

Síntese sol-gel de *scaffolds* porosos de vidro bioativo com adição de agente porogênico

(*Sol-gel synthesis of bioactive glass porous scaffolds with addition of porogen agent*)

F. B. A. P. Guimarães, B. R. Barrioni, A. C. X. Oliveira, A. A. R. Oliveira, M. M. Pereira

Depto. Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil
fabianabapg@gmail.com

Resumo

O uso de biomateriais capazes de gerar uma resposta biológica tem sido um dos maiores progressos em medicina regenerativa, devido à sua habilidade de suportar o crescimento e estimular a regeneração do tecido danificado. Neste contexto, biocerâmicas, particularmente o vidro bioativo (VB), foram o objetivo de múltiplos estudos. A técnica de adição de agentes porogênicos para a síntese de *scaffolds* é uma técnica interessante, pois vários tipos de agentes porogênicos podem ser usados. Este estudo propôs obter *scaffolds* através de quatro agentes porogênicos e avaliar os efeitos que a mudança na temperatura de tratamento poderiam ter em sua cristalinidade. *Scaffolds* de vidro bioativo obtidos pela técnica sol-gel 100S (100% SiO₂) mais agentes porogênicos (parafina 1, parafina 2, cera e CMC - carboximetilcelulose) foram preparados e caracterizados. Como os melhores resultados foram obtidos com a parafina 1, *scaffolds* com composição 58S (60%SiO₂-36%CaO-4%P₂O₅) e 100S usando parafina 1 como agente porogênico foram preparados. Os *scaffolds* foram submetidos a diferentes temperaturas de tratamento para avaliar a cristalinidade do material. A estrutura de poros foi analisada por microscopia eletrônica de varredura e microtomografia computadorizada e apresentou tamanho, distribuição e porosidade satisfatória, características importantes pois permitem migração celular, transporte de nutrientes, vascularização e crescimento tecidual. Por meio da difração de raios X constatou-se a natureza amorfa dos *scaffolds*. A 900 °C, *scaffolds* de VB 58S e 100S tiveram um pequeno aumento na sua cristalinidade. As análises de BET (adsorção de N₂) mostraram estrutura mesoporosa no material. A área de superfície específica variou de 73,2 m²/g no *scaffold* 58S tratado a 800 °C até 331,2 m²/g no *scaffold* 100S tratado a 800 °C. O material não é tóxico pelos ensaios MTT de citotoxicidade. Os resultados mostraram que é possível adicionar agentes porogênicos ao VB obtido via sol-gel e obter *scaffolds* favoráveis à regeneração tecidual óssea.

Palavras-chave: vidro bioativo, agente porogênico, biomateriais, sol-gel, cristalinidade.

Abstract

The use of biomaterials capable of generating a biological response has been one of the biggest progresses in regenerative medicine, due to their ability to support growth stimulation and damaged tissue regeneration. In this context, bioceramics, particularly bioactive glass (BG), were the subject of many studies. The technique of porogen agent addition for the synthesis of scaffolds is an interesting procedure, because several types of porogen agents can be used. The aim of the present work was to obtain scaffolds using four porogen agents and to evaluate the effects that a change in treatment temperature can have on their crystallinity. Scaffolds of sol-gel bioactive glass 100S (100% SiO₂) using as porogen agents paraffin 1, paraffin 2, wax and CMC (carboxymethyl cellulose) were synthesized and characterized. As the best results were obtained with paraffin 1, scaffolds 58S (60%SiO₂-36%CaO-4%P₂O₅) and 100S using paraffin 1 as porogen agent were prepared. The scaffolds were submitted to different treatment temperatures to evaluate the effect on their crystallinity. Pore structure was analyzed by scanning electron microscopy and micro-computed tomography. Scaffolds presented satisfactory pore size and pore size distribution, important characteristics for scaffolds because they allow cell migration, nutrient transport, vascularization and tissue ingrowth. X-ray powder diffraction showed the amorphous nature of the scaffolds. At 900 °C, scaffolds BG 58S and 100S showed a small increase in crystallinity. BET analysis (N₂-adsorption) indicated a mesoporous structure. The specific surface area varied from 73.2 m²/g for scaffold 58S treated at 800 °C to 331.2 m²/g for scaffold 100S treated at 800 °C. The materials obtained showed no toxic effects by MTT cytotoxicity assays. Results showed that the development of scaffolds is possible using porogen agents, with 3D interconnected porous structure and might therefore be a potential biomaterial for bone tissue regeneration.

Keywords: bioactive glass, porogen agent, biomaterials, sol-gel, crystallinity.

INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa têm como objetivo promover a cura e idealmente a regeneração

das estruturas teciduais, restabelecendo a função tecidual com previsibilidade, mais rapidamente e de forma menos invasiva em relação às técnicas convencionais. Enxertos ósseos autógenos fornecem uma matriz osteocondutora, além

de células e fatores de crescimento. Entretanto, a qualidade do osso autógeno é variada, dependendo da saúde geral do paciente. Muitos pacientes necessitam de um enxerto ósseo superior e em maior quantidade que seu organismo pode oferecer, tais como pacientes com osteopenia, osteoporose, diabetes e história de fumo [1].

Os vidros bioativos (VBs) são materiais que possuem capacidade de induzir uma resposta biológica na interface do material, levando à formação de camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA), responsável pela formação de forte ligação entre o material e os tecidos moles e duros [2]. O conceito de materiais bioativos formarem ligação com o osso foi sugerido inicialmente por Hench e, desde então, esses materiais vêm sendo intensamente estudados em variadas composições para aplicações na área biomédica [3]. Os componentes principais dos VBs são SiO_2 , CaO , P_2O_5 e Na_2O em proporções específicas. A composição do sistema é um fator determinante para a interação do biomaterial com o tecido, sendo que a mais comum é formada por SiO_2 , CaO e P_2O_5 [4]. O VB no fluido corpóreo está relacionado com as seguintes reações interfaciais: primeiro ocorre a troca de íons de Na^+ com íons de hidrogênio do fluido corpóreo e formação de ligação de SiOH e liberação de Si(OH)_4 ; a policondensação de $\text{SiOH} + \text{SiOH} \rightarrow \text{Si-O-Si}$ forma sílica gel hidratada. A adsorção de $\text{Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{3-} + \text{CO}_3^{2-}$ do VB pelo organismo receptor ocasiona a cristalização da hidroxiapatita carbonatada com adsorção de grupos biológicos na camada de hidroxiapatita e ação dos macrófagos. Nesse estágio ocorre a ligação de células indiferenciadas capazes de diferenciar em osteoblastos, as quais irão diferenciar e proliferar, gerando uma matriz; com a cristalização da matriz há a proliferação e o crescimento ósseo [5]. A arquitetura 3D do osso mineralizado é criada pelos osteoblastos, quando células são expostas a determinadas concentrações de constituintes iônicos solúveis liberados pelo VB. Aproximadamente 17 a 20 ppm de Si solúvel e 88 a 100 ppm de íons de Ca solúveis são necessários. A principal função dos VBs é liberar concentrações críticas de íons biologicamente ativos com taxas necessárias para proliferação e diferenciação celular [6-8]. O tratamento térmico e mudanças na composição dos VBs permitem controlar sua velocidade de reabsorção no organismo. O aumento do teor de silício diminui a taxa de degradação, sendo este um efeito direto da composição dos VBs. Tratamentos térmicos em elevadas temperaturas tornam esse biomaterial mais cristalino, diminuindo a resposta do organismo ao biomaterial [9, 10].

