade da solução. A viscosidade das soluções é, portanto, dependente da temperatura.

Por formar solução tixotrópica, o cisalhamento durante resfriamento produz fluido de baixa viscosidade que pode ser vertido, com excelentes propriedades de emulsão e estabilização de suspensões (DAMODARAN et al., 2010). Akkineni et al., (2016) informam que a geleificação é termoreversível em temperatura próxima a temperatura corporal; e Damodaran et al. (2010) salientam que os géis podem ser formados com concentrações tão baixas quando 0,05% em água.

Para estabilização do gel formado, esse polímero pode ser reticulado através da adição de íons monovalentes ou cátions bivalentes (POSADOWSKA et al., 2015; GANTAR et al., 2014). Esses cátions se ligam aos radicais das cadeias poliméricas e formam uma estrutura denominada caixa de ovos. Entretanto, Damodaran et al. (2010) afirmam que íons bivalentes são cerca de 10 vezes mais eficazes na estabilização da rede polimérica. A GG também pode ser reticulada por radiação.

Barbosa et al. (2016) acrescentam que, quando quelatados com cátions monovalentes, a redução do pH tende a elevar a temperatura de fusão, que é 70°C no estado de neutralidade. Para cátions divalentes, no entanto, o pH não influencia na temperatura de fusão, que é aproximadamente 100°C. Pequenas variações na temperatura de fusão e grandes variações de resistência mecânica do gel são obtidas com diferentes concentrações de cátions divalentes adicionadas a solução.

A GG possui alta afinidade com o Ca^{2+} , que mesmo em baixas concentrações, propicia a formação de gel mais rígido e termicamente irreversível devido à formação de pontes iônicas entre os grupos carboxil dos resíduos ácido D-glucurônico. (AKKINENI et al., 2016; BARBOSA, 2016; UTECH; BOCCACCINI, 2016). Essa afinidade indica que o hidrogel é facilmente mineralizável com fosfatos de cálcio, que agregam características bioativas ao material permitindo-o se ligar diretamente aos ossos. Outra vantagem da presença dessa fase mineral é o reforço mecânico e promoção da adesão e proliferação de osteoblastos (DOUGLAS et al. 2014).

O processo de geleificação é descrito por Barbosa (2016) em duas etapas a partir do sol. Na primeira etapa há mudança conformacional das cadeias para uma estrutura dupla-hélice durante o resfriamento da solução e, em seguida, ocorre a união mecânica dessas hélices nos seus pontos de contato. Na segunda etapa, a inserção de sal na mistura ou redução do pH favorece a formação de agregados estáveis e consequente formação do gel. Essa mudança no meio é necessária porque em um ambiente neutro e sem cargas, os aglomerados de GG se repelem naturalmente devido a sua natureza negativa provocada pelos grupos carboxila ligados.

A manutenção do hidrogel, portanto, se dá pelo ancoramento mecânico entre as estruturas helicoidais formadas no resfriamento, e pela interação intermolecular popularmente conhecida como "caixas de ovos" (POSADOWSKA et al. 2015). Essa interação ocorre entre folhas triplas que fixam os íons cálcio, formando zonas de junção, nas cavidades que se encontram entre as mesmas (DAMODARAN et al., 2010).

Depois de liofilizados e rehidratados, os hidrogéis podem dar origem à *scaffolds* esponjosos. No entanto, suas limitadas propriedades mecânicas reduzem a aplicabilidade desse material em engenharia de tecidos ósseos (GANTAR et al., 2014).

2.6. Hidrogéis

Segundo Kocen et al., (2017) e Douglas et al. (2014), o hidrogel é uma rede complexa de polímero hidrofílico contendo enorme quantidade de água enclausurada em sua estrutura (acima de 98%), resultando em complexo comportamento viscoelástico. Quanto a interação entre as fases constituintes, Blinker e Scherer (1990) definem o gel como uma substância que contém esqueleto sólido contínuo enclausurando fase líquida contínua, formando poros menores que 1µm, isso é, fases de dimensões coloidais. São quimicamente ou fisicamente reticulados. As forças que formam a rede interconectada são ligações covalentes para polímeros, emaranhados de cadeias poliméricas para géis gelatinosos, e forças de van der Walls para géis particulados.

As cadeias poliméricas podem formar uma rede interconectada através de reticulações físicas ou químicas. Nas reticulações químicas, as ligações covalentes que unem os grupos laterais das cadeias poliméricas ocorrem pela adição de um composto químico à mistura, como um

íon (ligação iônica). Um exemplo é a adição de cátion bivalente Ca²⁺ para reticulação da GG. Na reticulação física, as cadeias são unidas por *entanglements*, que são as junções provocadas pelo emaranhamento das cadeias. A radiação, mesmo que seja um agente físico, proporciona uma mudança química, sendo portanto uma reticulação química (UTECH; BOCCACCINI, 2016).

Quase todos os tecidos humanos possuem estrutura tridimensional que influencia nas interações mecânicas e químicas com os tecidos adjacentes; e interfere na morfologia, função e destino das células que o compõe. Kocen et al. (1990) e Utech e Boccaccini (2016) discorrem sobre a extrema importância dos hidrogéis na engenharia de tecidos porque esses materiais mimetizam a matriz extracelular. Esses materiais fornecem suporte estrutural às células e infiltração vascular, viabilizando o transporte de nutrientes, oxigênio e metabólitos que mantém a viabilidade celular. A elevada hidratação e biocompatibilidade dos hidrogéis permite o cultivo de células dentro da rede polimérica que é moldável. Controlando-se a composição química e densidade de reticulação, a estrutura da rede e tamanho de poro podem ser ajustados. Os hidrogéis também podem formar matrizes tridimensionais que assumem a forma do molde utilizado no processo de síntese, a forma também pode ser definida através de de impressão ou injeção. As características de biocompatibilidade, processos biodegradabilidade e propriedades biomecânicas são, portanto, variáveis de projeto influenciadas pelo material escolhido, rota de síntese aplicada, e aditivos adicionados.

2.7. Compósitos de hidrogél com aditivo inorgânico

O ambiente celular *in vivo* consiste em matriz extracelular, uma rede tridimensional, fibrosa, incorporada a gel altamente hidratado. A matriz constitui estrutura tridimensional para crescimento celular; garante estabilidade mecânica; possibilita o transporte de metabólitos, nutrientes e células; permite a vascularização e apresentação de sinais biofísicos e químicos. Além disso é dinâmica, isto é, se adaptando às mudanças de pressão e cisalhamento; ainda guia a organização e comportamento celular. Dessa forma, pode-se inferir que um único material não é capaz de mimetizar o meio extracelular, e sim uma composição de materiais (UTECH; BOCCACCINI, 2016).

Grande parte das integrinas, proteínas de adesão presentes na membrana celular, reconhecem o sistema RGD presente em componentes proteicos da matriz extracelular como fibronectina

e fibrinogênio. Dessa forma, o uso de partículas inorgânicas como fosfafos de cálcio e vidros bioativos auxiliam no processo de adesão celular. Os benefícios da incorporação dessas partículas, no entanto, não se restringem ao comportamento *in vivo*. Durante o processo de produção do biomaterial, a incorporação de partículas inorgânicas em redes poliméricas pode ser benéfica para facilitar o processamento de estruturas tridimendionais através da variação da viscosidade e características de fluxo da solução (UTECH; BOCCACCINI, 2016).

As partículas dispersas na matriz polimérica podem não interagir com o polímero, ou podem formar ligações químicas com a matriz resultando em um aprimoramento da densidade de reticulação e, portanto, aumento da resistência e estabilidade mecânica da rede polimérica. No entanto, a presença do aditivo pode perturbar a estrutura da rede polimérica enfraquecendo o hidrogel (UTECH; BOCCACCINI, 2016).

A combinação de hidrogéis com enchimentos inorgânicos visa resultar em materiais altamente biocompatíveis que podem atender aos requisitos mecânicos do local implantado, estimular o comportamento celular desejado e exibir perfis de degradação bem definidos (UTECH; BOCCACCINI, 2016).

Os enchimentos podem ser degradáveis como os biovidros ou persistentes como os nanotubos de carbono. Na primeira situação existe um efeito sinérgico na degradação, alguns polímeros como poliéteres e poliésteres liberam subprodutos ácidos na degradação, enquanto o VB libera subprodutos básicos. Ao combinar ambos, condições neutras são alcançadas. A incorporação de enchimentos ainda altera a hidrofilicidade da matriz, a geração de novas interfaces permite que a água penetre mais facilmente levando a uma degradação mais homogênea do polímero (UTECH; BOCCACCINI, 2016).

É necessária uma degradação simultânea de ambos os materiais para manter as interações estruturais e mecânicas do sistema durante a degradação e para obter os maiores benefícios dos efeitos sinérgicos (UTECH; BOCCACCINI, 2016).

