

ANA CRISTINA BORGES FARIAS

**SÍNTESE SOL-GEL DE BIOMATERIAIS À BASE
DE ÁGUA DE FONTES HIDROTERMAIS PARA
OTIMIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO
CELULAR E REGENERAÇÃO DOS TECIDOS
ÓSSEOS**



Universidade dos Açores

Departamento de Biologia

Ponta Delgada

2015

ANA CRISTINA BORGES FARIAS

**SÍNTESE SOL-GEL DE BIOMATERIAIS À BASE
DE ÁGUA DE FONTES HIDROTERMAIS PARA
OTIMIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO
CELULAR E REGENERAÇÃO DOS TECIDOS
ÓSSEOS**

Dissertação de Mestrado em Ciências
Biomédicas, apresentada à Universidade
dos Açores

Orientador: Professora Doutora Helena Cristina Menezes Vasconcelos



Universidade dos Açores
Departamento de Biologia

Ponta Delgada
Outubro de 2015

AGRADECIMENTOS

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas e instituições, às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento.

Em primeiro lugar, gostaria de expressar a minha sincera gratidão à minha orientadora Professora Doutora Helena Cristina Menezes Vasconcelos, pela disponibilidade manifestada e pelo apoio contínuo para orientar este trabalho, pela sua paciência e tempo gasto comigo, pela partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho, pela revisão crítica do texto, pelos profícuos comentários, esclarecimentos, opiniões e sugestões, pela acessibilidade e simpatia demonstradas, pela confiança que sempre me concedeu e pelo permanente incentivo que tornaram decisivos em determinados momentos da elaboração desta tese.

Gostaria de agradecer ao Instituto superior técnico de Lisboa por me receber e permitir que grande parte experimental deste trabalho fosse realizada nos seus laboratórios, o qual sem esse contributo esta investigação não teria sido possível. O meu muito obrigado ao Tiago pela sua disponibilidade e pela ajuda técnica nas inúmeras análises realizadas, e especialmente à Joana Matos que prescindiu de algum do seu tempo precioso comigo. Obrigado pela sua extraordinária gentileza, pela amizade, pela sua paciência e pelo esclarecimento de dúvidas que surgiram durante os ensaios.

Quero agradecer também à D. Helena do Departamento de Ciências Tecnológicas, pela sua generosidade no apoio da preparação de soluções e pela aquisição de todos os materiais necessários à realização deste trabalho.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de mestrado, em especial à Ana Rosa, por todo o apoio extra que contribuiu para a elaboração desta tese.

Por último, mas não menos importante, aos meus familiares, especialmente à minha mãe, pelo apoio e compreensão inestimáveis, pelos diversos sacrifícios suportados e pelo constante encorajamento a fim de prosseguir a elaboração deste trabalho.

A todos, o meu apreço e a minha eterna gratidão.

Índice

Resumo	viii
Abstract.....	ix
Introdução Geral	1
Capítulo I - Noções básicas sobre biomateriais	3
1 - Necessidade de biomateriais ao longo da história	3
2 - Definição de Biomaterial	5
3 - Tipos e propriedades dos Biomateriais	6
4 - Biomateriais como substitutos ósseos.....	9
4.1 - Conceitos e propriedades do tecido ósseo	11
4.2 - Células ósseas	14
4.3 - Hidroxiapatite - o constituinte mineral do osso.....	15
Capítulo II - Os Vidros como biomateriais.....	16
1 - O que é o vidro. Origem e principais aplicações atuais.....	16
1.1 - Constituintes do vidro	18
1.2 - Vidros silicatos	19
2 - Vidros bioativos.....	22
2.1 - História do biovidro 45S5 (Bioglass®)	23
2.2 - Outras composições bioativas e o índice de bioatividade (Ib).....	25
3 - Mecanismo da bioatividade: fatores que afetam a bioatividade e a nucleação da HCA	29
4 - Mecanismos de reação bioativos: Controlo genético do ciclo celular de osteoblastos	33
5 - A composição e a função dos vários componentes óxidos do biovidro	36
5.1 - A SiO ₂	37
5.2 - O P ₂ O ₅	38
6 - Teste de bioatividade <i>in vitro</i> - Simulated body fluid (SBF).....	38
Capítulo III – Obtenção de vidros pelo processo sol-gel.....	41

1 - Introdução	41
2 - Etapas do processo químico.....	44
3 - Gelificação	46
4 - Secagem	47
5 - Influência de alguns parâmetros químicos na cinética das reações	48
6 - Propriedades físicas	49
Capítulo IV - Materiais e Métodos	51
1 - Preparação dos biovidros do sistema ternário $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ e quaternário $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$	51
2 - Processo Sol-gel (síntese com água destilada e desionizada).....	53
2.1 - Sistema quaternário $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$	53
2.2 - Sistema ternário	53
3- Processo Sol-gel (síntese com águas altamente ionizadas - águas hidrotermais)	54
4- Tratamento térmico	57
5 - Teste da bioatividade <i>in vitro</i>	58
6 - Caracterização física e morfológica dos biovidros	61
6.1 - Difração de Raio-X (XRD).....	62
6.2 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	64
6.3 - Microscopia eletrônica de varrimento e microanálise (SEM/EDS).....	65
Capítulo V - Resultados e Discussão	67
1 - Processo Sol-gel.....	67
2 - Tratamento térmico	69
3 - Bioatividade	70
3.1 - Variação do pH da solução ao longo do tempo	70
4 - Resultados <i>in vitro</i> - Difração raio-X	70
4.1 - Azeda45S5	71
4.2 - A.Rebentão45S5	74

4.3 - Azeda58S	76
4.4 - A.Rebentão58S	79
4.5 - Azeda77S	81
5 - Resultados <i>in vitro</i> - FTIR	84
5.1 - Sistema quaternário 45S5	85
5.2 - Sistema ternário 58S	90
5.3 - Sistema ternário 77S	94
6 - Resultados <i>in vitro</i> - SEM-EDS	97
6.1 - Azeda45S5	97
6.2 - H2O.45S5	100
6.3 - A.Rebentão45S5	104
6.4 - Azeda58S	106
6.5 - H2O.58S	108
6.6 - A.Rebentão58S	111
6.7 - Azeda77S	113
6.8 - H2O.77S	117
Capítulo VI - Conclusões	119
Capítulo VII - Perspetivas futuras	121
Referências Bibliográficas	123

Resumo

Uma das principais classes de biomateriais que tem vindo a ser estudada ao longo do tempo, com promissoras capacidades bioativas e biodegradáveis, é a dos biovidros. Estes materiais possuem a capacidade de promover a osteocondução, auxiliando assim o processo de regeneração óssea. Essa regeneração é mediada pela libertação de iões de cálcio e fósforo presentes na composição dos biovidros e pela formação de uma camada de hidroxiapatite carbonatada (HCA) que promove a formação de um forte vínculo ao tecido ósseo, auxiliando o metabolismo celular.

O processo sol-gel, pela sua versatilidade e uso de baixas temperaturas, é uma das abordagens mais promissoras na obtenção de biovidros. Em particular, as composições 58S, 77S e 45S5 exibiram taxas de degradação significativas, com uma correspondente libertação de sílica solúvel e de outros produtos de dissolução iónica, capazes de induzir a proliferação de osteoblastos.

As espécies químicas presentes nas águas minerais da Furnas (S. Miguel) conferem-lhes determinadas especificidades adequadas a aplicações na área da saúde. O presente estudo foi motivado pelas características peculiares dessas águas, tendo como objetivo a obtenção de biovidros por sol-gel, mas em cuja síntese, nomeadamente na etapa de hidrólise dos precursores alcóxidos, se substituiu a tradicional água destilada e desionizada, por águas de fontes hidrotermais vulcânicas, nomeadamente a “água azeda” e a água azeda do rebentão”, respetivamente com pH de 5.09 e 4.95, ambas oriundas do vale das Furnas.

No presente trabalho foram desenvolvidos biovidros, baseados nos sistemas ternários 58S (58% SiO₂, 33%CaO, 9%P₂O₅) e 77S (77% SiO₂, 14%CaO, 9%P₂O₅) e quaternário 45S5 (46.1% SiO₂, 26.9%CaO, 24.4% Na₂O, 2.6%P₂O₅), preparadas e otimizadas pelo método sol-gel. A análise comparativa dos biovidros, quanto à sua estrutura, morfologia, porosidade, presença de fases cristalinas, assim como o seu caráter bioativo, foi estudado usando as técnicas de FTIR, XRD e SEM-EDS. A bioatividade foi avaliada *in vitro* através da capacidade de formação de hidroxiapatite à superfície, após a imersão dos biovidros em SBF. As amostras obtidas apresentam um elevado potencial do ponto de vista das propriedades e aplicações propostas, demonstrando-se o seu elevado grau de bioatividade após imersos em solução biológica simulada.

Abstract

One of the major classes of biomaterials that have been studied over time, with promising biodegradable and bioactive capacity, is the bioactive glasses. These materials have the ability to promote osteoconduction, thus helping the bone regeneration process. This regeneration is mediated by the release of calcium and phosphorus ions present in the composition of the bioactive glasses and the formation of a layer of carbonated hydroxyapatite (HCA), which promotes the formation of a strong bond to bone tissue, assisting cellular metabolism.

The sol-gel process, by its versatility and use of low temperatures, is one of the most promising approaches in obtaining bioactive glasses. In particular, the compositions 58S, 77S and 45S5 exhibited significant degradation rates with a corresponding release of soluble silica and other ionic dissolution products capable of inducing the proliferation of osteoblasts.

The chemical species present in the mineral waters of the Furnas (São Miguel) gives them certain specificities suitable for applications in health care. This study was motivated by the peculiar characteristics of such water, with the objective of obtaining bioactive glasses by sol-gel, but whose synthesis, particularly in the hydrolysis step of the alkoxide precursor, substituting the traditional distilled and deionised water, by waters of volcanic hot springs, namely "água azeda" and "água azeda do rebentão", with pH respectively at 5.09 and 4.95, both coming from the Furnas valley.

In the present work, bioglasses were developed based on ternary 58S systems (58% SiO₂, 33% CaO, 9% P₂O₅) and 77S (77% SiO₂, 14% CaO, 9% P₂O₅) and quaternary 45S5 (46.1% SiO₂, 26.9% CaO, 24.4% Na₂O, 2.6% P₂O₅), and optimized prepared by sol-gel method. The comparative analysis of bioactive glasses, as their structure, morphology, porosity, presence of crystalline phases, as well as its bioactive character, was studied using FTIR, XRD and SEM-EDS techniques. Bioactivity was assessed by *in vitro* formation of hydroxyapatite capacity to the surface of bioactive glasses after immersion in SBF. The samples have a high potential from the viewpoint of the properties and applications proposed, showing up its high degree of bioactivity after immersed in simulated biological solution.

Introdução Geral

Os seres vivos podem vir a apresentar falhas e defeitos ósseos, com origem em fraturas ou diversas patologias, sendo necessária a estabilização dos fragmentos ósseos e/ou o reestabelecimento dos ossos danificados para a recuperação da forma e da função do tecido lesionado (Carvalho *et al.*, 2010). Nos últimos anos, a ciência de materiais, combinada com as ciências biomédicas (medicina e biologia) contribuiu muito para o desenvolvimento de técnicas de reconstrução e/ou substituição de tecidos danificados, destacando-se, por exemplo a utilização de biovidros como implantes ósseos.

O grupo dos vidros bioativos e biodegradáveis tem sido intensamente estudado devido à suas propriedades de osteocondução, as quais auxiliam na regeneração dos ossos, através de um processo que permuta iões presentes na composição dos biovidros com o meio biológico envolvente. Os iões envolvidos nessa troca participam no metabolismo ósseo, desempenhando papéis fundamentais nas etapas de regeneração óssea, desde a angiogénese ao crescimento e mineralização dos tecidos (Hench *et al.*, 2004; Hench 2006; Hench *et al.*, 2010; Hope *et al.*, 2011).

Os biovidros com propriedades osteocondutivas e osteoindutivas, promovem uma rápida e durável ligação química, através da formação de uma interface apatítica (Jones 2013) que fixa o implante ao tecido ósseo por ser química e estruturalmente semelhante ao constituinte mineral do osso humano, o fosfato de cálcio hidratado denominado de hidroxiapatite (Vasconcelos 2012). Esta capacidade para estimular a regeneração e de “enganar” o tecido biológico de modo a que este responda como se estivesse na presença de um tecido natural, continua a impulsionar o desenvolvimento de novas gerações de biovidros, com características físico-químicas de superfície capazes, não apenas de fixar o implante ao osso, mas também de recrutar células que controlem a dissolução do biovidro mediante as necessidades (Tilloca & Cormack 2011). Aliás, é a capacidade de dissolução de um vidro que determina a sua bioatividade (Hench 1991).

A técnica de fabricação destes biovidros deve permitir a produção de estruturas tridimensionais e porosas para que haja possibilidade de transporte das células no seu interior e posterior adesão das mesmas, permitindo a formação do novo tecido. A técnica sol-gel é uma das abordagens mais promissoras na obtenção

de biovidros, devido à sua versatilidade, o uso de baixas temperaturas e a possibilidade de incorporação de diferentes iões com grande facilidade (Brinker & Scherer 1990).

Os diferentes iões presentes em águas de fontes hidrotermais do vale das Furnas, S. Miguel - Açores, e.g. bicarbonatos (de Ca, Mg, Na ou de K), carbonatos, hidróxidos, etc, (Cruz *et al.*, 2010) conferem a estas águas determinadas especificidades para aplicações de sucesso na área da saúde e bem-estar, e na cosmética farmacêutica (Ghersetich & Lotti 1996; Gomes & Silva 2007), pelo que biovidros produzidos com estas águas poderão apresentar um potencial elevado em aplicações biomédicas.

No presente caso foi estudado o processamento de biovidros por sol-gel, utilizando na etapa de hidrólise, águas de diferentes fontes hidrotermais do vale das Furnas, S. Miguel - Açores, com o intuito de melhorar o potencial bioativo de vidros 45S5, 58S e 77S.

Capítulo I - Noções básicas sobre biomateriais

1 - Necessidade de biomateriais ao longo da história

A procura constante do Homem pela melhoria dos padrões de vida e da longevidade nas últimas décadas, originou um grande desenvolvimento de áreas relacionadas com a biomedicina. Com o aumento da esperança de vida da população ocidentalizada, o apelo constante para o desenvolvimento de materiais a serem utilizados clinicamente na substituição e regeneração de tecidos ou órgãos danificados tem permitido também o crescimento da área multidisciplinar dos Biomateriais, a qual sendo multidisciplinar se baseia na combinação das ciências exatas e da engenharia com a biologia e a medicina. O enorme desafio em biomateriais é a duplicação de estruturas, propriedades e funcionalidades de tecidos ou órgãos do corpo humano que resultaram de milhares de anos de evolução natural.

A utilização de certos materiais como implantes não é um conceito novo. A ideia de se aproveitar materiais para substituir partes do corpo humano, atualmente designados por biomateriais, já é muito antiga. Com efeito, a utilização de olhos de vidro e pernas de pau remonta às antigas civilizações, havendo registos da sua utilização pelos, e.g. Egípcios, Astecas e Romanos (Crubzy *et al.*, 1998; Lyons 1987).

Antes da realização das primeiras cirurgias assépticas, desenvolvidas apenas no século XIX (Petrucci 1987), a utilização de biomateriais era baseada em ensaios de tentativa e erro, levando à morte de muitos pacientes. Após a 2ª Grande Guerra, programas experimentais mais ou menos extensivos de ensaios laboratoriais permitiram que determinados materiais, inicialmente desenvolvidos para aplicações bélicas (aços, polímeros, etc.), chegassem às aplicações clínicas, os quais ficaram conhecidos como os biomateriais da 1ª geração (Ratner *et al.*, 2004).

Durante esses eventos, na tentativa de evitar a amputação de membros que tinham perdido as suas funções, investigavam-se materiais que não fossem nocivos e não sofressem rejeição pelo organismo. Devido aos resultados inicialmente desastrosos, estabeleceu-se na época como objetivo a identificação de materiais que, além das propriedades estruturais e de não provocarem sérios danos à saúde do paciente, fossem aceites biologicamente pelo organismo. Assim, em 1947, o Comité Americano para o Tratamento de Fraturas do Colégio Americano de Cirurgiões recomendou o uso de aços inoxidáveis no fabrico de próteses. Desde então, um

considerável número de outros materiais sintéticos foi desenvolvido, testado e considerado adequado para a utilização em implantes com as mais variadas funções (Ratner *et al.*, 2004).

Em 1980 Hench dizia que quando os materiais sintéticos foram utilizados pela primeira vez em aplicações biomédicas, o único requisito era conseguirem "alcançar uma combinação adequada de propriedades físicas para coincidir com as do tecido substituído, com uma resposta tóxica mínima do hospedeiro". Ou seja, os biomateriais da primeira geração eram inertes, de modo a reduzir a resposta imunitária diminuindo a reação de corpo estranho.

A segunda geração de biomateriais surgiu a partir de 1980 e manteve-se assim designada até ao ano 2000, ficando caracterizada pelo desenvolvimento de materiais biocompatíveis com habilidade para interagir com o ambiente biológico por forma a aumentar a resposta biológica e promover a ligação de tecido / superfície, e ao mesmo tempo, sendo bioabsorvíveis sofrerem uma degradação progressiva em meio biológico, promovendo a regeneração do novo tecido e, finalmente, a cura do paciente. Esta mudança de paradigma nas funções do implante, passando da "substituição de" à "regeneração de" esteve na base do conceito de bioatividade (Hench & Polak 2002).

A bioatividade é uma característica de alguns materiais que se refere à capacidade de executarem uma espécie de "diálogo" com as células, com o objetivo de estimular a regeneração celular. A mineralização e a ligação entre o tecido ósseo e o implante é um dos processos mais correntemente conhecidos para aumentar a bioatividade em aplicações de reparação e fixação do osso. Biomateriais bioativos concebidos para fixação, reparação e regeneração do osso levaram à deposição *in vivo* de uma camada de hidroxapatite carbonatada na superfície do material. Em meados da década de 1980, estes materiais bioativos alcançaram o uso clínico numa variedade de aplicações ortopédicas e dentárias, incluindo vários vidros bioativos, cerâmicas, vitrocerâmicas e compósitos (Navarro *et al.*, 2008).

A terceira geração, considerada atualmente, caracteriza-se pelo aperfeiçoamento dos biomateriais com vista ao desenvolvimento de sistemas adaptáveis e inteligentes, não apenas biocompatíveis e bioativos, mas também biofuncionáveis, abrangendo os materiais capazes de estimular respostas celulares específicas a nível molecular. Nesta geração surgiram novas áreas de investigação como a Biomimética e a Engenharia de Tecidos. Neste âmbito, estão a ser desenvolvidas estruturas

porosas tridimensionais temporárias (scaffolds) que estimulam a invasão das células, adesão e proliferação, bem como superfícies funcionalizadas com sequências de péptidos que mimetizam os componentes da matriz extracelular, de forma a desencadear respostas de células específicas (Hench 2013; Navarro *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, com o aumento da longevidade da população, tem sido testemunhado uma crescente preocupação com a melhoria da qualidade de vida e a necessidade de intervenções clínicas cada vez mais frequentes para muitas doenças crônicas que levam à perda óssea, através de cirurgias de substituição, reparação e também, de regeneração, as quais têm contribuído decisivamente para o avanço da investigação no campo dos biomateriais e para o desenvolvimento e melhoria dos materiais utilizados como implantes, com o intuito de promover mais eficazmente a recuperação dos tecidos afetados (Carvalho *et al.*, 2010).

O aperfeiçoamento técnico-científico na área médica conquista-se dia a dia, impulsionado pela procura incansável do ser humano pela longevidade e por padrões de vida superiores, o que gera a necessidade de alternativas biomédicas para a recuperação e a substituição de tecidos vivos vitimados por traumas, patologias ou fraturas. Embora existam vantagens que estimulem o uso de enxertos autógenos (o doador é o próprio recetor) e alógenos (doador da mesma espécie), tais como a biocompatibilidade e o grande potencial osteogénico das células transplantadas, as desvantagens relacionadas com a disponibilidade limitada, dificuldade de armazenamento e de tempos de cirurgia mais longos, levam os cientistas a investigar cada vez mais materiais sintéticos que facilitem a reparação óssea visando o restabelecimento rápido das funções fisiológicas (Maia *et al.*, 2010).

2 - Definição de Biomaterial

Atualmente, a definição mais aceite de biomateriais é a utilizada pelo Instituto Nacional de Saúde norte-americano que descreve um biomaterial como "qualquer substância ou combinação de substâncias sintéticas ou de origem natural, que não sejam drogas, que podem ser usadas por qualquer período de tempo, que recupere, substitua parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo" (Williams 1999).

