

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS
CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

THIAGO PARREIRAS DE SOUSA

PREPARO DE HÍBRIDOS À BASE DE ALGINATO E VIDRO BIOATIVO

BELO HORIZONTE

2015

THIAGO PARREIRAS DE SOUSA

PREPARO DE HÍBRIDOS À BASE DE ALGINATO E VIDRO BIOATIVO

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado no Curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientador: Hermes de Souza Costa

BELO HORIZONTE

2015

THIAGO PARREIRAS DE SOUSA

PREPARO DE HÍBRIDOS À BASE DE ALGINATO E VIDRO BIOATIVO

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado no Curso de Graduação em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Materiais.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Ezequiel de Souza Costa Júnior

Prof. Hermes de Souza Costa

Prof^a. Roberta Viana Ferreira

AGRADECIMENTOS

Ao professor Hermes de Souza Costa, por todo o conhecimento transmitido e suporte para a realização deste trabalho.

À minha família.

Aos professores do curso de Engenharia de Materiais e demais funcionários do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, por proporcionar um ambiente propício para meu enriquecimento intelectual e pessoal.

Ao CEFET-MG, CNPq, CAPES e FAPEMIG por proporcionarem a estrutura e materiais necessários para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os vidros bioativos são materiais cerâmicos à base de sílica amorfa e apresentam biocompatibilidade. Entretanto esses materiais têm suas aplicações limitadas por sua resistência mecânica. Por outro lado, o alginato é um polímero de origem natural que tem capacidade de formar ligações com cátions divalentes, produzindo matrizes capazes de reterem grande quantidade de água em sua estrutura. Além de ser biocompatível e biodegradável, o alginato permite sua utilização como suporte para amortecimento de choques. Dessa forma, a incorporação de alginato de sódio na síntese de vidros bioativos é uma possível alternativa para melhorar o comportamento mecânico desse material, podendo ser usado na confecção de produtos finais com maior resistência mecânica e maior tenacidade à fratura, auxiliando na regeneração tecidual em situações estruturais onde há presença de cargas elevadas. Para tanto, foram realizadas sínteses de materiais à base de alginato e vidro bioativo, por três rotas distintas de processo, variando-se a concentração de alginato e a sequência de adição da solução algínica. As amostras foram caracterizadas usando-se ensaios de espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados indicaram os benefícios das rotas de síntese que mantêm a faixa metaestável do vidro, além de indicar a concentração de alginato, em solução, que melhora as propriedades mecânicas e resiste à contração do processo de secagem. As imagens obtidas pela análise de microscopia eletrônica de varredura indicaram melhora na síntese, resultando em material com estrutura homogênea.

Palavras-chave: Vidro Bioativo. Biovidro. Alginato.

ABSTRACT

Bioactive glass ceramics are materials made of amorphous silica and have high biocompatibility. However, these materials exhibit very low mechanical strength. On the other hand, the alginate is a natural polymer that is capable of forming bonds with divalent cations to produce matrices capable of retaining large amounts of water in its structure. In addition to being biocompatible and biodegradable, alginate allows its use as a support for absorbing shocks. Thus, the incorporation of sodium alginate in the synthesis of bioactive glasses might be an alternative for mechanical properties improvement and could be used as a material of products with higher mechanical strength and higher fracture toughness, assisting the tissue regeneration in structural conditions with the presence of high loads. Therefore, blends of alginate and bioactive glass were synthesized by three different process routes, varying the alginate concentration and the addition sequence of alginate solution. The samples were characterized by energy-dispersive x-ray spectroscopy (EDX) and scanning electron microscopy (SEM). The results show the benefits of the synthesis routes that keeps the metastable range of the glass and showed the alginate concentration that enhances the mechanical properties and resistance contraction of the drying process. The images obtained by analysis of scanning electron microscopy indicated synthesis improvements, resulting in material with homogeneous structure.

Keywords: Bioactive Glass. Bioglass. Alginate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Característica estrutural dos alginatos:	5
Figura 2 – Modelo caixa de ovo, representando a interação dos blocos-G na presença do íon Ca^{2+}	5
Figura 3 – Representação das cadeias formada por blocos-M, blocos-MG e blocos-G.....	6
Figura 4 - Dependência da capacidade do vidro se ligar ao osso com a sua composição em peso.....	14
Figura 5 – Etapas do processamento de um vidro bioativo pelo método sol-gel.....	16
Figura 6 – Representação esquemática das etapas do processo sol-gel.	18
Figura 7 - Agitador magnético C-MAG HS 7 IKAMAG®.....	20
Figura 8 – Balança de alta precisão Bel Engineering.....	20
Figura 9 - Estufa de secagem com circulação e renovação forçada de ar digital microprocessada da marca Cienlab.	21
Figura 10 – protocolo de síntese do vidro bioativo.	22
Figura 11 – 1ª rota de processo.....	23
Figura 12 - 2ª rota de processo.	23
Figura 13 – 3ª rota de processo.....	24
Figura 14 - Sputtering Quick Coater SC-701, da marca Sanyu Electron.....	25
Figura 15 - Amostras recobertas por nanocamada de ouro.	26
Figura 16 - Microscópio eletrônica de varredura Shimadzu SSX-550.....	26

Figura 17 – Amostra da síntese R1.....	28
Figura 18 – Amostra R2-A envelhecida.....	29
Figura 19 – Amostra R2-A após o processo de secagem.....	30
Figura 20 – Imagens de híbridos R2-A à base de alginato de sódio e vidro bioativo, obtidas por microscopia eletrônica de varredura.....	31
Figura 21 - Amostra envelhecida, preparada pela rota R2-B.....	37
Figura 22 – Amostra da rota R2-B, após o processo de secagem.....	37
Figura 23 – Imagens de híbridos à base de alginato de sódio e vidro bioativo, obtidas por microscopia eletrônica de varredura.....	38
Figura 24 - Amostra envelhecida, preparada pela rota R2-C.....	39
Figura 25 – Amostra preparada pela rota R2-C, após o processo de secagem.....	39
Figura 26 – Imagens de híbridos à base de alginato de sódio e vidro bioativo, obtidas por microscopia eletrônica de varredura.....	40
Figura 27 – Amostra preparada pela rota R3, após o processo de secagem.....	42
Figura 28 – Imagens de híbridos à base de alginato de sódio e vidro bioativo, obtidas por microscopia eletrônica de varredura.....	43
Figura 29 – Representação das rotas.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem e composição (frequência sequencial) dos alginatos.	7
Tabela 2 – Composição, estrutura, e índice de bioatividade de diferentes vidros.....	13
Tabela 3 – Rotas de síntese do composto de alginato e vidro bioativo.	24
Tabela 4 – Variação da concentração de alginato na solução algínica e proporção em volume da mistura entre a solução de alginato e a solução de vidro bioativo para cada rota.	24
Tabela 5 – Composição química das amostras, considerando os elementos Si, Ca e P pertencentes à estrutura do vidro bioativo e valores teóricos de referência vidro bioativo.....	33
Tabela 6 – Composição química das amostras, considerando os elementos Si, Ca e P pertencentes à estrutura do vidro bioativo e valores teóricos de referência vidro bioativo.....	34
Tabela 7- Composição química das amostras considerando os elementos Si, Ca e P pertencentes à estrutura do vidro bioativo e valores teóricos de referência vidro bioativo.....	35
Tabela 8 – Composição química das amostras considerando os elementos Si, Ca e P pertencentes à estrutura do vidro bioativo e valores teóricos de referência do vidro bioativo.	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Região da figura 20B.	32
Gráfico 2 - Região da figura 20E.....	33
Gráfico 3 – Região “3” da figura 20A.....	34
Gráfico 4 – Região “2” da figura 20A.....	35

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
2	Objetivos.....	2
2.1	Objetivo geral	2
2.2	Objetivos específicos	2
3	Revisão bibliográfica.....	3
3.1	Alginato	3
3.1.1	Estrutura química.....	4
3.1.2	Propriedades	8
3.1.3	Ligação iônica seletiva	10
4	Vidro bioativo.....	11
4.1.1	Fatores que afetam a bioatividade do vidro.....	12
4.1.2	Processamento sol-gel	14
5	Metodologia experimental.....	19
5.1	Materiais utilizados na síntese	19
5.1.1	Solução algínica.....	19
5.1.2	Solução de vidro bioativo	19
5.2	Equipamentos utilizados na síntese	19
5.2.1	Agitador magnético	19
5.2.2	Balança de alta precisão	20

5.2.3	Estufa com circulação de ar.....	21
5.3	Preparo de solução de alginato	21
5.3.1	Preparo da solução de alginato nas concentrações de 1% e 5% (p/v):.....	21
5.4	Síntese do cidro bioativo.....	22
5.5	Preparo dos compósitos ácido algínico-vidro bioativo.....	22
5.6	Caracterização do material compósito alginato- vidro bioativo	25
5.6.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia de Raios X	25
5.6.2	Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDX).....	26
6	Resultados e Discussão.....	28
6.1	Rota R1	28
6.2	Rota R2	29
6.2.1	Rota R2-A.....	29
6.2.2	Rota R2-B	37
6.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
6.2.4	Rota R2-C	38
6.2.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	40
6.3	Rota R3	41
6.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42

6.4	Resumo de parâmetros avaliados para preparo de compostos de alginato vidro bioativo	44
7	Conclusões.....	46
	Referências Bibliográficas.....	47

1 INTRODUÇÃO

Vidros bioativos são materiais cerâmicos à base de sílica amorfa e apresentam biocompatibilidade. Apesar de apresentarem bioatividade, os vidros bioativos apresentam resistência mecânica e tenacidade à fratura em uma faixa que reduz a possibilidade da sua aplicação em situações estruturais, onde há presença de cargas elevadas, limitando assim seu uso comercial à forma de particulados ou granulados (DAGUANO, 2010). Por outro lado, o alginato é um polímero natural obtido a partir de algas marrons e que tem capacidade de formar ligações com cátions divalentes, produzindo matrizes capazes de reterem grande quantidade de água na sua estrutura, além de ser biocompatível e biodegradável, o que permite sua utilização como suporte para amortecimento de choques.

Dessa forma, o preparo de mistura de vidro bioativo com alginato pode ser uma das alternativas para melhorar o comportamento mecânico dos vidros e manter estrutura que permita o crescimento celular. Para tanto, os parâmetros de síntese devem ser controlados para viabilizar o preparo de vidros bioativos via sol-gel em rota ácida com soluções de alginato, de forma a modular o processo de homogeneização e geleificação das misturas. O presente estudo visa preparar, caracterizar e analisar a viabilidade de se incorporar alginato de sódio em material com capacidade de bioatividade, à base de vidro bioativo, buscando obtenção de produto final que tenha propriedades mecânicas satisfatórias para serem aplicados em situações estruturais, onde há presença de cargas elevadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver compósitos na forma de hidrogel biocompatível com incremento na resistência mecânica, a partir da associação do polímero ácido algínico e da fase inorgânica composta por vidro bioativo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer metodologia experimental que permita obter hidrogéis à base de ácido algínico e vidro bioativo (BaG)
- Preparar misturas de ácido algínico/BaG, buscando melhor desempenho das soluções, em função da variação nas razões das misturas.
- Obter hidrogéis via geleificação das misturas.
- Caracterizar, química e morfologicamente, os materiais obtidos através das técnicas: microscopia de varredura (MEV) e espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ALGINATO

Alginato é um importante polissacarídeo largamente utilizado na indústria alimentícia, têxtil, gráfica, médica, odontológica e farmacêutica. São abundantes na natureza, uma vez que fazem parte do componente estrutural em algas marinhas marrons (*Phaeophyceae*), podendo constituir até 40% da massa seca dessas algas, e como polissacarídeo capsular em bactérias do solo (MÜLLER, JOSÉ MIGUEL, 2011). A produção anual de alginato é de cerca de 30 mil toneladas, sendo toda a produção comercial proveniente de algas marinhas marrons cultivadas em fazendas. Há, entretanto, pesquisas recentes que demonstram a viabilidade da produção via fermentação microbiana e via modificação pós-polimerização da molécula de alginato (DRAGET, SMIDSRØD e SKJAK-BRAEK, 2005).

Embora as algas marrons sejam a fonte principal para produção comercial de ácido algínico, bactérias do gênero *Azotobacter* e *Pseudomonas* também são capazes de sintetizá-lo. A produção bacteriana de alginato apresenta-se como alternativa interessante, e sua produção por microrganismos, além de possibilitar a produção de biopolímeros de alta qualidade com características específicas e pré-determinadas, irá diminuir o impacto ambiental nas regiões em que as algas marinhas das quais é extraído são coletadas (MÜLLER, SANTOS e BRIGIDO, 2011).

Devido às suas propriedades únicas de retenção de água, geleificação, aumento da viscosidade e estabilizante, os alginatos são utilizados como espessantes, estabilizantes de emulsões e de espuma, agentes de encapsulação, agentes de geleificação, agentes de formação de filmes e de fibras sintéticas, dentre outras aplicações. Já as suas aplicações na área de biotecnologia, são devido à manutenção de sua propriedade única de transição sol-gel na presença de cátions multivalentes (por ex: Ca^{2+}), que é praticamente independente da temperatura, tornando-o altamente adequado para o uso como matriz de imobilização para células vivas (DRAGET, SMIDSRØD e SKJAK-BRAEK, 2005). Estruturalmente, os hidrogéis são constituídos por uma ou mais redes poliméricas tridimensionais, formadas por cadeias macromoleculares interligadas. Os hidrogéis caracterizam-se por apresentar forte afinidade pela água devido à presença de grupos hidrofílicos, tais como: -OH, -COOH, -CONH₂, -SO₃H, entre outros (MÁRCIA R. DE MOURA, 2008).

