

## ***Scaffolds* de Vidros Bioativos: Desenvolvimento de Estruturas Bioativas Nanoestruturadas**

E. L. G. Medeiros<sup>1</sup>, A. M. C. Santos<sup>1</sup>, E. S. Medeiros<sup>2</sup>, R. R. Menezes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Tecnologia de Materiais (LTM), Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campina Grande-PB.

<sup>2</sup> Laboratório de Materiais e Biosistemas (LAMAB), Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa-PB.

(Recebido em 10/01/2018; revisado em 29/01/2018; aceito em 27/02/2018)  
(Todas as informações contidas neste artigo são de responsabilidade dos autores)

### **Resumo:**

A engenharia de tecidos ósseos é um campo multidisciplinar promissor, na qual a nanotecnologia tem um papel fundamental no desenvolvimento de novas abordagens. Visando a substituição, reparação e reconstrução de tecidos, diversas técnicas de produção de *scaffolds* têm sido criadas e testadas ao longo do tempo com o objetivo de melhorar a viabilidade celular, a proliferação e a diferenciação osteogênica. Dentre elas destacam-se a prototipagem convencional (CP) e a prototipagem rápida (RP). CP utiliza métodos de subtração, na qual partes dos materiais são removidos para que as características e propriedades objetivadas sejam alcançadas. As técnicas de RP proporcionam um aprimoramento da biocompatibilidade do *scaffolds* e permitem um controle pontual da porosidade, tamanho de poros e propriedades mecânicas. Desse modo, visando características específicas para a reconstrução de um tecido vivo, os vidros bioativos, atraem a atenção dos pesquisadores como *scaffolds*, uma vez que são osteocondutivos, e osteoindutivos. E dessa forma, esta revisão visa fornecer uma descrição das estratégias utilizadas na confecção de *scaffolds* nanoestruturados, visto que esse é um campo de estudo amplo que conecta áreas de estudos distintas, tais como a medicina e a engenharia. Os principais traços que caracterizam um *scaffold* adequado à regeneração óssea em relação aos seus requisitos biológicos, características estruturais, composição e tipos de fabricação são descritos em detalhes.

**Palavras-chave:** Engenharia de tecidos; nanotecnologia; *scaffolds*; vidros bioativos.

### **Abstract:**

Bone tissue engineering is a promising multidisciplinary field in which nanotechnology plays a key role in developing new approaches. In order to replace, repair and reconstruct tissues, several techniques of *scaffolds* production have been created and tested over time with the aim of improving cell viability, proliferation and osteogenic differentiation. Among them, conventional prototyping (CP) and rapid prototyping (RP) stand out. CP uses subtraction methods, in which parts of the materials are removed so that the characteristics and objectified properties are achieved. The PR techniques provide an improvement in the biocompatibility of the *scaffolds* and allow a punctual control of porosity, pore size and mechanical properties. Thus, by looking at specific characteristics for the reconstruction of a living tissue, bioactive glasses attract researchers' attention as *scaffolds*, since they are osteoconductive, and osteoinductive. Thus, this review aims to provide a description of the strategies used in making nanostructured *scaffolds*, since this is a broad field of study that connects areas of distinct studies such as medicine and engineering. The main features that characterize a *scaffold* suitable for bone regeneration in relation to its biological requirements, structural characteristics, composition and types of manufacturing are described in detail.

**Keywords:** Tissue engineering; nanotechnology; *scaffolds*; bioactive glasses.

### **1. Introdução**

Embora o campo da engenharia de tecidos tenha surgido há quase 20 anos, observa-se a necessidade da conexão interdisciplinar entre engenharia e medicina por trás da engenharia de tecidos. Nesse sentido, tem-se visto como a nanotecnologia tem impactado várias áreas da medicina e da

engenharia, desde o desenvolvimento de técnicas diagnósticas baseadas em imagens, até a formulação de agentes terapêuticos sintéticos direcionados a nanoescala, no que diz respeito a materiais biologicamente utilizáveis para aplicação dos tratamentos de regeneração óssea [1,2].

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem atraído uma atenção especial por parte da comunidade científica devido ao fato de que materiais nanométricos apresentam propriedades

\*Email: romualdo.menezes@ufcg.edu.br (R. R. Menezes)

superiores em diversas áreas de interesse. Nesse contexto, destacam-se as nanofibras, as nanofitas, os nanofios e os nanobastões [3]. Como exemplo, nanofibras podem ser usadas na liberação controlada de drogas, na regeneração de tecidos e na fabricação de *scaffolds*. Tipicamente, os *scaffolds* se tratam de estruturas temporárias que dão suporte para as células crescerem e se proliferarem [4].

No contexto de regeneração tecidual, sendo o osso um dos órgãos mais comumente transplantados em todo mundo, na engenharia de tecidos ósseos o processo de regeneração combina as propriedades dos *scaffolds*, fatores de crescimento e células específicas em busca de uma multiplicação e diferenciação para formar um novo tecido [5].

Dessa forma, a engenharia de tecido ósseo é uma abordagem promissora para o tratamento de defeitos ósseos, fornecendo um modelo para orientar essa regeneração tecidual. Os *scaffolds* fabricados com uma microestrutura similar à estrutura óssea do hospedeiro são necessários em estratégias de regeneração. Os vidros bioativos, nesse caso, atraem a atenção dos pesquisadores como *scaffolds*, uma vez que são osteocondutivos e osteoindutivos, visto que, o bloco de construção básico do osso é formado por uma matriz cerâmica de apatita e uma matriz proteica composta por fibras de colágeno. Dessa forma, compreende-se a importância das estruturas fibrilares para a produção de *scaffolds* utilizados na engenharia de tecidos [6,7].

## 2. Engenharia de tecidos – ET

Ao longo dos séculos XIX e XX a humanidade observou uma enorme mudança social após a invenção do microscópio de esferas de vidro. Este possibilitou o estudo e tratamento de muitas doenças levando ao aumento da expectativa de vida de 45 para mais de 80 anos. A consequente descoberta de formas de vida microscópicas como bactérias, vírus e fungos caracterizou a primeira revolução nos cuidados com a saúde [2]. A segunda revolução ficou por parte da engenharia de tecidos (ET). A ideia de substituir partes do corpo danificadas em humanos remonta a pré-história. Isto pode ser visto, por exemplo, no uso de próteses de madeiras para partes dos membros inferiores no antigo Egito (3000 a.c.), dentes artificiais feitos de conchas pelos Maias (600 a.c.) e de ouro e madeira pelos romanos, chineses e astecas [1]. Nos últimos 50 anos a ET entrou em cena visando a reparação, substituição e restauração de funções teciduais [2,8].

A primeira geração de materiais utilizados para reposição de tecidos compreende o conjunto daqueles que são inertes ao ambiente corporal. Os biomateriais padrões como os metais resistentes à corrosão, as biocerâmicas e os materiais poliméricos insolúveis, todos materiais não tóxicos, foram os selecionados para essa categoria [2,9]. A segunda geração de materiais utilizados na ET surgiu no final da década de 60 em função de falhas dos seus “precursores” devido a incompatibilidade da interface entre o material e o tecido vivo, além da natureza agressiva dos fluidos corporais. Um novo conceito de biocerâmica foi desenvolvido: os vidros bioativos. Diferentemente dos materiais da primeira geração, os vidros bioativos apresentavam a capacidade de se ligar a

tecidos vivos, aumentando consequentemente a biocompatibilidade entre o biomaterial e o meio hospedeiro. Como consequência, os vidros bioativos se tornaram alvo de estudos no campo da ET especificamente na regeneração do tecido ósseo [2].

O osso é um dos órgãos mais comumente transplantados em todo mundo. Uma série de desafios clínicos tem que ser superados para a reconstrução tecidual como: limitações devido à variedade de tamanhos de defeitos, tensões mecânicas e cobertura de tecidos moles disponíveis. O uso de implantes sintéticos é visto como uma opção na substituição do tecido ósseo danificado. Por outro lado, a fraca integração, infecções e outras reações podem gerar complicações e rejeição com posterior perda do material implantado [5].

A mais recente abordagem empregada para contornar os problemas supracitados faz o uso de um biomaterial hierarquicamente desenvolvido em uma estrutura em três dimensões (3D), capaz de mimetizar a matriz extracelular (MEC) do tecido ósseo, ou seja, deve fornecer suporte celular e porosidade adequada para o processo de adesão celular, proliferação e diferenciação durante o processo de formação óssea. [4,5].

A engenharia de tecidos visa, portanto, reparar e reconstruir novos tecidos, combinando os conceitos de ciências dos materiais e biomedicina (biomaterial, células, fatores de crescimento celular...) através de duas abordagens clássicas, *in vitro* e *in vivo* (Figura 1). A estratégia *in vitro* (Figura 1A) baseia-se no cultivo de células em um substrato de biomaterial, de forma que se obtenha um tecido funcional composto por células maduras para ser transplantado para o paciente. Neste caso, o *scaffold* deve apresentar densidade e porosidade adequada para a obtenção do alinhamento adequado das células fibrosas e uma boa vascularização, resultando na criação de tecidos capazes de gerar forças de contração fisiologicamente relevantes. Por outro lado, a abordagem *in vivo* (Figura 1B) baseia-se no transplante de células para o local da lesão, onde ocorre a regeneração muscular. A combinação de fatores de crescimento (substâncias com funções específicas), células e características estruturais no paciente proporcionam um nicho a partir do qual as células podem orquestrar o processo de regeneração. A formação de um novo tecido pode acontecer através da integração com o tecido do hospedeiro, ou através de mecanismos regenerativos do próprio corpo [10–12].

As estratégias clássicas de engenharia de tecidos até agora têm sido incapazes de mostrar consistentemente o sucesso em vários modelos pré-clínicos. Porém a engenharia de tecidos *in situ* (Figura 1C) tem mostrado grande potencial para superar essa inconsistência. Nessa abordagem, os biomateriais são confeccionados para sinalizar, ativar, recrutar e reorganizar populações de células, podendo ainda exercer propriedades de proteção imunológica. Os agentes sinalizadores estimulam o recrutamento e a organização das células hospedeiras e asseguram a sua sobrevivência através da vascularização [10,12,13].

Para melhor compreender o processo de regeneração óssea via engenharia de tecidos, três conceitos devem ser apresentados: a osteogênese, a osteocondução e a

osteogênese. Estes princípios podem ser utilizados para otimizar as abordagens terapêuticas para regeneração óssea. Osteogênese tem sido descrita como a transferência direta de células vitais para a área onde ocorrerá o processo de regeneração e formação do novo osso. Já a osteocondução trata do fornecimento do espaço e de um substrato para os eventos celulares e bioquímicos progredindo para a formação óssea. Osteoindução incorpora o princípio da conversão de células pluripotenciais (células capazes de se diferenciar em qualquer célula do tecido humano), derivadas de mesênquima em osteoblastos, com a formação subsequente do osso [14–16].