3 - Tipos e propriedades dos Biomateriais

Quando um biomaterial é implantado, para além de um desempenho adequado no que diz respeito às propriedades mecânicas e respetiva funcionalidade, outros aspetos têm inevitavelmente de ser considerados já que estes irão ditar o tipo de resposta induzida nos tecidos e células. Assim, um biomaterial deve apresentar propriedades físicas, químicas e biológicas compatíveis com os tecidos. As características físico-químicas à superfície do biomaterial irão promover a ocorrência de uma série de reações biológicas diversas e complexas com o tecido biológico ao nível da interface mas que no seu todo fazem parte do processo de reparação do componente biológico danificado (Mirtchi *et al.*, 1989).

Atualmente, impõe-se que os biomateriais não se limitem apenas a substituir tecidos ou órgãos, mas que sejam também capazes de estabelecer com o organismo um diálogo constante, reagindo, em tempo real, aos eventos biológicos que se vão desenrolando nos tecidos. Por outro lado, o processo de implantação cirúrgica de um biomaterial pressupõe uma agressão ao tecido biológico que é, por si só, suficiente para originar um processo inflamatório (Hench 1980; Morais *et al.*, 2010). Quando o organismo reconhece no implante um corpo estranho irá formar-se um tecido granular (composto essencialmente por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados) e células gigantes do tipo corpo estranho. Por outro lado, se o material for pouco reativo e interagir adequadamente com os tecidos conjuntivos na interface a resposta inflamatória poderá ser mínima, dando origem a uma cápsula de tecido fibroso de espessura variável. O processo inflamatório decorrente da implantação do biomaterial vai dar origem a uma diminuição do pH do meio fisiológico na zona da interface, o que irá constituir também uma agressão para o próprio material. Portanto, a ideia da inexistência de um biomaterial totalmente inerte e de que a resposta biológica produzida deverá ser benéfica como forma de promover uma integração tecido-material adequada, serve de base ao principal critério que está subjacente à condição de biomaterial, ou seja, este deve ser isento de produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistémica. Assim, os biomateriais não podem ser tóxicos, carcinogénicos e mutagénicos (Hench 1980; Morais *et al.*, 2007). Em aplicações sanguíneas, não devem ser trombogénicos. As complicações oriundas dos dispositivos implantados irão variar de acordo com a sua aplicação. Por exemplo, poderão ocorrer infeções resultantes da libertação de diversos iões (biodegradação) que afetem o organismo como um todo, especialmente em dispositivos que têm

aplicações de longa duração como próteses permanentes e válvulas cardíacas (Lam & Wu 2012).

Como característica imprescindível, estes materiais devem ser biocompatíveis, ou seja, devem atender ao requisito de funcionalidade, para o qual foram projetados, não estimulando ou provocando reações alérgicas ou inflamatórias (Ratner *et al.*, 2004). Assim, a biocompatibilidade significa que o material e os seus possíveis produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar prejuízos ao organismo a curto e a longo prazo (Ravaglioli & Krajewski 1992).

Paralelamente à biocompatibilidade, é importante que o implante permita o desempenho imediato e com êxito da função específica (estática e dinâmica) da parte do corpo que está sendo substituída. Esta habilidade está inserida no conceito de biofuncionalidade. Neste conceito estão incorporados também, os problemas associados à degradação química dos materiais, visto que o meio fisiológico pode ser bastante agressivo, mesmo aos materiais considerados inertes quimicamente, levando à redução da eficiência do implante (Hench 1991). É desejável que apresentem soluções clínicas altamente satisfatórias, com elevado índice de sucesso e mínimo desconforto para o paciente, sendo capazes de regenerar o tecido perdido e, assim, devolver forma e função adequadas (Pinto *et al.*, 2007).

Em geral, biomateriais utilizados na reposição dos chamados tecidos moles são muito diferentes daqueles usados na substituição de tecidos duros (ossos e dentes). Para os tecidos duros, dependendo do esforço mecânico a que são submetidos, alguns materiais podem ser mais apropriados que outros, devido à sua maior resistência.

Duma maneira geral, os diversos materiais podem ser classificados quanto à sua natureza em metais, polímeros, cerâmicos e vidros. Entre os materiais mais usados na produção de implantes destacam-se os materiais metálicos, especialmente utilizados devido à sua boa resistência mecânica e elevada tenacidade, facilidade de conformação e baixo custo. A maioria dos elementos metálicos usados como o Fe, Cr, Co, Ni, Ti, Mo, pode ser tolerada pelo organismo em quantidades limitadas, sendo até alguns, elementos fundamentais para determinadas funções celulares e metabólicas. Contudo, dada a agressividade do meio fisiológico a possibilidade de corrosão constitui um fator de risco que poderá comprometer o seu desempenho e a própria saúde do paciente (Manivasagam *et al.*, 2010).

Os materiais cerâmicos constituem uma extensa classe de materiais, incluindo também os vidros. São compostos inorgânicos, não-metálicos, com elevada dureza e fragilidade. Têm elevadas temperaturas de fusão e baixa condutividade térmica e elétrica. Em biomedicina o uso de materiais cerâmicos é abrangente, sendo largamente utilizados como material de implante em aplicações ósseas e mais recentemente como material de suporte para a engenharia de tecidos.

Os polímeros são macromoléculas formadas pela sequência de unidades básicas “monómeros” dando origem à formação de cadeias mais ou menos longas. O peso molecular destas cadeias é uma característica essencial do material. Os materiais poliméricos são materiais de excelência para aplicações biomédicas dada a diversidade de propriedades que apresentam e versatilidade de processamento, podendo apresentarem-se sob a forma de polímeros termoplásticos sintéticos (biodegradáveis e não-degradáveis), termoendurecíveis, hidrogéis, polímeros de origem natural e biopolímeros. Porém, apresentam a enorme desvantagem de se degradarem facilmente em ambiente fisiológico, libertando iões considerados tóxicos para o organismo (Shtilman 2003)

Na natureza a combinação de diversos materiais é uma constante pesquisa pela otimização de propriedades e funções. Ao examinar os diferentes tecidos e órgãos que constituem o corpo humano é possível verificar que os mesmos resultam particularmente da combinação de diferentes tipos de materiais biológicos, sendo o osso um exemplo típico. No desenvolvimento de biomateriais esta estratégia é também bastante utilizada. Existe uma diversidade de biomateriais que resultam da combinação de dois ou mais materiais com composição, estrutura e propriedades diferentes e que exibem propriedades finais superiores às dos seus componentes isolados, são os biomateriais compósitos. Uma das características mais importantes dos compósitos é a possibilidade de alteração das propriedades com a modificação de apenas uma das diversas variáveis de processamento, como por exemplo o tamanho, forma, distribuição e orientação dos constituintes, etc. A tabela 1 representa vantagens e desvantagens de alguns biomateriais.

A diversidade das aplicações dos biomateriais evidenciada na Tabela 1, assim como o amplo espectro de composição química e a necessidade de formas e morfologias apropriadas para a sua utilização, fazem da pesquisa nesta área do conhecimento um trabalho eminentemente interdisciplinar, envolvendo fatores que contribuem para o sucesso das diversas aplicações, tais como: técnicas de síntese,

processamento em formas variadas, fatores de qualidade e de esterilização clínicos e respostas do tecido hospedeiro (Kawachi *et al.*, 2000).

Tabela 1: Vantagens, desvantagens e aplicações de alguns biomateriais (adaptado de Kawachi *et al.*, 2000)

Biomaterial	Vantagens	Desvantagens	Aplicações	Referências
Polímeros Polietileno Poliéster Poliuretano Silicone	Elasticidade, Fácil fabricação, Baixa densidade	Baixa resistência mecânica, Degradação dependente do tempo	suturas, artérias veias, dispositivos para cirurgia maxilofacial, tendões artificiais, dispositivos para oftalmologia, scaffolds	Nair & Laurencin 2007 Rieu & Goeuriot 1993
Metais e ligas Aço inoxidável Liga de titânio Liga de cobalto-crômio	Elevada resistência mecânica, elevada resistência ao desgaste, elevada tenacidade (energia de deformação)	Baixa biocompatibilidade, Corrosão em meio fisiológico, Perda das propriedades mecânicas com tecidos conetivos moles, Alta densidade	Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios, hastes), Prótese de joelho e quadril, Implantes dentários	Dearnley 1999 López 1993 Rieu 1993 Rieu & Goeuriot 1993
Cerâmicas e vidros Alumina Zircônia Carbono Fosfatos de cálcio Porcelana Vidros Bioativos Hidroxiapatite	Boa biocompatibilidade, Resistência à corrosão, Inércia química, Alta resistência à compressão	Baixa resistência mecânica, baixa tenacidade, Baixa elasticidade, Alta densidade	Substitutos de ossos, juntas de articulações, Dentes, Revestimento de próteses metálicas	Dearnley 1999 Heimke 1989 Rieu 1993 Rieu & Goeuriot 1993
Compósitos Hidroxiapatite-ligas de titânio / cerâmicas / colagénio Polímero/cerâmica	Boa biocompatibilidade, Inércia química, Resistência à corrosão, elevada resistência mecânica e elevada tenacidade, são mais leves	Difíceis de processar e de conformar. Custos elevados.	Substituição de tecidos duros, Scaffolds	Rezwan <i>et al.</i> , 2006 Suchanek & Yoshimura 1998

4 - Biomateriais como substitutos ósseos

Apesar dos avanços verificados na área biomédica e da diversidade de aplicações atualmente existentes (Tabela1), a principal área de aplicação de biomateriais continua a ser a ortopedia. Nesta área, tem havido grandes avanços desde meados do século passado até à chamada terceira geração de biomateriais (Navarro *et al.*, 2008).

O aumento da expectativa de vida do homem, como consequência dos avanços da medicina e da maior preocupação com a alimentação, não esquecendo o conforto gerado pela assim denominada “vida moderna”, tem resultado no aumento da população de idosos e, conseqüentemente, da prevalência de doenças relacionadas com a velhice. Entre as diversas doenças que afetam a estrutura óssea, a osteoporose e a perda de massa óssea têm sido intensamente estudadas devido aos seus efeitos devastadores na qualidade de vida humana. Porém, os problemas de estrutura óssea não afetam apenas idosos, atingem também indivíduos jovens na sua fase mais produtiva, decorrentes de acidentes, nomeadamente rodoviários e de trabalho. A gravidade destes problemas de saúde na população tem levado os cientistas, principalmente dos países mais desenvolvidos, à procura de materiais que possam substituir de forma apropriada os ossos danificados (Kawachi *et al.*, 2000).

Inicialmente, para restituir as perdas ósseas os cirurgiões utilizavam enxertos autógenos, por serem considerados ideais devido ao material pertencer ao próprio indivíduo. Entretanto, esse procedimento veio a revelar sérias desvantagens, como por exemplo a morbidade do sítio doador. O próprio processo de recolha de osso autógeno também podia implicar o aparecimento de hematomas, dano de nervos, formação de hérnias, dor crónica, entre outras complicações. Perante essas limitações, os alógenos e os xenólogos (materiais obtidos de outra espécie) surgiram como possíveis substitutos. Entretanto, também eles apresentam limitações importantes, como o risco de rejeição ou de transmissão de doenças (Matassi *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2009).

Surgiram, então, os enxertos aloplásticos, que correspondem a biomateriais, classificados ou subdivididos conforme a sua origem (natural ou sintética) ou a sua composição química (metálicos, cerâmicas, polímeros ou compósitos).

Esse tipo de material tem ganho cada vez mais aceitação no mercado devido à facilidade de uso e manipulação, à diminuição do tempo cirúrgico, além da possibilidade de obtenção em diversos tamanhos e formatos (Fardin *et al.*, 2010). Como desvantagens, correm o risco de rejeição seguida de infeção, levando à necessidade de uma nova intervenção cirúrgica. Nesses casos, materiais reabsorvíveis são preferíveis, pois alguns estudos mostram que alguns enxertos não reabsorvíveis podem causar reações a longo prazo (Pinto *et al.*, 2007).

O preenchimento de defeitos ósseos por enxertos aloplásticos é facilitado pela osteocondução, uma vez que esse material fornece o suporte que apoiará a formação

óssea sobre ele. Assim, há algumas condições que devem ser cumpridas: o suporte deve ser constituído por um material bioinerte ou bioativo, a sua forma e dimensão devem favorecer o crescimento ósseo pelo seu interior e a deposição óssea deve ocorrer por substituição. É importante salientar que os materiais osteocondutores não têm capacidade de induzir a citodiferenciação de osteoblastos, mas preenchem as fraturas ósseas, orientando as novas células, originadas por proliferação das osteogénicas, provenientes das margens da fratura, a promoverem a neoformação de tecido ósseo (Matassi *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2008).

O biomaterial deve, portanto, ser biocompatível, osteoindutor, osteocondutor, osteogénico, além de permanecer no organismo por tempo necessário até que haja substituição de um novo tecido ósseo. Além disso, é desejável que seja de fácil manipulação, esterilizável, facilmente obtido, hidrofílico, económico, não seja um substrato para a proliferação de colónias bacterianas ou outros agentes patogénicos e não seja cancerígeno. Contudo, nenhum biomaterial, atualmente conhecido, possui todas estas características (Fardin *et al.*, 2010).

O biomaterial ideal para aplicações ósseas deve poder proporcionar:

1. Uma matriz osteocondutora, que é uma característica passiva, atuando como um andaime, no qual ocorre invasão vascular, infiltração celular, e a formação de novos ossos;
2. Fatores osteoindutores, que induzem precursores de osteoblastos para se diferenciarem em células formadoras de osso maduro, e
3. Osteossíntese - células osteogénicas, que constituirão futuramente uma nova matriz óssea (Ludwig *et al.*, 2000).

4.1 - Conceitos e propriedades do tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado, vascularizado e dinâmico que se modifica ao longo da vida do organismo. Quando lesado, possui uma capacidade única de regeneração e reparação sem a presença de cicatrizes, embora, em algumas situações o tecido ósseo não se regenere por completo, devido ao tamanho da fissura ou defeito (Ludwig *et al.*, 2000).

A formação do tecido ósseo inicia-se na sétima semana embrionária e continua se desenvolvendo, remodelando e desempenhando funções estruturais e metabólicas ao longo da vida do indivíduo. As suas funções incluem o suporte do corpo e a proteção dos órgãos internos. Também funciona como alavancas rígidas

para a realização dos movimentos mediante uma ação muscular, armazena minerais e gordura e é ainda um local de produção de células sanguíneas (Seeley *et al.*, 2003).

O osso é constituído pela matriz óssea e pelas células ósseas. A composição da matriz óssea é responsável pelas características do osso. As células ósseas produzem a matriz óssea, ficam aí enclausuradas e destroem-na para que uma matriz nova possa substituir a mais antiga. Em relação ao seu peso, a matriz óssea é constituída aproximadamente por cerca de 35% de material orgânico e 65% de material inorgânico. O material orgânico consiste fundamentalmente em colagénio e proteoglicanos, bem como células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos). O inorgânico consiste principalmente em cristais de um fosfato de cálcio de fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, denominado hidroxiapatite.

O colagénio e os componentes minerais são responsáveis pelas principais características funcionais do tecido ósseo. O colagénio confere resistência e ao mesmo tempo a flexibilidade necessária à matriz, enquanto os componentes minerais conferem à matriz resistência à compressão e capacidade de suportar o peso. Se for retirado a um osso longo todos os minerais que o compõem, o colagénio torna-se o principal constituinte e essa circunstância permite-lhe adquirir uma elevada flexibilidade. Por outro lado, se o colagénio for removido do osso, o componente mineral torna-se o principal constituinte, e o osso torna-se frágil e quebradiço (Figura 1).

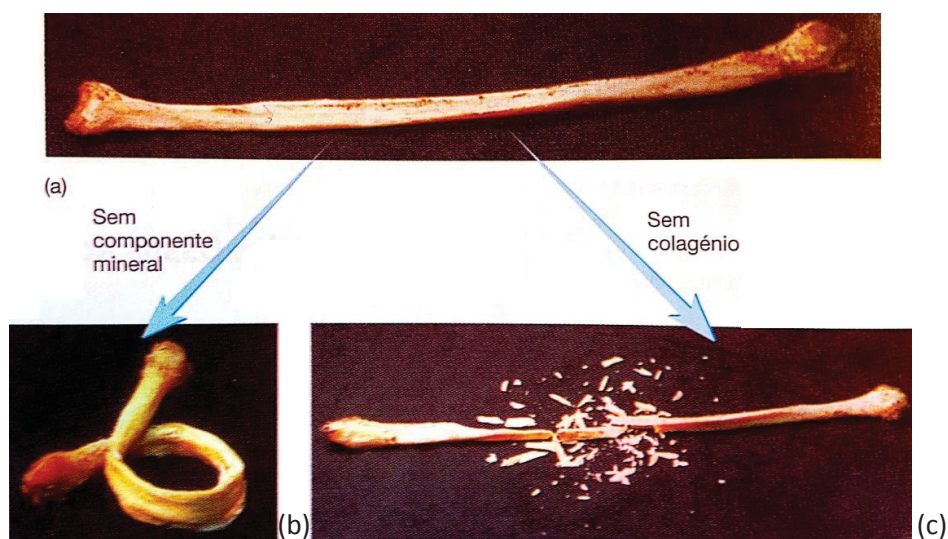


Figura 1: Efeitos das modificações da matriz óssea

a) osso normal. b) Osso desmineralizado, em que o colagénio é o principal componente que resta, pode ser dobrado sem quebrar. c) Quando o colagénio é removido, o principal componente que permanece é o componente mineral, tornando o osso frágil e quebradiço (Seeley *et al.*, 2003).

Os ossos são constituídos por duas camadas de tecido ósseo, uma interna e outra externa, de características diferenciadas (Figura 2). O osso cortical, compacto ou lamelar, que constitui a camada externa e o osso trabecular, esponjoso ou reticular, que constitui a camada interna. O osso cortical envolve o trabecular e constitui aproximadamente 80% do esqueleto, sendo o responsável pela resistência às solicitações mecânicas a que o esqueleto está sujeito.

Quer o osso esponjoso quer o osso compacto podem ser classificados de acordo com a relação entre a quantidade de matriz óssea e a quantidade de espaços vazios (poros) contidos no osso. O osso esponjoso contém menos matriz óssea e mais poros do que o osso compacto, o qual contém mais matriz óssea e menos região porosa que o osso esponjoso. O osso cortical é formado por um conjunto de unidades cilíndricas denominadas Sistemas de Havers, estando estes muito concentrados e o osso trabecular é formado por dispersas Camadas de Havers rodeados por medula óssea e vasos sanguíneos (Marcus *et al.*, 1997; Seeley *et al.*, 2003).

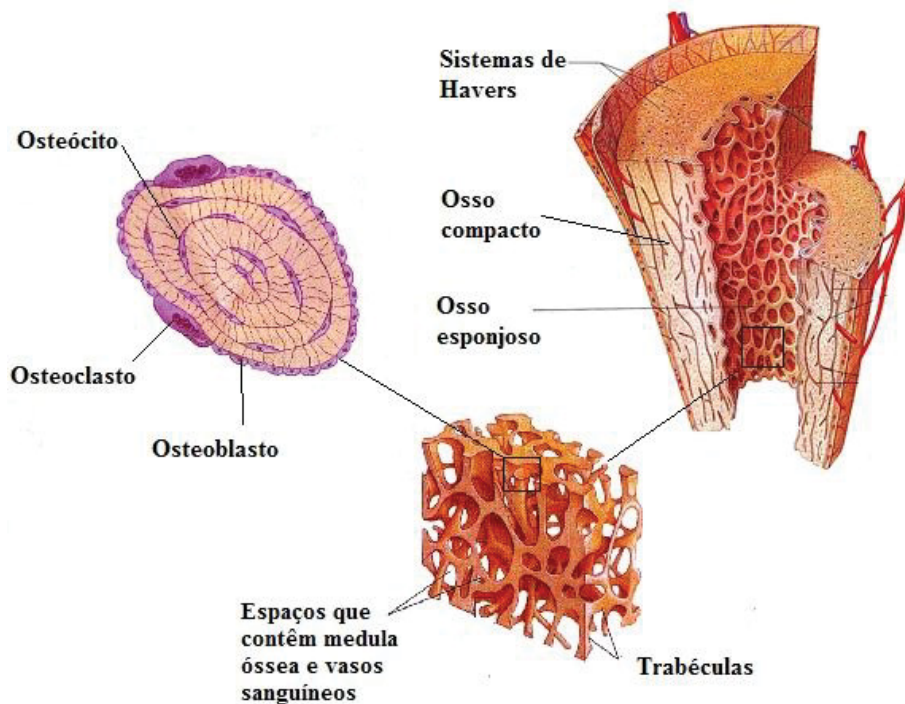


Figura 2: Constituição do osso (adaptado de Seeley *et al.*, 2003).