Em compósitos pode ocorrer a mineralização *in situ* ou ainda o início da polimerização / gelificação do hidrogel a partir da superfície de micro ou nanopartículas, o que normalmente resulta em redes de hidrogel extremamente resistentes (UTECH; BOCCACCINI, 2016).

2.8. Espuma híbrida de GG e VB para aplicação biomédica

Para mimetizar, isto é, se assemelhar ao máximo à complexidade do tecido a ser reparado, são utilizados materiais compósitos. Materiais compósitos são aqueles que contém dois ou mais constituintes distintos ou fases em uma escala maior que a atômica, cujas propriedades são significantemente alteradas em relação aos materiais homogêneos. Suas propriedades são controladas de acordo com o formato, fração volumétrica e interface entre as fases distintas. (LAKES, 2000, p.79).

Segundo Utech e Boccaccini (2016), o objetivo dos compósitos é que se alcance efeito sinérgico entre as fases, que resulta no aproveitamento de características benéficas de todas elas. Dessa forma, propriedades benéficas ao projeto são alcançadas ou otimizadas em relação ao que seria possível alcançar com o uso dos materiais isolados; ou ainda, uma desvantagem individual é evitada ou eliminada. Um exemplo de estrutura de compósito é apresentado na Figura 3, ela contempla o compósito formado por partículas inorgânicas dispersas em uma rede polimérica.



Figura 4 - Ilustração da formação de compósitos hidrogel/partículas inorgânicas.

Fonte: UTECH; BOCCACCINI, 2016. (Adaptada).

Tozzi et al. (2016) se referem ao trabalho de GANTAR et al., (2014) e mostram que, em relação ao VB puro, a incorporação de partículas de VB em géis de GG (em razão mássica de 1:1) aumentou o módulo de Young de 0.4 a ~1,2MPa e o limite de resistência a tração de 0.02 para ~0,11MPa. A análise da superfície de fratura também indicou que o material deixou de

sofrer fratura completamente frágil e passou a apresentar certa deformação. Além dessa melhora nas propriedades mecânicas, os autores também constataram melhor bioatividade *in vivo*.

Diante do exposto, esse trabalho visa construir uma matriz híbrida, esponjosa, de proporções variadas de GG e VB fabricados pelo método sol-gel. Ambos os materiais precursores são amplamente estudados na literatura devido a sua biocompatibilidade e demais características osteoprodutoras intrínsecas a cada elemento.

A formação de um híbrido de ambos os materiais já foi estudada por GANTAR et al. (2014), entretanto, com uma metodologia diferente para a síntese do VB, que não envolvia a rota solgel e, portanto, não contava com as vantagens dá utilização desse processo. O trabalho aqui desenvolvido visa, portanto, a percolação simultânea do polímero e do vidro bioativo em um mesmo sol, visando obter uma melhor interação entre as fases. O desenvolvimento da rota de síntese em um mesmo sol também proporciona a redução na quantidade de reagentes utilizados, e economia de tempo; fatores que levam à maior economia e produtividade.

Os resultados dos testes de caracterização visual, físico-química, morfológica, e biológica *in vitro* visam encontrar um destino promissor desse material para aplicação biomédica no reparo de tecido ósseo, levando em conta as vantagens de se usar a rota sol-gel na obtenção de um híbrido bioativo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização da pesquisa, foram utilizados os seguintes reagentes: Água destilada; Goma gelana em pó de baixa acetilação, da marca Sigma-Aldrich®, (GelzanTM CM), e massa molar 1.000.000 g.mol⁻¹; Ácido clorídrico (HCl, 37%, Neon®); Tetraetilortosilicato (TEOS, 98%, Sigma-Aldrich®); Trietilfosfato (TEP, ≥99,8%, Sigma-Aldrich®); Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂, Vetec, MM=147,01g/mol); Ácido Fluorídrico (HF, 50%, Fmaia); e Lauril Sulfato Sódico (LSS, Sigma-Aldrich®).

3.1. Etapas do desenvolvimento do trabalho

A figura 5 apresenta as etapas realizadas na rota de processamento para obtenção de híbridos à base de goma gelana e vidro bioativo.





Fonte: da autora

Foi preparada suspensão de GG em água destilada com concentração de 1,0%(m/v), mantida sob agitação até a completa solubilização do pó, em rotação de aproximadamente 300rpm.

Paralelamente foi preparada solução precursora de VB através da adição dos reagentes TEOS e TEP, em solução de ácido clorídrico com valor de pH igual 2,0±0,1; para atuar como

catalisador do processo de hidrólise (BLINKER; SCHERER, 1990). O TEOS foi hidrolisado utilizando 12:1 como razão molar de água destilada e alcóxido, razão molar comumente utilizada na literatura e adotada por Costa (2010), Oliveira et al. (2007), e Mansur et al. (2012). O tempo de agitação para essa reação de hidrólise foi de 45 minutos. Posteriormente essa solução recebeu TEP e teve mantida sua agitação por mais 30 minutos. As proporçõesadotadas visam a síntese do vidro com proporções em massa equivalentes a 70%SiO₂, 30%CaO e 10%P₂O₅, entretanto, no preparo do sol só foram utilizados o TEOS e TEP como soluções precursoras. Todo o cálcio é oriundo da fase posterior de imersão do compósito.

Ambas as soluções e suspensões foram misturadas nas proporções teóricas em massa de VB:GG equivalentes à 3:1; 4:1 e 5:1 respectivamente. Originando misturas com 75% de VB (75VB), 80% de VB (80VB) e 83,3% de VB (83VB). Os volumes das misturas para obtenção dos três híbridos foram corrigidos com água (pH=2) para que se igualem a amostra de maior volume. Após a homogeneização se deu início o processo de geleificação, nesse processo ocorreu a percolação entre as fases com aprisionamento de quase toda a água presente na mistura. As amostras foram mantidas sob refrigeração e envelhecidas, e posteriormente foram imersas em solução de CaCl₂ 2,0% (m/v) pelo período de 48h.

Os híbridos resultantes foram liofilizados para obtenção das espumas de VB e GG. Os compósitos foram congelados antes que o material fosse levado ao liofilizador. Nessa câmara ou aumento gradatidvo da temperatura e a baixa pressão levou à redução da temperatura de vaporização da água favorecendo à sublimação. Esse processo tem como objetivo a manutenção da estrutura porosa a fim de formar as espumas com menor contração da rede.

Posteriormente foi realizado o processo de caracterização das espumas. As amostras caracterizadas receberam a seguinte nomenclatura: **0VB**: GG em pó fornecida pelo fabricante; **75VB**: Espuma do compósito composto pelas frações em massa correspondentes a 75% de VB e 25%GG (proporção 3:1); **80VB**: Espuma do compósito composto pelas frações em massa correspondentes a 80% de VB e 20%GG (proporção 4:1); e **83VB**: Espuma do compósito composto pelas frações em massa correspondentes a 80% de VB e 20%GG (proporção 4:1); e **83VB**: Espuma do compósito composto pelas frações em massa correspondentes a 83,3% de VB e 16,6%GG (proporção 5:1).

3.2. Caracterização dos materiais

A amostra de GG conforme fornecida pelo fabricante e os compósitos liofilizados foram caracterizados através das técnicas de Termogravimetria (TGA), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR) e Difração de raios X (DRX). A TGA e o DSC visaram caracterizar o comportamento térmico desses materiais; a espectroscopia foi feita a fim de verificar a presença das bandas características de todos os compostos preparados; e o DRX teve por objetivo a identificação de possíveis fases cristalinas formadas com a inserção de cálcio na amostra, bem como a averiguação do caráter amorfo do polímero e do vidro, característica importante para o processo de infiltração celular em um *scaffold.* Os híbridos a base de VB e GG, por sua vez, foram caracterizados por técnicas adicionais de inspeção visual para avaliação da homogeneidade do sistema, observação se houve segregação de fases e averiguação da presença de porosidade. Essas amostras também foram caracterizadas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), acoplada a espectroscopia de energia dispersiva de elétrons (EDS), para fornecer informações quanto a composição química.

Para avaliação do possível comportamento dos compósitos em meio fisiológico foram realizados ensaios degradação e intumescimento em meio aquoso; e foi analisado o comportamento dos materiais após imersão em *Simulated Body Fluid* (SBF).

• Análise visual

O aspecto macroscópico das amostras foi realizado por meio de análise visual e registro através de câmera fotográfica digital (LG H818P G4) com resolução de imagem de 13MP, para identificação de fases segregadas, bem como existência de porosidades.

• Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) acoplado a Espectrometria de Energia Dispersiva (EDS)

A microscopia eletrônica de varredura foi aplicada para avaliação da morfologia, e presença de poros compatíveis a regeneração óssea. Foi utilizado o equipamento da marca Shimadzu, modelo SSX-550 acoplado ao Espectrômetro de Energia Dispersiva (EDS), utilizado para análise da composição química da superfície das amostras. Para esse ensaio, cada hibrido teve uma amostra retirada do bulk do material. Após o período de imersão em SBF as amostras foram novamente analisadas no EDS para verificar a troca iônica com a solução. Antes de

todos os ensaios as amostras foram metalizadas com ouro para obtenção de uma superfície condutora.