Portanto, como citado anteriormente, na terapia de engenharia óssea o processo de regeneração óssea deve ser acelerado de forma a combinar as propriedades de uma matriz, isto é, o *scaffold*, através da sinalização via fatores de crescimento para orientar a diferenciação em concordância com a multiplicação e proliferação de células para formação de tecido. Além disso, é necessário um suprimento sanguíneo afim de garantir uma adequada vascularização (Figura 1D) [5].

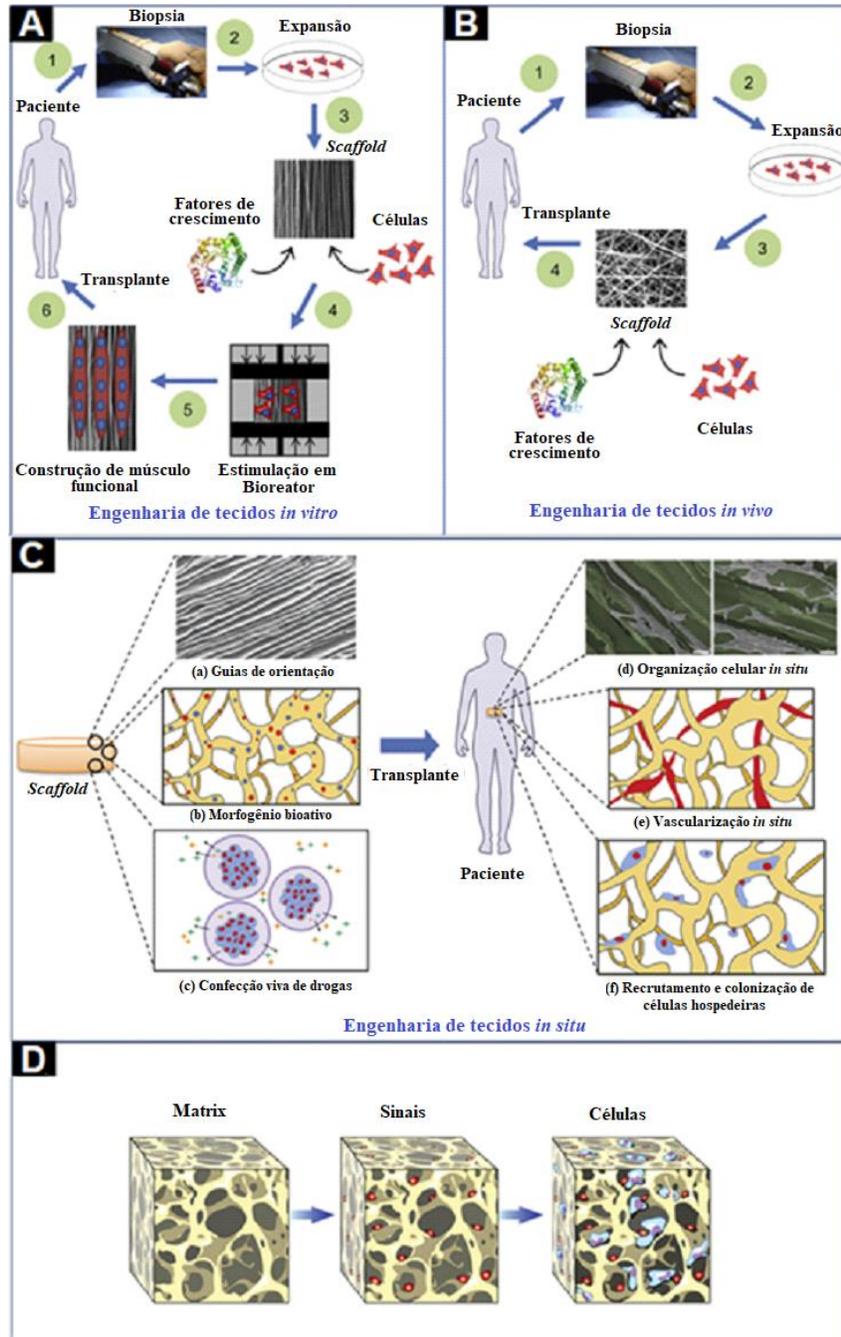


Figura 1 – (A) A engenharia de tecidos *in vitro*; (B) “*in vivo*”; (C) “*in situ*”; (D) Elementos essenciais para a regeneração óssea [5,10]

### 3. Scaffolds

#### 3.1 Estrutura e requisitos

A estrutura do *scaffold* deve ser porosa com poros interconectadas e ter uma química de superfície sob medida, de forma a facilitar o crescimento celular, a proliferação e o transporte de nutrientes e resíduos metabólicos. Além disso, requisitos como biodegradabilidade, biocompatibilidade, estrutura e propriedade mecânica devem ser observadas ao longo do processo de desenvolvimento. As células são direcionadas para crescerem para a forma física desejada e para suportar a vascularização do tecido encravado. Uma porosidade típica de 90%, bem como um diâmetro de poro de pelo menos 100  $\mu\text{m}$  é desejado para a difusão celular e uma vascularização adequada do novo tecido [12,17]. Após a implantação do biomaterial no paciente, o processo de regeneração promoverá a formação de um neo-tecido que deverá substituir os espaços deixados pela degradação do biomaterial. Do ponto de vista da engenharia, a otimização dos *scaffolds* em estruturas hierárquicas em 3D é de fundamental importância para a medicina regenerativa [18,19].

Biocompatibilidade tem haver com o fato do material não causar uma resposta inflamatória, nem demonstrar imunogenicidade ou citotoxicidade. Sua função é, de uma forma previsível com atividade osteogênica controlada, produzir apenas substâncias metabolicamente aceitáveis e a sinalizar para orientar a diferenciação celular, além de promover a regeneração tecidual [18–21].

Finalmente, as propriedades mecânicas do *scaffold* devem ser suficientes para evitar que a estrutura venha a colapsar durante o manuseio e atividades normais do doente, sendo necessário combinar as propriedades mecânicas dos tecidos hospedeiros com uma interface tecido-tecido, forte e estável, que persiste através do processo de degradação. Dessa forma, pode-se reduzir o risco de rejeição ou reação corpo estranho e conseguir uma boa adaptação e cobertura pelos tecidos moles circundantes que garantem o fornecimento de resistência e rigidez suficientes para prevenir a fratura sob cargas fisiológicas [18,22]. Atendendo a esses requisitos, o *scaffold* substitui temporariamente o tecido natural fornecendo uma estrutura adequada para o corpo criar um novo tecido ósseo [12,20,23].

#### 3.2 Métodos de fabricação

O interesse pelo desenho de estruturas 3D para utilização como *scaffolds* na ET foi acompanhado pelo desenvolvimento de métodos que buscaram atender às características e critérios antes discutidos. Várias tecnologias estão disponíveis e inicialmente podem ser divididas em duas categorias: prototipagem convencional (“*conventional prototyping*”, CP) e prototipagem rápida (“*rapid prototyping*”, RP). CP utiliza métodos de subtração, na qual partes dos materiais são removidos para que as características e propriedades objetivadas sejam alcançadas. Entretanto, a difícil introdução de arquiteturas e geometrias específicas, bem como o uso de

solventes orgânicos tóxicos de difícil retirada, torna essa tecnologia limitada [24,25]. As técnicas de RP proporcionam um aprimoramento da biocompatibilidade do *scaffold*, pois em geral não utilizam solventes orgânicos tóxicos, e permitem um controle pontual da porosidade, tamanho de poros e propriedades mecânicas. Essa técnica, baseia-se no conceito de fabricação aditiva no qual o objeto final é formado através da deposição de camadas sobrepostas [26].

As técnicas convencionais incluem moldagem por Lixiviação (“*Solvent casting and particle leaching*”), Liofilização (“*Freeze-drying*”), Separação de fases termicamente induzidas (“*Thermally Induced Phase Separation*”), Formação de espuma (“*gas foaming*”), Formação a partir de pó (“*Power forming*”), sol-gel e eletrofiliação (“*eletrospinning*”) [24].

#### Lixiviação (“*Solvent cast and particle leaching*”)

No método de lixiviação uma solução de polímero é dissolvida em um solvente com partículas de sal distribuídas uniformemente e com tamanho específico. O solvente é retirado por evaporação e uma matriz de partículas de sais incorporado é formada. O sistema é imerso em água para a dissolução do sal e formação de uma estrutura altamente porosa. Trata-se de uma técnica de fácil execução e de baixo custo. As vantagens estão relacionadas ao fácil controle no tamanho dos poros e a confecção de estruturas com elevada porosidade. Como desvantagens, produz estruturas simples como folhas planas e tubos, além do produto final poder conter resíduo de solvente, prejudicando as interações celulares [27]. Outro desafio observado nesse método é a espessura dos *scaffolds*, compreendendo valores de 3-4 mm, o que limita a aplicação em outras áreas, como reparo ósseo espesso, etc. Alguns pesquisadores modificaram esse método com a adição de tecnologia de centrifugação e camadas para solucionar essas limitações. A centrifugação melhorou a uniformidade e a interconectividade dos poros nos *scaffolds*. Ao utilizarem tamanhos de partículas de sal de 212-295, 295-425 ou 425-531  $\mu\text{m}$  e uma concentração de solução de polímero a 15% p/v, foram obtida uma porosidades entre 83-92% [28–30].

#### Liofilização (“*Freeze drying*”)

O processo de liofilização baseia-se no princípio da sublimação de um solvente através de um ajuste adequado de baixas temperaturas e baixas pressões. Por exemplo, na produção de *scaffolds* poliméricos o material é primeiro dissolvido em um solvente adequado e em seguida a solução polimérica é congelada abaixo do seu ponto de congelamento, levando a solidificação do solvente. Posteriormente, esse sistema é levado ao liofilizador ajustado a uma temperatura bem abaixo do ponto de congelamento do solvente e a pressões extremamente inferiores à atmosférica o que, por conseguinte, provoca o processo de sublimação do solvente [31]. Espaços vazios são formados deixando uma estrutura porosa e muitas vezes canais interconectados. Essa técnica abre um leque de possibilidades para introdução de fatores

biológicos, que facilmente se degradariam em procedimentos que envolvem altas temperaturas [27]. Além do mais, esse procedimento permite o controle do tamanho dos poros e da anisotropia, de forma que as estruturas geradas possam apresentar porosidade superior a 90% [32,33]. A literatura tem mostrado o avanço e o aprimoramento dessa técnica através do uso de diversos polímeros. Estes incluíram gelatina [33] e suas misturas com hidroxiapatita [34], poli ácido láctico (PLA) [35], poli (hidroxibutirato-co-valerato) com hidroxiapatita [36], policaprolactona (PCL) [37], e quitosana [38], dentre outros.