4.2 - Células ósseas

O tecido ósseo possui uma dinâmica metabólica muito intensa e encontra-se em constante processo de formação e remodelação. A remodelação óssea é um processo contínuo, que resulta das atividades acopladas de reabsorção óssea pelos osteoclastos e de formação óssea pelos osteoblastos. O processo de formação óssea ou osteogênese decorre em três etapas: a produção de matriz orgânica extracelular ou osteóide; a mineralização da matriz com formação de osso e a remodelação óssea com reabsorção seguida da formação de um novo osso (Marcus *et al.*, 1997).

A atividade celular dos osteoblastos, dos osteócitos (ou osteoblastos maduros) e dos osteoclastos é fundamental neste processo. Os osteoblastos têm um retículo endoplasmático desenvolvido e numerosas ribossomas. Produzem colagénio e proteoglicanos, que são armazenados nas vesículas do complexo de Golgi e libertados da célula por exocitose. Os osteoblastos também formam vesículas que acumulam iões de cálcio (Ca^{2+}), iões de fosfato (PO_4^{3-}) e várias enzimas. O conteúdo destas vesículas é libertado das células por exocitose e é utilizado na formação dos cristais de hidroxiapatite. É em consequência destes processos que se forma a matriz óssea mineralizada.

A partir do momento em que o osteoblasto fica rodeado por matriz óssea, torna-se uma célula madura que se designa por osteócito. Estes tornam-se relativamente inativos em comparação com a maioria dos osteoblastos, mas é-lhes possível produzir os componentes necessários para manter a matriz óssea.

Os osteoclastos, com a cooperação dos osteoblastos, participam dos processos de reabsorção e remodelação, ou destruição do tecido ósseo. São células gigantes e multinucleadas, extensamente ramificadas, derivadas da fusão de monócitos que atravessam os capilares sanguíneos. À medida que o processo de formação óssea progride, os osteoblastos preenchem as lacunas de reabsorção produzidas pelos osteoclastos, produzem a matriz óssea e passam a denominar-se osteócitos (Seeley *et al.*, 2003).

4.3 - Hidroxiapatite - o constituinte mineral do osso

O mais importante constituinte mineral do osso é a hidroxiapatite, um composto que é um fosfato de cálcio hidratado e que constitui cerca de $\frac{1}{4}$ do volume e mais de metade da massa do osso adulto normal. A vitamina D e a paratormona (PTH) são importantes mediadores da regulação de cálcio e a deficiência da primeira ou excesso da segunda podem conduzir à depleção mineral.

Idealmente o tecido ósseo deve possuir a rigidez necessária para suportar a carga do corpo, a flexibilidade e tenacidade suficientes para absorver impactos sem fraturar e a leveza adequada para permitir uma mobilidade adequada dos indivíduos. Em grande parte, estas características são moduladas pela quantidade de cristais de hidroxiapatite. Se o osso sofre uma desmineralização, como em algumas situações em que ocorre o aumento da reabsorção óssea, torna-se demasiado flexível e durante uma solicitação mecânica pode fraturar. Se ficar excessivamente mineralizado, torna-se demasiado rígido e frágil, podendo também ocorrer fratura (Rebello 2010).

Como referido anteriormente, a hidroxiapatite é um fosfato de cálcio hidratado constituído por três elementos químicos principais, que são o cálcio, o fósforo e o oxigénio. A sua forma biológica é não estequiométrica, ou seja, admite a substituição de iões estruturais, por outros, o que lhe confere modificações importantes ao nível da estrutura e da morfologia. Essas variações podem ser os parâmetros de rede, textura superficial, cristalinidade, solubilidade e dimensões do cristal. Exibe uma estrutura cristalina hexagonal, descrita pelo grupo espacial $P6_3/m$, onde P indica que é um sistema hexagonal primitivo. Consiste em iões Ca^{2+} e PO_4^{3-}

dispostos em torno de colunas de íons OH^- (Figura 3). As dimensões da célula unitária são $a=b=9,432 \text{ \AA}$ e $c=6,881 \text{ \AA}$ (Aoki 1991). A percentagem de espaço não ocupado desta estrutura cristalina permite-lhe acomodar facilmente diversos íons, tais como, CO_3^{2-} , Mg^{2+} , SiO_4^{4-} , Na^+ e F^- , etc., nos locais dos íons Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- ou intersticialmente nos vazios disponíveis. A acomodação desses íons pode influenciar o seu desempenho quando em contacto com os tecidos biológicos. (Miyaji *et al.*, 2005).

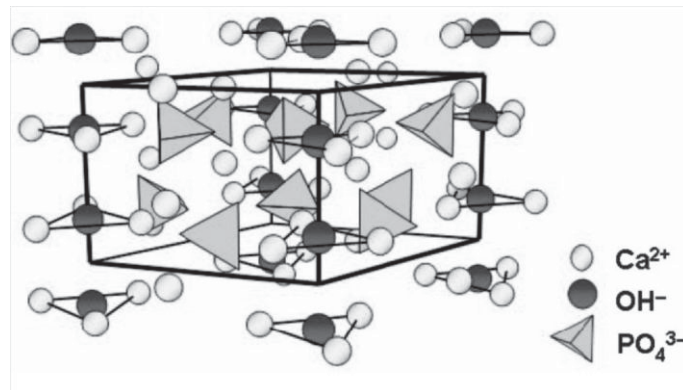


Figura 3: Esboço da célula unitária da hidroxiapatite (Aoki 1991)

Capítulo II - Os Vidros como biomateriais

1 - O que é o vidro. Origem e principais aplicações atuais.

Um vidro é um sólido não cristalino (amorfo) representado por uma ausência de ordem estrutural a longa distância (apenas ordem estrutural a curta distância). Assim, pode dizer-se que a estrutura de um vidro é caracterizada por uma célula unitária infinitamente grande, contendo um número infinito de átomos. Devido à falta de periodicidade, não existem dois átomos estruturalmente equivalentes. O carácter isotrópico do vidro será uma consequência natural da inexistência de simetria na rede, sendo o arranjo atómico estatisticamente igual em todas as direcções (Hynes & Jonson 1997).

O elemento básico da constituição do vidro comum é a sílica (SiO_2), podendo conter também na sua composição outros óxidos, nomeadamente fundentes, estabilizantes e substâncias corantes.

Os vidros podem ser obtidos por vários métodos, tais como sol-gel ou deposição em fase gasosa, mas o processo tradicional consiste na fusão-arrefecimento dos diversos componentes. O processo tem início com a fusão das

substâncias, seguido de arrefecimento rápido da massa fundida (mais ou menos viscosa), conhecido como *melt-quenching* (Shelby 2005).

O vidro apresenta um comportamento de fusão-solidificação distinto do exibido por um sólido cristalino, nomeadamente o processo de fusão do vidro passa por duas etapas distintas: a transição vítrea e a cristalização (Araujo 1997).

Ocorre uma diminuição descontínua do volume se, no processo de arrefecimento, a taxa for muito lenta, fazendo com que o material sofra contração sem ocorrer variação da temperatura. Isso acontece devido à perda de calor latente. Esta perda de calor é compensada pela diminuição do volume específico devido ao rearranjo atômico e, conseqüentemente, a diminuição da entropia, ocorrendo cristalização do fundido (Shelby 2005).

Se a taxa de diminuição da temperatura for muito grande, tal que não permita o rearranjo atômico, ou seja, o tempo será inferior ao necessário para que os átomos se distribuam pelas posições espaciais que correspondem às configurações de menor energia e haverá uma diminuição contínua do volume do material, que passará do estado líquido para um estado metaestável, com grande viscosidade, conhecido como líquido sobre-arrefecido. Haverá um ponto da etapa em que a viscosidade será tão grande que a mobilidade atômica será muito pequena. Neste ponto, o material adquire o comportamento de um sólido. Esta temperatura na qual ocorre a transição vítrea é conhecida como temperatura de transição vítrea (T_g), ou seja, o material deixa de ser um líquido e passa a ser um sólido, mantendo, porém, as características estruturais semelhantes às do líquido. Este sólido produzido por arrefecimento rápido é um líquido sobre-arrefecido, ou seja, um vidro. Desse modo, o vidro é também definido como sendo um sólido não cristalino que exhibe o fenómeno de transição vítrea (T_g) (Shelby 2005).

Os vidros foram descobertos por volta de 4000 a.C. Foram encontrados objetos de vidros em túmulos egípcios com aproximadamente 4000 anos de idade. Porém, conta a lenda que navegadores fenícios, ao deixarem acesas fogueiras construídas em "pedras" de carbonato de cálcio sobre a areia de uma praia, observaram que, após sofrer a ação do calor, durante toda a noite, se formava, no local, um líquido transparente a que se chamou vidro.

Todavia, este material pode também ser encontrado no seu estado natural, provavelmente desde os primórdios da formação da terra, a partir do arrefecimento

de magmas, ou seja, rochas vulcânicas fundidas que arrefeceram rapidamente e não tiveram tempo de cristalizar.

Atualmente o vidro é um material muito comum, presente no cotidiano, nas artes e também um material promissor sob o ponto de vista tecnológico (Araujo, 1997). Nos dias de hoje, a produção de vidros não se esgota nos produtos tradicionais de fabrico (objetos utilitários, embalagens, garrafas, etc.), tão conhecidos do grande público. O mundo dos vidros modernos inclui atualmente muitos outros produtos essenciais ao desenvolvimento de tecnologias avançadas (substratos e componentes para a indústria eletrônica, próteses para medicina, fibras óticas para as telecomunicações, etc.). Em particular, na medicina e na odontologia, os vidros são utilizados tanto em dispositivos instrumentais como também em implantes dentários, como material de preenchimento para reparação de defeitos ósseos e até mesmo em cirurgia reconstrutiva (Boccaccini & Li 2014).

1.1 - Constituintes do vidro

Os vidros podem ser obtidos de componentes quimicamente puros, ou a partir de uma mistura de minerais (exemplo: areia). Independentemente da fonte dos componentes utilizados para produzir um vidro específico, os materiais de partida podem ser divididos em três categorias principais, tendo em conta o papel de cada um no processo:

- 1) Formador de vidro;
- 2) Fundente;
- 3) Modificador de Propriedade.

O mesmo composto pode ser classificado em diferentes categorias, quando utilizado para diferentes fins. A alumina (Al_2O_3), por exemplo, serve como um formador de vidro nos vidros aluminato, mas é considerado um modificador de propriedades na maioria dos vidros silicatos. Porém, o componente principal de qualquer vidro é sempre o formador. Cada vidro contém um ou mais componentes que contribuem como fonte primária para a formação da estrutura. A identidade destes componentes serve geralmente de base para o nome genérico utilizado para o vidro. Se, por exemplo, o componente principal presente numa amostra específica de vidro é a sílica, então o vidro é denominado um silicato. Mas se uma quantidade significativa de óxido de fósforo também está presente, além de sílica, a amostra é denominada um vidro fosfosilicato.

Os formadores de vidro em vidros óxidos comerciais são a sílica (tetraedros de SiO_4), óxido bórico (B_2O_3) e pentóxido de fósforo (P_2O_5), visto que todos formam facilmente uma rede tridimensional de vidro. Um grande número de outros compostos pode atuar como formadores de vidro, em determinadas circunstâncias, incluindo GeO , Bi_2O_3 , As_2O_3 , Sb_2O_3 , TeO_2 , Al_2O_3 , Ga_2O_3 , e V_2O_5 .

1.2 - Vidros silicatos

A maioria dos vidros comerciais é baseado em SiO_2 . A estrutura dos vidros silicatos é constituída por unidades tetraédricas $[\text{SiO}_4]^{4-}$. Além de sílica, os vidros também contêm outros óxidos, como CaO , Na_2O , K_2O e Al_2O_3 , que influenciam as suas propriedades. Entre os vários tipos de vidros silicatos, a sílica vítrea é o vidro refratário de maior uso comercial. Possui elevada resistência química à corrosão, baixa condutividade elétrica, coeficiente de expansão térmica quase nulo e excelente transparência no ultra-violeta-visível (UV-vis). O vidro sodo-cálcico é a forma mais comum de vidro de silicato comercial e o menos caro. Estes geralmente contêm 60-70% de SiO_2 , 12-18% de soda (Na_2O) e 5-10% de cal (CaO). Vidros sodo-cálcicos são usados principalmente no fabrico de janelas porque transmitem facilmente a luz visível. Estes silicatos, embora com teores de soda e cal distintas das acima referidas, têm recebido muita atenção em utilizações médicas, como vidros bioativos.

Um sólido cristalino feito de sílica (por exemplo, quartzo), os tetraedros SiO_4 são organizados numa rede bem definida. Na sílica amorfa, tem-se tetraedros de SiO_4 , ainda que ligados entre si, mas com um ângulo entre eles que não é constante, e a estrutura resultante é desordenada (Figura 4) (Zarzycki 1991).

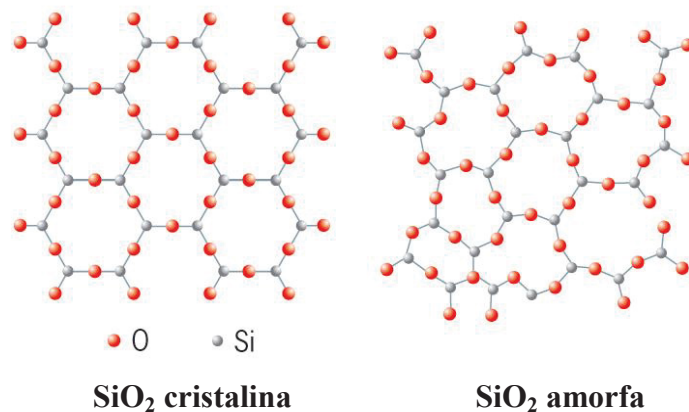


Figura 4: Comparação entre a estrutura da sílica cristalina e amorfa (Zarzycki 1991).

Os óxidos modificadores de rede, como os dos metais alcalinos (Na_2O , K_2O , Li_2O) e alcalino-terrosos (CaO , BaO), quebram, gradualmente, a rede de sílica (figura 5), aumentando o número de NBO (oxigénio não-em-ponte), diminuindo a T_g e a viscosidade do vidro. A estrutura resultante é chamada de rede modificada, constatação que esteve na base da elaboração da principal teoria de formação da rede vítrea (Zachariasen 1932).

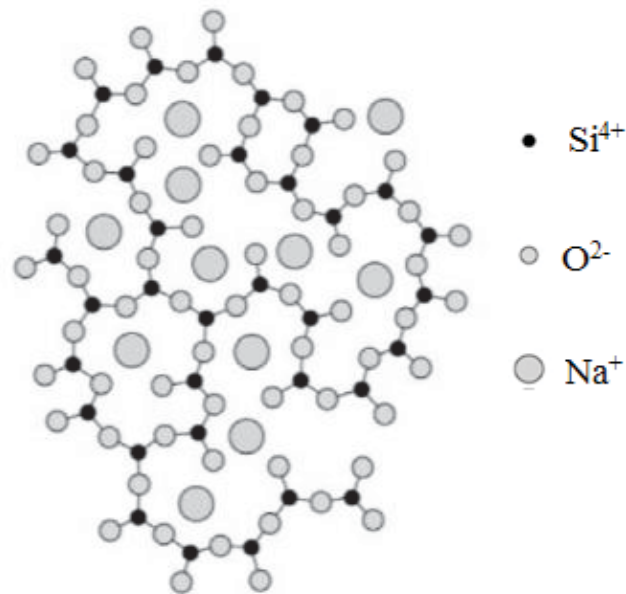
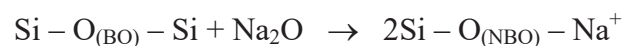


Figura 5: Alterações estruturais na rede de sílica pela introdução de cationes Na^+ (adaptado de Zarzycki 1991).

No vidro de sílica da figura 4, todos os tetraedros SiO_4 estão ligados entre si. Cada átomo de O é ligado a um átomo de Si. Estes átomos de O são chamados de oxigénios em ponte (BO). Quando, por exemplo, o modificador Na_2O é adicionado à composição do vidro, os cationes Na^{2+} interrompem a rede de sílica, impedindo que alguns átomos de O se liguem a átomos de Si. Estes átomos de O são chamados de oxigénios não-em-ponte (NBO):



O número diferente de unidades estruturais de silício presente nos vidros de silicato modificados foi designado como unidades Q^n , onde n representa o número de átomos de oxigénio ligados em ponte ao silício, como ilustrado na Figura 6.

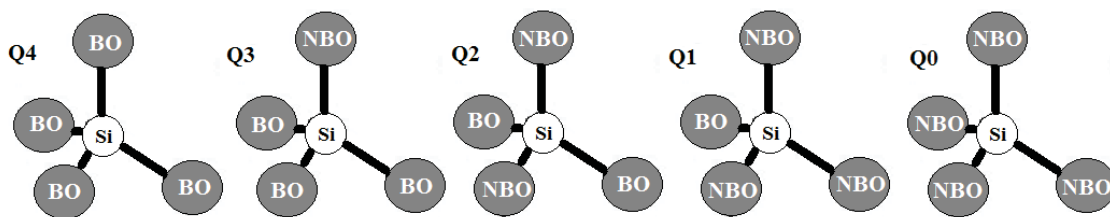


Figura 6: Unidades tetraédricas de silicato que podem existir nos vidros de silicato (Jones & Clare 2012).

Estudos estruturais realizados em vidros do sistema $\text{Na}_2\text{O-SiO}_2$ (Dupree *et al.*, 1986; Dupree *et al.*, 1987), revelaram que os que continham cerca de 33,3% molar de Na_2O apresentavam apenas unidades estruturais Q^3 , mas com o aumento do teor em Na_2O , ocorria a conversão progressiva de unidades Q^3 em unidades Q^2 , até que com 50% de Na_2O apenas predominam as unidades Q^2 .

O número médio de BO por tetraedro de SiO_4 (n) pode ser obtido se for conhecida a percentagem molar de SiO_2 no vidro (p_m) (Varshneya 1994):

$$n = 6 - 200/p_m$$

O valor de n também se relaciona com o número médio de tetraedros de SiO_4 que é possível definir por comprimento médio de ligações Si-O-Si presentes no vidro (l):

$$l = 2/(2-n)$$

Estes parâmetros podem ser facilmente determinados conhecendo o valor de p_m (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros estruturais de possíveis vidros silicatos.

P_m	n	l
40.0	1.00	2.0
45.0	1.56	4.5
47.5	1.79	9.5
50.0	2.00	∞
66.0	3.00	---
100.0	4.00	---

De acordo com o modelo de Zachariassen, o vidro só pode ser formado se $n \geq 3$, uma vez que nestas circunstâncias um tetraedro SiO_4 partilha pelo menos 3 oxigénios com outros tetraedros vizinhos, garantindo, desta forma, a formação de uma rede 3-D. Porém, na prática, vidros com $n < 3$ podem, ainda assim, ser formados, uma vez que a coesão do vidro se estabelecerá através de ligações iónicas entre os catiões e os NBO.

2 - Vidros bioativos

Como já referido, os primeiros materiais implantáveis, substitutos do tecido ósseo, eram bioinertes, tais como a maioria dos metais, os cerâmicos de alumina e zircónia, o polietileno, etc., os quais apresentavam uma duração média de vida no paciente não superior a 15 anos. Assim, com o passar do tempo vem a necessidade de substituição do osso, não só devido à diminuição da resistência deste após os 50 anos de idade, mas também devido ao aumento da expectativa de vida humana, estimada em cerca de 80 anos. Estes dois motivos tornaram o tempo de vida das tradicionais próteses bioinertes demasiado curto, e, por isso, muitos pacientes necessitavam de mais intervenções cirúrgicas. Uma das razões para a substituição dos materiais bioinertes na confecção de próteses é que não há nenhuma ligação biológica entre a prótese e o tecido hospedeiro, o que por sua vez leva ao desgaste e deterioração do implante. A segunda razão é o enfraquecimento do osso saudável devido à carga mecânica do implante por causa da desproporção existente entre as propriedades mecânicas do osso comparativamente às do implante (Cao & Hench 1996; Hench & West 1996; Jones & Hench 2001; Notingher *et al.*, 2003).

Tais fragilidades fizeram emergir um novo paradigma que assentou no desenvolvimento de novos materiais bioativos para próteses, combinando melhores propriedades mecânicas com a bioatividade, mas sem nunca perder de vista o objetivo de estimular uma resposta bioquímica do tecido que pudesse levar à formação de uma ligação forte, do tipo biológica, entre a prótese e o tecido vivo. Desta forma, o material bioativo facilitaria também a regeneração do tecido, em vez da mera substituição.