O *scaffold* ideal deve comandar a regeneração tecidual e remodelação *in vivo*; para tanto, deve ter uma superfície osteocondutora para que ocorra ligação e migração celular. Tem que induzir quimiotaxia (processo de locomoção de células em direção a um gradiente químico), estimular proliferação celular e coordenar a síntese de matriz no tecido hospedeiro. A complexidade da resposta celular para sinalização da matriz extracelular fez com que se desenvolvessem *scaffolds* tridimensionais (3D) que imitam as propriedades da matriz extracelular e não atuam apenas como suporte celular e tecidual [11]. Uma das maiores promessas de *scaffolds* para aplicação em engenharia de tecidos ósseos são os VBs, devido à bioatividade destes materiais. Várias técnicas permitem obter *scaffolds* altamente porosos, com estruturas em três dimensões, porosidade adaptada e tamanho de poro e interconectividade adequados [12]. Técnicas diversas existem para confeccionar *scaffolds* de VB, como a técnica de replicação da esponja [13, 14], técnica *foaming* (da espuma) de barbotinas cerâmicas [15], técnica conhecida como *robocasting* [16], também o desenvolvimento de *scaffolds* de VB por *electrospun* [17] e obtenção de *scaffolds* via adição de agentes porogênicos [18, 19]. A técnica de adição de agentes porogênicos é uma técnica versátil; uma infinidade de agentes porogênicos pode ser utilizada e nenhum estudo foi encontrado na literatura sobre sua adição ao VB obtido via sol-gel. Apoiado ao grande potencial dos VBs, este estudo surge com os objetivos de: (i) desenvolver uma nova rota de obtenção de *scaffolds* porosos de VB por adição de agentes porogênicos ao VB obtido via sol-gel; e (ii) avaliar os efeitos provocados na sua cristalinidade por modificações na composição e mudanças nas temperaturas de tratamento dos *scaffolds* de VB obtidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Síntese dos scaffolds com 100% SiO₂ com adição de diferentes agentes porogênicos

Os *scaffolds* de VB foram confeccionados pela rota sol-gel [20, 21], a princípio com composição 100% de sílica (VB100S). Os reagentes foram: alcóxido tetraetilortossilicato (TEOS) - Aldrich, 98% de pureza, $\text{Si(OC}_2\text{H}_5)_4$, precursor de SiO_2 , água deionizada, ácido nítrico 2N - Synth e solução 5% v/v ácido fluorídrico HF - Merck. A síntese seguiu o método sol-gel, rota de alcóxido, com a seguinte metodologia para o vidro 100S:

Tabela I - Composições das misturas (% em massa) utilizadas para síntese de *scaffold* 100S, para seleção do agente porogênico. [Table I - Mixed composition (wt%) used for the synthesis of the scaffold 100S, for porogen agent selection.]

Amostra	Agente porogênico	% de sol	% de agente porogênico	% de HF (v/v do sol)
VBC	Cera	40	60	5
VBP1	Parafina-1	45	55	5
VBP2	Parafina-2	30	70	5
VBCMC	Parafina-1 + CMC	27,4	50,3 de parafina-1 22,3 de CMC	5

220,4 mL de água deionizada, 36,7 mL de solução 2 N de ácido nítrico (HNO_3) e 228,6 mL de tetraetilortossilicato (TEOS) foram adicionados em um béquer e a agitação foi mantida por 60 min. O sol resultante foi misturado com o agente porogênico, conforme a Tabela I, juntamente com o HF, sendo este 5% (v/v) do sol, e colocado em recipientes de teflon fechados hermeticamente com tampa lisa e porcas de teflon. A quantidade de agente porogênico adicionada foi determinada pela máxima porcentagem dispersa do agente porogênico no biovidro sol-gel. Esses foram colocados na estufa para gelificação e envelhecimento a 60 °C por 72 h. Em seguida iniciou-se a secagem. As tampas foram trocadas por tampas com furos e fechadas com as porcas de teflon. Os recipientes foram colocados na estufa a 60 °C e a temperatura foi elevada em 10 °C a cada 24 h até atingir a temperatura de 120 °C e mantida por mais 24 h. Os *scaffolds* foram tratados termicamente nas temperaturas 700, 800 e 900 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/min, por 1440 min, para que degradasse toda a fase orgânica.

Síntese dos scaffolds de diferentes composições com adição do agente porogênico parafina 1

As análises dos resultados obtidos com diferentes agentes porogênicos, considerando integridade das amostras, tamanho e distribuição de tamanho de poros, permitiu selecionar o agente porogênico parafina 1 para a continuidade desse estudo. Vidros bioativos de duas composições foram então sintetizados: VB58S (58% SiO_2 -33% CaO-9% P_2O_5 em porcentagem mássica) e VB100S (100% SiO_2). Para o VB58S foram usados os seguintes reagentes: 132,2 mL de água deionizada, 22,04 mL de ácido nítrico 2 N - Synth, 13,75 mL de trietilfosfato (TEP) - Aldrich, 137,1 mL de tetraetilortossilicato (TEOS) - Aldrich e 85,01 g de nitrato de cálcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] - Synth. Foram adicionados em um béquer água deionizada e ácido nítrico. Em seguida foram adicionados o TEOS e TEP e mantida a agitação por 60 min. O nitrato de cálcio foi adicionado aos poucos à mistura; a agitação foi mantida por mais 30 min. Para o VB100S usou-se: 220,4 mL de água deionizada, 36,7 mL de ácido nítrico 2 N (HNO_3) - Synth, e 228,6 mL de tetraetilortossilicato (TEOS) - Aldrich. Foram adicionados em um béquer água deionizada e ácido nítrico. Em seguida foi adicionado o TEOS e mantida a agitação por 60 min. O sol resultante foi misturado com o agente porogênico (50% de massa por volume para o 58S e 55% de massa por volume para o 100S) e, então, foram adicionados 5% de HF - Merck (v/v do sol, como catalisador de gelificação). A mistura foi colocada em recipientes de teflon, que foram fechados hermeticamente com a tampa lisa e porcas de teflon e, então, colocados na estufa para gelificação e envelhecimento a 60 °C por 72 h. Para a secagem as tampas foram trocadas por tampas com furos e fechadas com as porcas de teflon. Os recipientes foram colocados na estufa a 60 °C e a temperatura foi elevada em 10 °C a cada 24 h até atingir a temperatura de 120 °C e mantida por mais 24 h. Os *scaffolds* (VB58S e VB100S) obtidos após secagem foram

colocados para tratamento térmico a 700, 800 e 900 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/min por 1440 min.

Caracterização estrutural dos scaffolds

A morfologia e composição química dos *scaffolds* foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS), respectivamente, utilizando o equipamento FEI-INSPECT S50, operado a 20 kV e equipado com um espectrômetro de energia dispersiva (EDS) da EDAX Genesis. Foi realizada a difração de raios X (DRX) no equipamento PW9710mpd, Philips, usando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) a 40 kV e 30 mA. A análise foi conduzida com 2θ variando de 3,00° a 90,00° com passo de 0,06° e tempo de coleta de 1 s. A microtomografia computadorizada (μCT) permitiu avaliar a morfologia, tamanho, distribuição e interconectividade dos poros, e foi realizada com aparelho Skyscan 1174 (Aartselaar), equipado com câmera de 1,3 MP, utilizando-se fonte de 50 kV e corrente de 800 μA com resolução de 14 μm . Foi utilizado filtro de alumínio com 1 mm de espessura. As amostras foram fixadas em um suporte e rotacionadas 180°, com imagens adquiridas a cada 0,7°. Após o escaneamento, cortes transversais foram reconstruídos em estruturas tridimensionais utilizando-se software SkyScan. As análises por adsorção de nitrogênio, BET (por isotermas de Brunauer, Emmett e Teller), foram realizadas utilizando um equipamento Quantachrome NovaWin, v. 10.01, e permitiram a determinação da área superficial total, o volume de poros e a distribuição de meso e microporos.