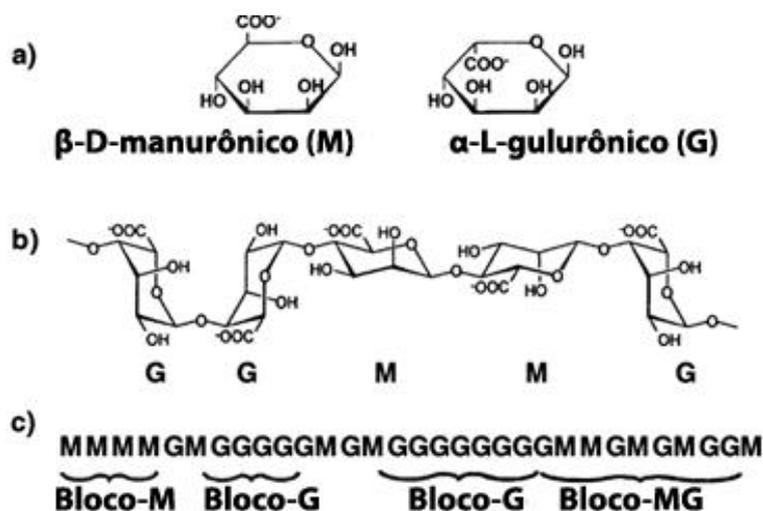
Hidrogéis de alginato são obtidos a partir do ácido algínico, o qual é encontrado nas paredes das células de algas marrons. O ácido algínico é um polímero linear de alta massa molar, com seções rígidas e regiões flexíveis. O alginato pode ser obtido substituindo-se íons H^+ desse ácido por cátions mono ou divalentes (ADLEY F. RUBIRA, 2009). A preparação de alginatos com base em ácido algínico isolado de algas castanhas foi descrito pela primeira vez em 1881, pelo inglês Edward Stanford. Mas foi somente em 1929 que se deu início à produção comercial de alginatos, sendo introduzidos na indústria alimentícia como estabilizantes para sorvetes. Com o desenvolvimento do alginato de propileno glicol, em 1944, houve aumento do uso desses compostos como aditivos em alimentos e na indústria em geral (SEGATO, 2007).

3.1.1 Estrutura química

Em termos moleculares, o alginato é um copolímero binário composto pelos ácido β -D-manurônico (M) e o ácido α -L-gulurônico (G), unidos por ligações glicosídicas 1 \rightarrow 4 e com grande variação de composição e sequência. Os monômeros são arranjados em blocos ao longo da cadeia polimérica, com regiões homopoliméricas de M e G denominadas blocos-M e blocos-G, respectivamente, e por regiões compostas por estruturas alternadas, chamadas blocos-MG, como demonstrado na figura 1 (JINCHEN SUN, 2012).

Quando cadeias poliméricas se aproximam na presença de íons divalentes, é formada estrutura dimérica. Essa estrutura é explicada pelo modelo conhecido como “caixa de ovo” (do inglês “egg-box model), figura 2, uma vez que os íons ficam nos interstícios entre as cadeias de alginato interagindo com o ânion carboxilato e com os grupos hidroxila, assumindo o formato de caixa de ovo, onde os íons representam os ovos e as cadeias de alginato representam a caixa. Essa interação é responsável pela capacidade dos alginatos de assumirem a forma de géis (SEGATO, 2007). A afinidade com cátions divalentes segue a seguinte ordem: $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+}$, Ni^{2+} , $Zn^{2+} > Mn^{2+}$. (MULDER, 2002)

Figura 1- Característica estrutural dos alginatos:

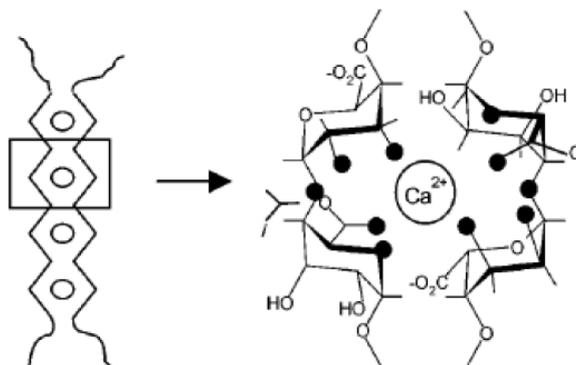


(a) monômeros de alginato, (b) conformação da cadeia, (d) distribuição de blocos.

Fonte: (DRAGET, SMIDSRØD e SKJAK-BRAEK, 2005)

Nos blocos-M, ligações diequatoriais conectam os resíduos manurônicos formando uma estrutura linear, enquanto nos blocos-G as ligações entre duas unidades de gulurônico é diaxial, e, portanto, menores. Os blocos-G possuem estrutura ondulada e menos flexível, com as junções entre as unidades estabilizadas por uma ligação de hidrogênio intra-molecular. Blocos-MG possuem tanto ligações equatoriais quanto axiais, mas a diferença do grau de liberdade dos grupos dá mais flexibilidade à cadeia do que a cadeia manurônica. Sendo assim, a rigidez das cadeias dos blocos aumenta na seguinte ordem $MG < MM < GG$ (MØRCH, 2008). As três estruturas estão representadas na figura 3.

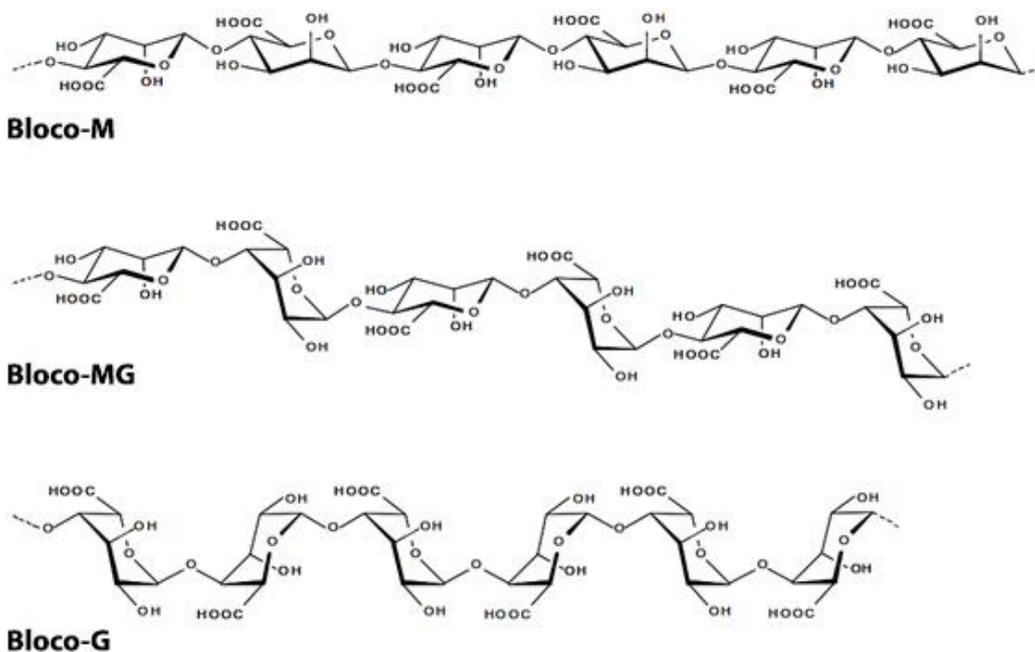
Figura 2 – Modelo caixa de ovo, representando a interação dos blocos-G na presença do íon Ca^{2+} .



Os círculos pretos representam os átomos de oxigênio envolvidos na coordenação do cátion.

Fonte: (MØRCH, 2008)

Figura 3 – Representação das cadeias formada por blocos-M, blocos-MG e blocos-G



Fonte: (MØRCH, 2008)

A composição e a sequência da estrutura do alginato é frequentemente um atributo funcional chave, e variações na composição e/ou sequência dos blocos podem causar diferenças de desempenho. A fonte de obtenção do alginato influencia diretamente na razão entre as unidades M:G e na quantidade relativa dos três segmentos poliméricos. Essa diferença da estrutura polimérica resulta em diferenças nas propriedades finais. Géis produzidos a partir de alginatos com maior porcentagem de blocos-G são mais rígidos e quebradiços, podendo sofrer sinérese¹. Já alginatos provenientes de algas marinhas diferente, cuja porcentagem de blocos-M é maior, são mais elásticos e dificilmente sofrem sinérese (SEGATO, 2007). A fração de ácido manurônico galurônico em uma amostra de alginato (F_M e F_G , respectivamente) e o comprimento médio de blocos-G podem ser determinados por técnicas de espectroscopia de ressonância magnética. (MØRCH, 2008).

Em alginatos provenientes de algas, F_G pode variar de 0,20 a 0,85. Altos valores de F geralmente são encontrados em alginatos preparados de plantas da espécie *Laminaria hyperborea*, enquanto alginatos de *Durvillea antarctica*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria digitata* e *Macrocystis pyrifera* são característicos por possuírem menor teor

¹ Sinérese é a expulsão gradativa do líquido devido à contração do gel.

de blocos-G. Composições mais extremas podem ser encontradas em alginatos isolados de bactérias, como *Azotobacter vinelandii* ou *Pseudomonas*. Alginatos provenientes de *Azotobacter* se assemelham a alginatos de alga, uma vez que têm estrutura formada por blocos ($F_G = 0.10-0.95$), enquanto alginatos de *Pseudomonas* invariavelmente não possuem blocos-G ($F_G = 0$). Entretanto, a principal diferença entre alginatos de alga e de bactéria é a presença de grupos O-acetil, influenciando o potencial de dilatação e retenção de água dos géis de alginato proveniente de bactérias (MØRCH, 2008).

A Tabela 1 contém a espécie de origem e a composição dos tipos mais comuns de alginatos.

Tabela 1 - Origem e composição (frequência sequencial) dos alginatos.

Fonte	FG	FM	FGG	FMM	FMG	FGM
Laminaria japônica	0.35	0.65	0.18	0.48	0.17	0.17
L. digitata	0.41	0.59	0.25	0.43	0.16	0.16
L. hyperborea						
Lâmina	0.55	0.45	0.38	0.28	0.17	0.17
Estipe	0.68	0.32	0.56	0.20	0.12	0.12
Córtex externo	0.75	0.25	0.66	0.16	0.09	0.09
Lessonia nigrescens	0.38	0.62	0.19	0.43	0.19	0.19
Ecklonia maxima	0.45	0.55	0.22	0.32	0.32	0.32
Macrocystis perlyfera	0.39	0.61	0.16	0.38	0.23	0.23
Durvillea antarctica	0.29	0.71	0.15	0.57	0.14	0.14
Ascophyllum nodosum						
Corpo frutífero	0.10	0.90	0.04	0.84	0.06	0.06
Tecido velho	0.36	0.64	0.16	0.44	0.20	0.20

Fonte: (MULDER, 2002)

Em sua forma natural, as cadeias poliméricas do alginato são longas. Porém o alginato é suscetível a variedade de processos de despolimerização. As ligações glicosídicas são clivadas tanto por mecanismos de degradação ácida e alcalina, quanto pela oxidação via radicais livres. Em relação ao pH, a degradação por clivagem do alginato é mínima em pH neutro, e aumenta à medida que o pH se reduz por sofrer hidrólise. Já em altos valores de pH a degradação se dá devido à eliminação de grupos alcóxi. A degradação via radicais livre ocorre principalmente devido a contaminação de agentes redutores, como polifenóis provenientes da alga marrom. Todas essas reações de despolimerização aumentam com o aumento da temperatura. Durante o processamento de alginatos para fins comerciais, o peso molecular do alginato diminui, raramente ultrapassando 500.000 g/mol (MØRCH, 2008).

3.1.2 Propriedades

As propriedades dos alginatos foram estudadas em grande extensão nas décadas de 1960 e 1970. Durante as duas últimas décadas, muitos avanços foram feitos no estudo da formação de géis de alginato.

3.1.2.1 Viscosidade

A viscosidade dos alginatos é propriedade fundamental para suas aplicações científicas e comerciais, pois proporciona aos compostos características únicas como espessantes, estabilizantes e geleificantes. Em geral, a viscosidade dos alginatos assumem altos valores, devido às ligações de hidrogênio entre os grupos polares da estrutura polimérica, especialmente a hidroxila, com os solventes hidroxilados, como a água (SEGATO, 2007).

A viscosidade da solução de alginato será dependente principalmente do peso molecular e da concentração da amostra polimérica. Entretanto, à medida que a flexibilidade das cadeias em bloco varia, a composição também pode afetar a viscosidade final da solução. Como o alginato é polieletrólito (polímero cuja unidade de repetição possui um íon) carregado negativamente, a repulsão eletrostática entre os grupos carregados contribui ainda mais para a viscosidade, por forçar que as moléculas assumam configuração semelhante a bobina. Consequentemente, a força iônica da solução terá grande importância nesse aspecto, uma vez que grandes forças iônicas servirão como uma carreira às cargas, reduzindo a extensão da cadeia. A viscosidade intrínseca $[\eta]$ do alginato é linearmente dependente da energia iônica na solução (MØRCH, 2008).

Além disso, a viscosidade do alginato é dependente da temperatura e do pH. Em relação à temperatura, a viscosidade dessas soluções diminui cerca de 2,5 % para cada 1 °C de aumento na temperatura. Este processo é reversível até temperatura em torno de 40 °C, a partir da qual inicia-se a despolimerização parcial do material conduzindo à sua plastificação. Já em relação ao pH, a viscosidade de soluções com pH entre 5-10 é independente do pH, e em soluções abaixo de pH 4,5 a viscosidade aumenta devido à diminuição da solubilidade do ácido algínico livre, que precipita em torno de pH 3 (SEGATO, 2007).

O alto peso molecular do alginato é vantajoso para uma série de aplicações. Entretanto, o uso de alginatos com peso molecular muito alto é limitado pela alta viscosidade. Além disso, o alto peso molecular pode também influenciar na viabilidade celular pois as forças de cisalhamento necessárias para a mistura dessas soluções podem ser muito altas (MØRCH, 2008).