Dos materiais bioativos desenvolvidos até à data, os vidros do sistema SiO_2 - Na_2O - CaO - P_2O_5 têm as propriedades mecânicas mais próximas do osso cortical e desencadeiam uma resposta bioquímica rápida quando colocados em fluidos

fisiológicos. Esta resposta bioquímica resulta de uma série de reações químico-biológicas, mais ou menos complexas, que têm lugar à superfície do vidro, consistindo essencialmente na permuta de iões entre o vidro e os fluidos biológicos em torno do mesmo, o que leva à formação de uma camada de hidroxiapatite carbonatada (HCA) na qual as células ósseas se vinculam e proliferam. O colagénio produzido pelas células ósseas, ligam-se à camada de HCA levando à regeneração óssea (Hench & West 1996; Notingher *et al.*, 2003).

2.1 - História do biovidro 45S5 (Bioglass®)

A maioria das invenções e descobertas da história foi obtida com muito esforço, investigação e trabalho. Há contudo casos de sucesso que surgiram como obras do acaso. Muitos materiais foram promovidos de “agressores” a “implantes” por obras do acaso. Um dos acasos mais famosos foi o das lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato (PMMA). Durante a 2ª Guerra Mundial foram investigados estilhaços desse polímero nos olhos dos pilotos ingleses “Spitfire”. Esses corpos estranhos não provocavam reações de rejeição, pelo que, após a guerra surgiram os primeiros implantes de lentes oculares de PMMA, que foram utilizadas em pessoas que sofriam de cataratas. No entanto, tal não foi o caso do vidro bioativo mas, mesmo assim, a sua descoberta foi alvo de um conjunto curioso de eventos. O primeiro vidro bioativo foi criado em 1969 por Larry Hench, professor da Universidade da Flórida. Hench começou o seu trabalho com a motivação de encontrar um material que se pudesse ligar biologicamente ao tecido ósseo. Na altura, o coronel Klinker do Exército dos EUA, que acabara de regressar da guerra do Vietnam, questionou Hench acerca da possibilidade de se desenvolver materiais que pudessem sobreviver ao ambiente agressivo do corpo humano, pois o problema era recorrente e todos os materiais implantáveis disponíveis no momento, na sua grande maioria os metais e os polímeros, desencadeavam reações de corpo estranho (encapsulamento fibroso) após a implantação, em vez de formar uma interface estável e duradoura com os tecidos circundantes (Hench 2006; Hench 2013; Krishnan & Lakshmi 2013).

Foi então que Hench a partir do sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$, sintetizou o primeiro vidro bioativo, com elevado teor de cálcio e com uma composição próxima do eutéctico ternário $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$. A composição 45% SiO_2 , 24.5% de CaO , 24.5%, Na_2O e 6% P_2O_5 (% expressa em peso), ficou conhecida como 45S5, o

Bioglass®. O nome "45S5" refere-se ao teor de SiO₂ (45% em peso) e à razão molar Ca/P = 5.

À síntese, seguiu-se o teste *in vivo*, verificando-se que após seis semanas da implantação no fêmur de um rato, se formou um vínculo com o osso tão forte que não podia ser removido sem que este se quebrasse (Hench 2006; Hench 2013; Jones 2013). A descoberta deu origem ao artigo publicado em 1971, no *Journal of Biomedical Materials Research*, o qual resumiu os resultados *in vivo* e os testes *in vitro* que levaram à proposta da primeira teoria acerca do mecanismo de ligação interfacial do implante ao osso. Os testes *in vitro* mostraram que a composição 45S5 desenvolveu uma camada de hidroxiapatite carbonatada (HCA) em soluções biológicas que não continham íons de cálcio ou de fosfato. A camada HCA formada *in vitro* teve uma correspondente equivalente observada *in vivo*, fato que foi comprovado por microscopia eletrônica de transmissão. Por outro lado, também se verificou que os cristais de HCA estavam ligados a camadas de fibras colagénicas produzidas na interface pelos osteoblastos (Hench 2006).

Após a descoberta do primeiro vidro bioativo, há quase 50 anos, foram surgindo, ao longo do tempo, novas oportunidades para as capacidades do 45S5. A tabela 3 sumariza a cronologia do desenvolvimento de vidros bioativos.

Tabela 3: Cronologia da ciência e desenvolvimento do produto clínico - biovidro 45S5 (adaptado de Hench 2013)

1969	Descoberta da capacidade de ligação óssea do Bioglass® na Universidade da Flórida
1971	Primeiras publicações de ligação óssea para vidros bioativos e de vitrocerâmica
1981	Descoberta de ligação do Bioglass 45S5 ao tecido conjuntivo mole
1981	Estudos de biocompatibilidade e de toxicologia <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
1985	Primeiro produto médico (Bioglass Ossicular)
1991	Desenvolvimento do método de processo sol-gel para biovidros estendendo a gama de bioatividade
1993	Uso de biovidro particulado para restaurar defeitos da doença periodontal (Perioglas)
1999	Partículas 45S5 para enxerto ósseo ortopédico (NovaBone)
2004	Partículas 45S5 para o uso no tratamento de hipersensibilidade dentária (NovaMin)
2005	Desenvolvimento de uma variedade de produtos de manutenção dental (NovaMin)
2011	Lançamento mundial da pasta de dentes Sensodyne Reparação e Proteção, para a prevenção da hipersensibilidade dentária e gengivite.

2.2 - Outras composições bioativas e o índice de bioatividade (Ib)

Desde o 45S5, e mesmo atualmente, muitos investigadores têm-se dedicado a procurar bioatividade noutras composições do mesmo sistema do Bioglass® SiO₂-P₂O₅-CaO-Na₂O, ou noutros sistemas menos convencionais, mais ou menos complexos, tais como fluoretos, calcogenetos, etc., de vidros ou vitro-cerâmicos bioativos, oferecendo numerosas possibilidades na Ciência dos Biomateriais (Kokubo *et al.*, 2003; Li *et al.*, 1991; Vallet-Regí *et al.*, 2006). Os vitro-cerâmicos consistem numa matriz de vidro, contendo uma fina dispersão de microcristais, cuja função é a de conferir melhores propriedades mecânicas ao vidro. Habitualmente recorre-se ao denominado índice de bioatividade (Ib) para quantificar a bioatividade de materiais bioativos. Este índice é definido como o inverso do tempo necessário para obter mais de 50% da interface ligada. Uma comparação entre a composição e o índice de bioatividade de alguns biovidros, é mostrada na Tabela 4 (Hench 1991).

Todos eles são bioativos, na medida em que formam uma camada biologicamente ativa de HCA à sua superfície, quando implantados.

Tabela 4: Composição (% peso), estrutura e índice de bioatividade de diversos vidros e vitro-cerâmicos (Hench 1991).

	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	Vitro-cerâmico	Vitro-cerâmico
Ib	12.5	12.5	10.5	5.6	6.0

A rapidez de ligação dos vidros bioativos aos tecidos depende de vários fatores, um deles é a composição. Assim, as taxas de ligação mais rápidas que ocorrem nos vidros bioativos de composição SiO₂, CaO, Na₂O e P₂O₅ são obtidas com teores de SiO₂ de 45 a 52% (em peso). Nesta gama de composições, a ligação surge logo após 5 a 10 dias, quer se trate de tecidos conjuntivos moles ou duros (osso). Os vidros bioativos contendo 55 a 60% de SiO₂ necessitam de mais tempo para formar um vínculo com ossos, mas não o fazem com tecidos moles. As composições com mais de 60% de SiO₂ não se ligam ao osso nem aos tecidos moles, e induzem a formação de uma cápsula fibrosa não aderente (são bioinertes). Estas considerações encontram-se resumidas na Figura 7, a qual exibe o diagrama ternário dos índices de biocompatibilidade, proposto por Hench, para vidros do sistema Na₂O-CaO-SiO₂ com uma constante de 6% em peso de P₂O₅ (Hench 2006).

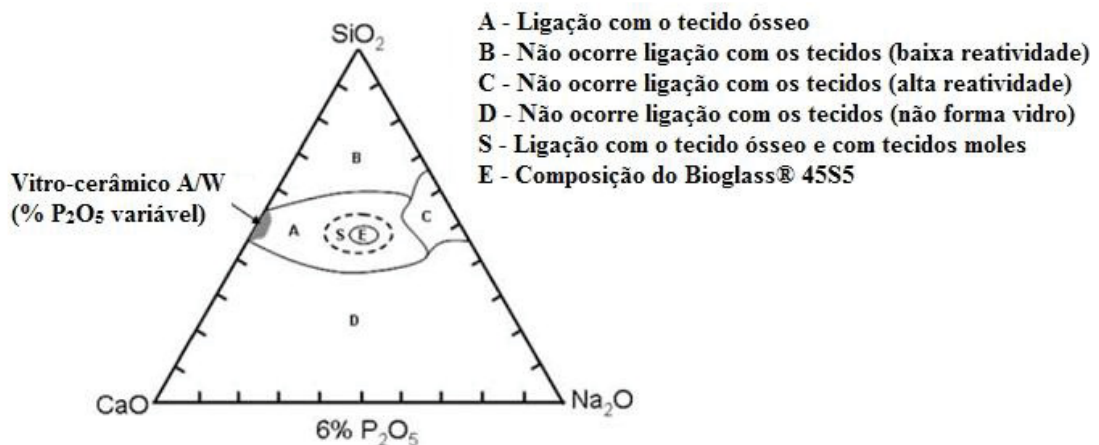


Figura 7: Diagrama de composição de ligação ao osso. Região S, é uma região de bioatividade de classe A onde os vidros bioativos se ligam aos tecidos ósseos e aos tecidos moles, ativando genes. A região E, representa a composição do Bioglass® (Adaptado de Hench 2006).

Os vidros cuja composição se insere na região A desenvolverem uma camada interfacial de HCA, quer *in vitro* como *in vivo*. As composições dentro da linha tracejada também se ligam, especialmente aos tecidos moles. Os vidros na região B são inertes, e os da região C são reabsorvíveis. A Região D corresponde a composições não formadoras de vidro e não ligantes aos tecidos. As composições de vidro com 40-52% de SiO₂ (região A) exibem valores de Ib que variam entre 12,5 e 10, baixando significativamente, para valores de 3 ou 4, se os materiais pertencerem à região B. Por outro lado, se outros iões, para além dos de Ca e Na, forem adicionados à composição do vidro, podem ocorrer igualmente importantes alterações no Ib. É o caso, por exemplo, de muitos elementos como o Sr, Cu, Zn ou Co, também presentes no corpo humano, embora em baixas quantidades (traços), mas com efeitos benéficos no metabolismo ósseo (Beattie & Avenell 1992; Saltman & Strause 1993; Nielsen 1990).

Por outro lado, os iões de cálcio (Ca), fósforo (P), silício (Si), estrôncio (Sr), zinco (Zn), bem como o boro (B), vanádio (V), cobalto (Co) e magnésio (Mg) estão também diretamente envolvidos no metabolismo do osso (Hoppe *et al.*, 2011), desempenhando funções fisiológicas essenciais ao nível da angiogénese, do crescimento e da mineralização do tecido ósseo.

Uma nova linha de investigação prende-se com a possibilidade de introduzir alguns destes iões, como dopantes, na composição de diversos biovidros e biocerâmicos, no sentido de aumentar a bioatividade destes.

A utilização da técnica de síntese sol-gel possibilitou a investigação de novos tipos de biomateriais pela facilidade de introdução de possíveis dopantes num vidro sintetizado por meio de sol-gel. Por exemplo, alguns investigadores adicionaram por esse meio, iões de Ag^+ à composição do vidro bioativo (Bellantone *et al.*, 2000) conferindo assim propriedades antimicrobianas ao material.

Como indicado na Figura 8, a libertação subsequente destes iões, após exposição a um ambiente fisiológico, pode influenciar favoravelmente o comportamento de células humanas além de melhorar a bioatividade dos implantes. Por exemplo, estudos realizados *in vitro* e *in vivo* mostraram que ocorreram aumentos significativos da bioatividade em hidroxiapatite dopada com Si^{4+} (Balas *et al.*, 2003; Vallet-Regi & Arcos 2005), vidros silicatos dopados com Sr^{2+} (Gentleman *et al.*, 2010) e vidros fosfato dopados com Mg^{2+} (Ahmed *et al.*, 2010).

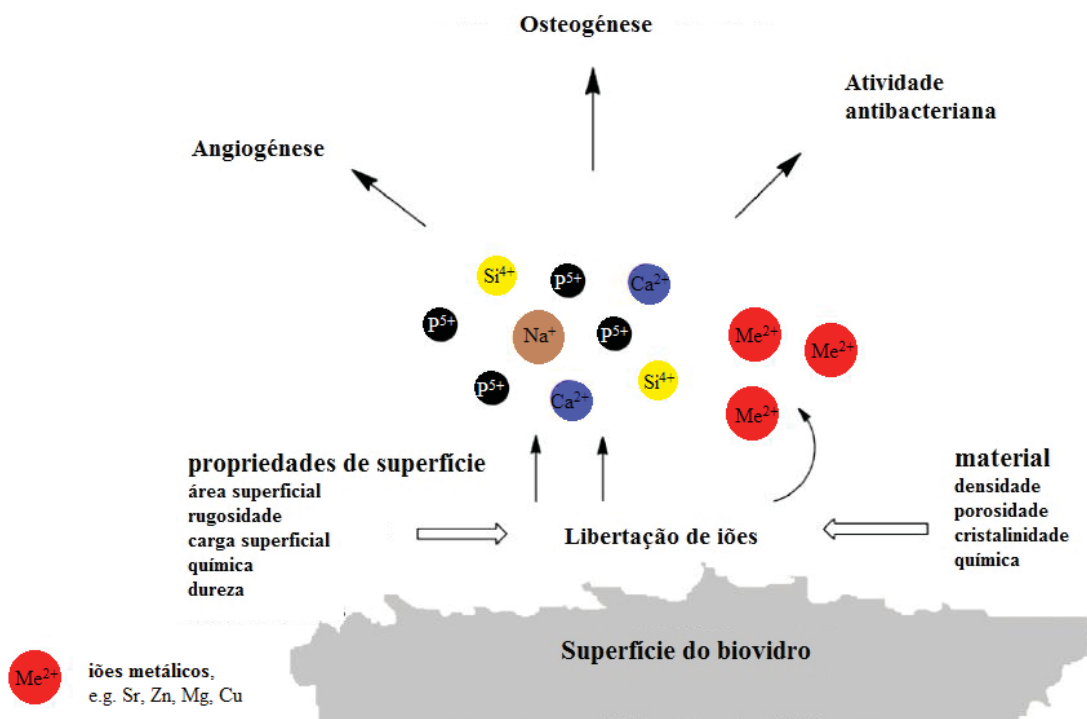


Figura 8: Visão geral das respostas biológicas aos produtos da dissolução iónica dos vidros bioativos (Hoppe *et al.*, 2011)

A obtenção de uma boa correspondência entre as propriedades mecânicas é uma condição necessária para o biomaterial estar em contato com os ossos. Outra propriedade importante ligada a este objetivo é a capacidade de formar uma interface estável entre o material e o tecido hospedeiro. Esta é a razão principal que faz com que os materiais bioativos sejam tão importantes para as aplicações ortopédicas.

Hench, como já referido, propôs uma classificação da bioatividade específica para biomateriais destinada a ser usada em implantes ortopédicos. Materiais pertencentes à “Classe A” exibem osteossíntese, o que significa que a sua superfície é colonizada por células osteogênicas quando colocado em contato com o tecido vivo. Estes materiais têm geralmente $I_b = 12$. Por outro lado, materiais pertencentes à “Classe B” exibem apenas osteocondução, ou seja, o material só funciona como um substrato, geralmente poroso, onde as células ósseas penetram e ficam ancoradas. Estes materiais têm $I_b = 3$ a 6. (Hench 2006; Hench 2013; Hench & Greenspan 2013; Wallace *et al.*, 1999).

3 - Mecanismo da bioatividade: fatores que afetam a bioatividade e a nucleação da HCA

No início dos anos 90, Li e seus colegas mostraram que se forma uma camada de HCA depositada sobre a superfície de um gel de sílica quando embebido durante alguns dias em fluido corporal simulado (SBF) (Li *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993).

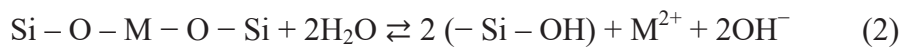
Portanto, a partir desse estudo ficou estabelecido que o grau de bioatividade de um material seria determinado pela taxa de formação da camada de HCA na sua superfície. O tempo necessário para a formação da camada de HCA dependia, contudo, de fatores tais como a composição e a estrutura do biovidro. Relativamente à estrutura, em particular, a presença de poros, verificou-se que a HCA não precipitava sobre sílica não porosa, tal como o quartzo, assim como também não precipitava sobre um gel de sílica tratado termicamente a $T \geq 900^\circ\text{C}$ (ou seja, como ocorreu sinterização a essa temperaturas, a porosidade foi eliminada). Portanto, os poros podem ser sítios de nucleação de HCA. Porém há que considerar o efeito provocado pelo tamanho de poro. Por exemplo, se os poros exibem diâmetros menores do que 6 Å, a HCA não pode precipitar, porque os iões PO_4^{3-} são grandes demais para difundirem para os poros.

Estudos da cinética de reação dos vidros bioativos *in vitro* e *in vivo* mostraram que existe uma sequência de doze etapas de reações que ocorrem na

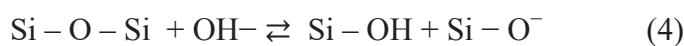
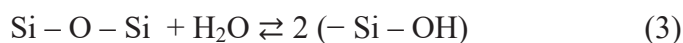
superfície dos biovidros de Classe A. A Figura 10 indica, no eixo do tempo de registo, que as primeiras cinco fases de reações de superfície ocorrem muito rapidamente e se completam em cerca de 24 horas. É o caso dos vidros altamente bioativos como o 45S5 (Hench 2013; Hench & Greenspan 2013).

O mecanismo e a escala de tempo envolvido na formação da camada de HCA, fases 1-5, e o crescimento de osso novo, fases 6-12, no implante biovidro estão também ilustrados na Figura 10 (Filgueiras *et al.*, 1993; Hench 2013; Hench & Greenspan 2013; Jones & Hench 2001; Notingher *et al.*, 2003).

Quando um vidro é colocado em contacto com uma solução aquosa, podem ocorrer dois processos: por um lado a dissolução dos catiões alcalinos e alcalino-terrosos a partir do interior do vidro para a solução, e por outro a rotura da rede de sílica. Geralmente prevalece o primeiro processo sempre que o pH <9, enquanto que a pH mais elevado ocorre a dissolução da rede de sílica (Iler 1979). O contacto da água com a superfície do vidro desencadeia a remoção dos iões alcalino (M⁺) e alcalino terrosos (M²⁺) existentes na matriz vítrea, envolvendo, por exemplo, as reações (1) e (2):



Ao longo do tempo, se a solução for a mesma, a tendência será para que, através de um aumento da concentração de iões alcalinos na água, o respetivo pH aumente, atingindo-se um ponto crítico a pH ~ 9 a partir do qual ocorre a dissolução da rede de sílica, envolvendo as reações (3) e/ou (4) e a formação de silanóis.



Hill tentou relacionar o parâmetro estrutural n com a bioatividade e calculou o valor de n em vários vidros bioativos (Tabela 5). A análise da Tabela 5 permite verificar que a maioria dos vidros bioativos analisados exhibe $n \ll 3$, ou seja, a grande maioria dos átomos de oxigénio presentes nestas estruturas são tetraedros de NBO, com alguns, tetraedros isolados de SiO₄. Assim, pode dizer-se que um dos fatores

que influi na dissolução de um vidro, na presença de água, é a quantidade relativa de tetraedros formadores (e.g. SiO_4^{4-}): quanto menor for esta, maior será a suscetibilidade do vidro à degradação.

Vidro	SiO ₂	CaO	Na ₂ O	P ₂ O ₅	B ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	<i>n</i>	Bioatividade
45S5	46	27	24	3	0	0	1.90	Sim
S53P4	54	22	23	2	0	0	2.39	Sim
S63.5P6	66	16	15	3	1	1	3.08	Não
CS	50	50	0	0	0	0	2	Sim
CS-Na	48	49	3	0	0	0	1.87	Sim
CS-P	49	50	0	1	0	0	2.03	Sim
S53P4	54	22	23	2	0	0	2.39	Sim
S52P8	55	14	26	4	1	2	2.69	Não
S38P8	40	26	28	4	1	2	1.81	Não

Tabela 5: Relação entre a composição, o índice estrutural e a bioatividade dos diferentes vidros (Hill 1996)

As reações que ocorrem à superfície do biovidro são, portanto, muito rápidas, libertando espécies iónicas solúveis a partir do vidro para o interior da solução (SBF). Em 1976 foi proposto pela primeira vez uma sequência detalhada de reações que ocorrem na superfície de vidros bioativos com composição em sílica (Clark *et al.*, 1976). Estas envolvem as seguintes etapas (etapas 1-5) (figura 9):

- 1) troca iónica entre a solução e a superfície do vidro, resultando na libertação de iões de Na^+ , Ca^{2+} e PO_4^{3-} e à formação de grupos silanóis (Si-OH);
- 2) perda de sílica solúvel, na forma Si(OH)_4 , devido à quebra de ligações Si-O-Si;
- 3) condensação de silanóis e repolimerização, e formação de uma camada porosa rica em SiO_2 à superfície;
- 4) aumento da concentração de Ca^{2+} e PO_4^{3-} na solução, devido à libertação com o tempo de iões do vidro, seguida de formação de um filme rico em CaO-P₂O₅ à superfície do vidro quando o ponto de saturação é alcançado.;
- 5) cristalização de uma camada de HCA pela incorporação de aniões OH^- e CO_3^{2-} da solução.