Avaliação da citotoxicidade dos scaffolds

A citotoxicidade do *scaffold* foi avaliada pelo ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], que analisa quantitativamente a redução do sal de tetrazólio (MTT) pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase presente nas mitocôndrias. A formação de um produto final de cristais de formazan é mensurada em espectrofotômetro a 595 nm. Esse ensaio é usado especificamente para avaliar a funcionalidade mitocondrial e proliferação celular.

Os ratos Wistar neonatos (1 a 5 dias), fêmeas, utilizados para este estudo foram obtidos a partir do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO). O estudo foi em conformidade com o Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório publicado pelo National Institutes of Health dos EUA (NIH publicação nº 85-23, revista em 1996). Os osteoblastos foram extraídos de calvária de 5 ratos neonatos. Os animais foram sacrificados e suas calvárias foram retiradas e cortadas em fragmentos de 2 mm/2 mm; esses fragmentos foram colocados em um tubo falcon contendo tripsina 1% e levados para estufa a 37 °C e 5% de CO_2 por 15 min. O sobrenadante foi descartado e foi colocado 0,06 g de colagenase tipo 2 em 30 mL de DMEM sem soro e colocado por 30 min a 37 °C. O sobrenadante foi descartado e foi colocado mais DMEM e colagenase

e retornado para estufa por mais 20 min. O tubo falcon com o material foi centrifugado por 5 min a 1400 rpm. O sobrenadante foi recolhido e colocado na garrafa de cultura T25 com 5 mL de meio DMEM complementado com soro fetal bovino (SFB). Foram feitas mais 2 digestões de 20 min. Os osteoblastos da segunda passagem foram tripsinizados e plaqueados (3×10^4 células/poço) em placas de 24 poços. Após 24 h, o meio foi aspirado, colocado um meio de cultivo fresco e as populações celulares foram expostas a 1 mg/mL de biomaterial [22]. O método de esterilização foi radiação ultravioleta. Como controle positivo, foi utilizado Triton X-100 a 1%. Como controle negativo, foi utilizado meio de cultivo DMEM complementado com SFB. Todos os ensaios foram realizados em triplicata ($n=3$). Após 24 h de exposição, todo o meio foi aspirado, sendo colocados 240 μ L de meio de cultura complementado com SFB em cada poço. Foram acrescentados 170 μ L de MTT (5 mg/mL) em cada poço, seguido por uma incubação de 4 h a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida foram colocados 170 μ L de solução de SDS/10% HCl. A placa foi incubada a 37 °C e 5% de CO₂ por 18 h. Então, foram retirados 100 μ L de cada poço e transferidos para uma placa plana de 96 poços e a quantificação foi feita em espectrofotômetro (ADAP 1.6, Anthos Labtec Instruments) com filtro de 595 nm (análise estatística - One-way / Bonferroni / GraphPad Prism).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Scaffolds obtidos com diferentes agentes porogênicos

Os agentes porogênicos foram analisados por MEV para avaliação de seus tamanhos e formatos. A cera apresentou formato disforme e variação de tamanho de 9 a 204 μ m. O CMC mostrou forma alongada, com distribuição de tamanho de 28 a 382 μ m. A parafina 1 apresentou formato mais arredondado com distribuição de tamanho de 609 a 993 μ m. A parafina 2 mostrou formato arredondado e mais uniforme, com distribuição de tamanho de 1,9 a 2,3 mm. Os *scaffolds* produzidos com adição de CMC e parafina desintegraram-se durante o tratamento térmico. Assim, não foi possível obter amostras viáveis a partir dessa composição de agentes porogênicos. O VBC 700 °C apresentou fragilidade ao manuseio, formato disforme e com o aumento de temperatura de tratamento térmico os *scaffolds* tornaram-se mais fáceis de manusear. O VBC 900 °C mostrou maior facilidade de manuseio e, visualmente, formato mais uniforme que os VBC 700 °C e VBC 800 °C. Os VBP1 700 °C, VBP1 800 °C e VBP1 900 °C demonstraram comportamento ao manuseio e formato mais uniforme que os demais *scaffolds*; o VBP1 700 °C com formato menos uniforme e com maior dificuldade de manusear, apresentou maior facilidade de fratura que os VBP1 800 °C e VBP1 900 °C. Os VBP2 700 °C, VBP2 800 °C e VBP2 900 °C apresentaram baixa resistência ao manuseio, com maior dificuldade de manuseá-los, em relação aos demais *scaffolds*. As análises de MEV dos VBC 700, 800 e 900 °C mostraram poucos poros abertos, sendo o diâmetro de 42 a 102 μ m, 55 μ m e 33 a

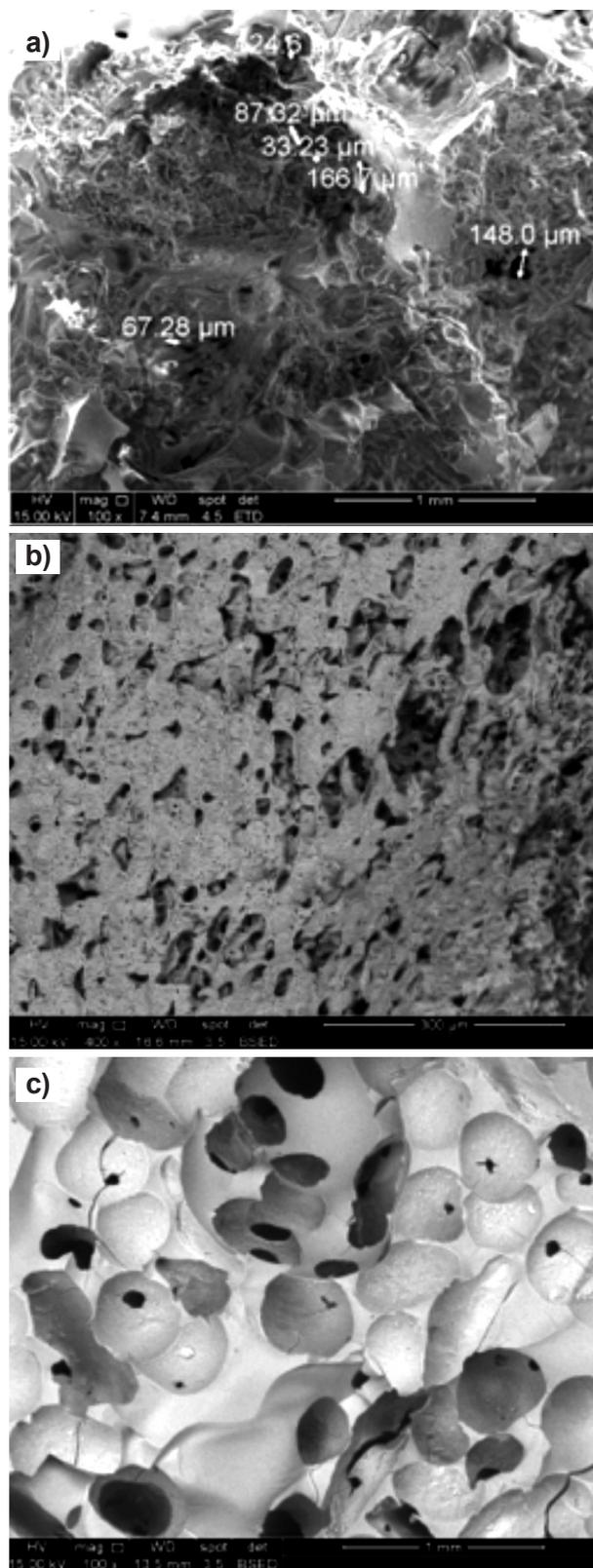


Figura 1: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds* produzidos com adição de cera, parafina 2 e parafina 1 tratados termicamente a: (a) VBC 900 °C, (b) VBP2 800 °C, (c) VBP1 700 °C.