• Termogravimetria (TGA)

A GG e híbridos foram analisados termicamente através do ensaio de termogravimetria. Para a obtenção da curva de variação de massa de acordo com o aumento da temperatura pelo ensaio TGA. Foi utilizado o equipamento SII EXSTAR, modelo TG/DTA 7200. Os parâmetros de ensaio foram: atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 90mL.min⁻¹, taxa de aquecimento igual a 10°C min⁻¹, em suporte de alumínio, com faixa de temperatura variando de 10°C a 900°C.

• Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Os materiais, GG e híbridos, foram analisada termicamente através da Calorimetria Exploratória Diferencial. Foi utilizado o equipamento da marca SII EXSTAR, modelo DSC 7020 em atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 90mL.min⁻¹, taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹, com massa aproximada de 2mg em suporte de alumínio, com faixa de temperatura variando de 30°C a 500°C.

• Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourrier (FTIR)

Para identificar os principais grupos químicos presentes no polímero e nos híbridos, associando-os às bandas de vibração evidenciadas nos espectros normalizados obtidos na região do infravermelho, a goma gelana e os híbridos foram analisados através da técnica de obtenção dos espectros de FTIR. Foi adotada a técnica de reflexão transmitida atenuada (ATR), utilizando o espectrofotômetro Nicolet Thermo Scientific 280 com cristal de seleneto de zinco (ZnSe) do Departamento de Química do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. O ensaio foi conduzido na faixa espectral de 400cm⁻¹ a 4000cm⁻¹, com resolução de 4cm⁻¹ e intervalo de 2cm⁻¹.

• Difratometria de raios X

Os parâmetros de cristalinidade da goma gelana, e dos híbridos, foram calculados por meio da análise do difratograma de raios X. Os picos presentes no difratograma foram identificados e o grau de cristalinidade calculado de acordo com a equação 11 a seguir. Nela, GC é o grau de

cristalinidade, AP é a área abaixo dos picos identificados até a sua linha de base, e AT é a área total abaixo do difratograma até a sua linha de base.

$$GC = \frac{AP}{AT} \times 100$$
(11)

No preparo dos híbridos para o ensaio, as amostras foram cortadas com 1mm de espessura e prensadas de modo a obter uma lâmina em torno de 100µm (COSTA, 2008). Os difratogramas foram obtidos no equipamento SHIMADZU XRD 7000. A radiação utilizada foi CuK α (λ =1,54Å), operando com 40kV, 20mA e ângulo 2 θ variando de 4° a 80°, com um passo de 0,02°.

• Degradação e intumescimento em meio aquoso

Seguindo o protocolo adotado por Oréfice (2000), os híbridos foram imersos em água destilada pelo período de 1, 3, 10, e 20 dias. Decorrido cada intervalo de tempo, as amostras foram secas e analisadas por EDS para identificar as trocas iônicas ocorridas com o meio. Nesses intervalos, as massas também foram aferidas para construção de uma curva de variação de massa com o aumento gradual da temperatura (massa x temperatura), de forma a tentar obter informações sobre a degradação do híbrido, em condição mais próxima daquela observada *in vivo*.

A determinação do grau de intumescimento das amostras foi utilizada para avaliar o perfil de hidratação dos híbridos. Inicialmente, as amostras foram secas em dessecador por 72h e pesadas (M₀). Posteriormente, foram imersas em água DI sob temperatura ambiente, obedecendo a relação entre área superficial e volume de solução igual à 0,1cm⁻¹ (ORÉFICE, 2000). As amostras foram pesadas novamente após imersão pelos períodos de 1, 3, 10 e 20 dias. Foram feitas duas pesagens, a primeira após remoção do excesso de água superficial com um papel absorvente para determinação do intumescimento da amostra (M_i); e a segunda após secagem da amostra em dessecador por 72h. O grau de intumescimento (GI) da amostra é dado em porcentagem através da equação 12. A degradação foi analisada após expressão dos dados em um gráfico de perda de massa com o tempo.

$$GI = \frac{M_i - M_o}{M_o} \times 100$$
(12)

• Avaliação após Imersão em SBF

Os híbridos foram imersos em solução simuladora do fluido biológico (Simulated Body Fluid) pelo período de 3 dias, seguindo a relação entre área e volume de líquido igual a 0,1cm⁻¹. (ORÉFICE, 2000). Decorrido o intervalo de tempo, as amostras foram secas em dessecador por 72h e analisadas por EDS para identificar as trocas iônicas ocorridas com o meio.

4. RESULTADOS

Aspecto macroscópico e microscópico dos compósitos

Durante o preparo da suspensão de goma gelana, foi constatado que essa mistura, mesmo em pequenas concentrações, possui alta viscosidade que dificulta a dispersão com o sol do vidro. O aumento da temperatura tendeu a reduzir a viscosidade da suspensão de goma, no entanto, a temperatura é catalizador do processo de geleificação do vidro impedindo que ele se misture adequadamente. Adicionalmente, pHs baixos levaram à geleificação da goma antes que a solução de vidro pudesse ser encorporada à mistura. De forma análoga, a mistura com a solução do vidro que é ácida (pH=2) também ocasionou a rápida geleificação do sistema coma goma. As muitas variáveis envolvidas na rota de formação do compósito formaram uma janela de processamento estreita pela qual ambos os materiais poderiam ser unidos com o objetivo de formar um compósito homogêneo. Por essa razão, esforços iniciais de definição da rota de processamento levaram ao preparo da suspersão de goma gelana em pH neutro que somente foi acidificada quando em contato com a solução ácida do VB. Foi observado que a geleificação da mistura ocorreu em aproximadamente 5 segundos. Durante esse tempo, foi feita a agitação vigorosa do sistema com o objetivo de unir os materiais de forma homogênea.

A imersão dos compósitos em solução de $CaCl_2$ teve o objetivo de induzir reticulações químicas na goma gelana tornando-a mais resistente, e também introduzir íons de Ca na estrutura do vidro bioativo que comumente é formado com frações significativas de óxido de cálcio (CaO). Contudo, quando os cátions Ca^{2+} se ligam à goma gelana a mobilidade das cadeias é reduzida. Por isso, a diminuição da temperatura foi aplicada na tentativa de reduzir a cinética dessas reações de reticulação evitando que ela ocorresse apenas na superfície externa do material. Dessa maneira acredita-se que o material obtido possui estrutura mais homogênea.

Após a formação do gel, os compósitos apresentaram formato cilíndrico semelhante ao do recipiente em que o gel foi formado. Visualmente o gel apresentou-se íntegro, sem defeitos como fissuras ou heterogeneicidades em seu interior; com rugosidades externas possivelmente associados as ligações cruzadas que ocorreram entre a goma gelana e o cálcio. O compósito, no entanto, obteve contração volumétrica após a secagem e liofilização.

A Figura 6 mostra compósitos esponjosos com camada externa mais compacta, indicando maior densidade de reticulações, sugestivo do contato imediato com os íons Ca²⁺ da solução de imersão. Por essa camada exterior não possuir as mesmas características do *buck* do material, ela foi retirada antes que fossem realizadas as demais caracterizações das espumas. Também é possível observar rugosidades, especialmente visíveis das laterais da espuma, que evidenciam a contração volumétrica sofrida no processo de secagem. Os moldes possuem 50mm de diâmetro, e as espumas obtiveram diâmetro final de 40mm. Visualmente, não houveram evidências de segregação se fases. A Figura 6 também exibe as espumas em corte transversal mostrando a sua estrutura porosa.



Figura 6 - Imagem macroscópica e microscópica dos híbridos

Amostras de híbridos com a) 70%, b) 80% e c) 83% de VB após liofilização. Vista da superfícial e em corte transversal. Fonte: da autora.

A elevada viscosidade da suspensão de goma gelana mesmo em baixas concentrações fez com que as proporções em massa dos componentes VB e GG nos hibridos fossem 3:1 (75VB), 4:1(80VB) e 5:1(83VB) respectivamente. Dessa forma, há predominância do vidro em relação à goma gelana nos compósitos. Entretanto, mesmo pequenas quantidades de goma demonstraram serem benéficas na redução da fragilidade do vidro logo após a liofilização. O compósito 83VB apresentou-se mais duro que os demais e com formação de pó que indicava pequenas partículas que se desprenderam da estrutura quando essa foi submetida à pressão no processo de secagem. Ao passo que a amostra 75VB, com maior fração polimérica, estava mais maleável à pressão quando compactada entre os dedos e com ausência ou menor

liberação de fragmentos particulados após a secagem. Entretanto, em inspeção visual, todas as estruturas estavam intactas, sem fraturas ou trincas.