3.1.2.2 Solubilidade

Há três parâmetros que determinam e limitam a solubilidade do alginato na água. O pH do solvente é fator importante pois irá determinar a presença de cargas eletrostáticas nos resíduos de ácido urônico. A energia iônica total da solução e a dureza da água (ou seja, a concentração de íons Ca^{2+}) também são fatores que podem limitar a solubilidade do alginato na água (ARNE HAUG, 1963).

Os valores de pK_a (constante de dissociação ácida) para o ácido manurônico e o ácido gulurônico são, respectivamente, 3,38 e 3,65, e o pK_a do polímero de alginato é semelhante ao dos monômeros. A redução rápida do pH para valores abaixo do pK_a resulta na precipitação de moléculas de ácido, enquanto que a redução lenta e controlada pode resultar na formação de gel de ácido alginico. A adição de ácido a solução de alginato resulta em precipitação em faixa relativamente estreita de pH. Essa faixa depende não apenas do peso molecular do alginato, mas também de sua composição química e sua sequência. Alginatos que possuem estrutura alternada (blocos-MG) irão se precipitar em valor mais baixo de pH do que alginatos que contenham estrutura de blocos mais homogênea (poli-M e poli-G). A presença de blocos homopoliméricos pode favorecer a precipitação pela formação de regiões cristalinas estabilizadas por ligações de hidrogênio. Com o aumento da “desordem” nas cadeias de alginato, a formação dessas regiões cristalinas é dificultada. Devido à baixa solubilidade do alginato em valores baixos de pH, o composto de alginato e propileno glicol (PGA) é utilizado como estabilizante em alimentos sob condições ácidas (DRAGET, SMIDSRØD e SKJAK-BRAEK, 2005).

3.1.3 Ligação iônica seletiva

A ligação iônica dos alginatos representa a base para capacidade de geleificação desse material e as características dessa interação são dependentes de sua composição. A ligação iônica seletiva é exclusiva do poli-G, sendo essa seletividade quase ausente no poli-M. A afinidade dos alginatos com metais terrosos aumenta na ordem $Mg \ll Ca < Sr < Ba$; essa propriedade é especial dos alginatos, se comparado com outros poliânions (com exceção do ácido pético). Estudos demonstram que a seletividade dos alginatos em relação aos metais alcalinos terrosos e metais de transição aumenta à medida que se aumenta a concentração de α -L-gulurônico na cadeia polimérica (DRAGET, 2006).

3.2 VIDRO BIOATIVO

“O material bioativo é aquele que provoca uma resposta biológica específica na interface do material, resultando na formação de ligação entre o tecido e o material”. Essa definição foi dada por Hench, que iniciou as pesquisas nessa área em 1970. Hench descobriu que vidros formados por SiO_2 , CaO , Na_2O e P_2O_5 ao serem implantados formavam ligações com os ossos e que camada de hidroxiapatita (HA), semelhante à fase mineral dos ossos, depositava-se na superfície do implante. Posteriormente, Wilson e Noletti demonstraram que ligações com tecidos moles também poderiam ser formadas (CERRUTI, 2004). Três características composicionais distinguem o vidro bioativo dos vidros tradicionais (HENCH, 1991):

- Menos que 60% em mol de SiO_2 ;
- Elevados teores de Na_2O e CaO ;
- Elevada razão de $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$.

O primeiro vidro bioativo estudado foi o Biovidro 45S5®, introduzido por Hench, em 1971, na Universidade de Flórida, em Gainesville, cujo estudos foram financiados pelo Comando de Pesquisa e Desenvolvimento do Exército dos EUA. O Biovidro 45S5® ainda é o mais utilizado em aplicações clínicas e o mais promissor. O nome ‘45S5’ se refere à composição de SiO_2 (45% em peso) e à razão molar entre $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$, que é igual a cinco. (HENCH, 2006). Hench implantou pequenas amostras do vidro no fêmur de ratos, e ao fim de seis semanas observou-se que as cerâmicas estavam fortemente ligadas ao osso, e não se moviam nem sob pressão ou impacto. Testes posteriores revelaram que o vidro estimulava a diferenciação de osteoblastos, sendo, então, osteocondutor e osteoindutor (HEPP, 2013).

O mecanismo da adesão histoquímica entre o vidro bioativo e o tecido ósseo foi descrito em 1974 por Hench e Peaschall. Após o contato com fluidos teciduais há troca de íons na superfície do vidro bioativo, formando camada de gel rica em sílica na superfície do material. Essa camada acelular, é bioativa e promove o surgimento de interface de união com o osso, não sendo identificada como corpo estranho, pois é semelhante química e estruturalmente à fase mineral do osso normal em osteogênese. Os osteoblastos reconhecem como superfície sobre a qual podem depositar colágeno e mucopolissacarídeos, desencadeando o efeito em rede, com a incorporação de fibras

colágenas ao gel, o qual faz parte da superfície da cerâmica de vidro bioativo. Quando os mucopolissacarídeos interagem com o gel e as fibras colágenas são ligadas à superfície, a estabilidade do gel aumenta e a corrosão é prevenida. A mineralização ocorre dentro da camada de maneira ectópica, produzindo cristais que fazem uma ponte entre a superfície do implante de vidro bioativo e o osso maduro (BAHJAT NASSER NETO).

3.2.1 Fatores que afetam a bioatividade do vidro

Nos vidros bioativos a sílica (SiO_2) é responsável pela formação estrutural, e os metais alcalinos (sódio e potássio) ou metais alcalinos terrosos (cálcio e magnésio) atuam como modificadores estruturais. As propriedades biológicas dos vidros são dependentes de sua composição, e, portanto, a taxa de formação óssea na interface do implante de vidro bioativo pode ser controlada alterando-se a composição do vidro (KERÄNEN, 2012).

Cálcio, fósforo e sílica desempenham papel importante na bioatividade do vidro. A sílica afeta o processo metabólico durante o processo de formação e calcificação do tecido ósseo. Ácido Ortosilicato, $\text{Si}(\text{OH})_4$, estimula a diferenciação de osteoblastos e a formação de colágeno. O alumínio reduz a bioatividade, enquanto estrôncio e magnésio aumentam a bioatividade do vidro. Numerosos estudos demonstraram a influência da dissolução de íons metálicos na bioatividade, sendo esta dependente da concentração de íons (GREENSPAN, 1999).

A tabela 2 compara entre a composição e o índice de bioatividade de alguns vidros bioativos com outras composições. Todos esses materiais são bioativos, e formam camada de HAC (hidroxiapatita carbonatada) em sua superfície quando implantados (CERRUTI, 2004).

A redução da concentração de sílica aumenta a solubilidade e bioatividade do vidro. O Biovidro 45S5® contém 45% em peso de sílica, e é o vidro bioativo com maior efeito estimulante em células ósseas. Vidros bioativos contendo entre 45 e 52% em peso de sílica, se ligam mais rapidamente ao osso, e também têm a capacidade de se ligar quimicamente a tecidos moles. Já vidros contendo entre 55 e 60% em peso de sílica,

apresentam bioatividade mais duradoura, porém não têm a capacidade de se ligar a tecidos moles (KERÄNEN, 2012).

Tabela 2 – Composição, estrutura, e índice de bioatividade de diferentes vidros

	45S5	45S5.4F	52S4.6	KGC Ceravital®	A/W-GC
SiO ₂	45	45	52	46.2	34.2
P ₂ O ₅	6	6	6	-	16.3
CaO	24.5	14.7	21	20.2	44.9
Ca(PO ₃)	2	-	-	-	25.5
CaF ₂	-	9.8	-	-	0.5
MgO	-	-	-	2.9	4.6
Na ₂ O	24.5	25.5	21	4.8	-
K ₂ O	-	-	-	0.4	-
Estrutura	Vidro	Vidro	Vidro	Vidro-Cerâmica	Vidro-Cerâmica
I _B	12.5	12.5	10.5	5.6	6.0

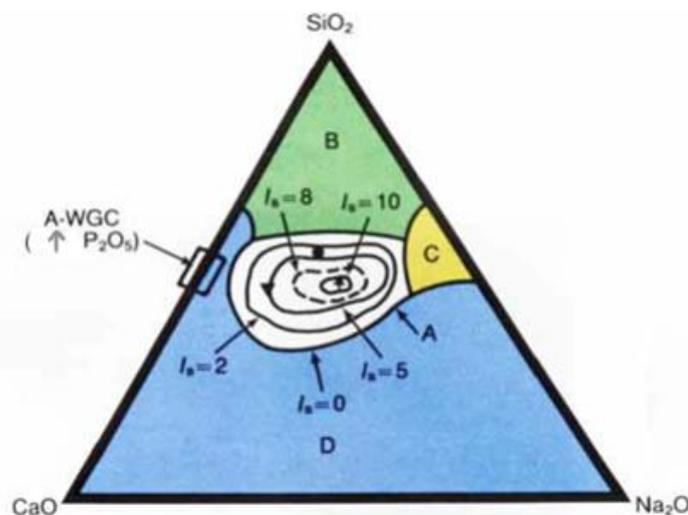
Fonte: (CERRUTI, 2004)

Estudos *in vitro* indicaram que a dissolução e formação de camada de HAC são mais rápidos em biovidros 58S, derivados de sol-gel (60% SiO₂, 36% CaO e 4% P₂O₅, em mol%) (uma hora), comparado com o Biovidro 45S5® (seis horas). Os resultados foram confirmados em experimentos *in vivo*, nos quais após 12 semanas quase toda a sílica do vidro-gel 58S fora consumida e resíduos de fosfato de cálcio foram observados. O implante 45S5 exibiu perda de íons de sódio, porém apresentou taxa de dissolução de sílica menor e a camada de HAC mais grossa. A sílica foi consumida a taxas semelhantes para os dois materiais nas primeiras seis horas. Após esse período, a taxa de dissolução da sílica do vidro-gel 58S foi maior. A taxa de liberação de sílica do 58S levou quatro dias a mais para se estabilizar comparado com a do 45S5. A formação óssea não apresentou diferenças após 12 semanas. Porém, outros estudos indicaram formação óssea melhorada para implantes de vidro-gel. A maior área superficial dos poros do implante de 58S permitiram troca iônica prolongada (POLAK, e KEMP, 2002).

Uma das características comuns dos vidros bioativos é a dependência do tempo das modificações químicas que ocorrem em sua superfície. O efeito osteogênico desses materiais é mediado por características superficiais e pela dissolução de íons. Vidros bioativos possuem a capacidade de ativar genes e estimular a secreção de fatores de crescimento angiogênicos (KERÄNEN, 2012).

A capacidade do biovidro de se ligar ao osso foi primeiramente demonstrada para determinada composição, que continha SiO_2 , CaO , Na_2O e P_2O_5 em proporções específicas. Caso a razão de $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ do Biovidro 45S5® seja reduzida substancialmente, esse material perderia sua capacidade de se ligar ao osso. A dependência da capacidade do vidro se ligar ao osso com a sua composição está demonstrado no diagrama da figura 4. Todos os vidros da figura 4 contêm 6% em peso de P_2O_5 . A região A representa as composições de vidros bioativos. Vidros que estão na região B se comportam como materiais inertes (vidro de garrafa, janela e lâmina microscópio, por exemplo), e são envolvidos por uma cápsula fibrosa fina quando usados como implantes. Já os vidros que se encontram na região C são reabsorvíveis e desaparecem alguns dias após a implantação. Vidros da região D não têm características de biomateriais (HENCH, 1991).

Figura 4 – Diagrama que ilustra a dependência da capacidade do vidro se ligar ao osso com a sua composição em peso.



Fonte: (MØRCH, 2008)

3.2.2 Processamento sol-gel

O processamento sol-gel é um dos métodos para se produzir cerâmicas, vidros, vitrocerâmicas e compósitos a temperaturas mais baixas que a sinterização. A descoberta de que a camada de gel de sílica desenvolvia importante papel na nucleação e cristalização da hidroxiapatita, levou ao desenvolvimento do vidro bioativo a partir da técnica de sol-

gel. O sol é a dispersão de partículas coloidais, e o gel possui rede rígida interconectada com poros de dimensões na ordem de submicrômetros e cadeias poliméricas que têm comprimento médio maior que 1 μ m. Coloides são partículas com diâmetro menor que 100nm. Além de menor temperatura de processamento, esse método possui outras vantagens em relação ao método derivado da fusão. Vidros derivados de sol-gel apresentam (POLAK, e KEMP, 2002):

- i. Baixa temperatura de processamento.
- ii. Potencial para se atingir alto grau de pureza, necessário para melhorar a bioatividade, devido às baixas temperaturas de processamento, alto teor de sílica e baixo teor de alcalinos.
- iii. Maior homogeneidade.
- iv. Possibilidade de diferentes composições (até 90% em mol de SiO₂) sem comprometer a bioatividade
- v. Melhor controle da bioatividade mudando-se a composição ou a microestrutura
- vi. Variações estruturais sem alterações na composição podem ser alcançadas pelo controle da hidrólise e reações de policondensação durante a síntese.
- vii. Maior facilidade na produção de pós
- viii. Maior bioatividade
- ix. Poros interconectados na ordem de nanômetros que podem ser variados para o controle da cinética da dissolução ou serem impregnados com fases biologicamente ativas para atuarem como fatores de crescimento.
- x. Possibilidade de formação de esponjas com poros interconectados de dimensões de 10 a 200 μ m, para serem usados como substitutos de osso trabecular.