[Figure 1: SEM micrographs of the scaffolds produced with addition of wax, paraffin 2 and paraffin 1 heat treated at: (a) VBC 900 °C, (b) VBP2 800 °C, (c) VBP1 700 °C.]

167 μm , respectivamente. As amostras de VBP1 700, 800, 900 $^{\circ}\text{C}$ mostraram-se, nas imagens de MEV, porosas com diâmetro de poros de 113 a 1174 μm , 219 a 1041 μm e 64 a 595 μm , respectivamente. As amostras de VBP2 700, 800 e 900 $^{\circ}\text{C}$ mostraram-se no MEV com poros muito grandes e abertos, sendo que o tamanho de poro variou de 437 μm , no *scaffold* tratado a 900 $^{\circ}\text{C}$, até 1045 μm , no *scaffold* tratado a 800 $^{\circ}\text{C}$. A Fig. 1 ilustra as imagens de MEV dos *scaffolds*. Os espectros de EDS de todas as amostras mostraram a presença de silício e oxigênio.

Os *scaffolds* produzidos com adição de cera, parafina 1 e parafina 2 foram submetidos à análise por μCT , que mostraram tamanhos médios de poros muito superiores aos observados por MEV; para o VBC tratado a 700, 800 e 900 $^{\circ}\text{C}$ foram 419, 411 e 399 μm , respectivamente. Isso se explica devido a μCT avaliar o volume do *scaffold* em 3D, além de outras razões variadas, como contração da amostra no MEV, especificações de claro e escuro na μCT , entre outros. A μCT para o VBP1 tratado a 700, 800 e 900 $^{\circ}\text{C}$ resultou em diâmetros de poros de 442, 400 e 371 μm , respectivamente, e a μCT do VBP2 tratado a 700, 800 e 900 $^{\circ}\text{C}$ mostrou diâmetros de poros de 532, 599 e 594 μm , respectivamente, e, devido ao grande tamanho e quantidade dos poros, os *scaffolds* apresentaram menor resistência ao manuseio em relação aos *scaffolds* produzidos com parafina 1 e cera. Todas as amostras apresentaram quantidade de poros abertos superior a 50%, exceto o

VBC 900 $^{\circ}\text{C}$ que apresentou 44% de porosidade. Ressalta-se que foram calculados por μCT apenas os macroporos, sendo a porosidade total provavelmente maior do que os resultados obtidos nesta caracterização, uma vez que os materiais obtidos pela rota sol-gel apresentam também um grande volume de mesoporos. Os *scaffolds* produzidos, além de terem quantidade satisfatória de poros abertos (superior a 50%), têm uma distribuição de tamanho de poros (superior a 150 μm) condizente para regeneração óssea [23]. As imagens de μCT mostram as diferenças estruturais em 3D dos VBC, VBP1 e VBP2 (Fig. 2), e a Fig. 3 apresenta o corte em 2D dos VBC, VBP1 e VBP2 tratados a 700 $^{\circ}\text{C}$. O VBC 700 $^{\circ}\text{C}$ apresentou 68% de poros abertos e os poros foram interconectados, mas irregulares, o que condiz com o formato do agente porogênico, com uma ampla distribuição de tamanho, sendo o diâmetro médio de 419 μm . O VBP1 700 $^{\circ}\text{C}$ apresentou 67,4% de poros abertos com formato mais uniforme, condizente com o formato do agente porogênico; os poros foram interconectados e com distribuição de tamanho de poros satisfatória, com diâmetro médio de 442 μm . O VBP2 700 $^{\circ}\text{C}$ apresentou 66% de poros abertos, grandes, arredondados, condizentes com o formato do agente porogênico, os poros foram inteconectados e o diâmetro médio foi de 532 μm .

As distribuições de tamanho de poros obtidas para os *scaffolds* VBC 700 $^{\circ}\text{C}$, VBP1 700 $^{\circ}\text{C}$ e VBP2 700 $^{\circ}\text{C}$ são mostradas na Fig. 4, que apresentaram médias de

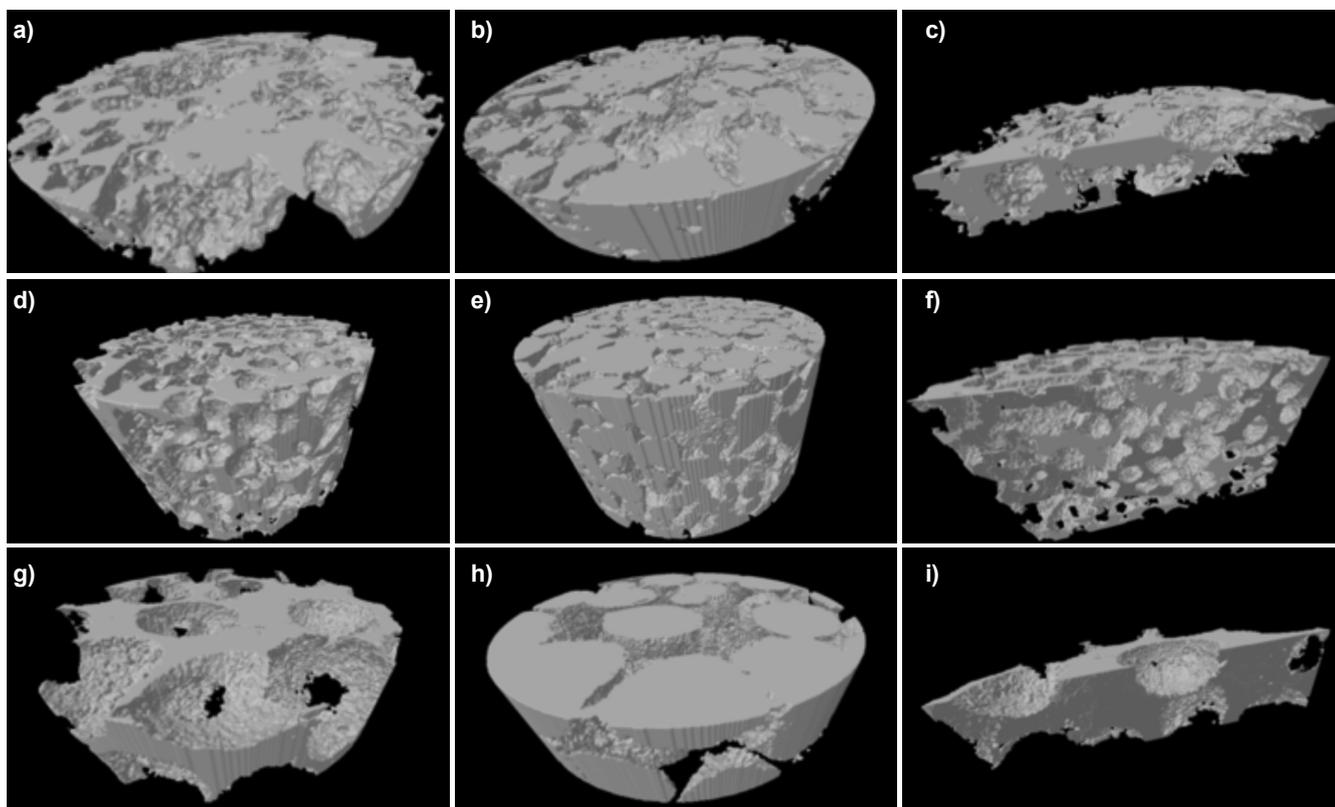


Figura 2: Imagens 3D de μCT de amostras tratadas a 700 $^{\circ}\text{C}$ de (a-c) VBC, (d-f) VBP1 e (g-i) VBP2: (a,d,g) - *scaffold*; (b,e,h) - estrutura de poros; (c,f,i) - estrutura interna.