Figura 7 – Imagens de MEV dos híbridos

Imagem de MEV em ampliação de 400x (coluna da esquerda) e 800x (coluna da direitra). As linhas correspondem às amostras a)75VB, b)80VB e c) 83VB. Fonte: da autora.

A Figura 7 é construída com as imagens obtidas na microscopia eletrônica de varredura, com aumentos de 40x e 800x. Nessas imagens é possível observar que não houve segregação de fases visíveis nesses aumentos. A boa mistura entre os componentes dos compósitos é importante para assegurar o efeito sinérgico entre as propriedades físico químicas e mecânicas de cada componente.

A presença de rugosidades nas imagens, visíveis da coluna direita (Figura 7), são características de contração de polimérica. Aliado ao fato de a espuma ter visivelmente reduzido o seu volume em relação as dimensões do gel, essas rugosidades evidenciam o fenômeno de contração que ocorreu durante a liofilização dos compósitos.

Quando não há infiltração de cálcio na goma gelana, esta tende a apresentar morfologia fusiforme; quando essa infiltração ocorre, no entanto, a morfologia tende a ser lamelar (CORREA, 2018). Nas imagens da Figura 7 é possível perceber a presença de estruturas lamelares do polímero, sugerindo que houve reticulação polimérica. Esse resultado indica que a redução da temperatura no processo de imersão dos compósitos em solução de CaCl₂ foi eficiente em permitir a infiltração de cálcio como era desejado.

Os poros, por sua vez, são formados pela interconexão entre essas lâminas e apresentam-se maiores que 300µm, que é a dimensão mínima de poro recomendada para que haja perfusão de células ósseas durante o crescimento celular.

Termogravimetria (TGA)

Os resultados da análise termogravimétrica são apresentados nas Figuras 8 a 11. Para identificação das temperaturas em que houve perda de massa significativa foi feita a curva derivada da TGA no programa OriginPro8®. As faixas de variação de temperatura e perdas de massa correspondentes estão discriminadas nas tabelas 1 a 4 que acompanham as figuras. Os fenômenos térmicos associados a cada faixa de temperatura também encontram-se evidenciados nas tabelas.

A figura 8 e tabela 1 apresentam os resultados da TGA para a amostra de goma gelana conforme fornecida pelo fabricante (0VB). O material apresentou perda de 8% em sua massa na faixa de temperatura até cerca de 83°C, associado a perda de água. Percebe-se nessa etapa

que a perda de massa ocorreu até aproximadamente 100°C, temperatura característica da evaporação da água, antes que houvesse estabilização da massa durante o aquecimento. Posterior a esse processo de desidratação, a amostra seca resultante apresentou redução de massa de 25% em uma etapa de desidratação, que ocorreu próximo a 256°C; dessa vez, da água adsorvida às moléculas de GG que necessitam de energia um pouco superior para se desprenderem. Posterior redução de 52% ocorreu devido à decomposição térmica. A temperatura de decomposição térmica começou em 256°C. Em seguinda, em 600°C, iniciouse o estágio de degradação do polímero com redução de 13% na massa. Nesse último estágio de degradação ocorreram reações endotérmicas de oxidação, seguidas por reações exotérmicas de pirólise (MACHADO et al., 2003). Ao final do ensaio restou um resíduo correspondente a 11% da massa seca inicial.

Figura 8 – TGA da GG em pó (0VB)



Fonte: da autora

Tabela 1 – Resultado da TGA da GG em pó (0)
--

Evento térmico	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)
Desidratação	25 a 83	8
Desidratação	83 a 256	25
Decomposição térmica da GG	256 a 600	51
Degradação da GG	600 a 800	13
Resíduo final	800	11

Fonte: da autora.

A figura 9 e tabela 2 apresentam os resultados da TGA para o híbrido 75VB. O material apresentou perda de 6% em sua massa em um processo de desidratação. A amostra seca teve então uma redução de 26% associada à desidratação da água adsorvida aos constituintes do híbrido; seguida de redução de 30% devido à decomposição polimérica e de 21% devido à degradação. Ao final do ensaio restou um resíduo correspondente a 23% da massa.



Figura 9 – TGA do híbrido 75VB

Fonte: da autora.

Evento térmico	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)
Desidratação	25 a 85	6
Desidratação	85 a 257	26
Decomposição	257 a 458	30
Degradação	458 a 800	21
Resíduo final	800	23

Tabela 2 – Resultado da TGA da amostra 75VB

Fonte: da autora.

A figura 10 e tabela 3 apresentam os resultados da TGA para o híbrido 80VB. O material apresentou perda de 14% em sua massa em um processo de desidratação. A amostra seca teve então uma redução de 27% associado à desidratação da água adsorvida aos constituintes do híbrido; seguida de redução de 23% devido à decomposição polimérica e de 19% devido à degradação. Ao final do ensaio restou um resíduo correspondente a 31% da massa.





Fonte: da autora.

Evento térmico	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)
Desidratação	25 a 97	14
Desidratação	97 a 251	27
Decomposição	251 a 480	23
Degradação	480 a 800	19
Resíduo final	800	31

Tabela 3 – Resultado da TGA da amostra 80VB

Fonte: da autora.

A figura 11 e tabela 4 apresentam os resultados da TGA para o híbrido 83VB. O material apresentou perda de 14% em sua massa em um processo de desidratação. A amostra seca teve então uma redução de 27% associado à desidratação da água adsorvida aos constituintes do híbrido; seguida de redução de 23% devido à decomposição polimérica e de 19% devido à degradação. Ao final do ensaio restou um resíduo correspondente a 31% da massa.





Fonte: da autora.

Evento térmico	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)
Desidratação	25 a 100	12
Desidratação	100 a 251	26
Decomposição	251 a 496	29
Degradação	496 a 800	10
Resíduo final	800	35

Tabela 4 - Resultado da TGA da amostra 83VB

Fonte: da autora

De forma a comparar os processos térmicos ocorridos nos materiais foi constuída a tabela 5 a seguir, agrupando as informações contidas nas tabelas anteriores (1-4).

T	Perda de massa (%)				
Evento termico	0VB	75VB	80VB	83VB	
Desidratação	8	6	14	12	
Desidratação	25	26	27	26	
Decomposição	51	30	23	29	
Degradação	13	21	19	10	
Resíduo final	11	23	31	35	

Tabela 5 – Comparação do resultado da TGA das amostras

Fonte: da autora

A partir da tabela 5 percebe-se que a quantidade inicial de água nos híbridos foi maior nas amostras com maior quantidade de VB, o que evidencia o caráter higroscópico desse material. Mesmo que as amostras tenham sido liofilizadas antes do ensaio, o contato com o ar atmosférico foi suficiente para que novas moléculas de água fossem adsorvidas. No entanto, a água aprisionada na estrutura da espuma correspondeu praticamente à mesma fração em massa em todos os híbridos, e foi semelhante àquela verificada na amostra em pó da GG. Essa característica mostra a eficiência no processo de liofilização das amostras. Evidencia também que a exposição do material à umidade do ar apenas levou à adsorção de moléculas de água, não introduzindo mais moléculas de água na estrutura no material.

A perda de massa na etapa de decomposição polimérica foi reduzida nos híbridos em relação à GG em pó, devido a menor proporção de goma gelana na amostra inicial. A maior variação entre as amostras ocorreu na fase de degradação polimérica e àquelas com menor proporção de goma obtiveram menor perda de massa relativa à degradação do polímero.

No resíduo final restaram os óxidos de silíco, compostos de cálcio e fósforo, e os produtos da combustão dos materiais orgânicos. Considerando somente a massa restante após a perda de água estrutural, adsorvida ao compóstico, percebe-se que as massas percentuais perdidas nos eventos de decomposição e degradação térmica correspondiam a 69% (75VB), 58% (80VB), e 53%(83VB). Essas perdas encontram-se na razão 1,00:0,84:0,76. Essa razão não corresponde a razão de goma presente nas amostras que é 1,00:0,80:0,67 respectivamente. Levando em consideração a amostra OVB, a razão do resíduo final teórico correspondente a GG seria 1,00:1,35:1,53; que também não corresponde aos valores encontrados nos compósitos. De forma análoga, as massas percentuais mantidas no resíduo final, em relação a massa seca após ambas as etapas de desidratação são 31%(75VB), 42%(80VB), e 47%(83VB). Tomando a amostra 0VB como base de cálculo, sabe-se que aproximadamente 15% da massa seca após as etapas de desidratação é mantida como resíduo da combustão do polímero. Portanto, seria esperado que o percentual do resíduo que corresponderia a 26,5% (75VB), 35,9% (80VB) e 40,1%(83VB) fosse proveniente do vidro, fornecendo a razão 1,00:1,35:1,51 . No entanto, a razão nominal de vidro presente nas amostras que é 1,00:1,06:1,11 respectivamente. Tais razões estão evidenciadas na Tabela 6.