Três métodos podem ser usados na confecção de materiais sol-gel:

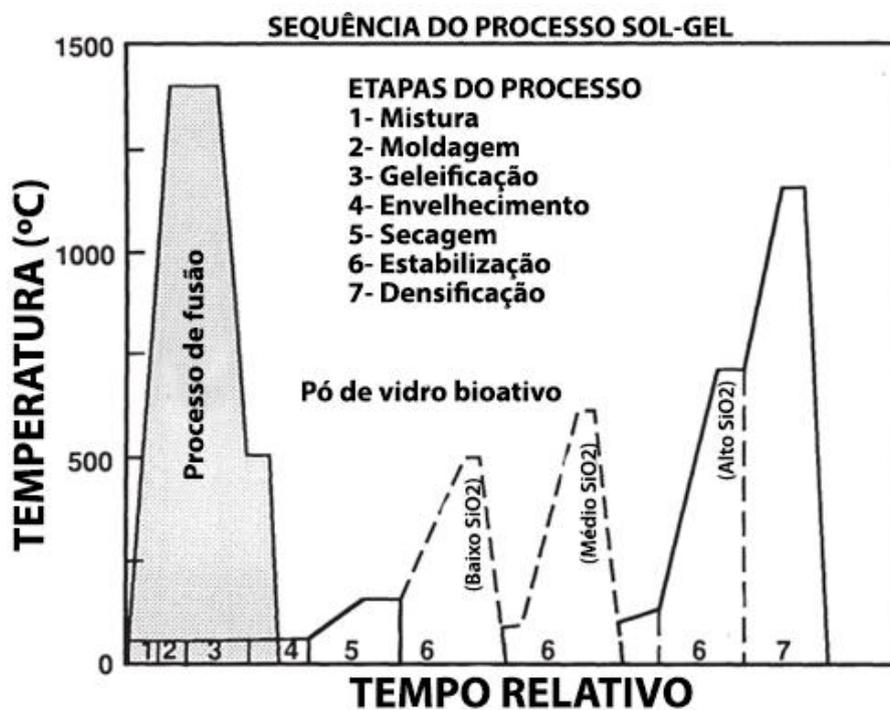
- Método 1: Congelamento de pó coloidal;
- Método 2: Secagem hiper-crítica;
- Método 3: Hidrólise controlada e condensação de alcóxidos de metais como precursores seguido de secagem à pressão ambiente.

Os três métodos consistem na criação de uma rede interconectada tridimensional (gel) contendo partículas coloidais (sol). No método 1, o pH do sol é alterado, ordenando-se essas partículas coloidais e formando o gel. Já no método 2 e 3, a rede de gel é formada

por meio da hidrólise e condensação de um precursor de alcóxidos de metais líquido, como ilustrado na figura 5 (HENCH e WILSON, 2013).

O processamento sol-gel é realizado em sete etapas, como indicado na figura 5, que ilustra cada etapa com sua respectiva temperatura e tempo de processamento. A primeira etapa, é a mistura dos precursores, que formarão um sol de baixa viscosidade. À medida que as cadeias se interconectam, a viscosidade aumenta consideravelmente. Antes de se completar a formação das redes, o sol pode ser utilizado como revestimento, transformado em fibra, impregnado em um compósito, transformado em pó ou moldado em um molde com forma precisa e aspectos superficiais específicos. A terceira etapa é o congelamento em um molde ou na superfície de um substrato, formando um objeto solido ou um revestimento superficial. Pós podem ser obtidos com uma distribuição dimensional altamente controlada (HENCH e WILSON, 2013).

Figura 5 – Etapas do processamento de um vidro bioativo pelo método sol-gel.



A temperatura de processamento é consideravelmente mais baixa que o processamento por meio de fusão.
Fonte: (HENCH e WILSON, 2013).

Os poros da rede de gel tridimensional são completamente preenchidos por líquido. A quarta etapa é o envelhecimento, e consiste na manutenção do líquido nos poros por algumas horas, sob a temperatura de 25 a 80°C. Isso resulta em uma solução e uma reprecipitação da rede sólida, aumentando a espessura dos pescoços entre as partículas, a densidade e a resistência do gel (HENCH e WILSON, 2013).

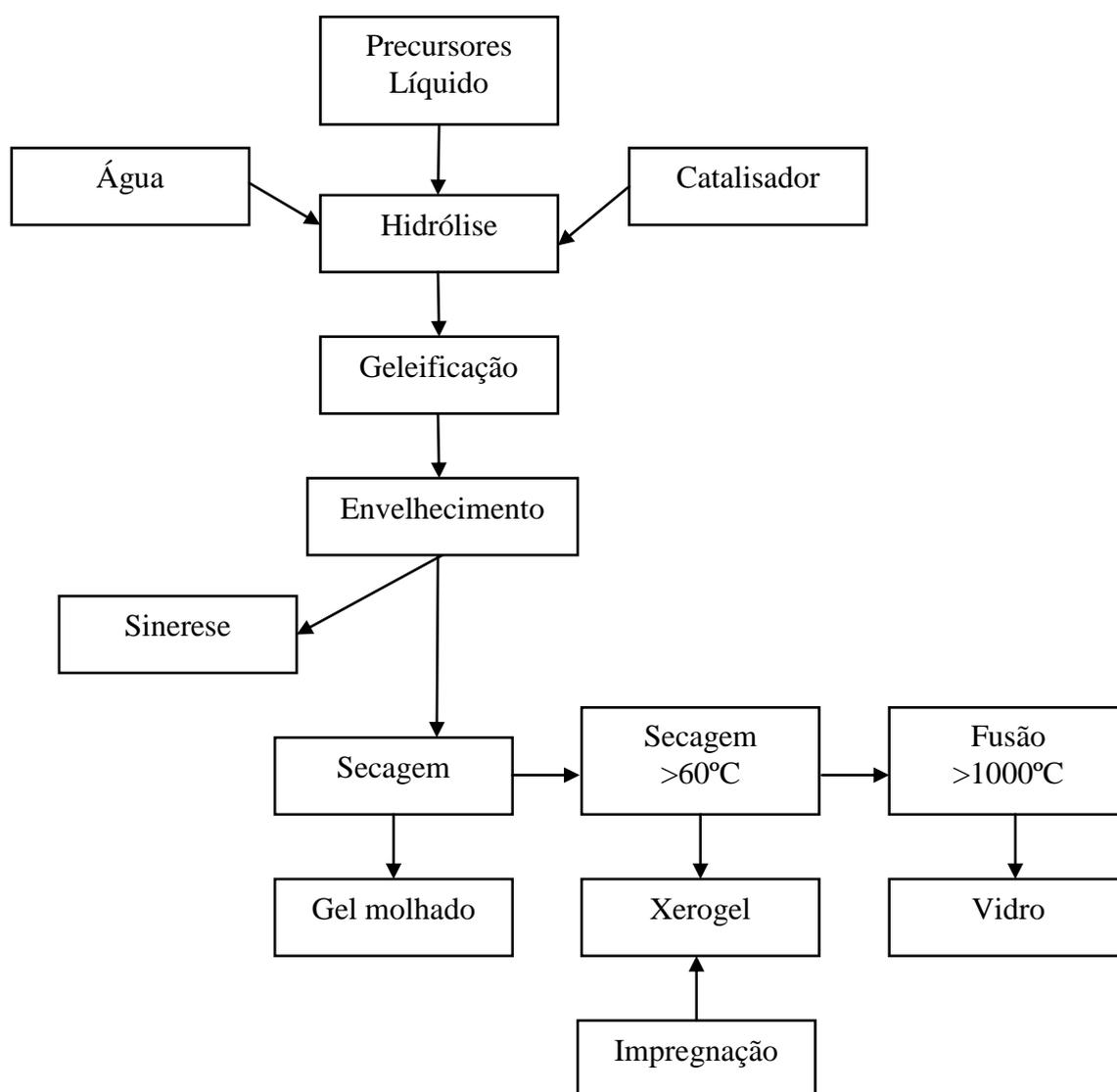
Na quinta etapa, o gel é secado, retirando-se o líquido dos poros. As grandes dimensões dos poros, maiores que 100nm, facilitam a secagem, porém poros de dimensões menores, como os géis à base de alcóxidos (entre 1 e 10nm) podem ter as tensões capilares aumentadas durante a secagem. A secagem hipercrítica, realizada sob altos valores de pressão e temperatura, acima do ponto crítico de transição líquido-sólido, evita o surgimento de interface- sólido-líquido e elimina tensões de secagem (método 2). Géis produzidos sob esse método são chamados de *aerogéis* que possuem densidade e resistência mais baixas, e são utilizados para aplicações óticas, porém ainda não são usados como biomateriais (HENCH e WILSON, 2013).

Já géis produzidos sob o método 3 são chamados de xerogéis, e são processados a temperatura ambiente ou sob temperaturas relativamente baixas. O termo genérico *gel* geralmente se refere ao xerogel. Esse método produz géis com faixa de distribuição de tamanho de poros muito estreita, controlando-se as taxas de hidrólise e condensação da primeira etapa. A água adsorvida é eliminada dos poros sob um aquecimento com taxas controladas a temperaturas de 120 a 180°C. A área superficial dos géis produzidos sob esse método é muito grande, entre 200 e 800m²/g, e o tamanho dos poros varia entre 1 e 12nm (HENCH e WILSON, 2013).

A quinta etapa é a estabilização química do gel desidratado e é necessária para o controle da estabilidade do material com o ambiente. Tratamento térmico com temperaturas na faixa de 500 a 900°C dissolve silanóis superficiais (Si-OH) e elimina 3 anéis de silício do gel. Essas características superficiais são importantes no controle da taxa de formação de HAC em vidro-géis e em sua bioatividade. Estabilização também aumenta a densidade, resistência e dureza de géis, e converte a rede em vidro com as propriedades da rede similares a de vidros derivados de fundição (HENCH e WILSON, 2013).

A densificação de vitro-géis derivados de alcóxidos é completada na faixa de 900 a 1150°C dependendo da composição. Vitro-géis com concentração de sílica moderada (entre 45 e 69%) e alto teor de CaO-P₂O₅, por exemplo, têm todos os poros eliminados ao fim do tratamento a 900°C, enquanto vidros com alto teor de Si requerem temperaturas na faixa de 1000 a 1150°C. Hidróxidos e água adsorvida devem ser removidos dos géis antes do fechamento dos poros ou podem ocorrer inchamento e falhas microestruturais. A grande vantagem do processo sol-gel é o controle químico da superfície por meio desses tratamentos térmicos (HENCH e WILSON, 2013). A figura 6 ilustra esquematicamente o processo de produção sol-gel.

Figura 6 – Representação esquemática das etapas do processo sol-gel.



Fonte: (PODBIELSKA e ULATOWSKA-JARZ' A, 2005)

4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS UTILIZADOS NA SÍNTESE

4.1.1 Solução algínica

No preparo da solução algínica, foi utilizado alginato de sódio em pó da marca Sigma-Aldrich® (massa molar (MW) = 100.000 g/mol, com aproximadamente 61% de ácido manurônico e 39% de ácido gulurônico, com uma relação M/G de 1,56).

4.1.2 Solução de vidro bioativo

Foram utilizados na síntese da solução de vidro bioativo

- H₂O (destilada),
- Si(OC₂H₅)₄ (tetraetil ortosilicato – TEOS),
- (C₂H₅)₃PO₄ (trietilfosfato – TEP) e
- CaCl₂.H₂O (cloreto de cálcio monohidratado).

4.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NA SÍNTESE

4.2.1 Agitador magnético

Foi utilizado agitador magnético do modelo C-MAG HS 7 IKAMAG® com alcance de velocidade de 100 a 1.500 rpm (figura 7).

Figura 7 - Agitador magnético C-MAG HS 7 IKAMAG®.



Fonte: O autor.

4.2.2 Balança de alta precisão

Foi utilizada balança de alta precisão da marca Bel Engineering (figura 8)

Figura 8 – Balança de alta precisão Bel Engineering.



Fonte: O autor.

4.2.3 Estufa com circulação de ar

Foi utilizada estufa de secagem com circulação e renovação forçada de ar digital microprocessada da marca Cienlab (figura 9).

Figura 9 - Estufa de secagem com circulação e renovação forçada de ar digital microprocessada da marca Cienlab.



Fonte: O autor.

4.3 SOLUÇÃO DE ALGINATO

4.3.1 Preparo da solução de alginato nas concentrações de 1% e 5% (p/v):

Foram preparadas soluções de alginato nas concentrações de 1% e 5% (p/v) por meio de solubilização do pó em água destilada. Em seguida, foi realizada a correção nas soluções para os valores de pH igual a $4,0 \pm 0,1$. As soluções foram tampadas com filme de PVC e mantidas sob agitação magnética por 24 horas, em 200 rpm em temperatura ambiente.

4.4 SÍNTESE DO VIDRO BIOATIVO

A solução inicial para obtenção do vidro bioativo, com composição de 58% (p/p) de SiO_2 , 33% (p/p) de CaO e 9% (p/p) de P_2O_5 (p/p), foi sintetizada por meio da mistura de $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (tetraetil ortosilicato – TEOS), H_2O (deionizada), $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{PO}_4$ (trietilfosfato – TEP) e $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (cloreto de cálcio monohidratado). A razão molar de $\text{H}_2\text{O}/\text{TEOS}$ foi de 12:1.

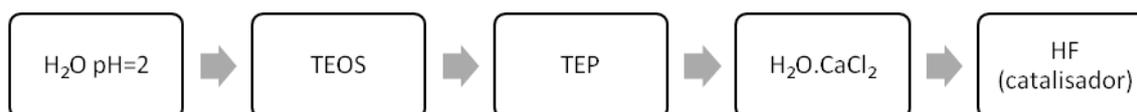
O protocolo de síntese do vidro bioativo compreendeu as etapas a seguir:

Adição de H_2O deionizada em béquer, sob agitação branda, seguida de ajuste do pH para o valor de $2,0 \pm 0,1$, utilizando solução de HCl 2N.

- Adição de TEOS na solução e manutenção da agitação por 45 minutos;
- Adição de TEP na solução e manutenção da agitação por mais 30 minutos;
- Adição de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ na forma de pó e manutenção da agitação por 1 hora;
- Adição de soluções 10%(v/v) de HF como catalisador da geleificação.

A figura 10 representa de maneira esquemática a rota de síntese:

Figura 10 – Esquema representativo do protocolo de síntese do vidro bioativo.



Fonte: O autor.