#### Seperação de fases termicamente induzidas (“Thermally Induced Phase Separation” TIPS)

A separação de fases termicamente induzida (TIPS) se trata de uma técnica que se baseia na mudança de energia interna de um sistema para provocar o processo de separação de fases de uma solução polimérica homogênea em outro sistema com dois ou mais domínios. Isso pode ser provocado por resfriamentos bruscos abaixo da curva de solubilidade binodal ou pelo uso de um não solvente [1]. O solvente se separa da estrutura polimérica devido a mudança no coeficiente de solubilidade provocado pelo abaixamento da temperatura, formando uma fase rica em polímero e outra pobre. A fase polimérica se solidifica e a outra fase é retirada deixando uma estrutura altamente porosa. Um de suas vantagens se reflete em poder combinar facilmente com outras tecnologias de fabricação (lixiviação de partículas) para projetar estruturas tridimensionais com a morfologia altamente controlada de poros [27].

Recentemente Gioacchino Conoscenti et al. em 2017, produziram *scaffolds* de PLLA (poliácido láctico) via separação de fases termicamente induzida e mostraram em seus resultados que a técnica é altamente capaz de criar *scaffolds* homogêneos com tamanho de poros bem definidos. O estudo revela que uma diferença remota no tamanho do poro do *scaffold* (100 vs. 200 micrometros) já leva a efeitos bem reconhecíveis na expressão gênica de marcadores de cartilagem [39].

#### Formação de espumas (“Gas foaming”)

A técnica de formação de espumas consiste na utilização de agentes de expansão que pressurizam polímeros moldados. Estes agentes se tornam instáveis formando bolhas de gás que agem como agente porosificadores causando uma expansão no volume e uma redução na densidade polimérica. Esta técnica tipicamente produz estruturas tipo esponja com um tamanho de poro médio na faixa de 30-700  $\mu\text{m}$  e uma porosidade até 85% [24]. Ela foi desenvolvida para evitar solventes orgânicos e citotóxicos. Um estudo recente utilizou a técnica de formação de espumas para produção de *scaffolds* de poliuretano (PU), de forma a avaliar a biomineralização e a citocompatibilidade celular. Os resultados mostraram que a biomineralização de espumas de PU pode ser muito útil no desenvolvimento de materiais para substituição óssea esponjosa, em relação às propriedades morfológicas,

capacidade de promover a adesão e proliferação celular de células ósseas mensenquimais [40]. A Figura 2 mostra uma micrografia da espuma de PU obtida por Meskinfam, em 2018 no trabalho acima citado.

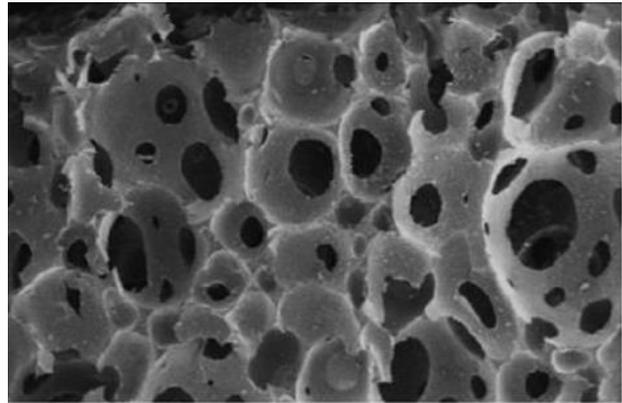


Figura 2 - *Scaffold* espumoso de PU fabricado por gas foaming [40].

#### Formação a partir do pó (“Powder-forming”)

O processo de produção de *scaffolds* utilizando pós consiste na preparação de uma suspensão de partículas cerâmicas em um líquido apropriado formando uma pasta. A partir dessa pasta os corpos verdes são produzidos de diversas formas. Uma subsequente queima resulta nos *scaffolds* porosos. Materiais como a sacarose, a gelatina, e um agente molhante (tensor ativo) podem ser adicionados à suspensão cerâmica com o intuito de produzir porosidade quando são evaporados ou queimados durante a sinterização [41]. Nesse processo, destaca-se um procedimento muito utilizado chamado de “replicação”. As partículas são distribuídas uniformemente e uma fase cristaliza na queima deixando a estrutura porosa. Essa técnica proporciona um bom controle de porosidade e tamanho de poros [24,31]. Chen et al., em 2006, produziram um biovidro segundo a composição 45S5 e em seu trabalho, esses pesquisadores obtiveram *scaffolds* com com porosidade de cerca 90% e tamanho de poro variando de 510 a 720  $\mu\text{m}$ , além de boa estabilidade mecânica sem perda de bioatividade [12].

#### Eletrofiação (“Electrospinning”)

Eletrofiação trata-se de uma técnica de fabricação “*top-down*” de fibras, na qual se utiliza um campo elétrico para formar fibras com diâmetros desde a escala micrométrica à nanométrica. Um aparato usual é composto de uma bomba de infusão, conjunto seringa e agulha metálica para a formação da gota de fiação, um coletor e o sistema elétrico. A diferença de potencial aplicada pelo sistema elétrico gera altos campos elétricos e sua força supera a tensão superficial da gota, alongando a mesma. O solvente evapora no processo de forma a resultar na formação fibrilar. As fibras são então coletadas no coletor aterrado [42].

Sendo assim, desde que as fibras micro-nanométricas são os blocos básicos de construção estrutural para a maioria dos tecidos conjuntivos (por exemplo, vasos sanguíneos, tendões,

nervos, etc.), para um *scaffold* é necessário uma estrutura fibrosa com tamanhos e porosidades adequados para permitir a infiltração celular [43]. Dessa forma, como técnica de fabricação de fibras, a eletrofição é um dos métodos mais utilizados para a fabricação de *scaffolds* fibrosos que mimetizam matrizes extracelulares.

Lin Jiang et al. (2017) fabricaram diferentes estruturas hierárquicas utilizando a eletrofição. Nesse estudo fibras de PCL em uma estrutura “*shish-Kebab*” foram utilizadas como *scaffolds* e suas propriedades de superfícies foram analisadas tendo em vista a citocompatibilidade. Células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVECs) foram então cultivadas para investigar a resposta celular nas fibras de PCL de superfície lisa, nanoporosas e fibras estruturadas “*shish-kebab*”. Em seus resultados, os *scaffolds* com superfícies porosas proporcionaram um ambiente mais favorável para o crescimento celular com base em testes e análises de morfologia celular em comparação com os *scaffolds* fibrosos estruturados *shish-kebab* [43].

A prototipagem rápida se trata de técnicas que utilizam métodos de subtração, de forma que se obtenha as características e propriedades desejadas através da retirada de parte dos materiais. Dentre as principais tecnologias destacam-se: esterolitografia (Stereolithography), modelagem por deposição do fundido (Fused Deposition Modeling, FDM), sinterização seletiva à laser (Selective Laser Sintering, SLS), impressão 3D, (3D Printing, 3DP) e bioimpressão (Bioprinting) [31].

#### Esterolitografia (“Stereolithography”)

Essa técnica baseia-se em métodos para fazer objetos sólidos, sendo fabricados camada por camada através de um material curável por luz ultravioleta (UV). Esquemáticamente tem-se um recipiente com uma resina líquida sensível a luz, na qual os feixes UV são direcionados através de um sistema de espelhos dinâmicos para pontos e locais específicos da resina, causando a cura do material. Uma plataforma móvel desloca a parte curada para que uma outra camada possa se solidificar produzindo assim, camada por camada, uma estrutura tridimensional. Finalmente a resina que não foi curada é retirada e uma nova cura é realizada para a produção do produto final [31]. A maioria dos materiais usados na esterolitografia tratam-se de resinas, termoplásticos e poli etileno glicol (PEG) à base de hidrogéis. Entretanto esses materiais têm aplicação limitada devido a falta de biodegradabilidade ou resistência mecânica suficiente. O poli propileno fumarato (PPF) tem sido usado como um material promissor para superar essas limitações [44]. Em 2007, Lee et al. produziram *scaffolds* porosos com poros interconectados de forma uniforme e regular. Ainda foram observados a bioatividade e o cultivo de células fibroblásticas para verificação da adesão e biocompatibilidade celular. Seus resultados mostraram que as células se aderiram aos *scaffolds* e ao longo do tempo células adicionais foram observadas [45].

#### Modelagem por deposição fundida (“Fused deposition modeling”)

O processo de modelagem por deposição fundida utiliza materiais termoplásticos fundidos, que a partir de um bico são depositados em uma base móvel. Na base, tem-se o plano xy e através de um sistema CAD/CAM os lugares específicos de deposição são pre-definidos. Quando uma camada é finalizada, a base move para baixo (eixo z) e o processo se repete. Dessa forma, os *scaffolds* são confeccionados tridimensionalmente, com porosidade controlada e a quantidade de material a ser depositado, a geometria definida no plano de deposição xy, e o intervalo de altura entre cada epata, são as variáveis do processo. Detacam-se como vantagens a produção de materiais com alta porosidade e boa resistência mecânica, além do fato de que nenhum solvente tóxico necessita ser usado [31].

#### Sinterização seletiva à laser (“Selective laser sintering, SLS”)

Na sinterização seletiva à laser, um pó pouco compactado é submetido a um laser de alta potência que sinteriza partícula por partícula unindo as mesmas de forma controlada, formando camadas finas. As camadas também são unidas umas as outras e o processo segue as informações e dados contidos em CAD pre-definidos. A interação do feixe do laser com o pó aumenta a temperatura do pó acima da temperatura de transição vítrea e abaixo da temperatura de fusão, fazendo com que a fusão e a ligação das partículas formem uma massa sólida [46]. O processo resulta em estruturas porosas, porém uma fase pós-processamento é necessária para a remover o pó que possivelmente fica preso [31]. Além disso, a condução e a difusão do calor do laser podem causar uma ligação indesejada entre partículas próximas do ponto focalizado pelo laser e isso é o que impossibilita a construção de características menores que 400 µm. O uso de um tamanho de ponto de laser menor, tamanho de partícula e espessura de camada mais fina pode melhorar o processo de SLS para permitir a produção do *scaffolds* com arquitetura mais controlada [47].

#### Impressão 3D, (“3D Printing, 3DP”)

A técnica de impressão 3D consiste no uso de uma impressora que é capaz de imprimir uma solução líquida contendo uma substância aglutinante. Primeiro, o equipamento distribui uma camada de pó sobre uma plataforma e as gotas do líquido impresso agem ligando as partículas do pó. A plataforma se move e outra camada de pó é depositada, e o processo de impressão se repete. Ao final do processo, a remoção do pó não aglutinado revela a peça construída. A possibilidade de processamento em temperatura ambiente da tecnologia 3DP permite o uso de uma ampla gama de materiais em pó e a incorporação de uma variedade de agentes farmacêuticos e biológicos [48].