Contudo, a imersão dos compósitos em solução de cloreto de cálcio visou a infiltração desse composto na estrutura da goma, como agente reticulante; e na estrutura do vidro bioativo

como um óxido adicional (CaO). O cálcio, portanto, seria um elemento adicional no resíduo final após a termogramiteria. Essa discrepância entre as razões dos componentes do compósito e a quantidade de resíduos obtidos indica, portanto, a incorporação do cálcio no híbrido. Além disso, as razões calculadas sugerem que o vidro reagiu preferencialmente com o cálcio uma vez que o aumento de 11% na proporção de VB da amostra 75VB para a 83VB gerou um aumento de 52% na razão entre os resíduos do 75VB e 83VB.

Como não foi analisada uma amostra 100VB na termogravimetria, não há como por essa análise termogravimétrica apenas, estipular quanto de cálcio foi absorvido. Mas cálculos adicionais podem ser feitos mostrando que se o resídio inorgânico não incluísse óxido de cálcio – e tomando o resídio inorgânico do 75VB como sendo apenas do vidro bioativo sem óxidos de cálcio – as proporções de VB nas amostras baseadas em seus resíduos deveriam ser aproximadamente 75%, 107% e 122%. Como essas proporções são, na verdade, 75%, 80% e ~83%, esse resultado mostra que o cálcio foi amplamente absorvido nas amostras com maior quantidade de VB.

	75VB	80VB	83VB	Razão
Porcentagem de GG	25,0%	20,0%	16,7%	1,00:0,80:0,67
Porcentagem de VB	75,0%	80,0%	83,3%	1,00:1,06:1,11
Perda percentual de massa na decomposição e degradação	69%	58%	53%	1,00:0,84:0,76
Resíduo final	31%	42%	47%	1,00:1,35:1,52
Resíduo final teórico correspondente a GG	4,5%	6,1%	6,9%	1,00:1,35:1,53
Resíduo final teórico correspondente a VB	26,5%	35,9	40,1%	1,00:1,35:1,51
Fonte: da autora	1			

Tabela 6 - Análise da termogravimetria

Por fim, é importante ressaltar que não ocorrem nos híbridos eventos térmicos distintos àqueles evidenciados na amostra 0VB uma vez que o vidro é um material cerâmico que sofre alterações térmicas apenas em temperauras muito elevadas, superiores às do ensaio. No entanto, houve deslocamento das curvas quanto à temperatura em que os eventos térmicos ocorreram; indicando que houve interação entre os materiais.

Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

A calorimetria diferencial exploratória da GG e dos compósitos encontram-se na Figura 12. Na DSC da goma gelana apresentada percebe-se picos endotérmicos em 51°C e 218°C referentes a desidratação do polímero. O pico exotérmico em 247°C pode estar associado à degradação polimérica. Nos híbridos, no entanto, existem um ponto de inflexão próximo a 28°C que sugere a degradação polimérica, e picos endotérmicos próximos a 100°C associados a volatização da água fisicamente absorvida no material. Essa volatização não encontra-se presente na amostra de GG porque o ensaio foi feito no polímero como entregue pelo fabricante. À direita da imagem encontra-se uma porção do gráfico ampliada. Nela é possível observar os picos exotérmicos das amostras. Para a GG, essa temperatura sugere degradação polimérica. Para os híbridos, o fluxo de calor é atenuado nessa transformação devido a quantidade inferior da fase polimérica. Siqueira e Zanotto (2013) mostram a temperatura de cristalização do vidro bioativo superior a 800°C, temperatura não explorada nesse ensaio. As informações contidas nesse gráfico, portanto, são condizentes com àquelas retiradas do ensaio termogravimétrico.





Fonte: da autora

Espectroscopia de Infra Vermelho (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram realizados para analisar a interação química entre o polímero goma gelana e o material cerâmico vidro bioativo após a fabricação dos compósitos. Os espectros da GG conforme fornecido pelo fabricante, 0VB, e dos compósitos de proporção 75%VB (75VB), 80%VB (80VB), e 83%VB (83VB) mostram bandas similares aos reportados na literatura e estão apresentados na Figura 13.

O espectro de infravermelho da amostra de GG em pó, 0VB, apresentado na figura 13(a), exibiu uma banda larga entre 3000cm⁻¹ e 3600cm⁻¹, associado às vibrações O-H, e banda em torno de 2886cm⁻¹, relacionado ao estiramento dos grupos C-H. As bandas em 1590cm⁻¹ e 1394cm⁻¹, por sua vez, estão relacionadas às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico dos ânions carboxilato respectivamente. Em 1020cm⁻¹ o pico identificado corresponde às estiramento da ligação C-O. Os comprimentos de onda encontrados estão próximos àqueles reportados por Dhanka et al. (2018), Arjama et al. (2018), Melo (2016), Laia (2015) e Hamil et al (2012) para as amostras de GG puras. A tabela 7 foi construída para identificação das principais bandas associado à elas os respectivos grupos químicos do polímero, GG.

Bandas	Grupos químicos
3334cm ⁻¹	Estiramento de O-H
2920cm ⁻¹	Estiramento de C-H
1600cm ⁻¹	Estiramento assimétrico de COO-
1398cm ⁻¹	Estiramento simétrico de COO-
1020cm ⁻¹	Estiramento de C-O

Tabela 7 – Principais bandas de absorção de infravermelho para GG (0VB)

Fonte: da autora.

O espectro de FTIR das amostras dos compósitos, que são mostrados na figura 13(b-d), apresentam absorção das principais bandas discriminadas na tabela 8 que se segue. As bandas cujos comprimentos de onda estão próximos a 3345cm⁻¹ associadas ao estiramento do grupo hidroxila (O-H) presentes nos anéis de glicopiranose (β -D-glucose) do polímero. Seguindo os dados encontrado na biografia, como Melo (2016) e Santos (2014), no VB também ocorre o estiramento nas hidroxilas presentes nos grupos silanois superficiais, SiO–H. A adição de VB nos compósitos leva, portanto, ao aumento das bandas de transmitância nessas regiões. Esse

pico é comumente encontrado em amostras higroscópicas como as constituintes do compósito.





Fonte: da autora.

Próximo a 2965cm⁻¹ a banda associada ao estiramento do grupo C-H, indicando a vibração dos grupos -CH₂ e -CH₃. Esse pico se tornou menos proeminente nos híbridos em relação a amostra 0VB, mostrada na figura 13a, uma vez que a quantidade de GG foi reduzida.

Nos compósitos as bandas próximas a 3345cm⁻¹ apresentaram maior intensidade em relação a 0VB e englobaram parte das bandas próximas a 1965cm⁻¹, esse resultado sugere a presença do complexo dos cátions Ca²⁺ com o grupo carboxilato. A diminuição na intensidade do pico posicionado em 1020cm⁻¹ corrobora com essa interpretação.

Próximas a 1600cm⁻¹ e a 1410cm⁻¹ as banda são associada à presença de de anions carboxilatos COO⁻, sendo estes estiramentos simétricos e assimétricos respectivamente. No entanto, nesse comprimento de onda também ocorre a deformação das moléculas de água presentes nas amostras. Por isso, as bandas próximas a 1410 cm⁻¹ ficam mais largas após a adição do VB, provavelmente pelo dobramento do O-H que sobrepõe o pico anteriormente visível nessa região referente a presença de ânions carboxilatos COO⁻.

As bandas coincidentes nos compósitos, encontradas em 1233cm⁻¹ e 1070 cm⁻¹ estão relacionadas aos modos vibracionais de estiramento das ligações Si–O–Si, mas também são percepitíveis quando há presença de fosfatos na amostra. Essas bandas foram parcialmente encobertas por aquela associada ao estiramento de C-O da GG, mas permanecem evidentes nos compósitos.

Bandas (cm ⁻¹)		Forto		
75VB	80VB	83VB	Grupos químicos	Fonte
3343	3356	3334	Estiramento O-H da água do VB e GG	LAIA, 2015.
2986	2989	2919	Estiramento de C-H da GG	LAIA, 2015.
1600	1606	1600	Dobramento O-H da molécula de água do VB	COSTA, 2010
1000	1000	1000	Estiramento assimétrico de COO-	COSTA, 2008
1396	1427	1413	Estiramento simétrico de COO ⁻ da GG	LAIA, 2015
1233	1233	1233	estiramento das ligações Si-O-Si	COSTA, 2008
1020	1022	1022	Estiramento C-O da GG	LAIA, 2015
1070	1070	1070	estiramento das ligações Si-O-Si	COSTA, 2008
987	992	994	Estiramento assimétrico Si-O-Si no SiO4	MANSUR et al, 2004
707))2	<u> </u>	tetraédrico do VB	COATS, 2000
950	950	946	Estiramento da ligação Si-OH do VB	PEREIRA et al., 2005
				MANSUR & COSTA, 2008
800	798	811	Estiramento simétrico da ligação Si-OH do VB	COSTA et al., 2008

Tabela 8 – Principais bandas de absorção de infravermelho para os compósitos

Fonte: da autora.