4.5 PREPARO DOS COMPÓSITOS ÁCIDO ALGÍNICO-VIDRO BIOATIVO

O preparo dos compósitos foi realizado por meio de três rotas distintas.

A) Rota R1

Na rota R1, representada pela figura 11, foi preparada solução de vidro bioativo, que recebeu a adição do cloreto de cálcio. Em seguida, foi realizada adição da solução de ácido algínico e da solução de ácido fluorídrico. A mistura resultante foi vertida em recipiente de polietileno.

Figura 11 – Esquema representativo da 1ª rota de processo.



Fonte: O autor.

B) Rota R2

Na rota R2, representada pela figura 12, foi preparada solução de ácido algínico em meio aquoso. Separadamente, foi preparada solução aquosa com valor de pH igual a $2,0 \pm 0,1$, que recebeu em seguida a adição de TEOS. Para correção do pH, foi utilizada solução de HCl 2N. Feitas as duas soluções iniciais, procedeu-se à mistura da solução de alginato na solução de TEOS. Após a adição de TEOS, foi realizada a adição de TEP, cloreto de cálcio e da solução de ácido fluorídrico. A mistura final foi vertida em recipiente de polietileno.

Figura 12 - Esquema representativo da 2ª rota de processo.

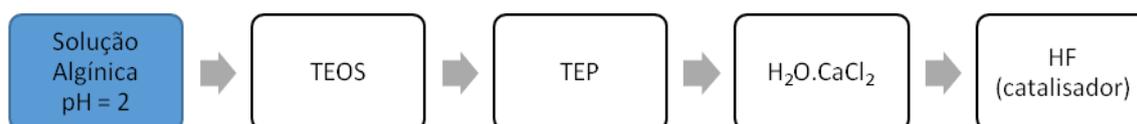


Fonte: O autor.

C) Rota R3

Na rota R3, representada pela figura 13, foi preparada solução de alginato que teve o pH corrigido para o valor de $2 \pm 0,1$. Em seguida, foi feita adição TEOS sob agitação magnética, sendo mantida a agitação por 45 minutos. Após esse período, foi feita a adição de TEP e mantida a agitação por mais 30 minutos e, finalmente, foi adicionada a parcela de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ com manutenção da agitação por mais 60 minutos. A solução final foi vertida em recipiente de polietileno.

Figura 13 – Esquema representativo da 3ª rota de processo.



Fonte: O autor.

A tabela 3 mostra, em resumo, as rotas utilizadas.

Tabela 3 – Rotas de síntese do composto de alginato e vidro bioativo.

ROTA	SOLUÇÃO ALGÍNICA
R1	Adicionada posteriormente à adição de cloreto de cálcio
R2	Adicionada posteriormente à adição de TEOS
R3	Substituiu-se o H ₂ O com pH igual a 2 pela solução de alginato 5% com pH igual a 2

Fonte: O autor.

D) Envelhecimento

Após as soluções obtidas nas rotas R1, R2 e R3 serem vertidas individualmente em recipientes de poliestireno com capacidade de 30ml, cada um dos recipientes recebeu vedação com filme de PCV para o envelhecimento das soluções por 7 dias à temperatura ambiente. Posteriormente, os recipientes foram abertos para a secagem, permanecendo em estufa por 2 dias à 40±2°C.

Foram produzidas amostras utilizando-se soluções algínicas em diferentes concentrações, além de se realizar a variação na proporção em volume das misturas entre a solução de alginato e a solução de vidro bioativo, como mostra a tabela 4.

Tabela 4 – Variação da concentração de alginato na solução algínica e proporção em volume da mistura entre a solução de alginato e a solução de vidro bioativo para cada rota.

ROTA	CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO ALGÍNICA (p/v)	PROPORÇÃO ENTRE SOLUÇÃO ALGÍNICA E SOLUÇÃO DE VIDRO BIOATIVO (v/v)
R1	1%	1:2
R2	A	1%
	B	5%
	C	5%
R3	5%	1:1

Fonte: O autor.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL COMPÓSITO ALGINATO-VIDRO BIOATIVO

4.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia de Raios X

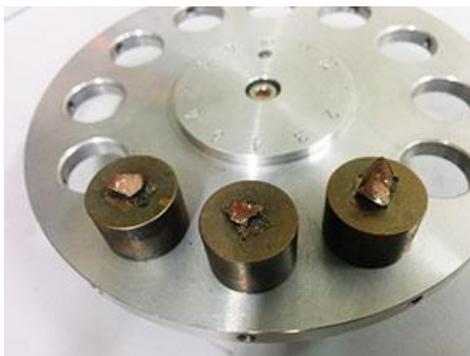
Foram realizadas análises morfológicas (MEV) do material no Laboratório de Caracterização e Microscopia do Departamento de Engenharia de Materiais do CEFET-MG nas amostras R2-A. Depositou-se, na superfície das amostras, uma nanocamada de ouro (em torno de 50nm), utilizando-se o Sputtering Quick Coater SC-701, da marca Sanyu Electron (figura 14). O material já preparado para as análises pode ser visto na figura 15.

Figura 14 - Sputtering Quick Coater SC-701, da marca Sanyu Electron.



Fonte: O autor.

Figura 15 - Amostras recobertas por nanocamada de ouro.



Fonte: O autor.

As amostras R2-A foram ensaiadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) por meio do equipamento Shimadzu SSX-550 (figura 16).

Figura 16 - Microscópio eletrônica de varredura Shimadzu SSX-550.



Fonte: O autor.

4.6.2 Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDX)

Análises químicas (EDX) foram realizadas por meio do ensaio de espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX), utilizando-se o equipamento Shimadzu XRD 7000 (figura 16).

A concentração molar de cada elemento estrutural do vidro bioativo foi calculada com base na tabela de concentração molar gerada pela análise. O cálculo foi feito considerando-se apenas elementos relevantes (Si, Ca e P), e desconsiderando-se os demais elementos identificados.

Devido à falta de nitrogênio líquido, não foi possível realizar análises de EDX nas amostras das sínteses R2-B, R2-C e R3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ROTA R1

Durante a adição da solução de alginato na solução de vidro bioativo, ocorreu reação abrupta de geleificação em parte do volume adicionado sem que ocorresse a mistura das soluções. Esse processo gerou regiões heterogêneas e distintas de material, como pode ser observado na figura 17.

Considerando os resultados obtidos pela rota R1, é possível supor que a solução de alginato tenha reagido com o cálcio presente, em concentração elevada, proveniente da solução de vidro bioativo. Essa reação pode ter promovido a complexação das cadeias de alginato entre si, formando gel que segregou da região referente aos precursores do vidro. Além disso, a alteração rápida da concentração do vidro bioativo pode ter levado à geleificação dos átomos de silício, fósforo e cálcio residual, produzindo outra fase segregada rica em vidro.

Ainda referente à rota R1, podemos perceber que a secagem resultou em estrutura irregular, compatível com o estresse de secagem diferenciado em cada uma das duas regiões citadas (região do alginato e região do vidro bioativo). Durante a secagem, o vidro não deve ter suportado a contração de secagem, ficando a estrutura resultante mais relacionada à estrutura do alginato.

Figura 17 – Amostra da síntese R1.



O alginato (região opaca) não se misturou ao vidro bioativo (região translúcida).

Fonte: O autor.

5.2 ROTA R2

5.2.1 Rota R2-A

Nessa síntese houve mistura entre as soluções, resultando em uma solução homogênea, como pode ser observado na figura 18, referente à amostra após o processo de envelhecimento.

Figura 18 – Amostra R2-A envelhecida.



Fonte: O autor.

Amostras da rota R2, submetidas ao processo de secagem em estufa, adquiriram aparência opaca e apresentaram tendência à fragmentação durante a manipulação, indicando baixa resistência mecânica. A figura 19 apresenta o aspecto das amostras fragmentadas após o processo de secagem.

A fragmentação da amostra é um indício de que a adição de alginato não promoveu melhora suficiente na resistência do material. Outra possibilidade seria a fragmentação ocorrida em razão do aumento de volume de H₂O utilizado durante o preparo das soluções, associado às concentrações de 1%(p/v) de alginato. O preparo de materiais com utilização de elevado volume de água representa a necessidade de remoção de grande volume de líquido durante a secagem. Como consequência da secagem, ocorrerá maior tensão de contração na estrutura do material. Além disso, a quantidade de alginato pode ter sido insuficiente para dispersar em quantidade suficiente para promover o incremento de resistência.

Figura 19 – Amostra R2-A após o processo de secagem.



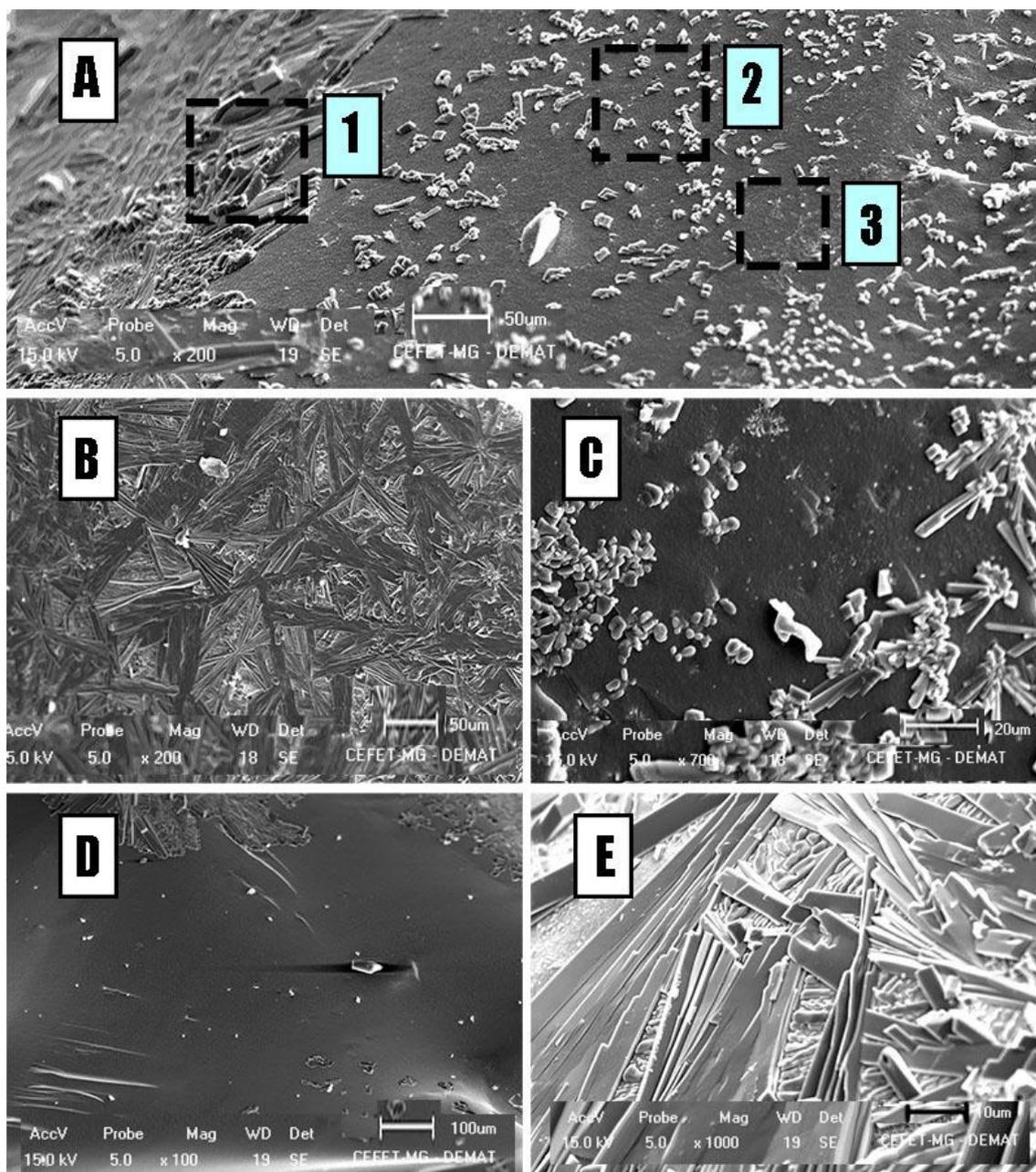
Fonte: O autor.

5.2.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A figura 20 apresenta imagens obtidas por meio da análise de microscopia eletrônica de varredura. É possível observar a heterogeneidade morfológica do material, uma vez que as imagens indicaram a presença de diferentes estruturas (figura 20A). Pode-se observar, nas Figuras 20B e 20E, estrutura semelhante a cristais, enquanto a figura 20D apresenta área com superfície mais regular e homogênea. Na figura 20C, pode-se observar regiões heterogêneas, com parte de superfície lisa, e parte de superfície com a presença de estruturas com formato de cristais.

A heterogeneidade observada nessas amostras pode ter sido causada pela solubilização não homogênea do cloreto de cálcio, que foi adicionado na forma de pó, em uma mistura que já continha alginato na sua composição. Uma vez que há afinidade das cadeias do alginato pelo elemento cálcio, além da possibilidade de reação das cadeias do alginato com átomos da estrutura do vidro bioativo, esses eventos podem ter causado alterações químicas instantâneas que levaram à conformação estrutural observada nos materiais obtidos pela rota R2.

Figura 20 – Imagens de híbridos R2-A à base de alginato de sódio e vidro bioativo, obtidas por microscopia eletrônica de varredura.