O processo pode ser entendido como em duas estratégias diferentes, a impressão 3D direta e a indireta. Na 3DP direta o

produto final é impresso diretamente. A 3DP indireta trata-se da fabricação de um molde na qual posteriormente o produto principal é fabricado. Imprimindo na forma direta, tem-se um maior controle pontual tanto macroscopicamente, como microscopicamente. Entretanto, os tamanhos de poros são limitados, bem como, há uma certa dificuldade em se fabricar formas altamente complexas. Na fabricação indireta os moldes são impressos com gesso e dessa forma, polímeros biodegradáveis são usados, sendo também possível a introdução de agentes porógenos sem limitação de tamanho. As limitações consistem na fabricação de cortes internos ou canais de cruzamento, bem como restrições de forma e design, tendo em vista a dificuldade de desmoldagem. (por exemplo, cortes internos ou canais de cruzamento) e restrições de forma ou design de recursos devido à dificuldade de desmoldagem [49,50].

#### *Bioimpressão (“Bioprinting”)*

A bioimpressão trata-se de uma técnica de fabricação aditiva na qual células e biomateriais são impressas conjuntamente com precisão micrométrica. Ela permite a construção de estruturas em condições ambientais e um certo controle da distribuição celular [49]. As técnicas de bioimpressão mais conhecidas são: a bioimpressão a base de jato, extrusão e laser [51].

A bioimpressão a base de jato produz estruturas 2D e 3D usando gotículas de bio-tinta em camadas sobre um substrato. O processo é muito semelhante a impressão 3D normal, e agrega baixo custo, alta velocidade de impressão e viabilidade celular relativamente alta (80-90%). As desvantagens residem no entupimento da cabeça de impressão e um gama de materiais estreita para a impressão [52]. Já na bioimpressão a base de extrusão, uma mistura de células com hidrogel é forçada por uma pressão a passar através de um micro-bico. Após a impressão de uma camada 2D, os hidrogéis são solidificados fisicamente ou quimicamente e as estruturas 3D são fabricadas por empilhamento. Através desse método tem-se uma maior seleção de biomateriais, uso de polímeros sintéticos, produção escalável e maior viabilidade celular (90%). A principal desvantagem da bioimpressão baseada em extrusão trata-se da utilização de resoluções relativamente baixas [51].

A bioimpressão a laser utiliza um laser para transferir o material à ser impresso para um substrato. Um material receptor geralmente constituído de um vidro coberto com uma camada de ouro, absorve o laser com um sistema de foco, e dessa forma é criado uma gota à alta pressão, que, por sua vez, transfere materiais contendo células para o substrato. Nessa técnica utiliza-se altas resoluções e não há problemas com entupimento, além de poder ser utilizado com uma variedade de biomateriais, uma vez que se trabalha com várias viscosidades [49,51]. Entretanto não é possível trabalhar com viabilidade celular alta, quanto comparada com os outros métodos [31].

## 4. Vidros bioativos

### 4.1 Conceito e aspectos principais

Todos os anos milhões de pessoas sofrem de defeitos ósseos decorrentes de trauma, tumor ou doenças relacionadas com os ossos [2]. Para resolver tais patologias, a segunda geração de biomateriais se utiliza de abordagens terapêuticas mais satisfatórias e livres de complicações aliada a busca de novos materiais para o uso na engenharia de tecidos. Um novo conceito para a reposição de tecidos foi criado no final da década de 60 quando Larry L. Hench formulou e produziu uma composição especial de vidro de soda-cal-fosfato-silicato. Posteriormente, Ted Greenlee e colegas na Universidade da Flórida [53,54] implantaram com sucesso um vidro em fêmures de ratos cuja formulação consistia de 45% de  $\text{SiO}_2$  em peso, com modificadores de rede de 24,5% de  $\text{Na}_2\text{O}$  e 24,5% de  $\text{CaO}$ . Adicionou-se ainda 6% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  à composição do vidro para simular os constituintes Ca/P da hidroxiapatita (HA). Os resultados iniciais mostraram total integração do vidro com o tecido hospedeiro, de forma que não pôde ser removido do local do implantado [53–55]. Essa descoberta levou ao desenvolvimento de uma nova classe de biomateriais, chamados de materiais bioativos, para uso em implantes ou próteses e reparo ou substituição de ossos, articulações e dentes.

Dessa forma, o conceito de "bioatividade" tornou possível expandir consideravelmente as abordagens tomadas na reposição de tecidos. As cerâmicas bioativas são materiais que promovem a formação de uma camada ativa de hidroxiapatita carbonatada (HCA), promovendo a ligação entre o material e o tecido ósseo, pois a fase HCA formada em implantes é equivalente, estrutural e quimicamente, a encontrada na fase mineral do osso [56].

Os vidros bioativos apresentam excelente biocompatibilidade e habilidade de ligar ossos, agregando as características de osteoindução e osteocondução. Quando em contato com fluidos biológicos, esse material é capaz de desenvolver uma camada de fosfato carbonatado deficiente em cálcio, a qual promove uma ligação química com o osso hospedeiro. A capacidade bioativa desses vidros está diretamente relacionada a capacidade biológica de formação da camada ativa de HCA [51-53]. Além disso, muitas pesquisas mostram que os vidros bioativos promovem atividade enzimática [59,60], vascularização [61,62], mantem a adesão osteoblástica, além de regular o crescimento e diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos [63,64]

Hench et al., em 1991, estudaram várias composições dos vidros bioativos e os classificaram de acordo com sua composição e bioatividade em três regiões principais, como pode ser observado na Figura 3. As cerâmicas que podem ser obtidas da região A (região branca) exibem alta bioatividade, habilidade de se ligar a ambos os tecidos, moles e duros, são osteoprodutivas (o osso cresce na superfície do material devido a associada atividade osteoblástica) e osteocondutivas. As composições de vidros relacionadas a região B exibem apenas osteocondutividade, e referente a região C, são

reabsorvíveis em até 30 dias *in vivo* [65,66]. Dessa forma, vidros bioativos com composição no sistema  $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ , tendo concentrações  $< 55\%$  de  $\text{SiO}_2$ , são encontrados na região A. Assim a composição química do biovidro é um dos fatores que possivelmente definirá seu comportamento de interação e de regeneração com os ossos [56,65].

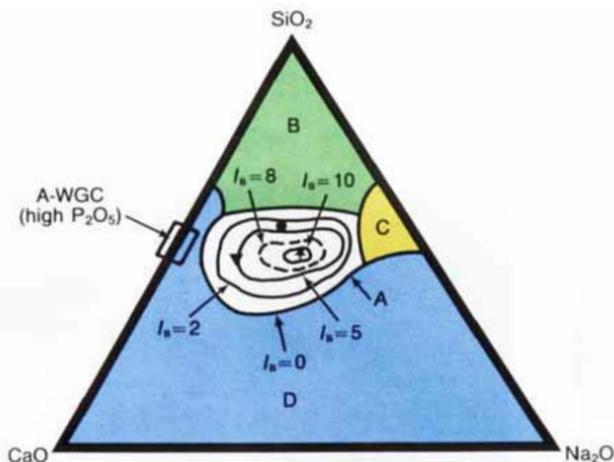


Figura 3 - Diagrama de composição mostrando as classificações para as cerâmicas bioativas [56]

#### 4.2 Métodos de Fabricação e evolução das composições

O método mais comumente utilizado para a produção dos vidros bioativos consiste na fusão de uma mistura de óxidos, carbonatos e fosfatos, seguida de uma têmpera do fundido para formar o vidro, o qual é então triturado quando o objetivo é obter o material na forma particulada. Sendo assim, sabendo que a formação da camada de HA tem relação direta com a razão Ca/P, a bioatividade e a biocompatibilidade de um vidro bioativo são devidas à presença de fósforo e cálcio. Ademais, os íons de sódio na composição Bioglass® contribuem para dois efeitos. Primeiro,  $\text{Na}_2\text{O}$  é um fundente eficaz no processo de fusão do vidro, tornando mais fácil para homogeneizar e diminuindo a temperatura de fusão do sistema. Em segundo lugar, a dissolução do  $\text{Na}^+$  e do  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do vidro resultará na formação de uma bicamada rica em sílica e rica em  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  e finalmente na formação de HCA. Os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  liberados também afetam o equilíbrio fisiológico da solução na interface vidro/cerâmica e modificam o pH local [53]. Desse modo, no ambiente fisiológico, a alcalinização ainda pode promover a síntese e reticulação do colágeno juntamente à formação de HA. A presença de  $\text{SiO}_2$  (formador de rede) também ajuda a precipitação ou reconstrução de superfície da camada solta, rica em sílica e, portanto, aumenta a formação da camada de hidroxiapatita. Além disso, do ponto de vista da produção, a sílica é responsável por manter a estrutura de vidro não periódica tridimensional durante a dissolução seletiva dos cátions [65,67,68].

Nos últimos anos diferentes composições e bioatividades correspondentes foram desenvolvidas, entretanto, os vidros

mais bioativos basicamente são constituídos de  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$ , e  $\text{P}_2\text{O}_5$ , tendo como principal composição a primeira desenvolvida, já mencionada, a do *45S5 Bioglass®* que contém 45%  $\text{SiO}_2$ , 24,5%  $\text{Na}_2\text{O}$ , 24,5%  $\text{CaO}$  e 6,0%  $\text{P}_2\text{O}_5$  em peso. Essa composição específica para o *45S5 Bioglass®* supra-regula a expressão genética que controla a osteogênese e a produção de fatores de crescimento [66,69]. A Figura 4, ilustra a formação da HA na superfície do *45S5 Bioglass®* após ensaio na solução que simula o fluido coporal (“*Simulated blood fluid*” – SBF).

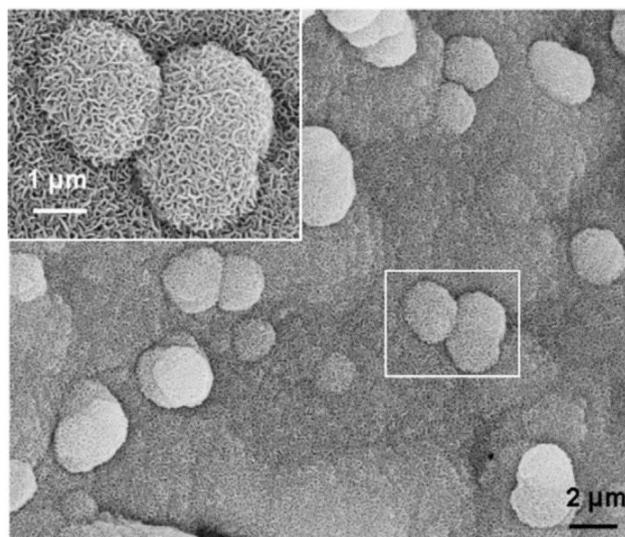


Figura 4 - Micrografia que ilustra a morfologia “couve-flor”, típica da hidroxiapatita formada sobre a superfície do *Bioglass® 45S5* após imersão em simulador de fluido corporal (SBF) durante 28 dias [30].