[Figure 2: 3D μCT images of samples treated at 700 $^{\circ}\text{C}$ of (a-c) VBC, (d-f) VBP1, and (g-i) VBP2: (a,d,g) - *scaffold*; (b,e,h) - pores structure; (c,f,i) - internal structure.]

tamanho de poros de 419, 442 e 532 μm , respectivamente. A parafina 1 como agente porogênico permitiu a formação de *scaffolds* com melhor distribuição de tamanho de poros; as caracterizações também permitiram observar que nos

scaffolds VBP1 os poros foram mais interconectados, pré-requisitos para que aconteça a regeneração óssea. A Tabela II resume os dados obtidos através das caracterizações estruturais dos *scaffolds* VBC, VBP1 e VBP2.

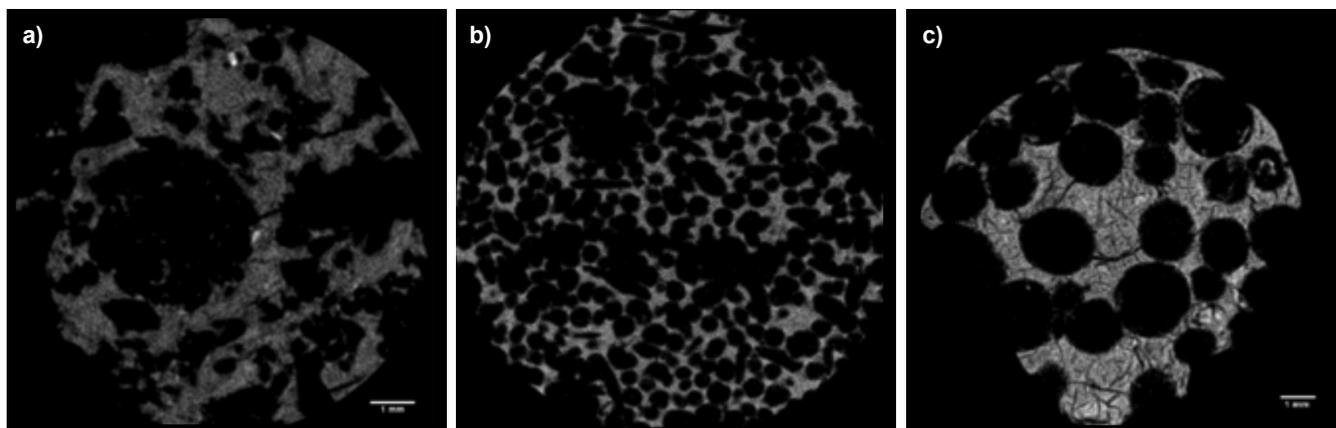


Figura 3: Imagens de corte 2D de μCT de amostras tratadas a 700 °C de (a) VBC, (b) VBP1 e (c) VBP2.
[Figure 3: 2D section μCT images of samples treated at 700 °C of (a) VBC, (b) VBP1, and (c) VBP2.]

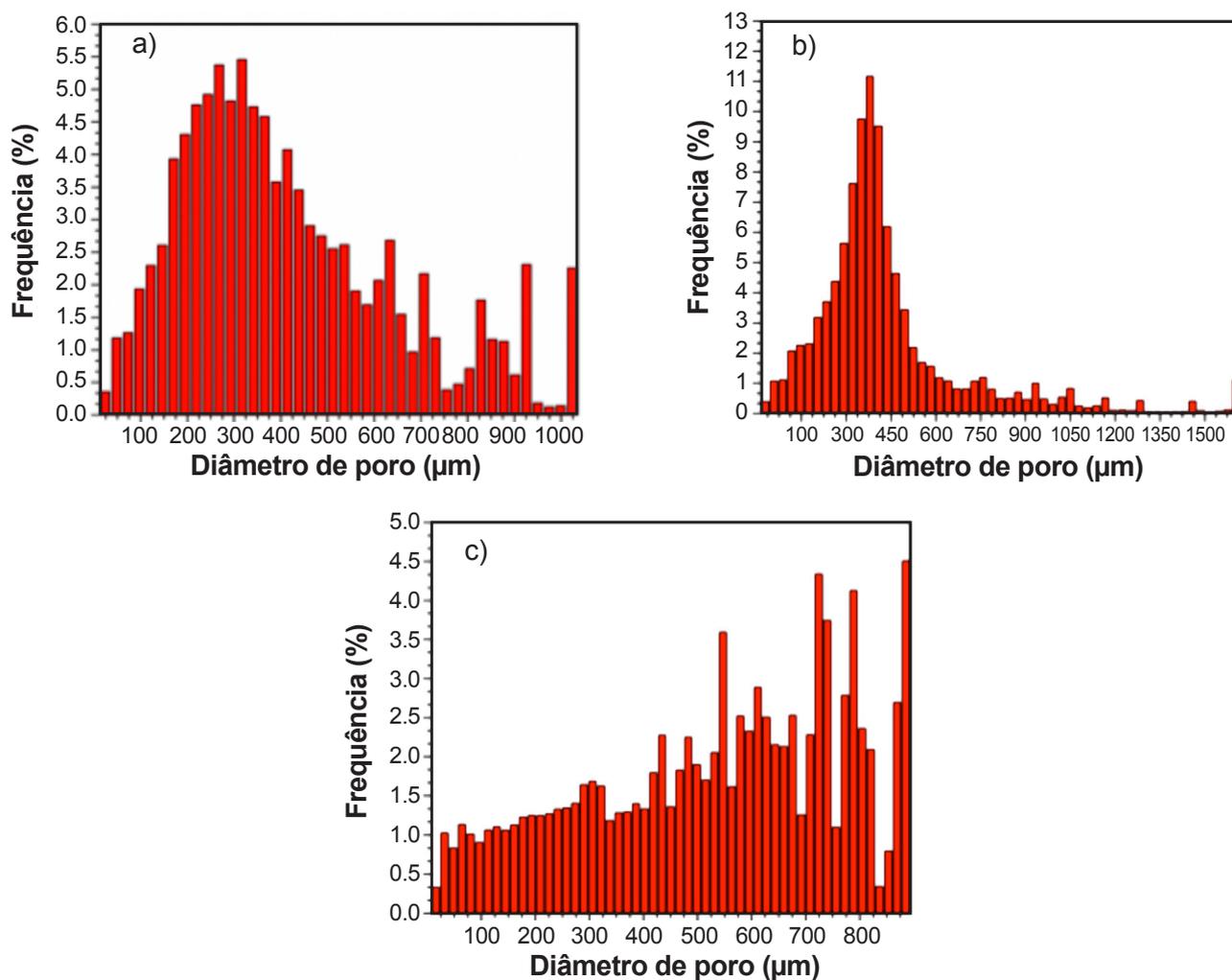


Figura 4: Distribuições de tamanho de poros obtidas por μCT : (a) VBC 700 °C, (b) VBP1 700 °C e (c) VBP2 700 °C.
[Figure 4: Pore size distributions obtained by μCT : (a) VBC 700 °C, (b) VBP1 700 °C, and (c) VBP2 700 °C.]

Tabela II - Diâmetro e fração de poros abertos (obtidos por μ CT e MEV) dos *scaffolds* de VB100S com adição dos agentes porogênicos: cera (C), parafina 1 (P1) e parafina 2 (P2), tratados a 700, 800 e 900 °C.

[Table II - Open pore diameter and fraction (obtained by μ CT and SEM) for the *scaffolds* VB100S with addition of porogen agents: wax (C), paraffin 1 (P1), and paraffin 2 (P2), treated at 700, 800 and 900 °C.]