Próximas a 1150cm⁻¹ as bandas estão associadas ao estiramento do C-O na GG; em 990cm⁻¹ ao estiramento assimétrico Si-O-Si no SiO₄ tetraédrico do VB; em 950cm⁻¹ as estiramento do silanol (Si-OH) no VB; e por fim, em 805cm⁻¹ ao estiramento simétrico do silanol. Contudo, essa vibração do grupo silanol é mais evidente na amostra 75VB.

O ligeiro deslocamento das bandas comuns às amostras sugere que houve interação entre as fases constituintes dos compósitos.

Difração de raios X

Os difratogramas das amostras foram construídos e estão apresentados na Figura 14. Neles, as fases cristalinas foram normalizadas e a linha de base subtraída para evidenciar os picos de difração. Todos os materiais apresentaram padrão de difração típicos de materiais semicristalinos, com bandas largas de difração e picos presentes em regiões específicas. O grau de cristalinidade (GC) foi equivalente a 8% (GG), 3% (70VB), 4% (80VB), e 1% (83VB). As amostras reduziram em mais de 50% seu GC quando misturados com o vidro bioativo, um material amorfo. Essa resultado mostra a eficiencia da rota sol gel na formação de vidro amorfo sem que sejam necessários tratamentos térmicos posteriores á síntese. O GC foi calculado de acordo com a equação 13 em que AP é a área dos picos e AT a área total sob a curva. Os picos considerados nesse cálculo encontram-se em destaque na Figura 14 e tabelados na Tabela 9.

$$GC = AP/AT$$
(13)

As bandas largas de difração, presentes em todas as amostras, evidenciam o caráter amorfo das mesmas. Na amostra de GG em pó (0VB) picos locais de difração com alta intensidade estão localizados em $2\theta = 10^{\circ}$ (d=0,928nm); e 20° (d=0,457nm) e são comumente retratados na literatura.

Os picos encontrados em 22° e 44,5° indicam a presença de cloreto de sódio; e demais picos identificados indicam a presença de carbonatos e fosfatos de cálcio (NUNES et al., 2017; SANTOS et al., 2015; BORLINI et al., 2005).



Figura 14 – Difratogramas de raios X da amostra OVB e compósitos

Difratogramas das amostras 0VB, 75VB, 80VB, e 83VB normalizados e com linha de base subtraída para melhor visualização dos picos. Fonte: da autora.

Tabela 9 – Picos de difração presentes no DRX das amostras

	20						
	10 °	20 °	22°	28 °	38,5 °	40,5 °	44,5 °
0VB	Х	Х		Х			
75VB					Х		Х
80VB			Х	Х		Х	
83VB	Х				Х		Х
Fonte:	da auto	ora					

Entre os compósitos percebe-se uma tendência de redução na cristalinidade quanto maior é a porção de VB na mistura, o que pode ser associada a estrutura amorfa desse material. No entanto, a amostra 80VB apresenta fases cristalinas que as demais não apresentaram; tendo com isso um padrão diferente das demais. Com isso, é possível inferir que as fases dentro desse compósito estão separadas, e o ensaio captou uma parte cristalina que apresentava cristais identificados como cloreto de sódio, carbonatos e fosfatos de cálcio.

Ensaio in vitro de degradação e entumescimento em meio aquoso

Os resultados de perda de massa e grau de hidratação das amostras com 5, 10, 15 e 20 dias são apresentadas nas Figuras 15 e 16 respectivamente.

Estudos mostram que a GG não tende a ser hidrolisada rapidamente, mantendo sua massa estável; Silva-Correia et al. (2010) não notou perda aparente no período de 30 dias, tempo superior ao estudo aqui realizado. A perda de massa se deve, portanto, a degradação do VB e à sua interação com a GG. Rahaman et al. (2011), no entanto, mostra que a massa do VB tende a se estabilizar após imersão prolongada em meio aquoso devido a deposição de fosfatos de cálcio oriundos dos íons liberados da estrutura durante o processo de degradação. Aumentos de massa se devem, possivelmente, à deposição de íons que se desprenderam nos dias iniciais de imersão. A extrapolação dos dados indicam que as massas finais das amostras em t ∞ (t>>20dias) correspondem a 50±3%.

Para compreensão do comportamento degradativo do material de estudo, para as amostras 75VB e 83VB, o gráfico apresentado na Figuras 15 e 16 foram dividido em duas regiões: R1 e R2. Em cada uma delas foi calculada a taxa K que é apresentada junto com a Figura 15 e corresponde a taxa de variação de massa calculada através da fórmula equação 14 em que ΔM é a variação percentual de massa e Δt a variação do tempo em dias:

$$K = \frac{\Delta M}{\Delta t}$$
(14)

Através dessas constantes percebe-se uma diminuição rápida da massa dos híbridos, correspondendo a uma queda em massa superior a 50% da massa inicial nos primeiros 10 dias. Após esse período, há uma tendência de aumento de massa nas amostras 75VB e 83VB, e uma persistencia na queda de massa para a amostra 80VB.

Observando a tendência descrita por Rahaman et al. (2011) e a extrapolação dos dados já observada, sugere-se que, a longo prazo, o comportamento da amostra 80VB segue o mesmo perfil das demais. Entretanto, no tempo de estudo, o comportamento do compósito 80VB foi influenciado pela interação microestrutural entre seus componentes, como indicado pelo DRX. A segregação de fases cristalinas e amorfas proporciona um maior número de interfaces que funcionam como regições de ataque em que a água pode se infiltrar e acelerar o processo de degradação do compósito.

O perfil de hidratação dos híbridos durante o mesmo período de 20 dias é apresentado na Figura 16. O gráfico mostra que todos os híbridos são higroscópicos e aumentaram a sua massa em aproximadamente 500% em relação a massa seca inicial. Assim como a perda de massa, a hidratação tende a estabilizar após o décimo dia.



Figura 15 – Perda percentual de massa dos híbridos

Perda de massa dos híbridos 75VB, 80VB, e 83VB com o intervalo de 1, 5, 10, e 20 dias e taxa de perda de massa dividido por regiões. Fonte: da autora.



Figura 16 – Perfil de hidratação os híbridos

Perfil de hidratação dos híbridos 75VB, 80VB, e 83VB com o intervalo de 1, 5, 10, e 20 dias. Fonte: da autora.

Teste in vitro – imersão em SBF

Resultados de EDS dos híbridos antes e após imersão em SBF estão apresentados na Figura 17 e revelaram que regiões distintas de uma mesma amostra sob a qual incidiu o feixe de raios X apresentaram diferentes proporções elementares, evidenciando regiões de segregação de fases em nível micrométrico. As amostras perderam quantidades significativas de fósforo para o ambiente (>80%), incorporaram sódio do meio, tendo maior afinidade com esse elemento a amostra com maior quantidade de GG. As amostras 75VB foi a única que absorveu quantidade significativa de cálcio, representando um aumento de 36% em relaçao a quantidae inicial. No entanto, essa amostra tinha menor quantidade de cálcio inicialmente. Tal resultado, aliado à absorção de Na, sugere que a GG possui alta afinidade com esses cátions, e que, com a degradação em meio aquoso, abriram-se mais caminhos para que os íons tivessem contato com esse material.

A presença de cálcio no EDS anterior a imersão em SBF confirmou a presença de cálcio no compósito. É possível perceber que o híbrido com maior quantidade de VB reteve mais cálcio, corroborando com o resultado encontrado na TG e discutido anteriormente. No entanto, os resultados posteriores à imersão em SBF mostram que a presença de cálcio aumentou de forma significativa apenas no compósito com maior proporção de goma. Esse sugere que o vidro tem afinidade com o cálcio, mas também o perde facilmente. A goma gelana, no entanto, além de ser reativa com o cálcio disponível no meio, tem maior tendência a retê-lo quando imersa em solução SBF. O EDS pontual, no entanto, é realizado em uma pequena área da amostra. A representatividade da imagem e contagem de elementos depende, portanto, da homogeneidade do sistema. Os valores numéricos não são, por isso, sugestivos; não precisos.

A presença de cálcio no EDS anterior a imersão em SBF confirmou a presença de cálcio no compósito. É possível perceber que o híbrido com maior quantidade de VB reteve mais cálcio, corroborando com o resultado encontrado na TG e discutido anteriormente. No entanto, os resultados posteriores à imersão em SBF mostram que a presença de cálcio aumentou de forma significativa apenas no compósito com maior proporção de goma. Esse sugere que o vidro tem afinidade com o cálcio, mas também o perde facilmente. A goma gelana, no entanto, além de ser reativa com o cálcio disponível no meio, tem maior tendência a retê-lo quando imersa em solução SBF. O EDS pontual, no entanto, é realizado em uma pequena área da amostra. A representatividade da imagem e contagem de elementos depende, portanto, da homogeneidade do sistema. Os valores numéricos não são, por isso, sugestivos; não precisos.