A respeito da composição, os vidros bioativos podem ser basicamente divididos em três grupos, nos quais dependem do oxido formador da rede, isto é, sistemas baseados em  $\text{SiO}_2$  (silicato), em  $\text{B}_2\text{O}_3$  (borato) e  $\text{P}_2\text{O}_5$  (fosfato). O primeiro grupo compreende uma ampla gama de formulações de vidro, incluindo *45S5 Bioglass®* e outras composições típicas, tais como 13-93 BG (% em peso: 53% $\text{SiO}_2$ -6% $\text{Na}_2\text{O}$ -12% $\text{K}_2\text{O}$ -5% $\text{MgO}$ -20% $\text{CaO}$ -4% $\text{P}_2\text{O}_5$ ) e S53P4 (53% $\text{SiO}_2$ -23% $\text{Na}_2\text{O}$ -20% $\text{CaO}$ -4% $\text{P}_2\text{O}_5$ ) comercialmente designado como *BonAlive®* (BonAlive Biomaterials, Turku, Finlândia). Os vidros de borato são caracterizados por sua maior reatividade em relação aos vidros à base de sílica, o que resulta em cinética bioativa mais rápida. Os vidros fosfatados são materiais reabsorvíveis e a sua taxa de dissolução pode ser ajustada de acordo com a sua composição [70].

O método padrão de fusão seguido da solidificação do líquido fundido para formar o vidro bioativo (especificamente da série *Bioglass®*) acompanha uma série de desvantagens, tais como: alto custo devido a altas temperaturas envolvidas e ao uso de recipientes especiais para sinterização; a utilização de muitas etapas, que podem influenciar na bioatividade e ser passível de contaminação; a limitação de composição devido a altíssima temperatura de equilíbrio-liquidus do  $\text{SiO}_2$  (1713°C) e a alta viscosidade do sistema fundido com alta porcentagem de  $\text{SiO}_2$ . Além disso, esse método de produção produz frequentemente materiais quimicamente heterogêneos. Dessa

forma, objetivou-se por um longo tempo a procura por uma nova rota de fabricação desses materiais. Assim, em 1991, Li et al. propuseram uma síntese de vidros bioativos semelhantes, pelo método sol-gel, o qual permitiu a produção de vidros bioativos com maior pureza e homogeneidade e também expandiu significativamente as gamas de composições que apresentam bioatividade, em comparação com vidros bioativos preparados pelo método tradicional de fusão [71].

Em contrapartida ao método via fusão, o método sol-gel utiliza baixas temperaturas, e sendo assim, não há mais a necessidade de componentes que sirvam como fundentes e que ajudem na homogeneização do sistema, tal como  $\text{Na}_2\text{O}$ . Dessa forma, esse fato levou a simplificação do sistema, dando origem aos primeiros vidros do sistema ternário  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  [71,72]. Além desse fato, outra consideração deve ser salientada, a adição desses componentes torna o vidro em questão mais solúvel em meio aquoso, fato esse, de suma importância para a formação da HCA e para a proliferação e diferenciação celular [60,72,73]. Por outro lado, o método de produção via sol-gel é capaz de produzir materiais com elevada área específica, e assim, esse fato é contrabalançado pela elevada área superficial dos vidros bioativos obtidos por essa rota [72,74,75].

O método sol-gel tem sido vastamente explorado em função de suas inúmeras vantagens. A possibilidade de introdução de novos elementos, como Zn [76], Mg [77], Ag [78], Sr [79], Sm [80], Ti [81], e Ce [82] e outros, visando aplicações específicas, foi objeto de estudo de várias pesquisas. No entanto, apesar destes desenvolvimentos em relação aos processos de síntese, o estudo dos vidros bioativos originais de sol-gel quaternário, contendo Na, foi largamente inexplorado. Laczka et al. em 2000 [83] sintetizaram materiais do sistema ternário  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$  com adição de vários outros elementos incluindo o  $\text{Na}_2\text{O}$ , e Carta et al. em 2005 [84] desenvolveu uma nova formulação no sistema quaternário, porém sua composição diferiu bastante da composição original do Bioglass® 45S5.

Ao mesmo tempo em que a cristalização de alguns sistemas vítreos diminuiu significativamente a sua bioatividade, os vidros bioativos geralmente apresentam alta bioatividade e baixas propriedades mecânicas, enquanto que os vidros-cerâmicos bioativos têm boas propriedades mecânicas, mas baixa bioatividade [85,86]. Em virtude desse fato, alguns grupos de pesquisadores têm direcionado sua atenção a produção de vitro-cerâmicas altamente cristalina, porém com uma bioatividade considerável.

A primeira vitro-cerâmica bioativa mostrando boas propriedades mecânicas e alta bioatividade foi desenvolvida em meados dos anos 90 por Peitl et al. [87]. Esta vitro-cerâmica bioativa monolítica do sistema  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$  é cerca de 30 a 65% cristalina, e a sua fase principal é  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  com algum fósforo em solução sólida e/ou na fase vítrea residual.

A mais recente vitro-cerâmica altamente bioativa do mesmo sistema quaternário,  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ , embora com algumas modificações de composição e cerca de 99,5% cristalina, foi desenvolvida por Ravagnani et al. Esta vitro-

cerâmica quase totalmente cristalina foi patenteada e registrada como Biosilicate® em 2003 [85,86]. Chen et al. em 2010 [88] propuseram a mesma composição, mas com modificações no processo sol-gel e o comparou com uma biocerâmica isenta de  $\text{Na}_2\text{O}$  (Composição 70%  $\text{SiO}_2$  e 30%  $\text{CaO}$  em peso) para os seguintes aspectos: fases cristalinas, cinética de degradação e formação de HA. Em seus estudos, ele concluiu que os materiais cerâmicos derivados de sol-gel com composições próximas a do 45S5 e sinterizados, resultando na formação de fase cristalina  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ , possuem as características essenciais de materiais bioativos contendo  $\text{Na}_2\text{O}$ . A comparação indicou que o  $\text{Na}_2\text{O}$  (ou óxidos de outros elementos ativos, tais como o  $\text{K}_2\text{O}$ ) poderia ser um constituinte importante permitindo a obtenção de uma combinação ótima de boas propriedades mecânicas e boa biodegradabilidade em um material bioativo.

Após Peitl et al. [87] demonstrarem a formação da fase cristalina bioativa  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$  em algumas composições vitro-cerâmicas bioativas, vários estudos têm objetivado a formação dessa fase, inclusive do próprio Bioglass® 45S5, mostrando assim seu comportamento de sinterização e cristalização para a obtenção de vitro-cerâmica bioativa em diferentes formas (pós, monólitos e *scaffolds* para engenharia de tecido ósseo) [80,84-87].

A técnica sol-gel ainda não foi aplicada com sucesso à produção de vidros bioativos ou cerâmicas de vidro contendo  $\text{Na}_2\text{O}$ , isto é, ainda não foi possível a produção de vidros via sol-gel com a mesma composição do Bioglass® 45S5, por exemplo. Todos os membros da série 49-86S (Tabela 1) de vidros bioativos derivados de sol-gel, por exemplo, contêm  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CaO}$  e  $\text{P}_2\text{O}_5$ , mas nenhum contém  $\text{Na}_2\text{O}$  [93,94]. A inclusão de  $\text{Na}_2\text{O}$  em um vidro bioativo via sol-gel representa um desafio técnico devido à elevada reatividade hidrolítica do alcoxido de sódio na água [94].

Tabela 1 – Composições nomeadamente 49-86S e da serie Bioglass® [71,113].

Nome	$\text{SiO}_2$	$\text{P}_2\text{O}_5$	$\text{CaO}$	$\text{Na}_2\text{O}$	$\text{Ca/P}$
49S	50	4	46	0	5,750
54S	55,0	4,0	41,0	0,0	5,125
58S	60,0	4	36	0	4,500
63S	65	4	31	0	3,875
68S	70	4	26	0	3,250
72S	75	4	21	0	2,625
77S	80	4	16	0	2,000
81S	85	4	11	0	1,375
86S	90	4	6	0	0,750
45S5	46,1	2,6	26,9	24,4	5,170
49S4,9	49,1	2,6	25,3	23,0	4,860
52S4,6	52,1	2,6	23,8	21,5	4,570
55S4,3	55,1	2,6	22,2	20,1	4,260
60S3,8	60,1	2,6	19,6	17,7	3,760

## 5. Micro e nanofibras de vidros bioativos

Um dos aspectos fundamentais no desenvolvimento de um *scaffold* é que a estrutura 3D desenvolvida mimetize a matriz extracelular natural (MEC) presente no tecido ósseo. A MEC é composta por uma estrutura proteica conhecida por colágeno, que se organiza em nanofibras com diâmetro de 50 a 500 nm e controla o comportamento celular com sua arquitetura. No osso, o bloco de construção básico da MEC é o colágeno mineralizado/fibrilas. E dessa forma, compreende-se a importância das estruturas fibrilares para a produção de *scaffolds* utilizados na engenharia de tecidos ósseos [7].

As diferentes propriedades físicas e químicas obtidas a partir da produção de materiais com alta área de superfície tem levado ao desenvolvimento técnicas de fabricação fibras cerâmicas em escalas nanométricas. Assim, novas aplicações têm surgido na áreas da biomedicina como na engenharia de tecidos e na liberação controlada de fármacos [95]. Sendo assim, combinando as necessidades de um *scaffolds*, de ser poroso, biodegradável e de apresentar uma determinada estrutura tridimensional, uma alta porosidade combinada com a estrutura morfológica das fibras promove um aumento ainda maior na área de superfície. Esse fato aumentou ainda mais a importância do uso de fibras para este tipo de aplicação [4].

Consequentemente, o avanço nanotecnológico de materiais cerâmicos, incluindo os biovidros, nos últimos anos, vem enfocando, em muito, o desenvolvimento de nanofibras e de fibras submicrométricas, de modo a se ter os benefícios da elevada área superficial desses materiais, sem as dificuldades e desvantagens da síntese e processamento dos nanopós.

Kim et al, foram os primeiros pesquisadores a fabricarem nanofibras de vidros bioativos utilizando ES segundo a composição  $70\text{SiO}_2 \cdot 25\text{CaO} \cdot 5\text{P}_2\text{O}_5$ . As fibras apresentaram excelente bioatividade e potencial osteogênico *in vitro* das nanofibras. Os diâmetros das nanofibras reduziram com a diminuição da concentração do sol também com os parâmetros de processo tais como a concentração polimérica, massa molar menor do plímero e com o aumento do campo elétrico aplicado. Adicionalmente, Kim examinou a biom mineralização das nanofibras de biovidro no simulador de fluido corpóreo (SBF) por 7 dias e os resultados mostraram que a habilidade de formação da hidroxiapatita nas nanofibras foi muito maior quando comparada ao nano biovidro convencional [96].