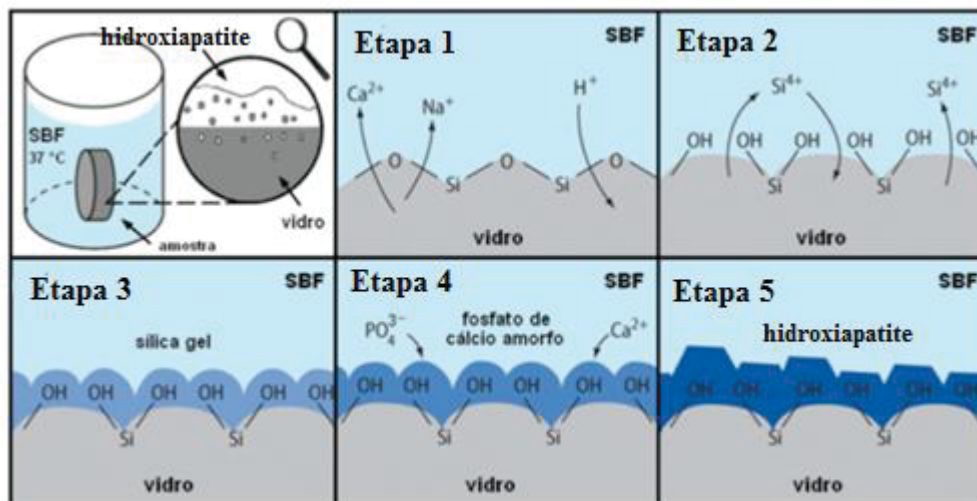


Figura 9: Representação esquemática do mecanismo de formação da HCA na superfície de um biovidro do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ (adaptado de Siqueira & Zanotto 2011).

A elevada área superficial da camada rica em sílica age como locais preferenciais para a nucleação heterogênea do filme de fosfato de cálcio amorfo e os grupos silanol podem ser locais de nucleação para a HCA (Cho *et al.* 1995), portanto, é atualmente vulgarmente aceite que após imersão em SBF, a superfície adquire a configuração de uma dupla camada, designadamente um depósito de fosfato de cálcio no topo de uma camada rica de sílica.

Após a ocorrência destas reações físico-químicas, as moléculas biológicas começam a interagir com a superfície do vidro. Moléculas de colagénio são incorporadas na camada de HCA e, em seguida, as células começam a responder. Nomeadamente, as reações de adsorção dos fatores de crescimento aumentam (fase 6, Figura 10) diminui consideravelmente a duração do tempo de macrófagos necessários no local de implantação para a reparação de tecidos (fase 7). A ligação de células estaminais (fase 8) e a proliferação e diferenciação das células (fase 9), ocorre rapidamente sobre a superfície de materiais bioativos da classe A. Em materiais de classe B, são necessárias várias semanas para eventos celulares semelhantes ocorrerem na sua superfície. A diferenciação de células osteogénicas num fenótipo osteoblasto maduro não ocorre em materiais bioinertes e é raro em materiais bioativos de classe B, devido à falta de estímulos iónicos. Em contraste, as células osteogénicas colonizam a superfície de materiais bioativos de classe A dentro de 24 - 48 horas e iniciam a produção de vários fatores de crescimento que estimulam a divisão celular, a mitose, e a produção de proteínas da matriz

extracelular (fase 10). A mineralização da matriz dá-se logo depois e os osteócitos maduros, incorporados na matriz de colagénio-HCA, são o produto final de 6 - 12 dias *in vitro* e *in vivo* (fases 11 e 12) (Hench 2013; Hench & Greenspan 2013).

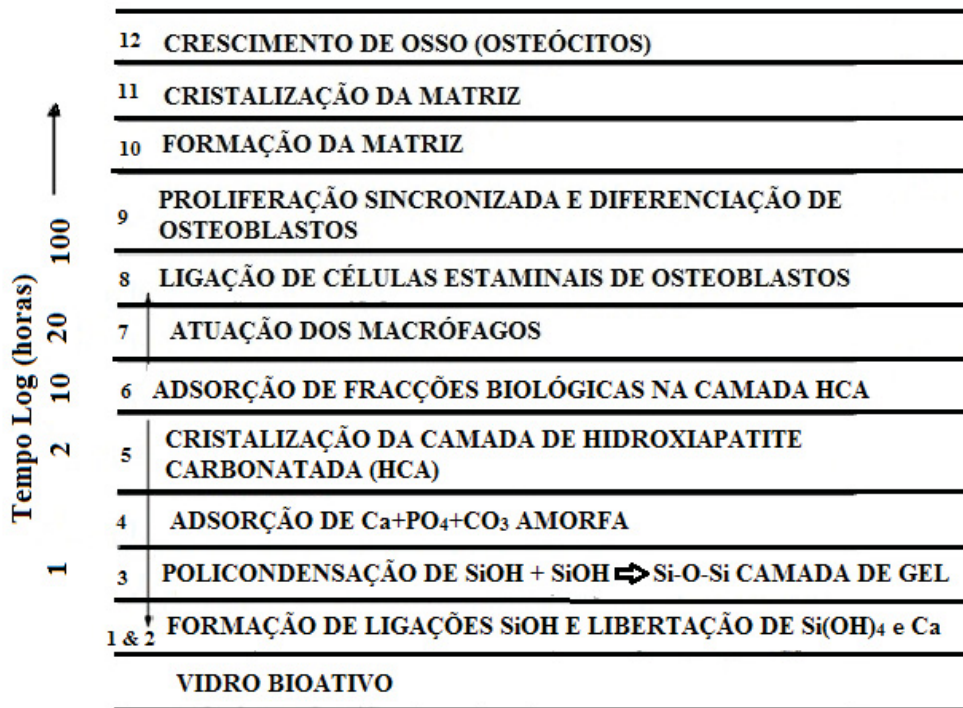


Figura 10: Sequência de reações envolvidas (12 fases) na formação de novo osso (osteogénese) ligado a uma superfície de vidro bioativo 45S5 (adaptado de Hench & Greenspan 2013).

4 - Mecanismos de reação bioativos: Controlo genético do ciclo celular de osteoblastos

Para se formar um osso novo, é essencial que as células osteogénicas sofram mitose. A maior parte dos tecidos estruturais passa por um período de vida, morte e substituição por novas células. O tecido ósseo apresenta reabsorção e remodelação, com perda de osteócitos e novos osteóides produzidos diariamente pelos osteoblastos. Para se diferenciarem, as células osteogénicas devem receber os estímulos químicos corretos do seu ambiente local que as instruem a entrar no ciclo celular. Para entender melhor este mecanismo, o ciclo de vida dos osteoblastos (células que produzem a matriz inorgânica de hidroxiapatite) é esquematicamente apresentado na Figura 11. (Hench 2006; Välimäki *et al.*, 2005; Xynos *et al.*, 2001).

O ciclo celular compreende os processos que ocorrem desde a formação de uma célula até à sua própria divisão. As quatro fases sucessivas do ciclo de divisão de uma célula são chamadas de G1, S, G2 e M. Considera-se ainda que uma célula em repouso está no estado G0. Na fase G1 as células crescem e desenvolvem com normalidade todo o seu processo metabólico. Posteriormente entram na fase S, onde iniciam a síntese de ADN. Logo que todos os cromossomas estejam duplicados, ocorre uma fase de crescimento secundário (G2), e, finalmente, de divisão (fase M, ou mitose). Este ciclo não é absolutamente sequencial, existem alguns mecanismos de resposta nas células que controlam o estado da mesma antes de mudar de uma fase para a próxima. Se o controlo falhar, a célula entra na fase de morte programada, denominada apoptose.

Materiais bioinertes ou materiais bioativos de classe B não produzem o ambiente químico local para permitir que as células osteogénicas presentes passem através destes pontos de verificação do ciclo celular. Somente materiais bioativos de classe A produzem uma rápida formação óssea *in vivo*, um processo denominado osteossíntese (Hench 2006).

A arquitectura 3-D de osso mineralizado é criada pelos osteoblastos, quando as células são expostas a concentrações críticas dos constituintes iónicos solúveis libertados pelos biovidros implantados. A capacidade do biovidro em libertar as concentrações críticas de iões biologicamente ativos, sobretudo à taxa adequada, permite a proliferação e a diferenciação celular (Hench 2006).

Estudos de biologia molecular realizados por Xynos *et al.*, mostraram que o ciclo celular dos osteoblastos está também sob controle genético. A exposição de algumas horas de osteoblastos humanos a fragmentos de 45S5 Bioglass[®] levou à ativação de várias famílias de genes, incluindo fatores de crescimento, especialmente IGF-II juntamente com as proteínas de ligação IGF e proteases que clivam a ligação IGF-II a partir das suas proteínas de ligação. Xynos *et al.*, verificaram um aumento de expressão de 200 a 500% destes genes em relação às culturas de controlo. A ativação de vários genes de resposta imediata e a síntese de fatores de crescimento provavelmente modulam a resposta do ciclo celular dos osteoblastos aos biovidros. Estes resultados indicam que os biovidros da classe A aumentam a formação de novo osso (osteogénese) através de um controlo direto sobre os genes que regulam a indução e a progressão do ciclo celular (Hench *et al.*, 2004; Hench 2006; Hench *et al.*, 2010; Xynos *et al.*, 2001).

O ciclo celular não se limita apenas a proporcionar a estrutura para a proliferação celular, mas também determina, em certa medida, o comprometimento e a diferenciação celular. O osteoblasto é uma célula capaz de proliferar e sintetizar produtos específicos das células ósseas, tais como osteócitos e colagénio de tipo I. Os osteócitos são pós-mitóticos e não sofrem divisão celular. No entanto, são capazes de sintetizar e manter a matriz de osso mineralizado. Assim, os osteócitos representam a população de células responsáveis pela produção da matriz extracelular e pela mineralização, considerado o passo final no desenvolvimento ósseo e provavelmente o mais importante, tendo em conta a importância da ligação de colagénio-HCA na determinação da função mecânica do osso (Hench 2006).

Portanto, é importante observar que o resultado final do ciclo celular ativado pelos produtos iónicos de dissolução do biovidro é a supra-regulação de numerosos genes que expressam citocinas, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular. Além disso, há um aumento de 700% na expressão de CD44, um marcador específico da diferenciação fenotípica dos osteócitos (Hench 2006; Xynos *et al.*, 2001).

Xynos *et al.* também mostraram, através da análise cDNA microarray, que houve um aumento de 320% na expressão de um fator de crescimento mitogénico de osteoblastos, fator de crescimento semelhante ao IGF-II, quando os osteoblastos foram expostos a estímulos de biovidros. IGF-II é o fator de crescimento mais abundante no osso e é também um indutor de proliferação de osteoblastos *in vitro*. Os resultados indicam que os produtos da dissolução iónica do Bioglass[®] podem aumentar a disponibilidade de IGF-II em osteoblastos por indução da transcrição do fator de crescimento e a sua proteína transportadora e também regulando a dissociação deste fator a partir da sua ligação às proteínas. (Hench 2006).

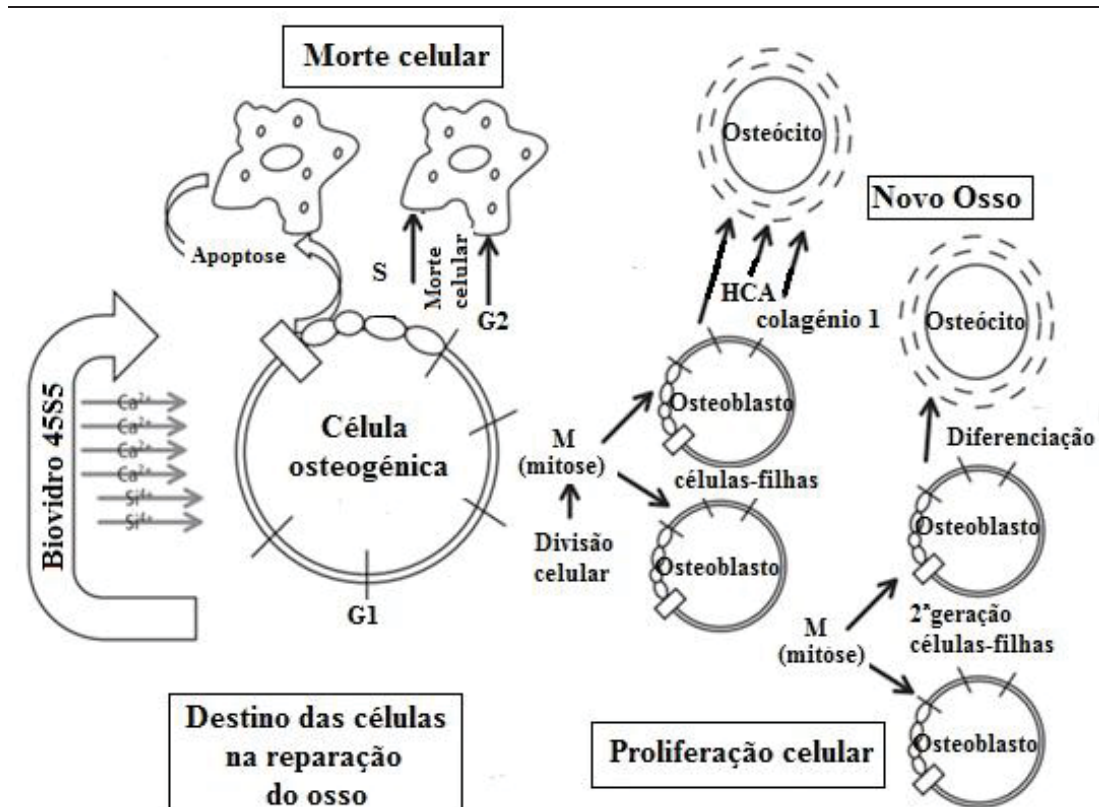


Figura 11: Esquema do ciclo celular de células osteogênicas de osteoblastos conduzindo à (1) morte celular programada (apoptose), (2) à mitose e proliferação celular ou (3) à diferenciação celular terminal em direção a um osteócito, quando expostos a produtos bioativos de dissolução iônica libertados pelo Bioglass® (adaptado de Hench *et al.*, 2010).

5 - A composição e a função dos vários componentes óxidos do biovidro

Como referido anteriormente, no final da década de 60, Larry Hench introduziu os primeiros vidros com fins biomédicos, que apresentavam uma estrutura à base de sílica (vidros silicatados), contendo também P_2O_5 , e outros óxidos do tipo alcalino (frequentemente Na_2O) e alcalino-terrosos, obrigatoriamente CaO . As quantidades de CaO e P_2O_5 eram, em muitas das situações, escolhidas para que a razão atômica Ca/P fosse próxima de 1,67 (valor correspondente à hidroxiapatite estequiométrica). Os íons alcalinos eram introduzidos com o objetivo de facilitar o processamento vítreo e de controlar a estabilidade química dos biovidros. O papel do SiO_2 era exclusivamente o de formador de vidro (Hench 1991; Pernot *et al.*, 1979; Pernot *et al.*, 1983). Contudo, graças às técnicas experimentais cada vez mais sofisticadas, foi possível avançar com a investigação e, verificar, por exemplo, que quando o biovidro entra em contacto com os tecidos, sofre um processo de degradação progressiva, por hidrólise, cedendo gradualmente ao meio biológico

envolvente os seus próprios constituintes, formando-se um revestimento na superfície do biovidro, cuja composição é reconhecida pelas células da linha osteoblástica como um substrato físico para a deposição de matriz óssea. Isso permitiu aos investigadores definir outras funções aos vários óxidos constituintes dos biovidros, identificando um conjunto de princípios considerados, hoje em dia, fundamentais para explicar o fenómeno da bioatividade dos materiais.

5.1 - A SiO₂

A incorporação de sílica em biomateriais poderia parecer algo despropositada, uma vez que a presença de silício em mamíferos não é abundante. Contudo, o silício parece ser bem tolerado no organismo humano desde que, quando em excesso, possa ser facilmente eliminado pelo organismo. Em relação à sua função nos tecidos ósseos, experiências realizadas em roedores permitiram concluir que, embora em pequenas quantidades, o silício está presente em tecidos conjuntivos e ósseos jovens em pleno processo de calcificação. A sua ausência é associada a deficientes formações ósseas. Nestes casos, é suposto que o papel do silício seja o de agente de nucleação na deposição de cálcio, sob a forma de silicato de cálcio (Jugdaohsingh 2009).

Do ponto de vista da composição dos biovidros, e independentemente das diferentes interpretações biológicas, incluindo a hipótese de Hench, verifica-se que a presença de silício na composição dos biovidros é de extrema importância para a formação da camada de HCA. Por exemplo, vidros do sistema SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ com elevada concentração de sílica (50 - 60%) formam primeiro uma camada de sílica gel (camada porosa rica em SiO₂) e só depois a camada de hidroxiapatite sobre a primeira. Em vidros com baixa concentração de sílica (mas não inferior a 40%) as duas camadas formam-se em simultâneo. Esta diferença de comportamento resulta da diferença nas durabilidades químicas dos vidros, a qual influencia a respetiva cinética de dissolução.

Tilocca 2009, demonstrou que vidros sol-gel do sistema binário SiO₂-CaO exibiam bioatividade mesmo contendo altas concentrações de SiO₂ (90%).

Numa experiência realizada por Porter *et al.*, 2004, que consistiu na implantação *in vivo* (num modelo ovino), de grânulos sintetizados de hidroxiapatite e cerâmicas Si-HCA, durante 6 e 12 semanas, verificou que a morfologia dos depósitos de hidroxiapatite e a sequência de eventos nas interfaces do osso com a

hidroxiapatite pura e com os implantes Si-HCA, eram diferentes. Logo após as primeiras 6 semanas foram encontradas fibrilhas de colagénio organizadas na interface osso / Si-HCA, enquanto junto ao implante de HCA puro só surgiram após 12 semanas. Ainda verificou que era em torno de Si-HCA que se formava a maior quantidade de cristais nodulares de hidroxiapatite. Estes resultados sugerem que a incorporação de iões de silício em HCA promove processos de remodelação óssea.

5.2 - O P_2O_5

O fósforo era inicialmente utilizado com o objetivo de aproximar a composição dos vidros à da composição óssea. Assim, foram desenvolvidos vidros cerâmicos para aplicações clínicas à base de fósforo (livres de sílica). Rapidamente se percebeu que a sua importância era discutível. Kokubo 1990 e Andersson & Karlsson 1990 concluíram que os iões fosfato necessários à formação da apatite superficial provinham essencialmente da solução envolvente. Tilocca 2009 desenvolveu vidros, sem fósforo, no sistema binário CaO-SiO₂ que se confirmou serem efetivamente bioativos. Mais tarde concluiu-se que vidros do sistema Na₂O-CaO-SiO₂ podem também apresentar uma bioatividade tão elevada quanto à do Bioglass® (Kim *et al.*, 1995).

A realização de testes *in vitro* e *in vivo* mostrou que a adição de P₂O₅ a vidros do sistema CaO-SiO₂ tinha um efeito não só no aumento da reatividade superficial do vidro mas também fortalecia a ligação aos tecidos ósseos (Ebisawa *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1995). Assim, embora dispensável quanto aos efeitos na bioatividade, a inclusão de fósforo na composição vítrea promove o aumento da nucleação de fosfatos de cálcio à superfície, tornando esses vidros muito promissores para aplicações de odontologia e ortopedia (Ali *et al.*, 2014).

6 - Teste de bioatividade *in vitro* - Simulated body fluid (SBF)

Devido às dificuldades experimentais e éticas inerentes aos procedimentos *in vivo*, vários procedimentos *in vitro* foram propostos para se testar a bioatividade de materiais sintéticos. Estudos pioneiros deste tipo foram realizados por Hench *et al.*, os quais mostraram o crescimento da camada de HCA, *in vitro*, em biovidros que libertavam iões de cálcio e fósforo para o meio, testando-os numa solução de água destilada tamponada com tris-hidroximetil-amino-metano e HCl (tampão tris) a um pH de 7,25 a 37 °C. Entretanto, quando outros tipos de biovidros, que não continham

cálcio e fósforo na sua composição original, mas que apresentavam bioatividade *in vivo*, eram imersos no tampão tris, não ocorria o crescimento da camada de HCA (Andrade & Domingues 2006, Ogino *et al.*, 1980; Salinas *et al.*, 2000).