É importante notar que a proporção entre vidro e goma na amostra 83VB manteve-se praticamente constante antes e após imersão em SBF. Esse resultado sugere que, embora o vidro retenha melhor o cálcio no processamento da espuma, e a goma realize esse papel após imersão em meio biológico; essa composição garante que no momento do implante exista cálcio disponível para reação com o tecido adjacente, e que a disponibilidade desse cátion se mantenha nos primeiros dias. Esse resultado é mais interessante do que o dos demais materiais que, embora possua maior quantidade de goma gelana assegurando maiores níveis de cálcio dias após o implante, não dispõe de uma reserva inicial tão alta como a do híbrido 83VB.



Figura 17 – EDS comparativo dos híbridos antes e após imersão em SBF

Amostras analisadas com os mesmos parâmetros do equipamento e dados normalizados. Fonte: da autora

As imagens feitas após imersão dos compósitos em SBF revelaram estruturas puntiformes que sugerem a presença de fosfatos de cálcio. A razão entre esses elementos, no entanto, não pôde

ser aferida devido a uma limitação da técnica. O EDS, ainda que pontual, seleciona uma pequena área em que a matriz também é selecionada, não apenas as estruturas puntiformes. Contudo, a variação na concentração de íons de cálcio e fósforo e o aumento da razão Ca/P, quando associado aos espectros de FTIR, sugerem a troca iônica do compósito com o meio e formação de fosfatos de cálcio.

A Figura 18 mostra as estruturas formadas após a imersão dos compósitos em SBF. A figura 18a é representativa de todo o material ensaiado porque as imagens obtidas nas demais regiões são semelhantes a essa apresentada. As figuras 18b e 18c, contudo, não são representativas. A formação desses cristais não ocorreu de forma uniforme em toda a espuma, houve concentração de cristais em algumas regiões específicas, e a maior parte dos compósitos apresentavam-se livre de cristais. A menor ocorrência de cristais e a falta de uniformidade na distribuição deles ratificam a afirmação de que a goma gelana tem maior facilidade de reter ou até mesmo atrair cálcio presente no meio aquoso (SBF).

Figura 18 – Microscopia eletrônica de varredura dos híbridos



Imagens obtidas em MEV com aumento de 2000x. (a)75VB, (b)80VB, e (c)83VB. Fonte: da autora.

5. CONCLUSÕES

É possível concluir que a metodologia de processamento utilizando a rota sol-gel para unir a goma gelana e o vidro bioativo foi eficaz para obtenção de compósitos porosos e morfologicamente estáveis. Utilzando um único sol, e eliminando etapas de secagem do VB antes de o unir à GG, foi possível desenvolver uma rota mais mais econômica e mais ágil do que àquelas exploradas na literatura.

Com a inspeção visual conclui-se que foram fabricados compósitos homogêneos, com tamanho de poro adequado a perfusão óssea e angiogênese, com presença de cálcio que aumenta a bioatividade do material.

Com a análise termogravimétrica e calorimetria exploratória diferencial ficam evidenciado os eventos térmicos e as proporções entre as massas percentuais dos resíduos finais corroborando com a afirmação de que houve infiltração de cálcio na estrutura e interação entre as fases.

O ensasio de FTIR evidencia as bandas características de ambos os componentes da mistura, goma gelana e vidro bioativo, bem como a interação que ocorre entre eles e formação de complexos que envolvem íons de cálcio.

Através da difração de raios X percebe-se que o cálcio incorporado na estrutura favorece a formação de carbonatos e fosfatos de cálcio. Entretanto, a amostra 80VB apresentou estruturas cristalinas não visíveis nas demais. Em conjunto com as demais análises em que esse compósito apresentou comportamento levemente diferente, conclui-se que a homogeneização desse sistema não foi rápida e eficaz o suficiente para evitar a formação de interfaces. Interfaces estas formadas entre as fases polimérica e cerâmica onde cristais formados tem facilidade de se depositarem, e regiões onde a degradação é acelerada, resultado evidente na fase de ensaio degradativo *in vitro*.

A degradação dos compósitos e perfil de hidratação em água confirmam a tendência em manter a estabilidade da amostra após 5 dias, bem como a sua hidrofilicidade, importante para interação com o meio em que um *scaffold* é implantado.

A composição elementar feita com auxílio de EDS antes e após imersão em SBF bem como as microscopias evidenciam que os compósitos realizam trocas ionicas com o meio biológico simulado e tendem a formar fosfatos de cálcio, importantes indicadores bioativos.

Com base nos resultados obtidos em cada uma das técnicas é possível, portanto, perceber que a matriz é estável para crescimento tecidual, mantem a sua morfologia mesmo após secagem e rehidratação. A adição de goma gelana ao compósito concede menor fragilidade à espuma, e favorece a precipitação de cálcio na superfície do híbrido. Embora o vidro, mesmo sem cálcio, já apresente elevada bioatividade, especialmente quando fabricados com elevada área superficial; a presença desse elemento favorece ainda mais a bioatividade de um biomaterial.

Considerando que as caracterizações das espumas mostraram que a amostra 83VB apresentou maior absorção de cálcio durante o processamento, e que a proporção entre VB e GG assegurou a disponibilidade praticamente constante de íons cálcio após três dias de ensaio *in vitro*. Conclui-se que essa amostra é a mais promissora para aplicação em reparo ósseo.

Ensaios de resistencia mecânica não foram realizados devido à complexidade encontrada em prender o material em garras para o ensaio de tração. O ensaio mecânico é, no entanto, uma etapa importante a ser explorada em trabalhos posteriores, bem como ensaio de porosidade e imagens nanométricas para construção eficaz de um modelo da espuma.

A espuma de goma gelana e vidro bioativo é, pelas razões apresentadas, promissora para aplicação em engenharia de tecidos ósseos. Essa importante aplicabilidade e presente demanda aponta a relevância dessa pesquisa e endossa a necessidade de prosseguimento nas caracterizações dos compósitos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKINENI, A. et al. Highly Concentrated Alginate-Gellan Gum Composites for 3D Plotting of Complex Tissue Engineering Scaffolds. **Polymers,** Dresden, v. 8, n. 5, p.1-16, abr. 2016.

ALBERTS, Bruce et al. Tecidos Especializados, Células-tronco e Renovação de Tecidos. In: ALBERTS, Bruce et al. **Biologia Molecular da Célula.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. Cap. 23. p. 1417-1484.

ARJAMA, Mukherjee et al. Sericin/RBA embedded gellan gum based smart nanosystem for pH responsive drug delivery. **International Journal Of Biological Macromolecules**, Tamiu Nadu, v. 120, p.1561-1571, dez. 2018.

BARBOSA, Eduardo J. **Avaliação da goma gelana como aglutinante em formulações de pellets contendo teofilina**. 2016. 112 f. Dissertação (Mestrado) – Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2016.

BARRIONI, Breno Rocha et al. Sol–gel-derived manganese-releasing bioactive glass as a therapeutic approach for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science**, Belo Horizonte, v. 52, n. 15, p.8904-8927, mar. 2017.

BLINKER, C. J.; SCHERER, George W. Sol-gel science. London: Academic Press, 1990. 909p.

BORLINI, M. C. et al. Cinza da lenha para aplicação em cerâmica vermelha. parte I: características da cinza. **Cerâmica**, Campos dos Goytacazes, v. 51, n. 319, p.192-196, set. 2005.

BOSE, S. et al. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends in Biotechnology**, Pallman, v.30, n.10, p.546-554, Oct. 2012.

COATES, John. Encyclopedia of analytical chemistry: Interpretation of infrared spectra, a pratical approach. R. A. Meyers. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000. p.10815-10837.

COHRS, Nicholas H. et al. Bioactive glass containing silicone composites for left ventricular assist device drivelines: role of Bioglass 45S5® particle size on mechanical properties and cytocompatibility. **Journal of Materials Science**, [s.l.], v. 52, n. 15, p.9023-9038, mar. 2017.

CORREA, Letícia Tasca dos Reis. **Desenvolvimento e caracterização de scaffolds 3D de alginato de sódio e goma** gelana. 2018. 114f. Dissertação (Mestrado) – Engenharia de Materiais, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

COSTA, Hermes de Souza; ROCHA, Magda Francisca; ANDRADE, Giovanna Ivo; BARBOSA-STANCIOLI, Edel Figueiredo; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; ORÉFICE, Rodrigo Lambert; VASCONCELOS, Wander Luiz; MANSUR, Herman Sander. **Sol-gel derived composite from bioactive glass-polyvinyl alcohol.** Journal of Materials Science, v.43, p.494-502, 2008 COSTA, Hermes de Souza. **Síntese, caracterização e avaliação do comportamento degradativo de híbridos porosos de poli (álcool vinílico)/vidro Bioativo.** 2010. 145 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

COSTA, Hermes S. et al. Engineered hybrid scaffolds of poly(vinyl alcohol)/bioactive glass for potential bone engineering applications: synthesis, characterization, cytocompatibility, and degradation. **Journal of Nanomaterials**, [s.l.], v. 2012, p.1-16, 2012.