<i>Scaffold</i>	% total de poros por μ CT	% de poros abertos por μ CT	Diâmetro dos poros por MEV (μ m)	Diâmetro dos poros por μ CT (μ m)
VBC 700 °C	72,0	68,0	42 a 102	419
VBC 800 °C	74,0	72,0	55	411
VBC 900 °C	57,0	44,0	33 a 167	399
VBP1 700 °C	67,4	67,4	113 a 1174	442
VBP1 800 °C	67,6	67,6	219 a 1041	400
VBP1 900 °C	70,0	70,0	64 a 595	371
VBP2 700 °C	66,0	66,0	1000	532
VBP2 800 °C	79,0	79,0	756 a 1045	599
VBP2 900 °C	66,0	66,0	438 a 989	594

Scaffolds VB58S e VB100S obtidos com parafina 1

Todas as amostras produzidas com parafina 1 apresentaram resistência ao manuseio. O tamanho dos poros, de acordo com o MEV, diminuiu com o aumento de temperatura de tratamento térmico, em todos os *scaffolds*. A Fig. 5 mostra imagens macroscópica e de MEV do VBP158S-800 °C. A análise de EDS, de todas as amostras, confirmou a presença de cálcio e fósforo, além da sílica nos *scaffolds*, importantes para o aumento da bioatividade do *scaffold*.

A μ CT permitiu calcular porcentagem e tamanho dos poros dos *scaffolds* através de análises tridimensionais realizadas em software. Deve ser considerado que o cálculo de porosidade considerou apenas os macroporos, sendo a porosidade total provavelmente maior. A quantidade de poros abertos e porosidade total diminuíram com o aumento de temperatura de tratamento nos *scaffolds* de VB58S; nesses *scaffolds* o aumento de temperatura de tratamento refletiu na diminuição da quantidade de poros, tornando as partículas mais densas e com número pouco menor de poros abertos; nos *scaffolds* de VB100S o aumento de temperatura não interferiu na porcentagem de poros abertos, mas o efeito do tratamento térmico fez com que diminuísse o tamanho dos poros. Pela análise de μ CT do VBP158S-700 °C obteve-se um diâmetro médio de poro de 269 μ m, para o VBP158S-800 °C o diâmetro de poros foi de 290 μ m e do VBP158S-900 °C de 278 μ m. Para o VBP1100S-700, 800 e 900 °C os tamanhos médios de poros foram de 442, 400 e 371 μ m, respectivamente. Pelas análises de μ CT, foi possível avaliar o volume, a distribuição, a porcentagem de poros abertos, bem como a interconectividade dos poros. Os *scaffolds* apresentaram quase totalidade de poros abertos, quando se avalia volume total de poros/volume de poros abertos. A Fig. 6 mostra imagens de μ CT do VBP158S-700 °C em 3D mostrando características estruturais do *scaffold* e rede de poros. Os *scaffolds* apresentaram tamanho médio de poros satisfatórios, de 269 μ m. A porosidade superior a 50% e

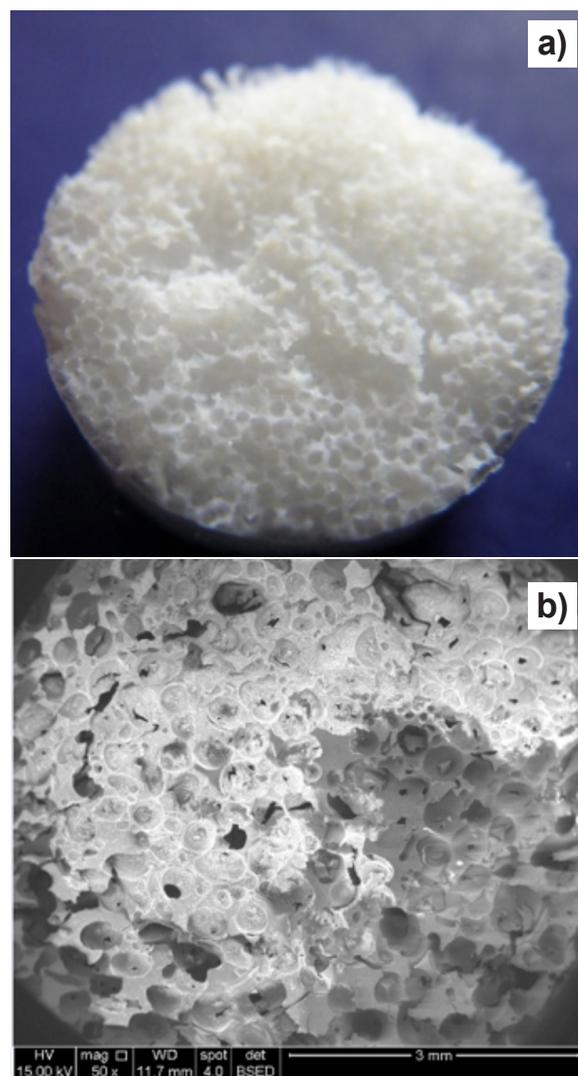


Figura 5: Imagens macroscópica (a) e de MEV (b) do VBP158S-800 °C.

[Figure 5: Macroscopic (a) and SEM (b) images of VBP158S-800 °C.]

poros maiores que 150 μm e interconectados são fatores importantes, pois permitem migração celular, transporte de nutrientes, vascularização e crescimento tecidual [24-27]. O VB100S com adição de parafina 1 apresentou porosidade superior a 67%, com tamanho de poro suficiente para regeneração óssea. O aumento de temperatura ocasionou uma diminuição no tamanho dos poros. A Tabela III resume todos os dados obtidos nas análises estruturais dos *scaffolds* VB58S e VB100S com adição do agente porogênico parafina 1.

A Fig. 7 apresenta os resultados de DRX dos *scaffolds* do VB58S e 100S com adição de parafina 1 e tratamento térmico a 700, 800 e 900 $^{\circ}\text{C}$. Observam-se poucos picos de cristalinidade, sendo que a definição dos picos indicaria a cristalização do material, obtendo possivelmente um material mais denso, mais resistente e menos bioativo. Os difratogramas de raios X de todas as amostras foram característicos de material amorfo, sem diferenças significativas em relação a cristalinidade. O resultado obtido é diferente do observado em outros trabalhos, como

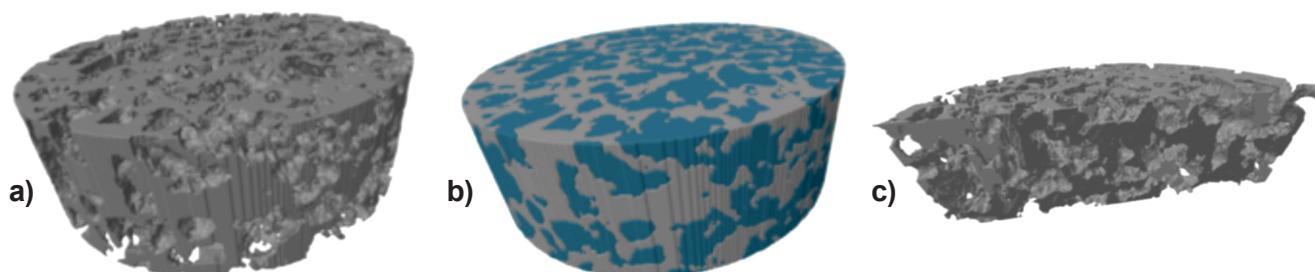


Figura 6: Imagens de μCT do VBPI58S-700 $^{\circ}\text{C}$ de (a) superfície do *scaffold*, (b) estrutura de poros e (c) estrutura interna.
[Figure 6: μCT images of VBPI58S-700 $^{\circ}\text{C}$ of (a) *scaffold* surface, (b) pores structure, and (c) internal structure.]

Tabela III - Diâmetro e porcentagem de poros abertos obtidos por MEV e μCT dos *scaffolds* de VB58S e VB100S com adição do agente porogênico parafina 1 (P1).

[Table III - Open pore diameter and fraction obtained by SEM and μCT for the *scaffolds* 58S and 100S with addition of porogen agent paraffin 1 (P1).]