Em 1990, Kokubo *et al.*, propôs uma nova solução aquosa para testes de bioatividade contendo concentrações de íons semelhantes às presentes no plasma humano e tamponada com tris-hidroximetil-amino-metano. Tal solução foi capaz de induzir mudanças estruturais na superfície de materiais bioativos semelhantes às apresentadas *in vivo*, ou seja, formava-se uma camada de HCA. Esta solução, chamada de “Simulated Body Fluid” (SBF), é acelular, livre de proteínas e apresenta um pH de 7,40. (Kokubo *et al.*, 1990) A sua composição é comparada à composição iônica do plasma sanguíneo na Tabela 6.

De acordo com a tabela 6, deve notar-se que o SBF original usado por Kokubo *et al.* e Hench *et al.* carece de íons SO_4^{2-} , os quais estão presentes no plasma sanguíneo. Em 1991, o lapso foi corrigido por Kokubo. Desde então, o SBF corrigido (c-SBF) tem sido utilizado por vários investigadores (Filgueiras *et al.*, 1993; Kokubo *et al.*, 1990; Kokubo 1991; Kokubo & Takadama 2006).

Mais tarde, em 1995, Cho *et al.*, propuseram uma receita aprofundada para a preparação do SBF sem que esta precipite, visto a solução de SBF ser supersaturada e de difícil preparação sem precipitação (Cho *et al.*, 1995; Kokubo & Takadama 2006).

No entanto, através da tabela 6, pode ser visto que o c-SBF é ainda mais rico em íons Cl^- e mais pobre em íons HCO_3^- , quando comparado com os íons do plasma sanguíneo humano. Em 2003, Oyane *et al.* tentou corrigir esta diferença, através da preparação de uma solução SBF revista (r-SBF) diminuindo a concentração de Cl^- e aumentando a de HCO_3^- para níveis mais próximos dos do plasma sanguíneo. No entanto, o carbonato de cálcio tem uma forte tendência para precipitar. Deste modo, em 2004, Takadama *et al.* propôs um novo SBF (n-SBF) em que diminuiu apenas a concentração de íons de Cl^- para o nível do plasma sanguíneo humano, deixando a concentração de íons do HCO_3^- igual ao do c-SBF. Esta melhoria do SBF foi comparada com o corrigido, e como resultado, confirmou-se que o c-SBF não diferia do n-SBF em estabilidade e reprodutibilidade. Deste modo, o método para a preparação de c-SBF foi cuidadosamente verificado e aperfeiçoado para que o SBF fosse facilmente preparado. Em 2003, o c-SBF com a receita aperfeiçoada foi proposto ao Comitê Técnico ISO / TC150 da *International Organization for*

Standardization como uma solução para a medição *in vitro* da capacidade de formação de apatite em materiais de implante (Kokubo & Takadama 2006; Machado, 2007; Oyane *et al.*, 2003).

Outros autores defendem que a solução c-SBF ainda deve ser melhorada, uma vez que, para a preparação da solução, o processo é longo e complicado, as soluções não são filtradas, e o teor de carbonato não é controlado. Além disso, a utilização de c-SBF, para testes de bioatividade, leva a falsos positivos, como também a falsos negativos. Apesar destas críticas, o uso do protocolo *in vitro*, proposto por Kokubo & Takadama, para testar o potencial de ligação de um material ao osso mantém-se um conceituado método (Bohner & Lemaître 2009).

Tabela 6: Concentração iônica do plasma sanguíneo humano e das soluções que simulam o fluido corporal (SBF) (Kokubo & Takadama 2006)

	Concentração de iões							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma sanguíneo humano	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF original	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0	0.0
SBF corrigido (c-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5
SBF revista (r-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF novo (n-SBF)	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	4.2	1.0	0.5

O procedimento atualmente mais usado para o teste de bioatividade *in vitro* consiste em imergir o material a ser testado em solução SBF por períodos de tempo entre 3 horas e 15 dias e verificar se houve formação de HCA na superfície do material. Materiais com diferentes graus de bioatividade são classificados de acordo com o tempo necessário para o aparecimento da camada de HCA, de acordo com o Ib proposto por Hench (Andrade & Domingues 2006).

Capítulo III – Obtenção de vidros pelo processo sol-gel

1 - Introdução

Além do processo de fusão, os vidros também podem ser obtidos através do processo sol-gel, a técnica de síntese que foi utilizada neste trabalho. Uma das vantagens deste método deve-se à homogeneidade química à escala molecular que pode ser obtida na preparação dos vidros. O uso de agentes complexos de iões metálicos permite aumentar a homogeneidade de distribuição destes iões na rede formada pela sílica. Este processo, além de apresentar um custo reduzido em relação aos processos convencionais, abriu inúmeras possibilidades de se produzir materiais com características específicas que não seriam possíveis utilizando os métodos convencionais. Uma das principais diferenças entre os vidros obtidos por sol-gel e os obtidos pela fusão dos seus componentes, encontra-se nas respectivas áreas superficiais: para os vidros de sol-gel, a área superficial varia de aproximadamente entre 250 a 700 m²/g, enquanto os vidros de fusão exibem, tipicamente, áreas superficiais inferiores a 1,2 m²/g. Esta grande diferença é devido às distintas condições de processamento dos dois tipos de materiais, especialmente no que se refere à temperatura de síntese: os vidros de sol-gel são sintetizados em meio aquoso, efetuando-se uma secagem simples a T<100°C e, finalmente, a sinterização a temperaturas que, normalmente não ultrapassem os 700°C. As propriedades estruturais (como por exemplo, a área superficial e a porosidade) podem ser definidas controlando a composição e as condições da síntese. Desta forma, também é possível obterem-se materiais nanoestruturados (Brinker & Scherer 1990).

Os vidros bioativos obtidos por fusão são aquecidos previamente acima do maior ponto de fusão dos componentes da mistura, normalmente a temperaturas superiores a 1000°C, usando um procedimento análogo ao utilizado para fundir vidros de janela comuns. O material resultante não tem qualquer porosidade, e a área de superfície depende somente do tamanho das partículas obtidas após a moagem de pós (Shelby 2005).

A camada de HCA é mais facilmente precipitada e de forma muito mais rápida em vidros bioativos sol-gel do que no de fusão tradicional. Com efeito, é atribuída à estrutura porosa dos vidros bioativos sol-gel, a maior facilidade na formação da camada interfacial de HCA, na qual, como já foi referido, moléculas biológicas podem entrar, manter a sua configuração estrutural e a sua atividade

biológica. Desta forma, próteses de vidros de sol-gel podem não ser reconhecidas com intrusos no hospedeiro.

A bioatividade foi demonstrada em diversos vidros sintetizados pela técnica sol-gel e imersos em fluidos corporais simulados (SBF). Algumas das composições selecionadas ocorreram nos sistemas CaO-SiO₂ (Izquierdo-Barba *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2000; Saravanapavan *et al.*, 2003), SiO₂-CaO-P₂O₅ (Peitl *et al.*, 2001; Peltola *et al.*, 1999; Vallet-Regi *et al.*, 1999) e SiO₂-CaO-P₂O₅-MgO (Perez-Pariente *et al.*, 1999; Perez-Pariente *et al.*, 2000). Em geral, a uma maior quantidade de SiO₂ na composição do vidro corresponde a uma maior área superficial mas menor fração porosa. Por outro lado, as temperaturas mais elevadas utilizadas no processo de síntese diminuem a área superficial do vidro.

O processo sol-gel tem sido amplamente investigado para a síntese de materiais inorgânicos (Chen *et al.*, 1986; Pope & Mackenzie 1986) e representa atualmente uma alternativa eficaz na produção de vidros com propriedades especiais.

O processo sol-gel pode ser definido como um método de síntese química a baixa temperatura que permite a obtenção de materiais cerâmicos e vítreos sob a forma de sólidos (monólitos), pós, filmes (revestimentos), ou fibras. O processo é iniciado pela obtenção de uma solução de alcóxidos (sol), que evolui para um estado de gel (pré-vítreo) através de reações de hidrólise e policondensação, condicionadas por um número considerável de parâmetros (catálise, temperatura, grau de hidrólise, etc.) (Brinker & Scherer 1990; Pierre 1998).

A primeira preparação de materiais vítreos através do método sol-gel foi obtida por Ebelman e Graham no século XIX, que nos seus estudos sobre géis de sílica puderam observar que a hidrólise do alcóxido ortosilicato de tetraetilo (TEOS), C₈H₂₀O₄Si, em condições de catálise ácida resultava na produção de SiO₂. Porém as limitações impostas pela incapacidade de evitar a fratura dos vidros durante o processo de secagem que, por esse facto, tinha que ser muito longo (cerca de um ano) fizeram com que a comunidade industrial e científica perdesse o interesse nestes materiais e se afastasse durante quase um século (Diaz *et al.*, 2012; Ebelman 1846; Graham 1864).

O interesse por este processo foi retomado devido aos trabalhos de Roy que resultaram essencialmente da demonstração de que era possível obter um produto com características vítreas por uma via totalmente diferente da tradicional fusão de óxidos. Além disso, as baixas temperaturas usadas, o grau de pureza muito superior

ao obtido pelas técnicas tradicionais (só dependente da pureza dos reagentes iniciais) e as qualidades ópticas finais apresentadas eram importantes vantagens. Uma vantagem adicional resultava da possibilidade de preparação de cerâmicas inovadoras à base de óxidos de Al, Ti, Si, Zr, etc., que seriam impossíveis de obter pelos métodos tradicionais (Pierre 1998; Roy 1956).

A preparação do sol-gel, desde a escolha dos reagentes até ao produto final pretendido, envolve um complexo conjunto de etapas em que estão presentes diversos processos químicos (e.g. hidrólise e condensação) e físicos (e.g. secagem).

A denominação de sol-gel para esta técnica de preparação de materiais advém de uma das suas etapas mais importantes que consiste no momento de transição de uma fase *sol* para uma fase *gel*. Um *sol* consiste numa dispersão coloidal de partículas, com dimensões compreendidas entre 1 e 200 nm, num líquido denominado solvente. No entanto, o termo solução é mais utilizado para um *sol* quando as partículas em suspensão têm pequenas dimensões. Devido à sua reduzida massa, as forças gravitacionais a que estas partículas estão sujeitas podem ser negligenciáveis o que se traduz numa fase estável no fluido ao mesmo tempo que a sua inércia é suficientemente pequena para as mesmas partículas apresentarem movimentos brownianos (Brinker & Scherer 1990).

Um *gel* é, geralmente, um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios. É composto por uma rede tridimensional, sólida e porosa, preenchida por um meio líquido. Desse modo, os géis coloidais resultam da agregação linear de partículas primárias, que só pode ocorrer pela alteração apropriada das condições físico-químicas da suspensão. Por outro lado, os géis poliméricos são, geralmente, preparados a partir de soluções onde se promovem reações de polimerização. Neste caso a gelificação ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas lineares (Alfaya & Kubota 2002; Brinker & Scherer 1990; Iler 1979; Pierre 1998). A figura 12 ilustra, simplifadamente, as etapas que ocorrem na síntese sol-gel.

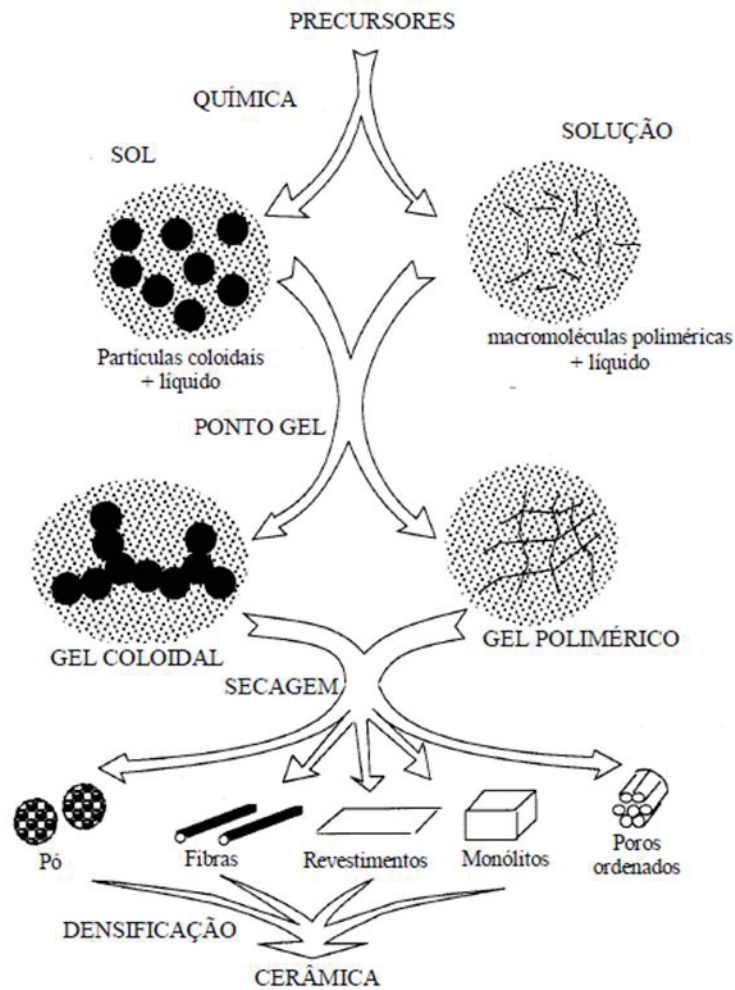


Figura 12: Esquema simplificado do processo sol-gel (Moreira 2005).

2 - Etapas do processo químico

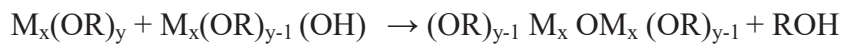
O processo de sol-gel pode ser dividido em duas classes, dependendo da natureza do precursor inorgânico utilizado: a dos sais (cloretos, nitratos, sulfetos, etc.) e a dos alcóxidos. A rota que envolve o uso de precursores do tipo alcóxido aparece atualmente como a mais versátil (Alfaya & Kubota 2002).

As principais etapas envolvidas na transformação de um precursor molecular num óxido inorgânico através deste método podem ser sumarizadas nas etapas de hidrólise e policondensação que são descritas abaixo, considerando-se a utilização de um único alcóxido de fórmula geral $M_x(OR)_y$:

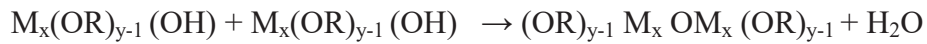
- Hidrólise



-
- Condensação alcoólica



- Condensação aquosa



em que M representa o íon metálico, R representa um grupo alquila, logo OR é um grupo alcóxido e ROH o seu respetivo álcool.

A hidrólise é o primeiro passo do processo, iniciado com a mistura do precursor com água, na presença de um solvente alcoólico e de um catalisador (ácido ou básico), sem o qual a reação não progride. À medida que a reação decorre formam-se ligações entre o metal, M, e os grupos hidroxila (M-OH). A etapa de condensação das espécies M-OH leva à formação de ligações M-O-M, e ocorrem por via de dois mecanismos em competição: a condensação de dois grupos hidróxidos, com formação de água; e a condensação de um grupo hidróxido com um grupo alcóxido, com formação de álcool. Desta forma, a policondensação destas espécies M-OH gera uma rede polimérica, permanecendo a água e o álcool, obtidos como produtos de reação, aprisionados na rede. Neste passo, o centro nucleofílico das moléculas de água “ataca” o metal central do alcóxido deficiente de eletrões devido à presença do oxigénio fortemente eletronegativo, formando uma espécie intermediária pentavalente, após a qual a transferência de um protão é seguida da quebra da ligação dos grupos ROH. Este processo geral pode dividir-se em dois processos ligeiramente diferentes conforme a reação ocorra com catálise básica ou ácida (Alfaya & Kubota 2002; Brinker & Scherer 1990).

Se o elemento M for o Si, as reações de hidrólise e policondensação formam as ligações características da matriz vítrea da sílica. Estas reações (quer de hidrólise, quer de policondensação) são reversíveis e ocorrem simultaneamente em solução. As primeiras reações de hidrólise e policondensação sobre as moléculas dos precursores dão origem a monómeros e dímeros e, à medida que prosseguem, dão origem a macromoléculas cada vez mais complexas, cuja estrutura e morfologia dependem da cinética das reações envolvidas, influenciada por parâmetros químicos (Alfaya & Kubota 2002; Brinker & Scherer 1990; Siqueira 2010; Zhong & Greenspan 2000).

Do mecanismo de sol-gel apenas a primeira etapa, a hidrólise, é bem conhecida, pois as reações de condensação começam antes das reações de hidrólise

terminarem, tornando o mecanismo muito complexo e envolvendo muitas reações de hidrólise e condensação simultâneas (Alfaya & Kubota 2002).

3 - Gelificação

À medida que as reações de hidrólise e policondensação prosseguem, a viscosidade da solução aumenta até atingir um ponto de transição, denominado ponto de gelificação. Esta passagem é normalmente acompanhada por um aumento abrupto da viscosidade, resultado da formação de uma rede tridimensional embebida num meio líquido (Pierre 1998).

O tempo necessário para se atingir o ponto de gelificação é denominado *tempo de envelhecimento*. Este parâmetro, assim como a evolução da viscosidade ao longo do tempo, depende dos fatores mencionados na secção anterior. A viscosidade de uma solução é um parâmetro importante para o processo de deposição de filmes, e deve ser monitorizada. A preparação de materiais com a mesma composição mas com diferentes configurações (sólidos, filmes, fibras, etc.) é possibilitada para diferentes condições da viscosidade. A figura 13 mostra a evolução temporal da viscosidade e da constante elástica de corte no período pós-gelificação, destacando a transição sol-gel (ponto de gelificação).

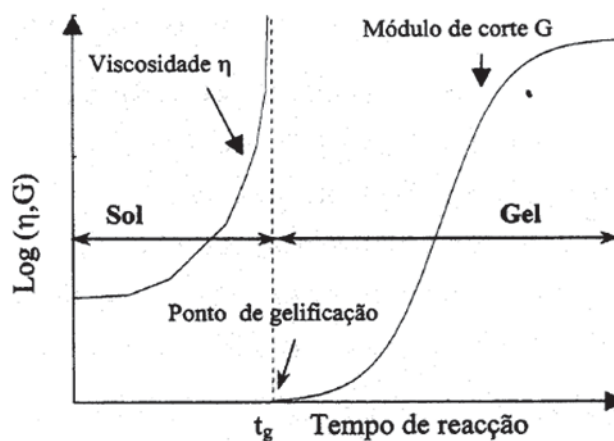


Figura 13: Evolução da viscosidade na fase sol e da constante elástica de corte na fase gel (Pierre 1998)

4 - Secagem

Após suceder a gelificação, a fase líquida é removida do interior dos poros por evaporação, etapa denominada de secagem, ocorrendo simultaneamente um aumento da interligação entre as cadeias por meio das reações de condensação que, progressivamente, vão fortalecendo ainda mais a rede. Essa secagem pode ser acelerada através de temperatura controlada, no interior de muflas. Durante a secagem, quando os poros são pequenos, ocorrem grandes tensões capilares na estrutura (Hench & West 1990; Moreira 2005). O aquecimento durante a secagem também remove os subprodutos dos precursores, tais como restos de solvente ou outros componentes como os nitratos, precursores, por exemplo, de cálcio ou sódio. Este processo a baixa temperatura também permite fabricar scaffolds porosos, com a vantagem adicional de incorporação de polímeros e moléculas orgânicas com o objetivo de se obter materiais híbridos, menos frágeis (Jones 2013).

A figura 14 apresenta um fluxograma do processo sol-gel de catálise ácida.