DAMODARAN, Srinivasan et al. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900 p.

DHANKA, Mukesh; SHETTY, Chaitra; SRIVASTAVA, Rohit. Methotrexate loaded gellan gum microparticles for drug delivery. **International Journal Of Biological Macromolecules**, Mumbai, v. 110, p.346-356, abr. 2018.

DOUGLAS, T. E. L. et al. Injectable self-gelling composites for bone tissue engineering based on gellan gum hydrogel enriched with different bioglasses. **Biomedic Materials**, [s.l.], v.9, n.4, p 1-14, jul. 2014.

DOUGLAS, Thimothy E. L., et al. Novel injectable, self-gelling hydrogel-microparticle composites for bone regeneration consisting of gellan gum and calcium and magnesium carbonate microparticles. **Biomadical Materials**, [s.l.], v.11, n.1, p 1-6, Nov. 2016.

DUCHEYNE, P.; QIU, Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. **Biomaterials**, Philadelphia, v. 20, n. 23-24, p.2287-2303, dez. 1999

FELIX, Franciele T. Síntese e caracterização de compósitos de fosfato de cálcio e nanofibra de celulose visando aplicação no reparo de tecidos ósseos. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, Viçosa, v.3, n.8, p.1209-1226, Dez. 2017.

FLORENCIO-SILVA, Rinaldo et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2015, p.1-17, 2015.

GANTAR, Ana et al. Nanoparticulate bioactive-glass-reinforced gellan-gum hydrogels for bone-tissue engineering. **Materials Science And Engineering: C,** [s.l.], v. 43, p.27-36, out. 2014.

GKIONI, Katerina et al. Mineralization of Hydrogels for Bone Regeneration. **Tissue Engineering**, Nijmegen, v. 16, n. 6, p.577-585, dez. 2010.

GORODZHA, S. et al. High-resolution synchrotron X-ray analysis of bioglass-enriched hydrogels. Journal of Biomedical Materials Research Part A, [s.l.], v. 104, n. 5, p.1194-1201, fev. 2016

GUPTA, Nidhi; SANTHIYA, Deenan. In situ mineralization of bioactive glass in gelatin matrix. **Materials Letters**, Delhi, v. 188, p.127-129, fev. 2017.

HAMIL, N. F. A., et al. Gellan gum-lol gel polymer electolytes, **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, [s.l.], v. 554, n. 1, p. 232-238, Jan. 2012.

HOERSTRUP, Simon P.; VACANTI, Joseph P. Overview of tissue engineering. In: RATNER, Buddy D. et al. (Eds.). **Biomaterials science:** an introduction to materials in medicine. 2. ed. San Diego: Elsevier, 2004. p. 712-728.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa; CARNEIRO, José. Tecido Ósseo. In: JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa; CARNEIRO, José. **Histologia Básica:** Texto e Atlas. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. Cap. 8. p. 131-148.

KOCEN, Rok et al., Viscoelastic behaviour of hydrogel-based composites for tissue engineering under mechanical load. **Biomedical Materials**, Ljubljana, v.12, n.12, p. 1-11. Mar. 2017.

KRISHNA, K. Arun; VISHALAKSHI, B.. Gellan gum-based novel composite hydrogel: Evaluation as adsorbent for cationic dyes. **Journal Of Applied Polymer Science**, Karnataka, v. 134, n. 47, p.45527-45527, 7 ago. 2017

LAIA, Andréia G. S. **Estudo de filmes e hidrogéis a base de alginado e goma gelana visando aplicações na regeneração de discos intervertebrais**. 2015. 113f. Dissertação (Mestrado) – Engenharia de Materiais, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

LAKES, Roderic S. Composite biomaterials. In: PARK, Joon B.; BRONZINO, Joseph D. **Biomaterials:** principles and applications. 2. ed. Boca Ranton: CRC, 2000. p 79-93.

LANGER, Robert; VACANTI, Joseph P. Tissue engineering. Science, [s.l.], v. 260, p. 920-926, n. 5110, 14 mai. 1993.

LIU, Tao et al. Facile synthesis of hollow bioactive glass nanospheres with tunable size. **Materials Letters**. Hangzhou, n.190, p. 99-102. Mar. 2017.

MACHADO, Gilmara de Oliveira; REGIANI, Anelise Maria; PAWLICKA, Agnieszka. Carboxymethylcellulose derivatives with low hydrophilic properties. **Polimery**, v.48, p.273-279, 2003.

MANSUR, Herman Sander; COSTA, Hermes de Souza. Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly (vinyl alcohol)/chitosan/bioactive glass hybriid scaffold for biomedical applications. Chemical Engineering Journal, v.137, p.72-83, 2008.

MANSUR, H. S. et al. Mechanical behavior of nanostructured hybrids based on poly(vinyl alcohol)/bioactive glass reinforced with functionalized Carbon nanotubes. **Journal of Nanomaterials**, [s.l.], v. 2012, p.1-9, 2012.

MELO, Bárbara Machado. Síntese e caracterização de matrízes híbridas tridimensionais de vidro bioativo reforçadas com polímero poli (àcido acrílico) (PAA). Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. Dissertação. Belo Horizonte. 2016, 92p.

MIOLINO, Giulia et al. Electrophoretic deposition of spray-dried Sr-containing mesoporous bioactive glass spheres on glass-ceramic scaffolds for bone tissue regeneration. **Journal Mater Sci**, Turin, v. 51, n. 15, p. 9103-9114, Mar. 2017.

NOORI, A et al. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine**, [S.l.], v.12, n.8, p.4937-4961, July. 2017.

NUÑEZ, Camila Corral et al. Enhanced bioactive properties of BiodentineTM modified with bioactive glass nanoparticles. **Journal Of Applied Oral Science**, Santiago , v. 25, n. 2, p.177-185, abr. 2017.

OLIVEIRA, Agda A. R et al. Avaliação das propriedades mecânicas de espumas híbridas de vidro bioativo/álcool polivinílico para aplicação em engenharia de tecidos. **Matéria (Rio de Janeiro)**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 140-149, 2007.

OLIVEIRA, Agda A. R. **Síntese e caracterização de espumas híbridas vidro bioativos/PVA para aplicação em engenharia de tecidos.** 2007. 130f. Dissertação (Mestrado) – Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

POSADOWSKA, Urszula et al. Injectable gellan gum-based nanoparticles-loaded system for the local delivery of vancomycin in osteomyelitis treatment. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine,** [s.l.], v. 27, n. 1, p.1-9, nov. 2015.

PRAJAPATI, V. D. et al. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. **Carbohydrate Polymers**, India, v. 93, p. 670-678, Jan. 2013.

RAHAMAN, Mohamed N. et al. Bioactive glass in tissue engineering. Acta Biomaterialia, [s.l.], v. 7, n. 6, p.2355-2373, jun. 2011.

RATNER, Buddy D. et al., Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor. In: RATNER, Buddy D. et al. (Eds.). **Biomaterials science:** an introduction to materials in medicine. 2. ed. San Diego: Elsevier, 2004. p. 1-9.

SANTOS, M. C. et al. Craqueamento termocatalítico da borra de neutralização do óleo de palma em escala de bancada. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis, p.1-8, fev. 2015

SANTOS, Alessandra Nogueira. Síntese, caracterização e avaliação citotóxica de vidro bioativo com adição de diferentes proporções de cério. Universidade Federal de Minas Gerais. Tese. Belo Horizonte. 2014, 83p.

SEO, E. et al. Strategies for osteochondral repair: Focus on scaffold. **Journal of Tissue Engineering**, Cheonan, v.5, p.1-14, July. 2014.

SILVA-CORREIA, J. et al. Gellan gum-based hydrogels for intervertebral disc tissueengineering applications. Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine, Guimarães, v. 5, n. 6, p.97-107, 29 dez. 2010. SIQUEIRA, Renato Luiz; ZANOTTO, Edgar Dutra. 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, Nova York, v. 24, n. 2, p.365-379, 1 nov. 2012.

TOZZI, Gianluca et al. Composite Hydrogels for Bone Regeneration. **Materials**, [s.l.], v. 9, n. 12, p.267-291, 2 abr. 2016

UTECH, Stefanie; BOCCACCINI, Aldo R. A review of hydrogel-based composites for biomedical applications: enhancement of hydrogel properties by addition of rigid inorganic fillers. **Journal of materials science**, New York, v. 51, n. 1, p.271-310, Jan. 2016.