<i>Scaffolds</i>	% de porosidade total	% de poros abertos	Diâmetro dos poros por MEV (μm)	Média de diâmetro dos poros por μCT (μm)
VBP158S-700 $^{\circ}\text{C}$	56,5	56,4	213 a 502	269
VBP158S-800 $^{\circ}\text{C}$	52,0	52,0	192 a 430	290
VBP158S-900 $^{\circ}\text{C}$	51,0	51,0	112 a 454	278
VBP1100S-700 $^{\circ}\text{C}$	67,4	67,4	113 a 1174	442
VBP1100S-800 $^{\circ}\text{C}$	67,6	67,6	219 a 1041	400
VBP1100S-900 $^{\circ}\text{C}$	70,0	70,0	64 a 595	371

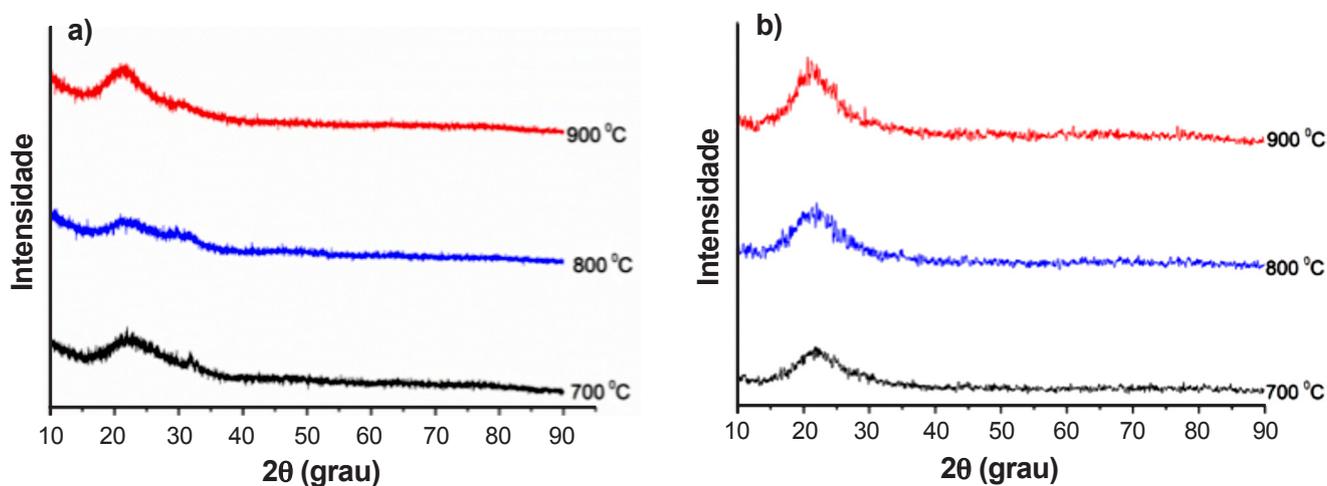


Figura 7: Difratogramas de raios X das amostras de *scaffolds* de (a) VB58S e (b) VB100 tratadas em diferentes temperaturas.
[Figure 7: XRD patterns of the *scaffold* samples of (a) VB58S and (b) VB100 treated at different temperatures.]

Tabela IV - Área superficial específica (SSA) e volume e diâmetro de poros, determinados por BET - adsorção de nitrogênio, dos *scaffolds* de VB58S e VB100S com adição do agente porogênico parafina 1 (P1).

[Table IV - Specific surface area (SSA), and pore volume and diameter, determined by BET - nitrogen adsorption, of the *scaffolds* of VB58S and VB100S with addition of porogen agent paraffin 1 (P1).]

Amostra	SSA (m ² /g)	Volume de poro (cm ³ /g)	Diâmetro de poro (nm)
VBP158S-700 °C	325,5	1,1	13,6
VBP158S-800 °C	73,2	0,4	21,7
VBP158S-900 °C	100,6	0,3	13,1
VBP1100S-700 °C	261,4	1,5	22,3
VBP1100S-800 °C	331,2	1,9	22,9
VBP1100S-900 °C	192,3	0,5	9,4

scaffolds de VB obtidos pela técnica da espuma, em que o difratograma apresenta picos de cristalinidade com tratamento térmico a 700 °C [28].

A área superficial (SSA) dos *scaffolds* foi determinada com o modelo BET, adsorção física das moléculas de gás sobre superfície sólida em multicamadas. A distribuição de diâmetro de poro foi calculada pelo modelo BJH (Barrett, Joyner e Halenda) [29] aplicado para as curvas de dessorção, que confirmou que os *scaffolds* têm estrutura mesoporosa com SSA variando de 73,2 m²/g no VBP160S-800 °C até 331,2 m²/g no VBP1100S-800 °C. Os *scaffolds* foram classificados como mesoporosos (Tabela IV), como esperado para os materiais bioativos obtidos pelo método sol-gel, com poros na faixa de 2 a 50 nm, que são bem mais favoráveis do que aqueles completamente densos, porque estes materiais possuem alta área superficial o que resulta em alta bioatividade e elevada tendência à biorreabsorção. As isoterma podem ser identificadas como tipo II, as quais são características de materiais mesoporosos. Mesoporosidade é indicada pela presença de histerese de adsorção/dessorção e pela inclinação da curva de adsorção [30].

Avaliação da citotoxicidade dos *scaffolds*

A atividade metabólica mitocondrial dos osteoblastos primários foi avaliada pelo ensaio de MTT após 24 h de exposição dos osteoblastos ao material. Esta análise permite mensurar o metabolismo celular com a adição do MTT. As células viáveis absorvem o tetrazólio de metiltiazol e o metabolizam na mitocôndria utilizando enzimas ativas, que se acumulam sob a forma de cristais de tetrazólio ou formazan, sendo possível diferenciar células viáveis das menos viáveis. Quanto maior a leitura no espectrofotômetro, maior é a taxa metabólica [31]. A Fig. 8 apresenta a viabilidade relativa das células osteoblásticas primárias em contato com os materiais. A viabilidade das células osteoblásticas variou de 96,5% no VBP1100S-900 °C até 145% no VBP158S-900 °C, utilizando como controle negativo células cultivadas no meio sem o material, como 100% de viabilidade, e como controle positivo células postas no meio de cultura com adição de Triton, substância

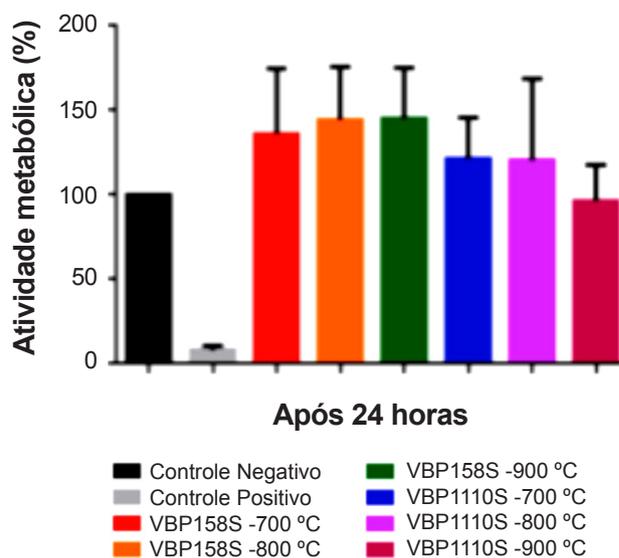


Figura 8: Atividade metabólica dos osteoblastos primários quando expostos aos *scaffolds* de VB58S e VB100S por 24 h.