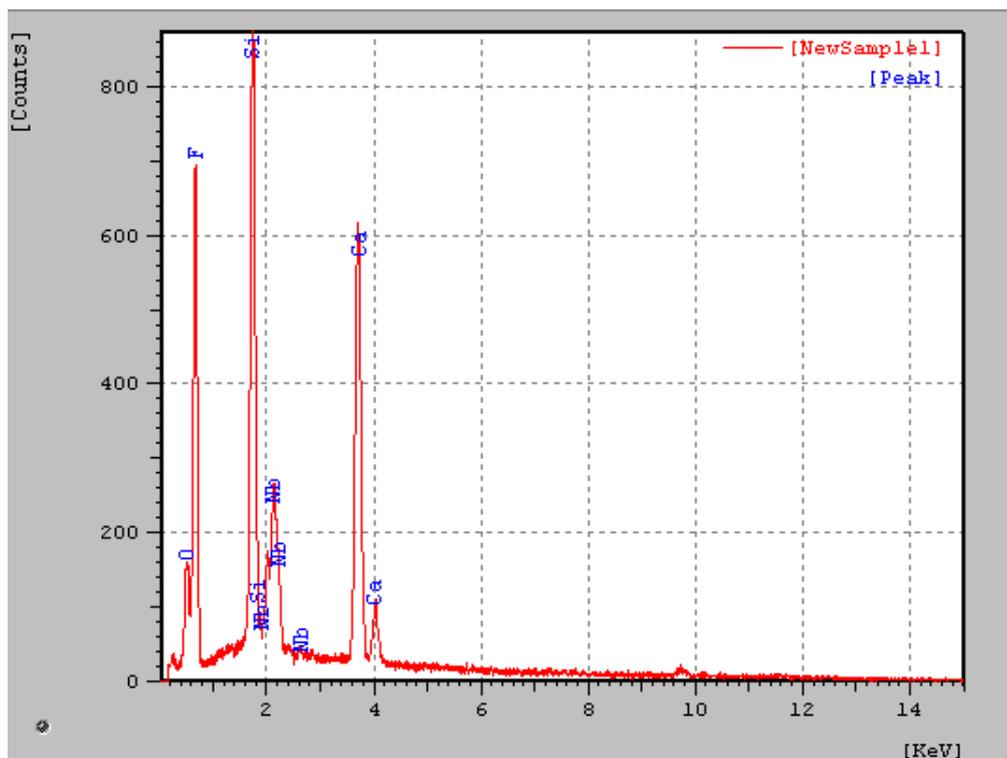
Em (A) é mostrada região heterogênea da amostra em aumento de 200x; (B) mostra região com presença de cristais relacionados a região (1) indicada em “A”; (C) apresenta região heterogênea associada à região (2) indicada em “A”; (D) apresenta região homogênea predominantemente associada à região (3) indicada em “A” e (E) apresenta região cristalina da amostra sob aumento de 1000x. Fonte: O autor.

5.2.1.2 Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDX)

As imagens apresentadas a seguir foram obtidas por meio da análise de espectroscopia de raios X por dispersão em energia:

A) Gráfico referente à região da figura 20B:

Gráfico 1 - Região da figura 20B.



Fonte: O autor.

Pode-se observar, no Gráfico 1, relacionado à região cristalina da figura 20B, a presença dos elementos estruturais do vidro bioativo representados por silício e cálcio, bem como a presença do elemento flúor, proveniente do ácido utilizado na catalisação da reação de geleificação da solução do vidro.

Ainda pelo gráfico, não foi observado pico referente ao elemento fósforo, talvez justificado pela baixa concentração utilizada durante a síntese. Entretanto os picos referentes ao nióbio podem ter sido identificados erroneamente, uma vez que a faixa do fósforo é próxima à do nióbio, como pode ser observado no Gráfico 2 e Gráfico 3.

A tabela 5 mostra a composição química da amostra. Para o fósforo, foi utilizada a faixa correspondente ao nióbio, por motivos já explicados anteriormente.

De acordo com os dados da tabela 5, comparando-se a composição da amostra com a composição do vidro bioativo puro, percebe-se que a amostra apresentou menor concentração de silício, maior concentração de cálcio e concentração de fósforo semelhante à esperada.

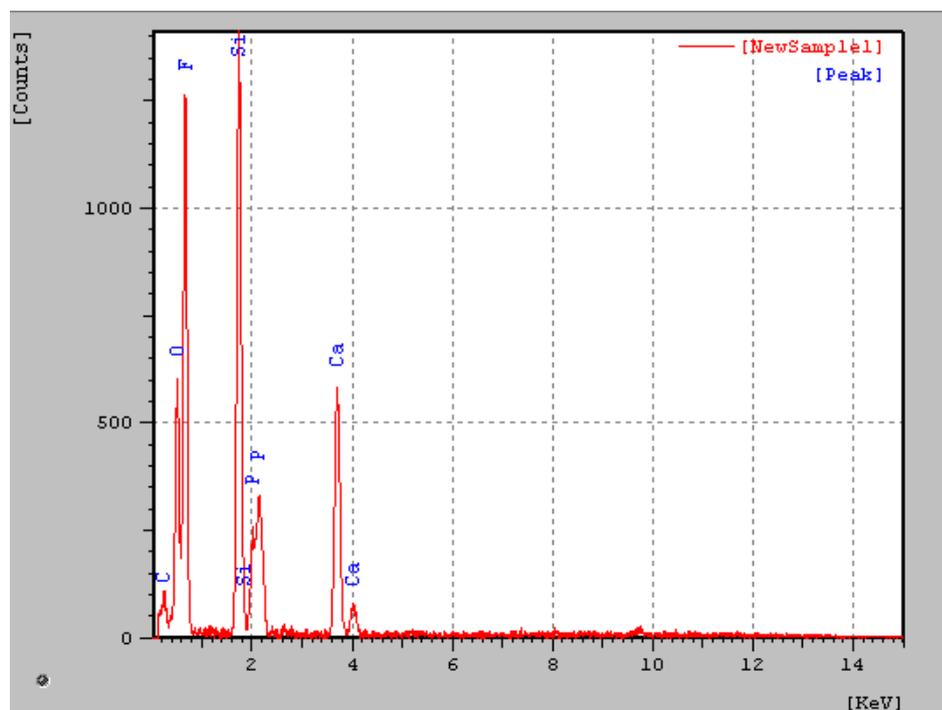
Tabela 5 – Composição química referente à região da figura 20B, considerando os elementos Si, Ca e P pertencentes à estrutura do vidro bioativo e valores teóricos de referência vidro bioativo.

ELEMENTO	VIDRO BIOATIVO	REFERÊNCIA
Si	44%	58%
Ca	48%	33%
P	8%	9%

Fonte: O autor.

B) Gráfico referente à região da figura 20E

Gráfico 2 - Região da figura 20E.



Fonte: O autor.

Pode-se observar, no Gráfico 2, a presença de todos os elementos estruturais do vidro bioativo representados por silício, fósforo e cálcio, bem como a presença do elemento flúor, proveniente do ácido utilizado na catalisação da reação de geleificação da solução do vidro. A Tabela 6 mostra a composição química da amostra.

Tabela 6 – Composição química referente à região da figura 20E, considerando os elementos Si, Ca e P pertencentes à estrutura do vidro bioativo e valores teóricos de referência vidro bioativo.

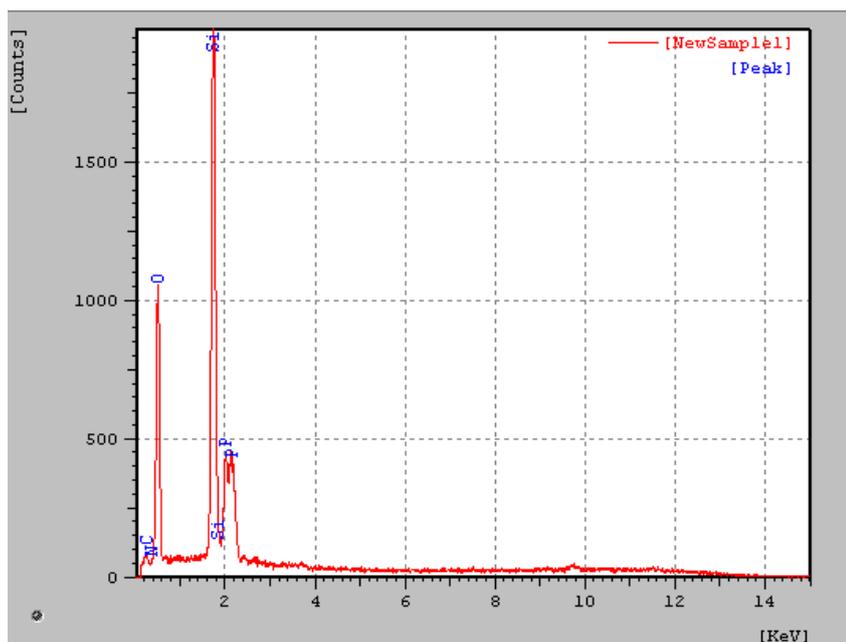
ELEMENTO	VIDRO BIOATIVO	REFERÊNCIA
Si	42%	58%
Ca	51%	33%
P	7%	9%

Fonte: O autor.

De acordo com os dados contidos na Tabela 6, comparando-se a composição da amostra com a composição do vidro bioativo puro, percebe-se que a amostra apresentou menor concentração de silício, maior concentração de cálcio e concentração de fósforo semelhante à esperada.

C) Gráfico referente à região “3” da figura 20A

Gráfico 3 – Região “3” da figura 20A.



Fonte: O autor.

A Tabela 7 mostra a composição química da amostra.

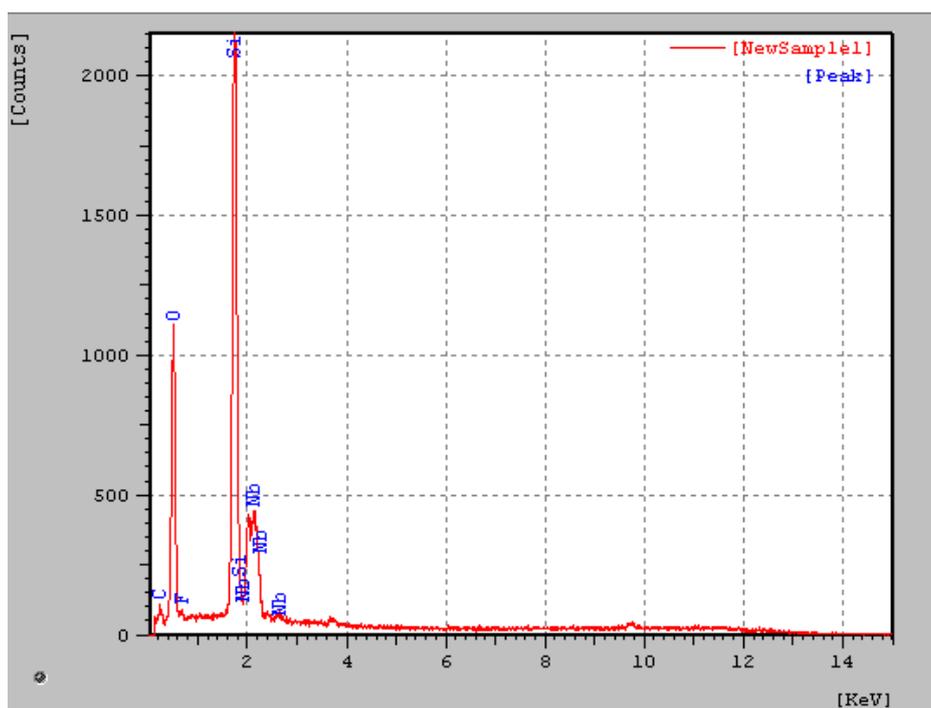
Tabela 7- Composição química referente à região “3” da figura 20^a, considerando os elementos Si, Ca e P pertencentes à estrutura do vidro bioativo e valores teóricos de referência vidro bioativo.

ELEMENTO	VIDRO BIOATIVO	REFERÊNCIA
Si	80%	58%
Ca	-	33%
P	20%	9%

De acordo com os dados contidos na tabela acima, comparando-se a composição da amostra com a composição do vidro bioativo puro, percebe-se que a amostra apresentou maior concentração de silício e de fósforo e não foi identificada a presença de cálcio.

D) Gráfico referente à região “2” da figura 20A

Gráfico 4 – Região “2” da figura 20A.



Fonte: O autor.

O único elemento estrutural do vidro bioativo observado no gráfico acima foi o silício. Assim como na situação na região representada pelo Gráfico 1, descrita anteriormente, os picos referentes ao nióbio podem ter sido identificados erroneamente, uma vez que a faixa do fósforo é próxima à do nióbio, como pode ser observado no Gráfico 2 e Gráfico 3. A Tabela 8 mostra a composição química da amostra.

Tabela 8 – Composição química referente à região “2” da figura 20^a, considerando os elementos Si, Ca e P pertencentes à estrutura do vidro bioativo e valores teóricos de referência do vidro bioativo.

ELEMENTO	VIDRO BIOATIVO	REFERÊNCIA
Si	85%	58%
Ca	-	33%
P	15%	9%

Fonte: O autor.

De acordo com os dados contidos na tabela acima, comparando a composição da amostra com a composição do vidro bioativo puro, percebe-se que a amostra apresentou maior concentração de silício e fósforo e não foi identificada a presença de cálcio.

5.2.1.3 Relação entre as análises de MEV e EDX

A relação entre as análises de EDX e MEV indicam que a heterogeneidade estrutural observada nas imagens obtidas pelo MEV pode ser devido às diferenças na composição química entre determinadas regiões, uma vez que há regiões sem presença de cálcio, mas sendo identificada a presença de silício e fósforo, como observado na figura 20 e Gráfico 3. A superfície apresentou-se com superfície homogênea; enquanto regiões que continham todos os elementos estruturais do vidro bioativo (cálcio, fósforo e silício) como na figura 18 em A, B e D e Gráfico 1 e Gráfico 2, apresentaram estruturas semelhantes a cristais. Há ainda indícios de que a estrutura com aspecto cristalino observado nas figuras 20B e 20E foi formada devido ao alto teor de F, possivelmente na forma de CaF_2 , proveniente do ácido utilizado na catalisação.