Xia et al investigaram o efeito dos parâmetros da eletrofição em relação ao diâmetro e morfologia de fibras bioativas, obtendo como resultado um controle do diâmetro fibrilar em função da concentração polimérica, do tipo de polímero, e da intensidade do campo elétrico aplicado [97]. Porém da mesma forma que o trabalho citado anteriormente, esses pesquisadores não utilizaram Na em suas composições.

Deliormanlı (2015) produziu nanofibras bioativas objetivando a composição do bioglass 45S5, usando a eletrofição. Um tratamento térmico a  $700^\circ\text{C}$  levou à formação de combeita como a principal fase cristalina. Abaixo de  $700^\circ\text{C}$ , os nitratos não puderam ser removidos da estrutura, fato esse evidenciado por DRX e por MEV, mostrando pedaços de cristais de nitrato de sódio na

estrutura. Apesar da natureza cristalina, as supostas nanofibras 45S5 fabricadas apresentaram alta bioatividade no SBF [98].

No mesmo ano, esse mesmo pesquisador e colaboradores, produziram fibras bioativas segundo a composição conhecida como 13-93 ( $53\text{SiO}_2$ ,  $6\text{Na}_2\text{O}$ ,  $12\text{K}_2\text{O}$ ,  $5\text{MgO}$ ,  $20\text{CaO}$ , e  $4\text{P}_2\text{O}_5$  em peso). Fibras de vidro bioativas com um diâmetro médio de  $680 \pm 142$  nm foram fabricadas por eletrofição. Os resultados mostraram que as fibras mantiveram sua natureza amorfa após um tratamento térmico a  $625^\circ\text{C}$  com redução de diâmetro para  $464 \pm 95$  nm após o tratamento térmico. Suas análises mostraram que a  $625^\circ\text{C}$  todos os nitratos foram retirados da estrutura. As nanofibras fabricadas apresentaram alta bioatividade no SBF. Também foi avaliada a biocompatibilidade em células pré-osteoblásticas MC3T3-E1, utilizando o ensaio XTT (avaliação por métodos colorimétricos), que não revelou citotoxicidade das fibras [99].

## 6. Scaffolds nanoestruturados de vidros bioativos

Nesse contexto da produção de fibras de vidros bioativos, o avanço dos estudos e o estado da arte no campo das nanofibras tem se devotado a sua utilização para a confecção de *scaffolds* fibrosos [74]. Muito tem sido produzido com a eletrofição, desde *scaffolds* como estruturas hierárquicas a partir de compósitos nanofibrilares de colágeno e vidro bioativo [100], bem como gelatina e vidro bioativo [101] à fibras de biovidro para aplicação como guia de nervos na engenharia de tecidos [102].

Por outro lado, os *scaffolds* eletrofiados de nanofibras apesar de muito estudados para uso na engenharia de tecidos, pecam por proporcionar uma inerentemente inadequada infiltração celular [103,104], pois a arquitetura fibrilar eletrofiada, e ainda assim, os espaços vazios entre as fibras dificulta a integração tridimensional com o tecido hospedeiro, e este fato, representa um desafio significativo para a transição entre a ciência e a clínica. Várias abordagens têm sido utilizadas para melhorar o espaçamento entre as fibras de *scaffolds* eletrofiados [42,104], incluindo o uso de porosificadores *in situ*, tais como a introdução de sais [105], gelo [106], uma fase polimérica solúvel [103]. Fotopadronização também foi aplicada utilizando máscaras litográficas [107].

A literatura tem reportado o desenvolvimento de inúmeros trabalhos envolvendo a fabricação de *scaffolds* feitos a partir de biocerâmicas [108]. E dessa forma, observa-se o quanto é importante a combinação de propriedades mecânicas e bioatividade, pois para aplicações voltadas para a engenharia de tecidos, os *scaffolds* de vidros bioativos amorfos são muito frágeis. Para se obter boa resistência mecânica, os *scaffolds* de vidro bioativos têm de ser sinterizados para formar fases cristalinas e assim adquirir boa estabilidade mecânica. Entretanto, outras estratégias estão sendo elaboradas para resolver esse problema [89].

Em 2014, Poologasundarampillai et al. [109] produziu as primeiras formas bioativas tridimensionais (3D) para regeneração de tecido ósseo com uma estrutura semelhante ao algodão-lã (ou algodão doce). Esta estrutura fibrosa 3D é

amorfa e flexível, ideal para o englobamento de defeitos complexos. Além disso, apresenta grandes espaços inter-fibrilares para promover a vascularização, penetração de células e transporte de nutrientes em todo o *scaffold*. A estrutura fibrosa 3D foi obtida por *electrospinning*, onde o campo elétrico aplicado e as instabilidades exercem uma força sobre o jato de fiação, que é necessário ser viscoelástico para evitar a quebra do mesmo. Nesse trabalho foi observado que estruturas tridimensionais semelhantes ao algodão só foram produzidas quando foram utilizadas soluções contendo nitrato de cálcio, sugerindo que a carga dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  teve um efeito significativo, visto que, nesse processo de fiação altos campos elétricos são utilizados. As fibras de sílica bioativas resultantes apresentaram diâmetros da ordem de 0,5-2,0  $\mu\text{m}$  e eram nanoporosas, bem como bioativas.

Embora os implantes feitos com vidro bioativo tenham mostrado resultados promissores para o reparo ósseo, sua aplicação na reparação de ossos que necessitem ou sejam solicitados mecanicamente durante o tratamento é limitada. Esse fato se justifica devido a diferença entre suas propriedades mecânicas. Dessa forma, Thomas et al. em 2017, produziram *scaffolds* feitos de vidro bioativo com a composição 13-93 (mencionada anteriormente) reforçados com fibras de Ti, preparados por impressão por extrusão. Os *scaffolds* reforçados com 0,4% em volume de fibras apresentaram um aumento de 70% na dureza e 40% na resistência à flexão, em comparação com os fabricados sem fibras. Além disso, a avaliação *in vitro* revelou que a adição de fibras de Ti ao vidro 13-93 reforçou os *scaffolds* de forma mecânica sem inibir suas propriedades bioativas, referente a formação de hidroxiapatita [110].

Uma outra abordagem a ser utilizada trata-se da introdução de partículas de vidros bioativos em fibras poliméricas. Em um estudo recente, dois tamanhos diferentes de partículas (composição 45S5 Bioglass®) foram incorporados com sucesso em fibras de PCL/quitosana. As propriedades morfológicas, químicas e mecânicas, bem como a bioatividade celular das fibras obtidas foram investigadas. As nanofibras apresentaram formação de precipitados de HCA já após 1 dia de imersão na solução de SBF, confirmando que as partículas incorporadas nas malhas poliméricas preservaram sua bioatividade [111].

Em 2016, Medeiros et al. desenvolveram um procedimento para produzir rapidamente nanofibras bioativas porosas combinando SBS (Solution Blow Spinning) e TIPS. Além disso foram produzidos *scaffolds* com macroporos interligados formados a partir dessas nanofibras porosas. Os resultados mostraram ótima formação de hidroxiapatita, e de acordo com os parâmetros do SBS, foi possível controlar a macroporosidade do *scaffolds* [112].

### Considerações Finais

Diante do exposto, observa-se que, da forma como a engenharia de tecidos cresceu, desde seu surgimento aos dias atuais, um vasto leque de técnicas e procedimentos foram desenvolvidos. Com o intuito de aprimorar as exigências biológicas, químicas, estruturais e mecânicas, o

desenvolvimento dos *scaffolds*, no que diz respeito às propriedades ótimas para sua aplicação na engenharia de tecidos osseos necessitou de abordagens que cada vez mais aproximassem as características e necessidades do tecido osseo à dessa estrutura. Visando a transição entre a ciência e a clínica, um dos principais desafios trata-se da indução de vascularização suficiente, otimizando a taxa de degradação para uma aplicação específica e fabricando estruturas com propriedades biomiméticas mecânicas e estruturais. A descoberta de ligação de osso a composições específicas de vidros levou a uma nova geração de materiais bioativos para a substituição de tecidos. Dessa forma, a funcionalização e a nanoestruturação de *scaffolds* de vidros bioativos provocou um enorme avanço nesse campo do conhecimento. Além disso, interações dessas estruturas com biomoléculas são essenciais para afetar os resultados *in vivo*. Apesar dos avanços tecnológicos que foram citados neste artigo, muito ainda tem que ser compreendido sobre os mecanismos não descobertos envolvidos e os efeitos adversos dos tratamentos utilizados na engenharia de tecidos.

### Agradecimentos

Os autores agradecem pelo auxílio financeiro fornecidos pela CAPES e pelo CNPq

### Referências

- [1] B.D. Ratner, a S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. .
- [2] L.L. Hench, Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications, New Journal of Glass and Ceramics, 3, 67–73, 2013.
- [3] Q. Cui, X. Dong, J. Wang, M. Li, Direct fabrication of cerium oxide hollow nanofibers by electrospinning, Journal of Rare Earths, 26, 664–669, 2008.
- [4] W. Tutak, S. Sarkar, S. Lin-Gibson, T.M. Farooque, G. Jyotsnendu, D. Wang, J. Kohn, D. Bolikal, C.G. Simon, The support of bone marrow stromal cell differentiation by airbrushed nanofiber scaffolds, Biomaterials, 34, 2389–2398, 2013.
- [5] E. Saiz, E.A. Zimmermann, J.S. Lee, U.G.K. Wegst, A.P. Tomsia, Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering, Dental Materials, 29, 103–115, 2013.
- [6] A.A. El-Rashidy, J.A. Roether, L. Harhaus, U. Kneser, A.R. Boccaccini, Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: A review of *in vivo* studies in bone defect models, Acta Biomaterialia, 62, 1–28, 2017.
- [7] R.A. Que, S.W.P. Chan, A.M. Jabaiah, R.H. Lathrop, N.A. Da Silva, S.-W. Wang, Tuning cellular response by modular design of bioactive domains in collagen, Biomaterials, 53, 309–317, 2015.