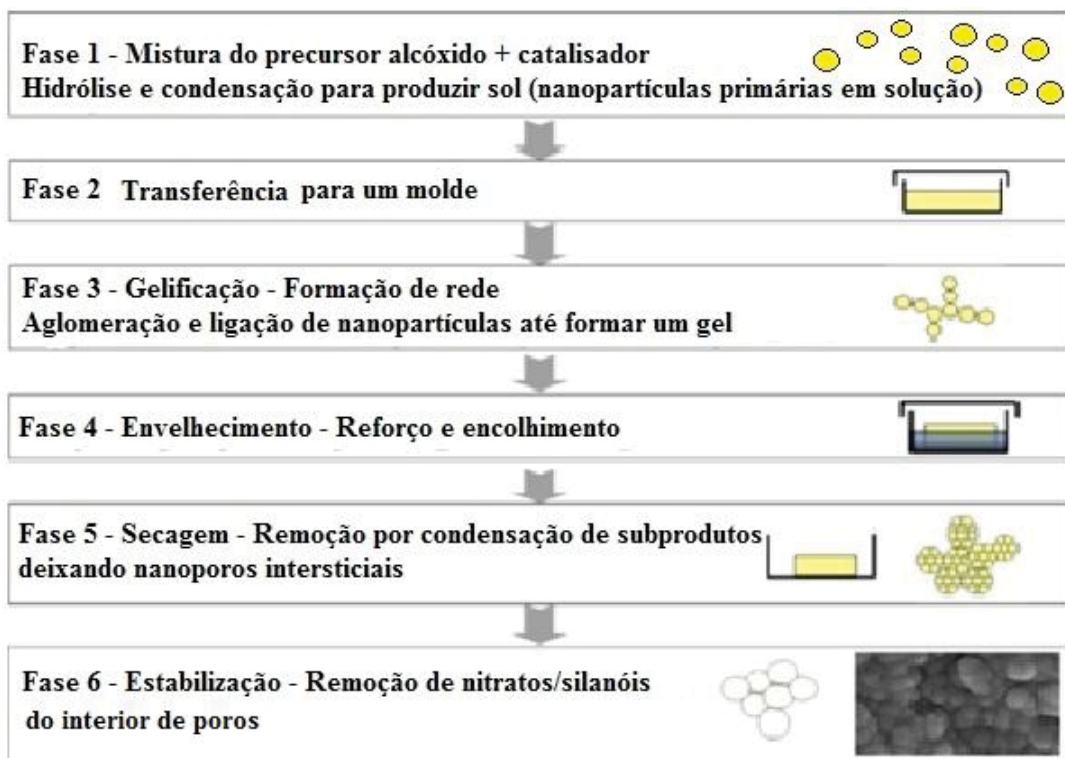


Figura 14: Fluxograma do processo sol-gel de catálise ácida, da síntese de um biovidro com esquemas da evolução do gel e a sua nanoporosidade (adaptado de Jones 2013).

5 - Influência de alguns parâmetros químicos na cinética das reações

Vários parâmetros de natureza química influenciam as velocidades de hidrólise e policondensação envolvendo as diversas espécies moleculares existentes na solução. Quando estas estruturas atingem dimensões macroscópicas, podem gerar um gel com características próprias, ou então soluções coloidais ou precipitados. Estas refletem processos diferentes de crescimento das partículas. O estudo e, conseqüentemente, o conhecimento dos efeitos destes parâmetros é essencial para produzir o material final com as propriedades desejadas (Milea *et al.*, 2011; Moreira 2005).

As diferentes reatividades dos precursores, relacionadas com a natureza do elemento M e do radical R, originam taxas de hidrólise variadas, portanto, é necessário ter em conta este facto quando os precursores são misturados em solução.

Os alcóxidos de silício não são muito reativos e, portanto, levam algum tempo (podendo alcançar várias semanas ou meses) a gelificar quando é adicionada água com pH neutro. No entanto, a hidrólise pode ser acelerada, usando catalisadores para este efeito. Além disso, a reatividade do precursor é ainda dependente do grupo alcóxido envolvido. Assim, quanto maior for o radical alcóxido, mais forte se torna a ligação Si-OR, mais difícil se torna a substituição do radical alcóxido OR pelo grupo hidróxido OH, e por isso o alcóxido torna-se menos reativo (Moreira 2005; Pierre 1998).

A razão molar H₂O/alcóxidos é um dos parâmetros mais importantes da química do processo sol-gel, na medida em que define a quantidade de água necessária para a hidrólise e condensação dos precursores. Ainda mais importante é o efeito do pH da solução, estabelecido através da introdução de um catalisador (ácido ou básico), com efeito no crescimento das partículas, o que se refletirá nas propriedades dos géis. É geralmente aceite que, para soluções catalisadas por ácidos, obtêm-se uma estrutura constituída por cadeias poliméricas lineares, e que para soluções catalisadas por bases obtêm-se aglomerados de partículas coloidais densas (Milea *et al.*, 2011).

Para além destes parâmetros, há a considerar o efeito do solvente, o tempo de envelhecimento e a temperatura, sabendo-se que a reação de hidrólise se intensifica com o aumento da temperatura assim como a evaporação do solvente, fazendo com que as partículas se aproximem mais rapidamente, favorecendo as reações de condensação. A viscosidade da solução aumenta até se atingir o estado de *gel*.

Finalmente, há um conjunto de fatores relacionados com as condições experimentais, tais como a ordem de adição de todos os reagentes, a agitação da solução e os fatores ambientais no local: temperatura e pressão atmosférica (Moreira 2005; Pope & Mackenzie 1986).

6 - Propriedades físicas

As etapas de gelificação e de secagem influenciam a estrutura final do gel (Brinker & Scherer 1990; Hench & West 1990). Após estas etapas, o gel seco passa por uma série de processos distintos dependendo das características e aplicações do material final pretendido. No esquema da Figura 15 tem-se vários possíveis produtos finais, de acordo com os tratamentos introduzidos após ou durante o processo de reação.

É importante referir que, as propriedades físicas finais (isto é, área superficial específica, tamanho médio dos poros e sua distribuição) de um gel seco, dependem fortemente dos parâmetros utilizados no processo de sol-gel. A razão molar água/alcóxido, a natureza e a concentração do catalisador e o tipo do precursor alcóxido são parâmetros específicos que afetam fortemente as velocidades relativas das reações de hidrólise e condensação, as quais, por sua vez, ditam as propriedades do material final. Em geral, um pH ácido e um baixo teor de água produzem materiais mais densos com tamanho médio de poros pequenos, enquanto valores de pH alcalino e elevados teores de água produzem materiais mais porosos (Alfaya & Kubota 2002; Brinker & Scherer 1990).

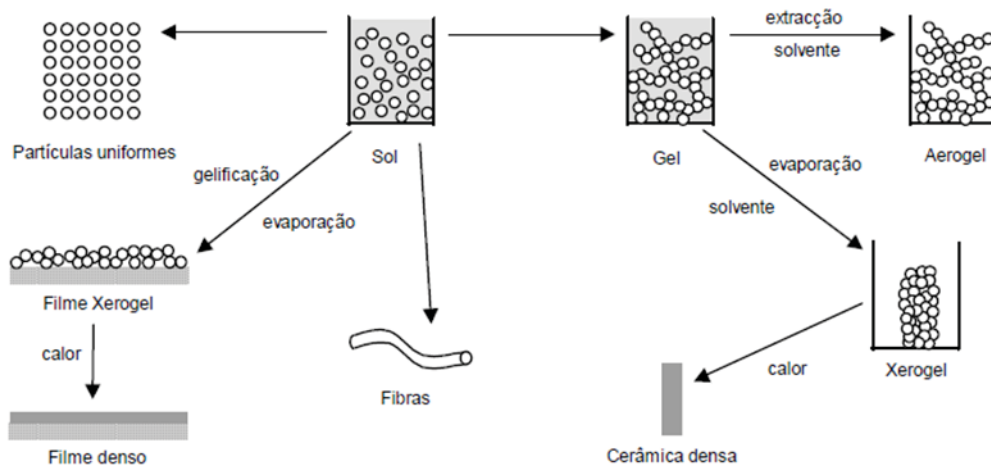


Figura 15: Esquema das diferentes etapas da produção de derivados de sol-gel (Pereira 2004)

Após a gelificação e durante as fases de “envelhecimento” e secagem ocorre uma redução do volume do gel, devido à expulsão de água e/ou solvente que estavam retidos nos poros. Estabelecem-se conseqüentemente gradientes de pressão entre o interior dos poros e a restante matriz que podem provocar o aparecimento de fissuras e a fratura do gel. Contudo, é possível evitar ou prevenir a fissuração adotando procedimentos complementares, como por exemplo, a utilização de temperaturas e pressões superiores aos valores críticos de evaporação dos solventes; usar a secagem “gelada” que corresponde a congelar o líquido nos poros e a proceder de seguida à sublimação do restante sólido, sob vácuo; e à utilização de surfactantes que reduzam a tensão de secagem (Ibrahim & Ibrahim 2013). A adição de surfactantes reduz a ocorrência de fraturas, diminuindo as energias de interface e, portanto, reduzindo as pressões capilares. No entanto, a inclusão destes compostos químicos tem a desvantagem de introduzirem moléculas de dimensões consideráveis na estrutura do gel, não removíveis, e que podem influenciar as propriedades pretendidas. (Anderson & Binions 2014; Pereira 2004).

A densificação corresponde à última etapa na obtenção de um vidro sol-gel. Portanto, após uma sinterização (eliminação de porosidade) a uma temperatura apropriada, normalmente superior a 500°C, os grupos orgânicos (solventes) e moléculas de água (grupos OH⁻) são eliminados, havendo a formação de uma rede 3-D de óxido M-O-M, que cria a estrutura final do vidro.

Capítulo IV - Materiais e Métodos

Neste capítulo são explicadas, com algum detalhe, as técnicas e protocolos experimentais utilizados no trabalho realizado.

A figura 16 ilustra, resumidamente, as etapas utilizadas ao longo deste estudo.

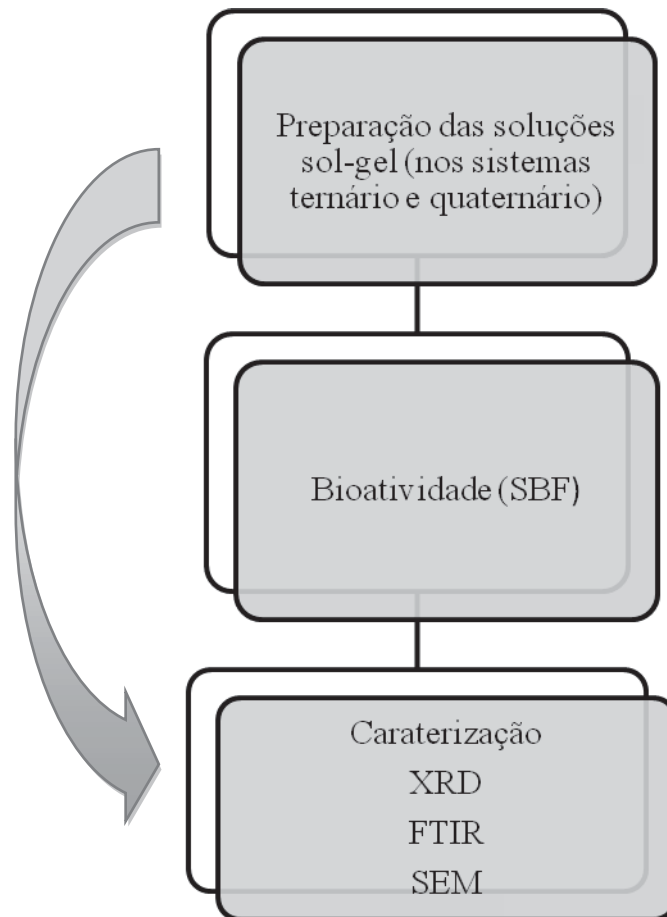


Figura 16: Etapas realizadas ao longo do estudo

1 - Preparação dos biovidros do sistema ternário $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ e quaternário $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$

Pós bioativos vítreos do sistema ternário, $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, e do sistema quaternário, $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$, foram sintetizados utilizando o processo sol-gel. Na tabela 7 constam todos os reagentes utilizados neste processo.

Tabela 7: Reagentes utilizados para a síntese dos pós bioativos vítreos do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ e $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ e a sua função no processo sol-gel.

Reagente	Fórmula química	Origem	Pureza	Função
Nitrato de cálcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich	99%	Precursor
Ortosilicato de tetraetilo (TEOS)	$\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$	Aldrich	98%	Precursor
Fosfato Triethyl (TEP)	$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$	Aldrich	99.8%	Precursor
Nitrato de sódio	NaNO_3	Sigma-Aldrich	99.5%	Precursor
Etanol absoluto	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Fisher Chemical	100%	Diluição dos precursores
Ácido clorídrico	HCl (0.1M)	Riedel de Haën	37%	Catalisador
Água desionizada	H_2O	-	-	Hidrólise dos precursores
Águas minerais	Cruz <i>et al.</i> , 2010			Hidrólise dos precursores

A composição nominal das diversas amostras, estabelecida para a realização da síntese dos vidros dos sistemas $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ e $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ é mostrada na tabela 8.

Tabela 8: Composição nominal estabelecida para a síntese dos vidros pertencentes ao sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ e $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$

	SiO_2	CaO	P_2O_5	Na_2O
45S5	46.1%	26.9%	2.6%	24.4%
58S	58%	33%	9%	-
77S	77%	14%	9%	-

% - valor expresso em mol

2 - Processo Sol-gel (síntese com água destilada e desionizada)

A preparação dos biovidros pela técnica sol-gel foi otimizada de modo a proporcionar a obtenção de vidros sem heterogeneidades químicas de composição.

2.1 - Sistema quaternário $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$

Os biovidros do sistema quaternário 45S5, foram sintetizados por sol-gel, usando água destilada e desionizada, e um catalisador ácido, de acordo com o descrito a seguir:

1. Na hote, foi colocado um gobelé sobre um agitador magnético, à temperatura ambiente;
2. TEOS, o precursor da sílica, foi adicionado ao gobelé, seguido de água destilada e desionizada, e de etanol;
3. Quando a mistura ficou homogênea, juntou-se o catalisador HCl;
4. Após 60 minutos com agitação de 8rpm, o tempo necessário para que se iniciassem as reações, foi adicionado lentamente TEP, o precursor do fósforo. A mistura ficou em agitação durante mais 30 minutos;
5. O precursor do sódio, NaNO_3 , (diluído em água) foi depois adicionado, gota-a-gota, à solução anterior, ficando a mesma a homogeneizar, sob agitação, por mais 60 minutos.
6. Finalmente, o precursor de cálcio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foi adicionado, gota-a-gota, à solução, ficando a mesma mais 60 minutos em agitação para garantir a homogeneidade química da mistura final;
Nota: O nitrato de cálcio tetrahidratado foi diluído em etanol, antes de juntar à solução.
7. A solução final foi transferida para uma caixa de petri e deixada a gelificar à temperatura ambiente;
8. Após gelificação, a amostra foi transferida para uma estufa de secagem, à temperatura de 35°C , onde permaneceu cerca de 4 a 5 dias, até à completa gelificação (envelhecimento).

2.2 - Sistema ternário

A síntese dos biovidros do sistema ternário 58S e 77S decorreu de forma análoga aos do sistema quaternário 45S5, exceto no passo 5, o qual foi obviamente suprimido.





3- Processo Sol-gel (síntese com águas altamente ionizadas - águas hidrotermais)

Foram preparadas amostras dos sistemas ternários, 58S e 77S, e quaternário 45S5, utilizando-se águas provenientes de fontes hidrotermais das Furnas (S. Miguel-Açores). O vale das Furnas é conhecido pelas suas caldeiras em ebulição, um testemunho a céu aberto da génese vulcânica do local. É lá que se encontra também a maior diversidade/m² de águas minerais e termais do arquipélago, havendo múltiplas nascentes de características físico-químicas distintas: águas alcalinas-hipertermais; águas acídulas hipertermais; águas acídulas frias fluoretadas e não fluoretadas; águas neutras frias, águas ácidas hipertermais, sulfurosas e férreas, com especificidades distintas ao nível do pH, temperatura, condutividade eletrolítica e elevada concentração de iões, como por exemplo, HCO₃⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻ e SO₄²⁻, entre muitos outros (Cruz *et al.*, 2010). A tabela 9 exhibe a designação e a composição das águas minerais utilizadas para este estudo.

Neste processo, não foi adicionado o catalisador à solução, uma vez que as águas escolhidas já apresentavam carácter ácido (valores baixos de pH), pretendendo-se observar a sua eficácia como precursores na formação de vidros sol-gel.

A otimização dos procedimentos de homogeneização foi realizada através de pequenos ajustes de água e de solvente.

Tabela 9: Composição química das águas minerais das Furnas (Cruz *et al.*, 2010)

	Miguel Henriques 	Água de Prata	Caldeirão 	Água Azeda 	Água Azeda de Rebentão 
Temp. (°C)	21.1	34.4	75.1	15.9	15.6
pH	5.27	5.33	6.16	5.09	4.95
CO₂ (mg/L)	545.2	364.2	81.0	617.4	469.0
SiO₂ (mg/L)	105.70	114.90	165.40	109.10	103.60
Na (mg/L)	56.00	45.00	85.00	33.00	34.00

K (mg/L)	25.00	20.00	14.00	20.00	18.00
Ca (mg/L)	9.60	11.00	8.90	8.20	11.00
Mg (mg/L)	2.56	3.06	3.18	3.72	3.29
SO₄ (mg/L)	46.00	41.00	7.50	18.00	33.00
Cl (mg/L)	22.70	19.90	36.90	20.90	19.50
HCO₃ (mg/L)	120.80	159.20	256.80	92.10	74.40
Al (mg/L)	567	593	129	705	739
As (mg/L)	1.86	0.91	52.8	0.8	1.45
B (mg/L)	23	22	1110	22	18
Br (mg/L)	77	71	111	65	61
Cd (mg/L)	0.03	0.02	0.01	0.08	0.03
Cr (mg/L)	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Cu (mg/L)	<0.2	0.2	1.8	1.1	0.8
Fe (mg/L)	4210	2200	1090	4350	4160
Hg (mg/L)	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2
Li (mg/L)	14	12	40	5	6
Mn (mg/L)	720	867	790	565	511
Ni (mg/L)	5.1	7.3	0.9	1.3	2.2
Pb (mg/L)	0.12	0.19	1.05	0.83	0.2
Sr (mg/L)	25.2	25.3	23.9	23.9	21.9
Zn (mg/L)	20.1	10	11	26.9	22.9

A tabela 10 resume os procedimentos de preparação, quantidades de reagentes e a designação das amostras para este estudo.

Tabela 10: Quantidade de reagentes utilizados na preparação das diferentes amostras pela técnica sol-gel.

Amostra	C₈H₂₀O₄Si (ml)	H₂O₍₁₎ (ml)	E₁OH₍₂₎ (ml)	HCL (ml)	C₆H₁₅O₄P (ml)	NaNO₃ (g)	H₂O₍₃₎ (ml)	Ca(NO₃)₂.4H₂O (g)	E₁OH₍₄₎ (ml)
H₂O 45S5	10	4	12	0.21	0.86	2	9	6.23	9.5
Miguel H. 45S5	10	4	12	-	0.86	2	9*	6.23	9.5
Prata 45S5	10	4	12	-	0.86	2	9*	6.23	9.5
Caldeirão 45S5	10	4	12	-	0.86	2	9*	6.23	9.5
Azeda 45S5	10	4	12	-	0.86	2	9*	6.23	9.5
A.Rebentão 45S5	10	4	12	-	0.86	2	9*	6.23	9.5
H₂O 58S	10	4	12	0.21	2.36	-	-	6	9
Azeda 58S	10	4	12	-	2.36	-	-	6	9
A.Rebentão 58S	10	4	12	-	2.36	-	-	6	9
H₂O 77S	10	4	12	0.21	1.80	-	-	1.93	3
Azeda 77S	10	4	12	-	1.80	-	-	1.93	3

* - Adição de mais 16ml etanol, para a solução se manter transparente.

(1)- Quantidade de água adicionada no início do processo sol-gel, consoante a amostra.

(2)- Quantidade de etanol adicionada no início do processo sol-gel.

(3)- Quantidade de água desionizada utilizada para dissolver o nitrato de sódio.

(4)- Quantidade de etanol utilizada para dissolver o nitrato de cálcio.

4- Tratamento térmico

As amostras envelhecidas foram seguidamente submetidas a um tratamento térmico a 60°C por forma a obter-se um gel seco. No final, os géis apresentavam-se translúcidos ou opacos, de cor branco. Os géis secos foram ainda calcinados a 550°C e a 700°C num forno tipo mufla Thermolyne 48000, com taxa de aquecimento de 1 °C/min., seguido de arrefecimento lento no interior do forno. A tabela 11 apresenta os tempos utilizados para os tratamentos térmicos.

Após a realização dos diferentes tratamentos térmicos foram tomadas amostras para análises de caracterização, a cada uma das temperaturas de calcinação.

Quando finalizadas, todas as amostras foram conservadas num exsiccador de sílica-gel.

Tabela 11: Tratamento térmico efetuado no estudo

Amostra	Tratamento térmico		
	60°C	550°C	700°C
H ₂ O 45S5	3dias	2horas	2horas
Azeda 45S5			
Azeda Rebentão 45S5			
Miguel Henriques 45S5	-		
Caldeirão 45S5			
Prata 45S5			
H ₂ O 58S	3dias	2horas	2horas
Azeda 58S			
Azeda Rebentão 58S			
H ₂ O 77S			
Azeda 77S			

A figura 17 mostra um fluxograma que descreve os procedimentos estabelecidos para a preparação das amostras por sol-gel e posteriores tratamentos térmicos.