A ausência de cálcio em determinadas regiões pode ser justificada pela ligação do elemento às cadeias de alginato, que teria causado alterações químicas e estruturais na amostra, uma vez que as cadeias algínicas tendem a se ligar ao cálcio. Outra hipótese é que a heterogeneidade teria sido causada pela dificuldade na solubilização do cloreto de cálcio na solução de vidro de maneira homogênea, uma vez que, ao entrar em contato com a solução, o cálcio teria iniciado o processo de nucleação do vidro em determinados sítios, antes que a solubilização ocorresse por completo.

5.2.2 Rota R2-B

Nessa síntese houve solubilização entre as soluções, resultando em uma solução homogênea, como pode ser observado na figura 21, que apresenta a amostra já envelhecida.

Figura 21 - Amostra envelhecida, preparada pela rota R2-B.



Fonte: O autor.

Após a secagem em estufa, a amostra adquiriu aparência opaca e também houve fragmentação do material, como pode ser observado na figura 22. A fragmentação é indício de que o aumento da concentração de alginato não foi suficiente para obter melhora desejável na resistência do material. É possível que a fragmentação tenha ocorrido em razão do aumento de volume de líquido removido do material durante a secagem, causando tensão na estrutura do material, que teria levado o material à fratura.

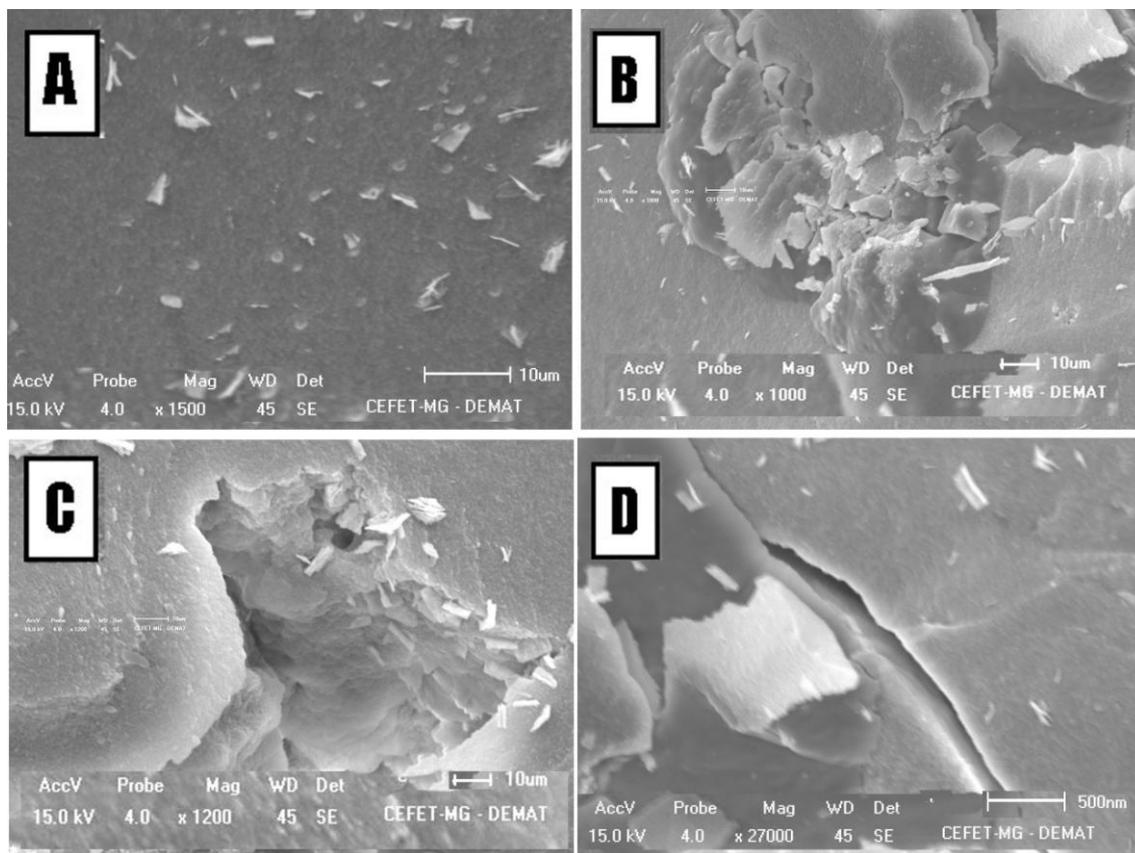
Figura 22 – Amostra da rota R2-B, após o processo de secagem.



Fonte: O autor.

5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Figura 23 – Imagens de híbridos à base de alginato de sódio e vidro bioativo, obtidas por microscopia eletrônica de varredura.



Em (A) é mostrada região heterogênea da amostra em aumento de 1.500x; (B) e (C) apresentam regiões de fragmentação da amostra e sob aumento de, respectivamente, 1.000x e 1.200x; e (D) mostra região com presença de trinca em ampliação de 27.000x. Fonte: O autor.

Pode-se observar, na figura 23A, estrutura heterogênea semelhante à estrutura observada na amostra da síntese R2-A (figura 20B). Em B e C, são observadas regiões onde a amostra se fragmentou e, em D, a presença de trincas para aumentos de 27.000 vezes.

5.2.4 Rota R2-C

Nessa síntese houve solubilização entre as soluções, resultando em uma solução homogênea, como pode ser observado na figura 24, que mostra a amostra após o processo de envelhecimento.

Figura 24 - Amostra envelhecida, preparada pela rota R2-C.



Fonte: O autor.

Após a secagem em estufa, a amostra adquiriu aparência opaca e fragmentada, como pode ser observado na figura 25. A fragmentação pode ser indício de que o aumento da quantidade de alginato não foi suficiente para obter a melhora desejada na integridade do material. É possível que a fragmentação tenha ocorrido devido ao aumento de volume de líquido removido do material durante a secagem, causando tensão na estrutura do material, que levou o material a fratura.

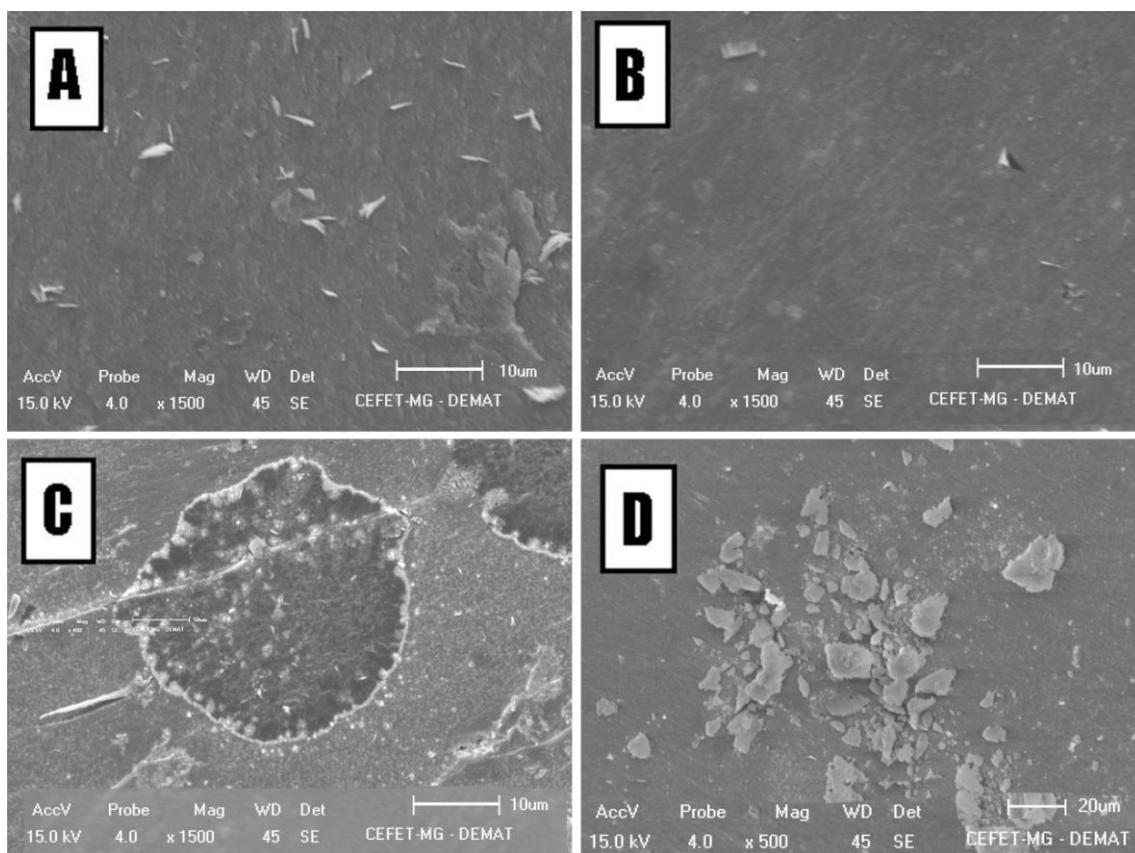
Figura 25 – Amostra preparada pela rota R2-C, após o processo de secagem.



Fonte: O autor.

5.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Figura 26 – Imagens de híbridos à base de alginato de sódio e vidro bioativo, obtidas por microscopia eletrônica de varredura.



Em (A) e (B) são mostradas regiões predominantemente homogêneas da amostra em aumento de 1.500x; (C) apresenta região de heterogeneidade sob aumento de 400x; e (D) apresenta outro tipo de heterogeneidade, em ampliação de 500x. Fonte: O autor.

As regiões observadas nas figuras 26A e 26B apresentam estrutura mais homogênea que aquelas observadas na amostra preparadas pela rota R2- A (figura 20C). A figura 26C mostra heterogeneidade com duas regiões bem delimitadas, sugerindo um núcleo de reação circundado por outra região com superfície mais regular, que somente foi observada em maior aumento. Na figura 26D, podem ser observadas partículas depositadas na superfície do material com tamanho na ordem de 1 a 20µ, sugerindo a precipitação de produtos não reagidos das soluções utilizadas na síntese.

5.3 ROTA R3

A rota R3 foi adotada com o objetivo de preparar amostras que apresentassem, na sua composição, menor volume de líquido, que seria removido durante a secagem. Isso foi feito substituindo-se o H₂O pela solução algínica.

Durante a síntese, foi observado aumento na viscosidade da solução e alteração na sua coloração. Essas duas alterações estão relacionadas com o aumento da concentração de alginato utilizado na solução.

Durante a adição do reagente CaCl₂ na forma de pó monohidratado, houve geleificação da solução em poucos segundos. Essa geleificação precoce pode ter ocorrido devido à alteração de pH resultante da interação do CaCl₂ com a solução de consistência mais viscosa da suspensão de alginato 5% (p/v), que dificulta a homogeneização das soluções.

Para que o material na forma de gel pudesse ser agitado por 1 hora, foi adicionado 10% em volume de H₂O à solução. Com isso a solução tornou-se fluida novamente, possibilitando a agitação.

Após a homogeneização, foi adicionado ácido fluorídrico para catalisar a geleificação da solução, porém a mesma não foi observada para o tempo estudado. Possivelmente, a solução tenha passado a ter concentração baixa de silícios não ligados e a agitação apenas criou re-suspensão da mistura de alginato com vidro bioativo e água.

Após ser mantida em repouso por 3 dias, a solução adquiriu consistência de gel, com diferença de cor entre a região superior, que estava incolor, e a região inferior, que adquiriu coloração amarelada. Essa diferença na coloração pode indicar que a água adicionada durante a agitação segregou da solução, mantendo-se na parte superior da amostra. Outra hipótese seria que houve segregação do vidro bioativo puro e do vidro bioativo com alginato em sua estrutura, resultando na separação das fases. Caso a primeira hipótese seja verdadeira, o excesso de líquido estará separado da estrutura do vidro, e por isso a adição de água não terá aumentado o volume de líquido a ser removido da amostra durante a secagem, favorecendo a redução da tensão por contração durante a secagem, como desejado.

Após a secagem, a amostra, que pode ser vista na figura 27, não se fragmentou, como ocorrido com as outras sínteses, indicando melhora nas propriedades mecânicas. Outra observação importante foi a homogeneidade da coloração da amostra, sustentando a hipótese de que a parte incolor era referente à água adicionada durante a agitação, pois indica que essa fase composta pelo excesso de líquido, e foi removida durante a secagem.

Figura 27 – Amostra preparada pela rota R3, após o processo de secagem.