- [8] F. Baino, G. Novajra, V. Miguez-Pacheco, A.R. Boccaccini, C. Vitale-Brovarone, Bioactive glasses: Special applications outside the skeletal system, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 432, 15–30, 2016.
- [9] V. Krishnan, T. Lakshmi, Bioglass: A novel biocompatible innovation., *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4, 78–83, 2013.
- [10] T.H. Qazi, D.J. Mooney, M. Pumberger, S. Geißler, G.N. Duda, Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering: Existing technologies and future trends, *Biomaterials*, 53, 502–521, 2015.
- [11] S. Lin, C. Ionescu, K.J. Pike, M.E. Smith, J.R. Jones, Nanostructure evolution and calcium distribution in sol-gel derived bioactive glass, *Journal of Materials Chemistry*, 19, 1276, 2009.
- [12] K. Rezwani, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering., *Biomaterials*, 27, 3413–31, 2006.
- [13] F. Gattazzo, A. Urciuolo, P. Bonaldo, Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840, 2506–2519, 2014.
- [14] B.S. McAllister, K. Haghghat, Bone Augmentation Techniques, *Journal of Periodontology*, 78, 377–396, 2007.
- [15] H. Seeherman, J.M. Wozney, Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration, *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 16, 329–345, 2005.
- [16] K.A. Schlegel, R. Zimmermann, M. Thorwarth, F.W. Neukam, B. Klöngnoi, E. Nkenke, E. Felszeghy, Sinus floor elevation using autogenous bone or bone substitute combined with platelet-rich plasma, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 104, 15–25, 2007.
- [17] E.A. Phelps, A.J. García, Engineering more than a cell: Vascularization strategies in tissue engineering, *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 704–709, 2010.
- [18] Y. Liu, J. Lim, S.H. Teoh, Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering, *Biotechnology Advances*, 31, 688–705, 2013.
- [19] S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay, Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends in Biotechnology*, 30, 546–554, 2012.
- [20] A.G. Mikos, J.S. Temenoff, Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering, *Biotechnology of Human Disorders*, 3, 1–32, 2000.
- [21] M. Sittlinger, D.W. Huttmacher, M. V. Risbud, Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration, *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 411–418, 2004.
- [22] S.J. Hollister, Porous scaffold design for tissue engineering, *Nature Materials*, 4, 518–524, 2005.
- [23] Q.Z. Chen, K. Rezwani, V. Françon, D. Armitage, S.N. Nazhat, F.H. Jones, A.R. Boccaccini, Surface functionalization of Bioglass®-derived porous scaffolds, *Acta Biomaterialia*, 3, 551–562, 2007.
- [24] B. Thavornnyutikarn, N. Chantarapanich, K. Sittthiseripratip, G.A. Thouas, Q. Chen, Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques, *Progress in Biomaterials*, 3, 61–102, 2014.
- [25] P. Bajaj, R.M. Schweller, A. Khademhosseini, J.L. West, R. Bashir, 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 16, 247–276, 2014.
- [26] K. Torabi, E. Farjood, S. Hamedani, Rapid Prototyping Technologies and their Applications in Prosthodontics, a Review of Literature., *Journal of Dentistry (Shiraz, Iran)*, 16, 1–9, 2015. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4345107&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [27] B. Subia, J. Kundu, S.C. Kundu, Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques for Potential Tissue Engineering Applications, in: *Tissue Eng., InTech*, : p. 524.
- [28] D. Sin, X. Miao, G. Liu, F. Wei, G. Chadwick, C. Yan, T. Friis, Polyurethane (PU) scaffolds prepared by solvent casting/particulate leaching (SCPL) combined with centrifugation, *Materials Science and Engineering: C*, 30, 78–85, 2010.
- [29] N. Aboudzadeh, M. Imani, M.A. Shokrgozar, A. Khavandi, J. Javadpour, Y. Shafieyan, M. Farokhi, Fabrication and characterization of poly(D,L-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone tissue regeneration, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 94A, 137–145, 2010.
- [30] A. Prasad, M.R. Sankar, V. Katiyar, State of Art on Solvent Casting Particulate Leaching Method for Orthopedic Scaffolds Fabrication, *Materials Today: Proceedings*, 4, 898–907, 2017.
- [31] L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I. Bartolotti, B. Grigolo, Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives, *Materials Science and Engineering: C*, 78, 1246–1262, 2017.
- [32] F.J. O'Brien, B.A. Harley, I.V. Yannas, L.J. Gibson, The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds, *Biomaterials*, 26, 433–441, 2005.
- [33] K.M. Pawelec, A. Husmann, S.M. Best, R.E. Cameron, Understanding anisotropy and architecture

- in ice-templated biopolymer scaffolds, *Materials Science and Engineering: C*, 37, 141–147, 2014.
- [34] H.-W. Kim, H.-E. Kim, V. Salih, Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin–hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds, *Biomaterials*, 26, 5221–5230, 2005.
- [35] Q. Yao, J.G.L. Cosme, T. Xu, J.M. Miszuk, P.H.S. Picciani, H. Fong, H. Sun, Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation, *Biomaterials*, 115, 115–127, 2017.
- [36] N. Sultana, M. Wang, Fabrication of HA/PHBV composite scaffolds through the emulsion freezing/freeze-drying process and characterisation of the scaffolds, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 2555–2561, 2008.
- [37] V. Maquet, S. Blacher, R. Pirard, J.-P. Pirard, M.N. Vyakarnam, R. Jérôme, Preparation of macroporous biodegradable poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) foams and characterization by mercury intrusion porosimetry, image analysis, and impedance spectroscopy, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 66A, 199–213, 2003.
- [38] Z. Li, H.R. Ramay, K.D. Hauch, D. Xiao, M. Zhang, Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 26, 3919–3928, 2005.
- [39] G. Conoscenti, T. Schneider, K. Stoelzel, F. Carfi Pavia, V. Brucato, C. Goegele, V. La Carrubba, G. Schulze-Tanzil, PLLA scaffolds produced by thermally induced phase separation (TIPS) allow human chondrocyte growth and extracellular matrix formation dependent on pore size, *Materials Science and Engineering: C*, 80, 449–459, 2017.
- [40] M. Meskinfam, S. Bertoldi, N. Albanese, A. Cerri, M.C. Tanzi, R. Imani, N. Baheiraei, M. Farokhi, S. Farè, Polyurethane foam/nano hydroxyapatite composite as a suitable scaffold for bone tissue regeneration, *Materials Science and Engineering: C*, 82, 130–140, 2018.
- [41] Q.Z. Chen, Foaming technology of tissue engineering scaffolds - a review, *Bubble Science, Engineering & Technology*, 3, 34–47, 2011.
- [42] B. Sun, Y.Z. Long, H.D. Zhang, M.M. Li, J.L. Duvail, X.Y. Jiang, H.L. Yin, Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning, *Progress in Polymer Science*, 39, 862–890, 2014.
- [43] L. Jiang, L. Wang, N. Wang, S. Gong, L. Wang, Q. Li, C. Shen, L.S. Turng, Fabrication of polycaprolactone electrospun fibers with different hierarchical structures mimicking collagen fibrils for tissue engineering scaffolds, *Applied Surface Science*, 427, 311–325, 2018.
- [44] K.-W. Lee, S. Wang, B.C. Fox, E.L. Ritman, M.J. Yaszemski, L. Lu, Poly(propylene fumarate) Bone Tissue Engineering Scaffold Fabrication Using Stereolithography: Effects of Resin Formulations and Laser Parameters, *Biomacromolecules*, 8, 1077–1084, 2007.
- [45] J.W. Lee, P.X. Lan, B. Kim, G. Lim, D.-W. Cho, 3D scaffold fabrication with PPF/DEF using microstereolithography, *Microelectronic Engineering*, 84, 1702–1705, 2007.
- [46] S.M. Peltola, F.P.W. Melchels, D.W. Grijpma, M. Kellomäki, A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes, *Annals of Medicine*, 40, 268–280, 2008.
- [47] S. Yang, K.-F. Leong, Z. Du, C.-K. Chua, The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part II. Rapid Prototyping Techniques, *Tissue Engineering*, 8, 1–11, 2002.
- [48] B.M. Wu, S.W. Borland, R.A. Giordano, L.G. Cima, E.M. Sachs, M.J. Cima, Solid free-form fabrication of drug delivery devices, *Journal of Controlled Release*, 40, 77–87, 1996.
- [49] H.N. Chia, B.M. Wu, Recent advances in 3D printing of biomaterials, *Journal of Biological Engineering*, 9, 4, 2015.
- [50] C. Schubert, M.C. van Langeveld, L.A. Donoso, Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs, *British Journal of Ophthalmology*, 98, 159–161, 2014.
- [51] Y.-J. Seol, H.-W. Kang, S.J. Lee, A. Atala, J.J. Yoo, Bioprinting technology and its applications, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 46, 342–348, 2014.
- [52] G. Gao, T. Yonezawa, K. Hubbell, G. Dai, X. Cui, Inkjet-bioprinted acrylated peptides and PEG hydrogel with human mesenchymal stem cells promote robust bone and cartilage formation with minimal printhead clogging, *Biotechnology Journal*, 10, 1568–1577, 2015.
- [53] L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee, Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, *Journal of Biomedical Materials Research*, 5, 117–141, 1971.
- [54] C.A. Beckham, T.K. Greenlee, A.R. Crebo, Bone formation at a ceramic implant interface, *Calcified Tissue Research*, 8, 165–171, 1971.
- [55] T.K. Greenlee, C. a Beckham, a R. Crebo, J.C. Malmorg, Glass ceramic bone implants., *Journal of Biomedical Materials Research*, 6, 235–44, 1972.
- [56] L.L. Hench, Bioceramics, *Stress The International Journal on the Biology of Stress*, 28, 1705–1728, 1998.
- [57] L.L. Hench, Glass and Glass-Ceramic Technologies to Transform the World, *International Journal of Applied Glass Science*, 2, 162–176, 2011.