[Figure 8: Metabolic activity of the primary osteoblasts when exposed to the VB58S and VB100S *scaffolds* during 24 h.]

citotóxica. O aumento de temperatura de tratamento nos *scaffolds* 58S não diminuiu a proliferação celular e sim demonstrou um pequeno aumento da atividade metabólica dos osteoblastos. Os *scaffolds* 100S apresentaram atividade celular satisfatória, embora menor que nos *scaffolds* 58S; o aumento de temperatura de tratamento ocasionou apenas pequena diminuição da atividade metabólica celular. Com base nesses resultados concluiu-se que os *scaffolds* 58S e 100S são biocompatíveis, uma vez que a viabilidade mínima aceitável como biocompatível é de 50% [31]. Os resultados mostraram significado estatístico apenas dos *scaffolds* e do controle negativo em relação ao controle positivo; não houve diferença estatística significativa entre o controle negativo e os *scaffolds*, e entre os *scaffolds*; porém, observa-se que os *scaffolds* 58S e 100S, e com maior porcentagem o 58S, induziram a proliferação celular das células osteoblásticas primárias, fator de relevância para o sucesso da regeneração óssea e sua utilização na engenharia de tecido ósseo.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados conclui-se que é possível adicionar agentes porogênicos ao VB obtido via sol-gel e produzir *scaffolds* para engenharia de tecidos. Os *scaffolds* obtidos via sol-gel do VB 58 e 100S com adição de parafina 1 são viáveis para regeneração óssea. Apresentaram poros interconectados, com fração de poros abertos superior a 50% e diâmetro de poros superior a 150 μm . Os VBP158S-700 °C, VBP158S-800 °C, VBP158S-900 °C, VBP1100S-700 °C, VBP1100S-800 °C e VBP1100S-900 °C apresentaram diâmetro médio de poros de 269, 290, 278, 442, 400 e 371 μm , respectivamente, e fração de poros abertos de 56,4%, 52%, 51%, 67,4%, 67,6% e 70%, respectivamente, sendo que a relação porosidade total/poros abertos foi de quase 100%. Os *scaffolds* apresentaram formato de poros arredondados, abertos em seu interior, o que foi demonstrado através da caracterização tridimensional por MEV e μCT . Os *scaffolds* tiveram estrutura mesoporosa e os mesoporos variaram de 9,4 nm no VBP1100S-900 °C até 22,9 nm no VBP1100S-800 °C. A área superficial variou de 73,2 m^2/g no VBP158S-800 °C até 331,2 m^2/g no VBP1100S-800 °C. Os *scaffolds* de VB 58S e 100S continuaram amorfos mesmo com o aumento de temperatura de tratamento térmico. Os *scaffolds* não apresentaram citotoxicidade ao ensaio de MTT e induziram a proliferação das células osteoblásticas primárias, mesmo os *scaffolds* de VB100S, fatores de relevância para o sucesso da regeneração óssea e sua utilização na engenharia de tecido ósseo.

REFERÊNCIAS

- [1] S.E. Lynch, R.E. Marx, M. Nevins, L.A. Wisner-Lynch, *Tissue Engineering Applications in Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontics*, 2ª Ed., Quintessence Publishing, Chicago, EUA (2008) 296.
- [2] M.N. Rahaman, D.E. Day, B.S. Bal, Q. Fu, S.B. Jung, L.F. Bonewald, A.P. Tomsia, *Acta Biomater.* **7**, 6 (2011) 2355-2373.
- [3] M.M. Pereira, L.L. Hench, *Bioactive glass*. In: G.E. Wnek, G.L. Bowlin, Eds., *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, 2ª Ed., Marcel Dekker, New York, EUA (2004) 53-62.
- [4] A.S. Hoffman, B.D. Ratner, F.J. Schoen, J.E. Lemons, *Biomaterials Science, an Introduction to Materials in Medicine*, 2ª Ed., Elsevier, San Diego EUA (2004) 879.
- [5] L.L. Hench, N. Roki, M.B. Fenn, *J. Mol. Struct.* **1073** (2014) 24-30.
- [6] L.L. Hench, *J. Mater. Sci: Mater. Med.* **17** (2006) 967-978.
- [7] L.C. Gerhardt, A.R. Boccaccini, *Mater.* **3** (2010) 3867-3910.
- [8] G.L. Jiang, C.R. White, H.Y. Stevens, J.A. Frangos, *J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **283** (2002) 383-389.
- [9] D. Bellucci, V. Cannillo, A. Sola, *Sci. Sintering* **42** (2010) 307-320.
- [10] J. Ma, C.Z. Chen, D.G. Wang, X.G. Meng, J.Z. Shj, *Ceram. Int.* **36**, 6 (2010) 1911-1916.
- [11] S.C. Owen, M.S. Shoichet, *J. Biomed. Mater. Res.* **94A**, 4 (2010) 1321-1331.
- [12] Q. Chen, J. Roether, A. Boccaccini, *Tissue engineering scaffolds from bioactive glass and composite materials*, In: N. Ashammakhi, R. Reis, F. Chiellini, Eds.; *Topics in Tissue Engineering*, V. 4 Chap. 6, Expertissues e-books, Oulu, Finland (2008) 1-27.
- [13] F. Baino, M. Ferraris, O. Bretcanu, E. Verné, C. Vitale-Brovarone, *J. Biomater. Appl.* **27** (2013) 872-890.
- [14] A.R. Studart, U.T. Gonzenbach, E. Tervoort, L.J. Gauckler, *J. Am. Ceram. Soc.* **89**, 6 (2006) 1771-1789.
- [15] E.P. Santos, C.V. Santilli, S.H. Pulcinelli, *J. Non-Cryst. Solids* **304**, 1-3 (2002) 143-150.
- [16] J.R. Jones, *Acta Biomater.* **9** (2013) 4457-4486.
- [17] G. Poologasundarampillai, D. Wang, S. Li, J. Nakamura, R. Bradley, P.D. Lee, M. M. Stevens, D.S. McPhail, T. Kasuga, J.R. Jones, *Acta Biomater.* **10**, 8 (2014) 3733-3746.
- [18] Y. Kang, S. Kim, A. Khademhosseini, Y. Yang, *Biomater.* **32**, 26 (2011) 6119-6130.
- [19] J.L. de M. Machado, L.A. dos Santos, *Cerâmica* **55**, 334 (2009) 216-222.
- [20] M.M. Pereira, E.A. Clark, L.L. Hench, *J. Mater. Synth. Process.* **2**, 3 (1994) 189-195.
- [21] M.M. Pereira, E.A. Clark, L.L. Hench, *J. Biomed. Mater. Res.* **28** (1994) 693-698.
- [22] J. Ajita, S. Saravanan, N. Selvamurugan, *Mater. Sci. Eng. C* **53** (2015) 142-149.
- [23] S. Yang, K. F. Leong, Z. Du, C.K. Chua, *Tissue Eng.* **7**, 6 (2001) 679-689.
- [24] F.P.W. Melchels, J. Feijen, D.W. Grijpma, *Biomater.* **30** (2009) 3801-3809.
- [25] A.O. Helminen, H. Korhonen, J.V. Seppala, *J. App. Polym. Sci.* **86** (2002) 3616-3624.
- [26] A. Ronca, "Bioactive Composite Scaffolds for Bone Regeneration: From the Process to the Biological Validation", Tese Dr., Napoli: Università Degli Studi di Napoli "Federico II" (2010) 148p.
- [27] H. Yoshikawa, N. Tamai, T. Murase, A. Myoui, *J. R. Soc. Interface* **6** (2009) 341-348.
- [28] M.B. Coelho, M.M. Pereira, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **75B**, 2 (2005) 451-456.
- [29] N.J. Coleman, L.L. Hench, *Ceram. Int.* **26** (2000) 171-178.
- [30] K.S.W. Sing, *Pure Appl. Chem.* **57** (1985) 603-619.
- [31] T. Mosmann, *J. Immunological Methods* **65** (1983) 55-63.

(Rec. 22/12/2015, Rev. 19/02/2016, Ac. 09/04/2016)