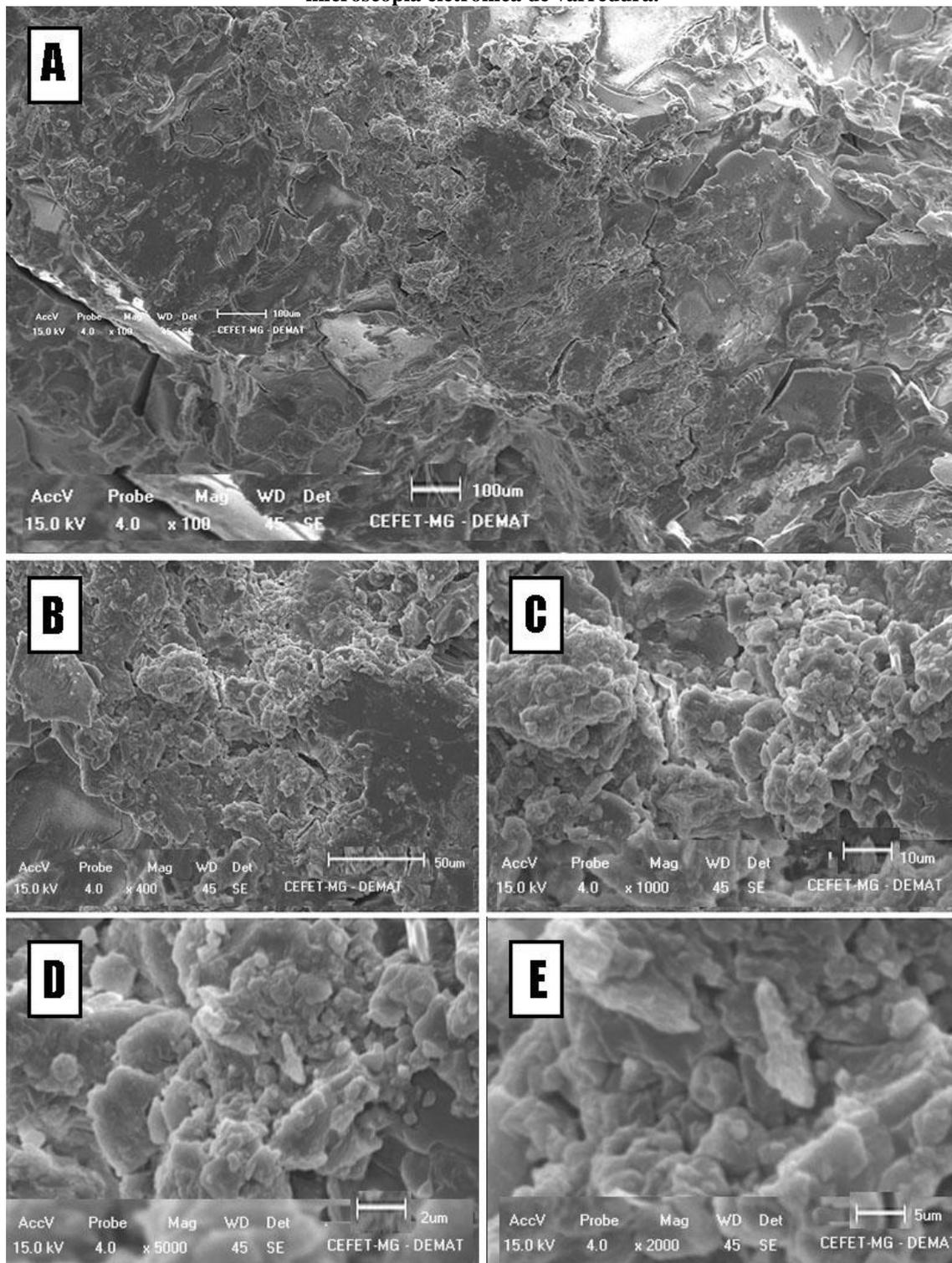


Fonte: O autor.

5.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A amostra produzida pela rota R3 apresentou estrutura morfológica diferente das observadas nas demais amostras, como pode ser observado na figura 28. As imagens de MEV para aumentos de 100x apresentados na figura 28A permitiu a observação de estrutura com maior homogeneidade, diferente das demais amostras. As imagens das figuras 28B, 28C, 28D e 28E são de uma mesma região, com aumento, respectivamente, de 400x 1.000x, 2.000x e 5.000x. As imagens mostraram a presença de aglomerados interligados entre si que apresentaram estrutura com presença de poros na ordem de alguns micrometros, compatíveis com o processo de geleificação da estrutura do vidro bioativo em matriz polimérica, que, após a secagem, resistiu ao processo de secagem, mantendo as ligações da fase inorgânica.

Figura 28 – Imagens de híbridos à base de alginato de sódio e vidro bioativo, obtidas por microscopia eletrônica de varredura.



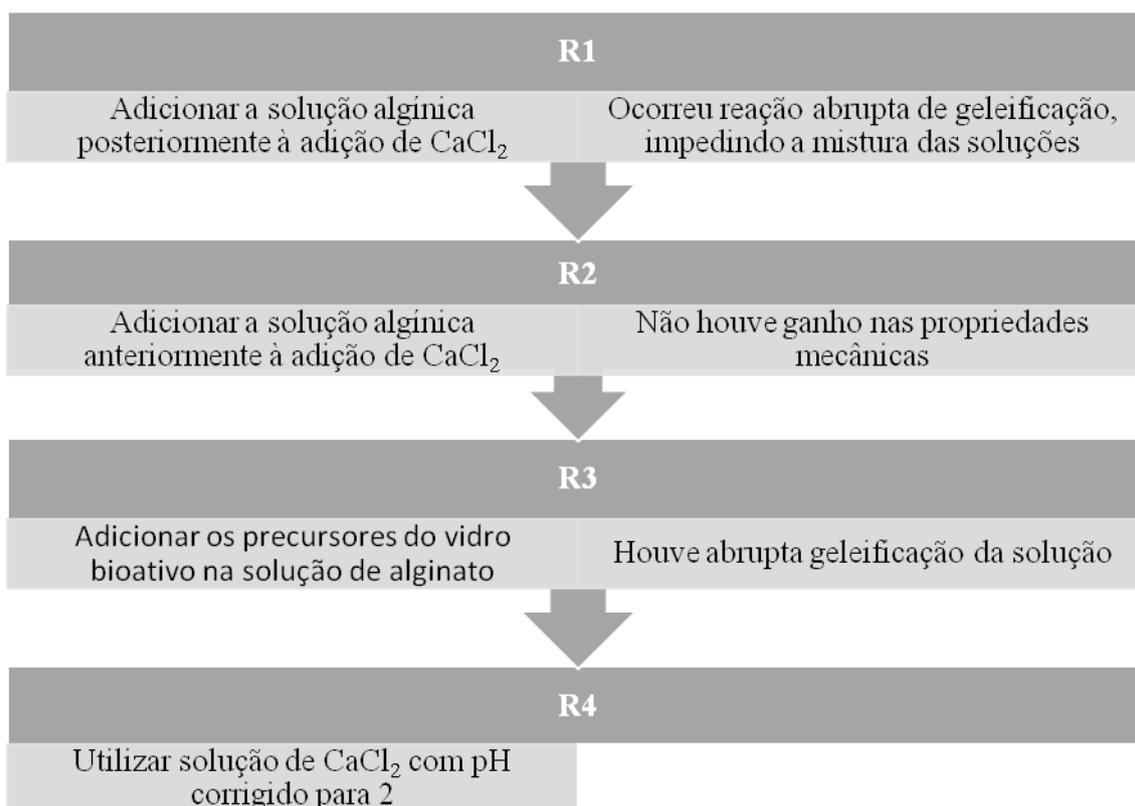
Em (A) é mostrada região homogênea e porosa da amostra em aumento de 100x; (B), (C), (D) e (E) apresentam ampliações da região “A”, sob aumento de, respectivamente, 400x, 1.000x, 2.000x e 5.000x.

Fonte: O autor.

5.4 RESUMO DE PARÂMETROS AVALIADOS PARA PREPARO DE COMPOSTOS DE ALGINATO VIDRO BIOATIVO

Devido à geleificação precoce ocorrida na rota R3, ao adicionar-se o cálcio, recomenda-se que sejam realizadas modificações na rota. É possível que a geleificação tenha ocorrido devido à alteração de pH, ocasionado pela adição de CaCl_2 na forma de pó monohidratado à solução, uma vez que o alginato se geleifica sob a redução do pH. Assim, indica-se que seja preparada solução de cloreto de cálcio e, em seguida, a correção do pH para uma faixa que evite a complexação do alginato. Para tanto, é necessário observar se o acréscimo no volume de água da solução acarretará aumento na tensão estrutural durante o processo de secagem, o que pode causar fragilização da amostra. A figura 29 ilustra o processo de definição das rotas, bem como a próxima etapa, identificada pela rota R4.

Figura 29 – Representação das rotas.



A coluna da esquerda se refere às alterações realizadas e a coluna da direita às inconformidades geradas.

Fonte: O autor.

Dessa forma podemos perceber que deve haver rigoroso controle do pH para evitar a geleificação precoce das misturas.

Com relação às soluções de alginato, foi observado que a adição de cálcio associada à concentração de polímero adicionado interfere na homogeneização, dado que o aumento na viscosidade define regiões preferenciais de reação do cálcio com o polímero, dificultando assim a estrutura mais homogênea.

Outra condição que deve ser considerada é a razão entre o alginato e o vidro bioativo. As concentrações das misturas devem apresentar razão que permita a formação de géis em tempos compatíveis com as reações de formação de vidro, bem como a geleificação com o polímero. Dessa forma poderão ser favorecidas estruturas mais homogêneas e resistentes à contração durante a secagem.

6 CONCLUSÕES

Foram realizadas sínteses de materiais à base de alginato e vidro bioativo, por três rotas distintas de processamento. Variou-se a concentração de alginato e a sequência de adição da solução algínica. Apenas as amostras produzidas com adição dos precursores do vidro bioativo (TEOS e TEP) na solução de alginato, com o devido controle do pH na faixa metaestável do sol, apresentaram condição de miscibilidade do polímero com o vidro, resultando em melhora nas propriedades mecânicas.

Os resultados indicaram as amostras preparadas pela rota R1 como inviáveis. As análises morfológicas e químicas indicaram a estrutura das amostras produzidas pela rota R2 como heterogêneas, sugerindo que as cadeias algínicas possam ter-se ligado ao cálcio da estrutura do vidro bioativo, o que impediu solubilização do cálcio de maneira homogênea, levando à fragilização das amostras.

Para amostras da rota R3, a adição de CaCl_2 em solução foi indispensável para promover homogeneização do cálcio na mistura, sem reação de complexação abrupta. Dessa forma essas amostras apresentaram estrutura homogênea e porosa, importante para aplicação desses materiais em biomateriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLEY RUBIRA, E. M. M. G. Morfologia de Hidrogéis-IPN Termo-sensíveis e pH-Responsivos para Aplicação como Biomaterial na Cultura de Células. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, p. 105-110, 2009.
- ARNE HAUG, B. L. **The Solubility of Alginate at Low pH**. Norwegian Institute of Seaweed Research. Trodheim. 1963.
- BAHJAT NASSER NETO, T. M. D. C. L. M. S. O Uso do Vidro Bioativo na Terapia Regenerativa Periodontal. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, Curitiba, PR, 2007.
- CERRUTI, M. G. **Characterization of Bioactive Glasses. Effect of the Immersion in Solutions that Simulate Body Fluids**. University of Turin. Turin, p. 228. 2004.
- DAGUANO, J. K. M. D. F. **Biovidros e Vitrocerâmicos Bioativos do Sistema $3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ para Aplicações Biomédicas: Processamento e Caracterizações Estruturais, Mecânicas e Biológicas**. Escola de Engenharia de Lorena – EEL, Universidade de São Paulo – USP. São Paulo. 2010.
- DRAGET, D. K. I.; SMIDSRØD, P. D. O.; SKJAK-BRAEK, P. D. G. Alginates from Algae. In: _____ **Biopolymers Online**. [S.l.]: [s.n.], 2005.
- DRAGET, K. I. Food Polysaccharides and Their Applications. 2ª. ed. [S.l.]: CRC Press, 2006. Cap. 22, p. 752.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL. Os Alginatos e Suas Múltiplas Aplicações, v. 26, p. 5, 2013.
- GREENSPAN, D. C. Bioactive Glass: Mechanisms of Bone Bonding. **Vetenskap**, 1999.
- HAY, I. D.; REHMAN, Z. U.; MORADALI, M.. F. Microbial Alginate Production, Modification and Its Applications. **Microbial Biotechnolog**, Christchurch, 6 jul. 2013. 14.

HENCH, L. L. **Bioceramics: From Concept to Clinic**. University of Florida. Gainesville, p. 24. 1991.

HENCH, L. L. The story of Bioglass®. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine** , v. 17, n. 11, p. 967-978 , 2006.

HENCH, L. L.; WILSON, J. In: _____ **An Introduction to Bioceramics**. 2ª. ed. [S.l.]: Imperial College Press, 2013. Cap. 1, p. 620.

HEPP, A. **The Effect of Bioactive Glass Particle Size on Sintering**. The Faculty of Alfred University. [S.l.], p. 33. 2013.

JINCHEN SUN, H. T. **Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications**. School of Materials Science and Engineering, Nanjing University of Science and Technology. Nanjing. 2012.

MÜLLER, JOSÉ MIGUEL, R. L. D. S. R. V. B. **Produção de Alginato por Microrganismos**. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC. [S.l.]. 2011.

KERÄNEN, P. **Use of Bioactive Glasses as Porous Implant Surface Inlays, a Laser-Deposited Coating and Peri-Implant Bone Graft Extender**. University of Helsinki. Helsinki, p. 92. 2012.

LEROUX, M. A.; GUILAK, F.; SETTON, L. A. **Compressive and Shear Properties of Alginate Gel**. Duke University. Durham, Carolina do Norte, p. 8. 1999.

MÁRCIA R. DE MOURA, A. F. R. E. C. M. Hidrogéis Semi-IPN Baseados em Rede de Alginato-Ca²⁺ com PNIPAAm Entrelaçado: Propriedades Hidrofílicas, Morfológicas e Mecânicas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, p. 132-137, 2008.

MØRCH, Ý. A. **Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy**. Norwegian University of Science and Technology. Trondheim, p. 85. 2008.

MULDER, L. **Cell Adhesion on Alginate Scaffolds for the Tissue Engineering of an Aortic Valve – A Review**. Eindhoven University of Technology. [S.l.]. 2002.

MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L. D.; BRIGIDO, R. V. **Produção de Alginato por Microrganismos**. Universidade Federal de Santa Catarina. [S.l.]. 2011.

PODBIELSKA, H.; ULATOWSKA-JARZ' A, A. **Sol-gel Technology for Biomedical Engineering**. Wrocław University of Technology. Breslávia, p. 11. 2005.

POLAK, J. M.; , L. L. H.; KEMP, P. Future Strategies for Tissue and Organ Replacement. 1ª. ed. [S.l.]: World Scientific Publishing, 2002. Cap. 1: Bioactive Materials for Tissue Engineering Scaffolds, p. 448.

SEGATO, M. P. **Estudos Termoanalíticos Do Ácido Algínico E Dos Alginatos De Metais Alcalinos, Alcalino-Terrosos, Amônio, Mono-, di- e Trietanolamônio**. Universidade de São Paulo. São Carlos, p. 112. 2007.