- [58] J.R. Jones, Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, *Acta Biomaterialia*, 9, 4457–4486, 2013.
- [59] H. Ohgushi, Y. Dohi, T. Yoshikawa, S. Tamai, S. Tabata, K. Okunaga, T. Shibuya, Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on the surface of bioactive glass ceramics, *Journal of Biomedical Materials Research*, 32, 341–348, 1996.
- [60] K.D. Lobel, L.L. Hench, In vitro adsorption and activity of enzymes on reaction layers of bioactive glass substrates, *Journal of Biomedical Materials Research*, 39, 575–579, 1998.
- [61] R.M. Day, A.R. Boccaccini, S. Shurey, J.A. Roether, A. Forbes, L.L. Hench, S.M. Gabe, Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds, *Biomaterials*, 25, 5857–5866, 2004.
- [62] H. Keshaw, A. Forbes, R.M. Day, Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass, *Biomaterials*, 26, 4171–4179, 2005.
- [63] J. a Roether, J.E. Gough, a R. Boccaccini, L.L. Hench, V. Maquet, R. Jerome, Novel bioresorbable and bioactive composites based on bioactive glass and polylactide foams for bone tissue engineering., *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13, 1207–1214, 2002.
- [64] J. Zhao, W. Han, H. Chen, M. Tu, S. Huan, G. Miao, R. Zeng, H. Wu, Z. Cha, C. Zhou, Fabrication and in vivo osteogenesis of biomimetic poly(propylene carbonate) scaffold with nanofibrous chitosan network in macropores for bone tissue engineering, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23, 517–525, 2012.
- [65] L.L. Hench, Bioceramics: From Concept to Clinic, *Journal of the American Ceramic Society*, 74, 1487–1510, 1991.
- [66] L.L. Hench, The story of Bioglass®, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17, 967–978, 2006.
- [67] C.-C. Lin, L.-C. Huang, P. Shen,  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6\text{-P}_2\text{O}_5$  based bioactive glasses. Part 1: Elasticity and structure, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 351, 3195–3203, 2005.
- [68] J.M. Oliveira, R.N. Correia, M.H. Fernandes, Effects of Si speciation on the in vitro bioactivity of glasses, *Biomaterials*, 23, 371–379, 2002.
- [69] I.D. Xynos, M.V.J. Hukkanen, J.J. Batten, L.D. Buttery, L.L. Hench, J.M. Polak, Bioglass @45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: Implications and applications for bone tissue engineering, *Calcified Tissue International*, 67, 321–329, 2000.
- [70] S. Kaya, M. Cresswell, A.R. Boccaccini, Mesoporous silica-based bioactive glasses for antibiotic-free antibacterial applications, *Materials Science and Engineering: C*, 83, 99–107, 2018.
- [71] R. Li, A.E. Clark, L.L. Hench, An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing, *Journal of Applied Biomaterials*, 2, 231–239, 1991.
- [72] P. Sepulveda, J.R. Jones, L.L. Hench, In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses, *Journal of Biomedical Materials Research*, 61, 301–311, 2002.
- [73] M.R. Filgueiras, G. La Torre, L.L. Hench, Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass., *Journal of Biomedical Materials Research*, 27, 445–453, 1993.
- [74] M. Vallet-Regí, A.J. Salinas, D. Arcos, Tailoring the Structure of Bioactive Glasses: From the Nanoscale to Macroporous Scaffolds, *International Journal of Applied Glass Science*, 7, 195–205, 2016.
- [75] L.-C. Gerhardt, A.R. Boccaccini, Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Materials*, 3, 3867–3910, 2010.
- [76] G.S. Lázaro, S.C. Santos, C.X. Resende, E.A. dos Santos, Individual and combined effects of the elements Zn, Mg and Sr on the surface reactivity of a  $\text{SiO}_2\text{-CaO}\cdot\text{Na}_2\text{O}\cdot\text{P}_2\text{O}_5$  bioglass system, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 386, 19–28, 2014.
- [77] S. Lee, A. Obata, D.S. Brauer, T. Kasuga, Dissolution behavior and cell compatibility of alkali-free  $\text{MgO-CaO-SrO-TiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$  glasses for biomedical applications, *Biomedical Glasses*, 1, 151–158, 2015.
- [78] A. Balamurugan, G. Balossier, D. Laurent-Maquin, S. Pina, A.H.S. Rebelo, J. Faure, J.M.F. Ferreira, An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system, *Dental Materials*, 24, 1343–1351, 2008.
- [79] J. Lao, E. Jallot, J.-M. Nedelec, Strontium-Delivering Glasses with Enhanced Bioactivity: A New Biomaterial for Antiosteoporotic Applications?, *Chemistry of Materials*, 20, 4969–4973, 2008.
- [80] E.S. Valente, E.M. Cupers Schmid, T.P.R. De Campos, Characterization of ceramic seeds with samarium-153 for use in brachytherapy, *Materials Research*, 14, 21–24, 2011.
- [81] K. Jurczyk, M.U. Jurczyk, K. Niespodziana, J. Jakubowicz, M. Jurczyk, Titanium–10wt% 45S5 Bioglass nanocomposite for biomedical applications, *Materials Chemistry and Physics*, 131, 540–546, 2011.
- [82] A.M. Deliormanlı, H. Seda Vatansever, H. Yesil, F. Özdal-Kurt, In vivo evaluation of cerium, gallium and vanadium-doped borate-based bioactive glass scaffolds using rat subcutaneous implantation model, *Ceramics International*, 42, 11574–11583, 2016.
- [83] M. Laczka, K. Cholewa-Kowalska, A. Laczka-Osyczka, M. Tworzydło, B. Turyna, Gel-derived

- materials of a CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> system modified by boron, sodium, magnesium, aluminum, and fluorine compounds, *Journal of Biomedical Materials Research*, 52, 601–612, 2000.
- [84] D. Carta, D.M. Pickup, J.C. Knowles, M.E. Smith, R.J. Newport, Sol-gel synthesis of the P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O-SiO<sub>2</sub> system as a novel bioresorbable glass, *Journal of Materials Chemistry*, 15, 2134, 2005.
- [85] R.L. Siqueira, E.D. Zanotto, Facile route to obtain a highly bioactive SiO<sub>2</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> crystalline powder, *Materials Science and Engineering: C*, 31, 1791–1799, 2011.
- [86] J. Moura, L.N. Teixeira, C. Ravagnani, O. Peitl, E.D. Zanotto, M.M. Beloti, H. Panzeri, A.L. Rosa, P.T. de Oliveira, In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®), *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 82A, 545–557, 2007.
- [87] O. Peitl, E. Dutra Zanotto, L.L. Hench, Highly bioactive P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub> glass-ceramics, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 292, 115–126, 2001.
- [88] Q.-Z. Chen, Y. Li, L.-Y. Jin, J.M.W. Quinn, P.A. Komesaroff, A new sol-gel process for producing Na<sub>2</sub>O-containing bioactive glass ceramics, *Acta Biomaterialia*, 6, 4143–4153, 2010.
- [89] Q.Z. Chen, I.D. Thompson, A.R. Boccaccini, 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 27, 2414–2425, 2006.
- [90] R. Huang, J. Pan, A.R. Boccaccini, Q.Z. Chen, A two-scale model for simultaneous sintering and crystallization of glass-ceramic scaffolds for tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 4, 1095–1103, 2008.
- [91] L. Lefebvre, L. Gremillard, J. Chevalier, R. Zenati, D. Bernache-Assolant, Sintering behaviour of 45S5 bioactive glass, *Acta Biomaterialia*, 4, 1894–1903, 2008.
- [92] K. Xie, L. Zhang, X. Yang, X. Wang, G. Yang, L. Zhang, H. Shao, Y. He, J. Fu, Z. Gou, Preparation and Characterization of Low Temperature Heat-Treated 45S5 Bioactive Glass-Ceramic Analogues, *Biomedical Glasses*, 1, 80–92, 2015.
- [93] L.L. Hench, Sol-gel materials for bioceramic applications, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 2, 604–610, 1997.
- [94] A. Rámila, F. Balas, M. Vallet-Regí, Synthesis Routes for Bioactive Sol-Gel Glasses: Alkoxides versus Nitrates, *Chemistry of Materials*, 14, 542–548, 2002.
- [95] T. Jiang, E.J. Carbone, K.W.-H. Lo, C.T. Laurencin, Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration, *Progress in Polymer Science*, 1553, 1–24, 2014.
- [96] H.-W. Kim, H.-E. Kim, J.C. Knowles, Production and Potential of Bioactive Glass Nanofibers as a Next-Generation Biomaterial, *Advanced Functional Materials*, 16, 1529–1535, 2006.
- [97] W. Xia, D. Zhang, J. Chang, Fabrication and in vitro biomineralization of bioactive glass (BG) nanofibres., *Nanotechnology*, 18, 135601, 2007.
- [98] A.M. Deliormanlı, Preparation and in vitro characterization of electrospun 45S5 bioactive glass nanofibers, *Ceramics International*, 41, 417–425, 2015.
- [99] A.M. Deliormanlı, Preparation, in vitro mineralization and osteoblast cell response of electrospun 13–93 bioactive glass nanofibers, *Materials Science and Engineering: C*, 53, 262–271, 2015.
- [100] F.-Y. Hsu, M.-R. Lu, R.-C. Weng, H.-M. Lin, Hierarchically biomimetic scaffold of a collagen-mesoporous bioactive glass nanofiber composite for bone tissue engineering, *Biomedical Materials*, 10, 25007, 2015.
- [101] E. Sharifi, M. Azami, A.-M. Kajbafzadeh, F. Moztarzadeh, R. Faridi-Majidi, A. Shamousi, R. Karimi, J. Ai, Preparation of a biomimetic composite scaffold from gelatin/collagen and bioactive glass fibers for bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 59, 533–541, 2016.
- [102] M.T. Souza, O. Peitl, E.D. Zanotto, A.R. Boccaccini, Novel Double-Layered Conduit Containing Highly Bioactive Glass Fibers for Potential Nerve Guide Application, *International Journal of Applied Glass Science*, 7, 183–194, 2016.
- [103] K. Wang, M. Xu, M. Zhu, H. Su, H. Wang, D. Kong, L. Wang, Creation of macropores in electrospun silk fibroin scaffolds using sacrificial PEO-microparticles to enhance cellular infiltration, 1–8, 2013.
- [104] S. Zhong, D. Ph, Y. Zhang, D. Ph, C.T. Lim, D. Ph, Fabrication of Large Pores in Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Cellular Infiltration: A Review, 18, 2012.
- [105] T.G. Kim, H.J. Chung, T.G. Park, Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid / collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition / leaching of salt particles, 4, 1611–1619, 2008.
- [106] M. Simonet, O.D. Schneider, P. Neuenschwander, W.J. Stark, Ultraporous 3D Polymer Meshes by Low-Temperature Electrospinning: Use of Ice Crystals as a Removable Void Template, 2007.
- [107] H.G. Sundararaghavan, R.B. Metter, J.A. Burdick, Electrospun Fibrous Scaffolds with Multiscale and Photopatterned Porosity, *Macromolecular Bioscience*, 10, 265–270, 2010.
- [108] H.R. Ramay, M. Zhang, Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-

- casting and polymer sponge methods, *Biomaterials*, 24, 3293–3302, 2003.
- [109] G. Poologasundarampillai, D. Wang, S. Li, J. Nakamura, R. Bradley, P.D. Lee, M.M. Stevens, D. S. McPhail, T. Kasuga, J.R. Jones, Cotton-wool-like bioactive glasses for bone regeneration, *Acta Biomaterialia*, 10, 3733–3746, 2014.
- [110] A. Thomas, K.C.R. Kolan, M.C. Leu, G.E. Hilmas, Freeform extrusion fabrication of titanium fiber reinforced 13–93 bioactive glass scaffolds, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 70, 43–52, 2017.
- [111] L. Liverani, J. Lacina, J.A. Roether, E. Boccardi, M.S. Killian, P. Schmuki, D.W. Schubert, A.R. Boccaccini, Incorporation of bioactive glass nanoparticles in electrospun PCL/chitosan fibers by using benign solvents, *Bioactive Materials*, 1–9, 2017.
- [112] E.L.G. Medeiros, A.L. Braz, I.J. Porto, A. Menner, A. Bismarck, A.R. Boccaccini, W.C. Lepry, S.N. Nazhat, E.S. Medeiros, J.J. Blaker, Porous Bioactive Nanofibers via Cryogenic Solution Blow Spinning and Their Formation into 3D Macroporous Scaffolds, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2, 1442–1449, 2016.
- [113] V. Krishnan, T. Lakshmi, Bioglass: A novel biocompatible innovation, *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4, 78, 2013.