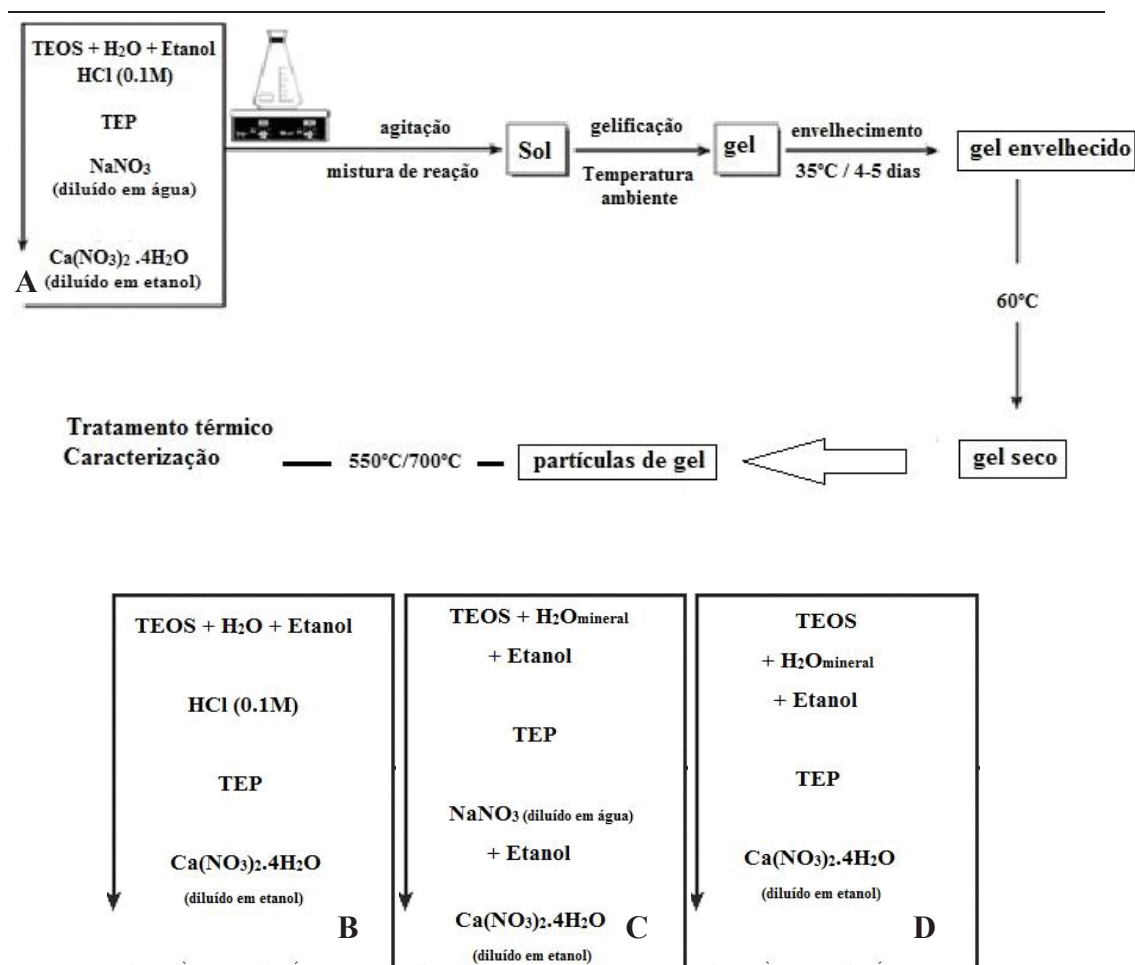


Figura 17: Resumo do fluxograma dos passos utilizados para obtenção dos géis e a sua subsequente conversão em pós vítreos, após tratamento térmico. A-Esquema geral (sistema quaternário), B-Reagentes utilizados para preparação do sistema ternário, C-Modo de preparação do sistema quaternário com águas minerais, D-Modo de preparação do sistema ternário com águas minerais.

5 - Teste da bioatividade *in vitro*

Sendo uma das finalidades deste trabalho a obtenção de biovidros é imprescindível a realização de um ensaio específico para a avaliação do nível de bioatividade do biovidro. Assim, a bioatividade das diferentes amostras obtidas, foi avaliada *in vitro* através da técnica da solução acelular que simula o meio fisiológico, conhecida como SBF, para testar a capacidade de formação da camada de HCA na superfície dos biovidros obtidos com águas altamente ionizadas. A solução SBF usada neste estudo foi preparada com a mesma concentração iónica mostrada na tabela 6 (c-SBF) e com pH igual a 7.4, tal como descrito por Kokubo & Takadama 2006. Na tabela 12 constam todos os reagentes utilizados para esta finalidade.

Tabela 12: Reagentes utilizados na preparação da solução SBF

Ordem	Reagente	Quantidade	Pureza (%)	Peso molecular
1	NaCl	8.035g	99.5	58.4430
2	NaHCO ₃	0.355g	99.5	84.0068
3	KCl	0.225g	99.5	74.5515
4	K ₂ HPO ₄	0.1763g	99.0	174.18
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0.311g	98.0	203.3034
6	1.0 _M -HCl	39ml	-	-
7	CaCl ₂	0.3868g	98.0	147.02
8	Na ₂ SO ₄	0.072g	99.0	142.0428
9	Tris	6.118g	99.0	121.1356
10	1.0 _M -HCl	0-5ml	-	-

A preparação da solução SBF para os testes de bioatividade é um processo delicado e a sua metodologia deve seguir uma sequência inflexível, caso contrário pode levar à precipitação de sais na solução, resultando na sua inutilização.

A solução SBF foi preparada (1litro) tomando sempre a atenção que a solução se mantivesse incolor e transparente e que não houvesse depósitos na superfície do recipiente. Dessa forma, colocou-se 700ml de água destilada e desionizada num balão volumétrico de um litro coberto com um vidro de relógio, mantido em constante agitação com um agitador magnético e em banho-maria até atingir uma temperatura de $36.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$. A essa temperatura foram adicionados os reagentes de 1 a 8, um a um na mesma ordem em que aparecem na tabela 12, tendo o cuidado de só adicionar o reagente seguinte quando o anterior já estivesse completamente dissolvido. A temperatura da solução foi mantida sob constante monitorização durante todo o tempo de preparação da solução, tendo sido, portanto, necessário a fixação de um termómetro ao banho-maria (figura 18).

Após os reagentes estarem todos dissolvidos, perfez-se a solução com água destilada até um total de 900ml, mantendo o valor de pH a 2.0 ± 1.00 .

Posteriormente, mantendo-se a mesma temperatura, dissolveu-se pouco a pouco o reagente Tris na solução verificando-se com isso um aumento gradual do pH. A quantidade total de Tris adicionada atingiu o valor máximo quando o pH atingiu um valor de 7.45 ± 0.01 . Com a ajuda de uma seringa colocou-se 1M-HCl até atingir um pH de 7.42 ± 0.01 , tendo o cuidado para que não descesse abaixo de 7.40.

Dissolveu-se o restante Tris intercalando alternadamente com uma solução de 1M-HCl, mantendo o valor de pH no intervalo de 7.42-7.45.

Após a adição de todos os reagentes e a estabilização da solução, a temperatura foi ajustada para 36.5°C e o valor de pH para 7.40 através da adição de 1M-HCl. De seguida, a solução foi transferida para um frasco de plástico, deixou-se descer a temperatura para 20°C e ajustou-se o volume total com água destilada e desionizada até aos 1000ml. O frasco com a solução finalizada, bem selado com parafilm, foi mantido num refrigerador entre 5-10°C até à sua utilização, não ultrapassando os 30 dias.



Figura 18: Modo de preparação da solução SBF

Para a realização do teste de bioatividade *in vitro*, 100mg de amostra foram imersas em SBF em tubos de Falcon em banho-maria equipado com termómetro analógico (Nahita) à temperatura do corpo controlada (36,5°C) durante vários períodos de tempo até aos 14 dias (3, 48, 120, 216 e 336 horas). As amostras foram testadas na forma de pó, tendo sido selecionados os vidros sol-gel designados por Azeda45S5, A.Rebentão45S5, H₂O45S5 (padrão), Azeda58S, A.Rebentão58S, H₂O58S (padrão), Azeda77S e H₂O77S (padrão).

O volume de SBF utilizado em testes de bioatividade está relacionado com a área da superfície da amostra. De acordo com os procedimentos descritos por Kokubo & Takadama 2006, para um material denso, o volume apropriado da solução deve obedecer à seguinte relação:

$$V_s = S_a / 10$$

onde V_s representa o volume de SBF (mL) e S_a representa o total da área geométrica da amostra (mm^2). Para materiais porosos, ou na forma de pó (caso deste estudo), os autores sugerem a utilização de um volume maior do que o calculado pela Equação. Assim, no presente trabalho foi utilizado o procedimento seguinte: massa de amostra (m) dividida pelo volume de SBF (V_s) é igual a $0,01 \text{ gml}^{-1}$, porque m era constante em todas as amostras.

O pH das soluções a 36.5°C foi monitorizado ao longo do tempo do ensaio. Após os testes de bioatividade, as amostras foram retiradas dos frascos, deixadas escorrer e conservadas num exsiccador de sílica-gel para análises posteriores.

6 - Caracterização física e morfológica dos biovidros

Os estudos *in vitro* têm sido usados como uma importante ferramenta na avaliação precoce do comportamento e das propriedades dos implantes de biovidro *in vivo*.

Tendo em conta que nas amostras em causa interessa analisar não só o biovidro, em volume (com um todo), mas também os recobrimentos ou filmes que se formam à sua superfície, o processo de caracterização pode tornar-se extenso e complexo. Contudo, no caso particular da investigação em biovidros, o procedimento de caracterização engloba normalmente a avaliação dos seguintes aspetos:

- Composição química;
- Tamanho, forma e distribuição de fases e estruturas (cristalino, amorfo, etc);
- Microestrutura;
- Superfícies, interfaces e recobrimentos.

Neste estudo, as técnicas utilizadas para caracterizar as reações de superfície de amostras bioativas imersas em fluidos corporais simulados em função do tempo foram a difração de raios-X (XRD-X-ray diffraction), a microscopia eletrónica de varrimento (SEM-scanning electron microscopy) e a espectroscopia vibracional, nomeadamente a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-Fourier Transform Infrared) (Hench & Wilson 1993).

A caracterização microestrutural passa pela determinação da estrutura cristalina, composição química, quantidade, tamanho, forma e distribuição das fases. A determinação da estrutura cristalina normalmente envolve a utilização de técnicas de difração, tais como difração de raios X (XRD). Para determinação da composição química das fases são utilizadas as análises de raios X dispersão de energia (EDS). A quantidade, tamanho, morfologia e distribuição das fases e defeitos cristalinos são características estudadas com auxílio da microscopia eletrônica de varrimento (SEM), sendo possível a aquisição de fotografias de alta resolução espacial (Notingher *et al.*, 2003).

A espectroscopia vibracional é uma das técnicas mais comuns utilizadas para estudar a composição e propriedades químicas da superfície de amostras sólidas. Os espectros de infravermelho são gerados como resultado simultâneo da multiplicidade de diferentes modos de vibração, rotação e flexão de átomos ou grupos de átomos da estrutura ao interagir com a radiação. As principais vantagens da técnica de FTIR são: resultados rápidos e quantitativos, não sendo necessário grandes quantidades de amostra.

Neste estudo, a difração de raios-X (XRD) foi utilizada na identificação das fases cristalizadas (antes e após os testes de bioatividade *in vitro*). As camadas de apatite depositadas sobre as amostras de vidro, bem como as suas características morfológicas, foram observadas através de microscopia eletrônica de varrimento (SEM) acoplada à espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS). A evolução estrutural dos biovidros foi analisada por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).

6.1 - Difração de Raio-X (XRD)

Os raios-X, descobertos em 1895 por W. Röntgen, são radiações eletromagnéticas com comprimentos de onda da ordem de tamanho dos diâmetros atômicos (0,1-10 Å). Esta radiação é gerada a partir de um feixe de elétrons acelerados, com uma diferença de potencial da ordem de 35KV, entre um cátodo e um alvo metálico (geralmente de cobre) que funciona como ânodo, e em que todo o processo é realizado em vácuo. A difração de raios-X é uma técnica experimental, não destrutiva, essencial na caracterização cristalográfica de materiais. Um difratograma de difração de raios-X típico consiste numa sequência de picos caracterizados pelas suas posições, intensidades, larguras, etc. (Guinebretière 2007).

Um material cristalino é constituído por diferentes grãos. Cada grão é um monocristal, que num modelo simples pode ser considerado como sendo dividido em pequenos domínios coerentes de difração, em que cada um destes domínios é constituído por um empilhamento regular de átomos. Este arranjo de átomos pode ser descrito por um conjunto de planos de átomos, denominados planos cristalinos e caracterizados por uma distância d . Quando se irradia um material cristalino com radiação X podem produzir-se picos de radiação com diversas intensidades. Isto ocorre devido à interação dos raios-X e o arranjo periódico do material que provoca um feixe difratado apenas para alguns valores do ângulo entre o feixe incidente e a normal ao material. Este fenómeno designa-se por difração. A condição necessária para existir difração foi definida por Bragg e pode ser traduzida pela seguinte equação:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

Nesta equação n indica a ordem da difração (tomando valores inteiros maiores que 0), d representa a distância entre os planos dos átomos na rede cristalina, λ e θ correspondem respetivamente ao comprimento de onda e ao ângulo de incidência da radiação utilizada.

Materiais amorfos irão refletir o feixe de raios X em todas as direções evitando a possibilidade de interferência entre eles (Pereira 2004). O difratograma de um material amorfo apresenta duas ou três bandas largas, indicando que a estrutura tem ordem de curto alcance, mas não de longo alcance.

Existem fatores que promovem o alargamento dos picos de difração, nomeadamente o tamanho de grão e a cristalinidade. Quanto menor é o tamanho do grão maior é o alargamento do pico de difração.

A difração de raios X é o principal método usado para identificar fases de materiais cristalinos e, em alguns casos, fazer a identificação qualitativa dos constituintes. Este método pode ser aplicado em materiais na forma de pó ou em materiais densificados.

A difração de raios X (PW 1830 generator Philips) realizada no Instituto Superior Técnico de Lisboa, utilizando uma radiação Cu-K α (K α = 1,54056 Å), foi utilizada para analisar a presença de fases cristalinas nas amostras em pó, antes e depois da imersão em SBF.

O difractómetro foi operado a 40 kV e 30mA numa faixa de varrimento angular 2Θ de 10-80° com passo de 0.02° e tempo de 1.25s, usando um ânodo de cobre (Cu w2200 kv60) como alvo.

6.2 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A técnica FTIR tem sido intensamente utilizada no estudo da reação de superfícies de materiais bioativos após a sua imersão em soluções SBF. A FTIR pode rapidamente ser utilizada para identificar a formação de HCA.

A espectroscopia de infravermelhos é uma técnica não destrutiva de análise química que mede a intensidade da radiação infravermelha (IV) para os diversos comprimentos de onda. Quando a radiação IV interage com o material, as ligações químicas entre os átomos distendem-se, e contraem-se e fletem-se relativamente umas às outras. Assim, determinados grupos funcionais presentes no vidro tendem a absorver a radiação de infravermelhos num dado comprimento de onda. Como o comprimento de onda para o qual os grupos funcionais absorvem a radiação IV está bem definido, é possível identificar os grupos funcionais presentes no vidro, por comparação das bandas de absorção padrão com as dos picos do espectro obtido. Por exemplo, a camada de HCA é caracterizada pelas bandas de vibração em flexão P-O a 560 e 604 cm^{-1} e a bandas assimétricas de vibração em distensão P-O entre 1000 e 1150 cm^{-1} (Ohtsuki *et al.*, 1991). Os picos correspondentes às vibrações em flexão são as mais utilizadas para diferenciar a HCA e o material bioativo, uma vez que a banda em distensão P-O é sobreposta à banda em distensão Si-O correspondente aos biovidros, enquanto a banda de absorção de flexão correspondente a Si-O está entre 400 e 500 cm^{-1} , a frequências mais baixas que a correspondente à flexão P-O na HCA (Notingher *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 1994).

A espectroscopia na região do infravermelho é uma ferramenta analítica importante para a caracterização de estruturas vítreas. Permite a determinação da unidade estrutural presente no vidro, através de seus grupos funcionais.

As análises de FTIR foram realizadas com pastilhas de brometo de potássio ($\text{KBr} \geq 99\%$, FT-IR grade, de Sigma-Aldrich). Amostras de biovidros obtidas foram moídas finamente, usando um almofariz e um pilão de ágata e misturadas com

brometo de potássio, e, em seguida, prensadas num disco (2 mg de amostra / 200 mg de KBr) formando pastilhas.

Os espectros de transmissão foram obtidos no Instituto Superior Técnico de Lisboa através do espectrómetro Thermo NICOLET 5700. Como branco foi usada uma pastilha de KBr e a aquisição dos espectros de transmissão foi feita através de um separador de feixe de KBr.

Cada espectro foi obtido com uma média de 128 scans, percorrendo a região de 4000-400 cm^{-1} .

6.3 - Microscopia eletrónica de varrimento e microanálise (SEM/EDS)

O princípio de funcionamento da SEM consiste no varrimento da superfície de uma amostra por um feixe de eletrões altamente focado, orientando o brilho em cada ponto da imagem, obtida num monitor de visualização, pelo sinal emitido pela amostra. Este sinal pode ser proveniente da emissão de eletrões secundários, como resultado da interação entre os eletrões incidentes e as orbitais dos átomos constituintes da amostra, ou de eletrões retrodifundidos. Obtém-se, deste modo, uma correspondência entre a imagem e a região observada da amostra. A microscopia eletrónica de varrimento é um dos instrumentos mais versáteis disponíveis para a caracterização e análise da morfologia, microestrutura e composições químicas de uma vasta gama de materiais (Zhou & Wang 2006). Desde o seu aparecimento (final de 1930/início de 1940) que o SEM é uma técnica muito apreciada por muitos cientistas e técnicos, pois tem a capacidade de obter informação tridimensional de superfícies, numa gama considerável de escalas de comprimento (Stokes 2003).

Os sinais que derivam de interações eletrão-amostra revelam informações sobre a amostra, incluindo a morfologia externa (textura), a composição química, a estrutura cristalina e a orientação dos materiais que compõem a amostra. Na maioria das aplicações, os dados são recolhidos ao longo de uma área selecionada da superfície da amostra, gerando uma imagem 2-D que exhibe variações espaciais nestas propriedades. A microscopia eletrónica de varrimento permite obter imagens semelhantes às que se podem obter por microscopia ótica de reflexão, mas numa faixa de ampliação muitíssimo superior (desde 10x até 18000x), com uma profundidade de campo de 30 μm . A esta técnica está geralmente associada a técnica de espectroscopia dispersiva de Raios-X (EDS), que permite uma análise semi-

quantitativa dos elementos químicos na superfície dos materiais (Zhou & Wang 2006).

O estudo da microestrutura é importante para se averiguar a morfologia da superfície, nomeadamente as várias fases presentes numa amostra, o tamanho e a distribuição espacial da porosidade e o grau de uniformidade estrutural.

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e a espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS), usadas para compreender as alterações químicas e as transformações de composição durante a imersão em SBF, foram realizadas no Instituto Superior Técnico de Lisboa.

A caracterização morfológica das amostras em relação às modificações de superfície que ocorreram durante os testes de bioatividade *in vitro* foi realizada por SEM. Um conjunto de amostras foi selecionado e analisado antes e depois da imersão em solução SBF em diferentes momentos de teste (216 e 336 horas). As amostras foram previamente revestidas com uma camada fina de ouro, tornando a superfície electro condutora, e, em seguida, analisadas num microscópio modelo JEOL JSM-7001F, operado com uma tensão de aceleração de 15,0 kV, acoplado a um EDS, o que ajudou a caracterização da superfície através da análise química qualitativa.

Capítulo V - Resultados e Discussão

1 - Processo Sol-gel

Os géis dos sistemas ternário e quaternário revelaram tempos de gelificação diferentes (Tabela13) em função do tipo de água utilizada durante a hidrólise. O tempo de gelificação foi considerado como o tempo necessário para a solução se tornar num sólido, relativamente rígido, incapaz de fluir. O objetivo desta etapa experimental foi selecionar, do grupo de águas termais que exibiam baixos pH, aquelas que através do processo sol-gel originassem amostras de vidro (transparentes e/ou translúcidas), à temperatura ambiente (ou a 35°C) e que gelificassem uniformemente num máximo de cinco dias.

Deste modo, todas as águas que não apresentaram capacidade de formação de amostras de vidro nestas condições foram descartadas, permanecendo apenas as amostras produzidas com as águas Azeda e Azeda do Rebentão: Azeda45S5, AzedaRebentão45S5, Azeda58S, AzedaRebentão58S, Azeda77S e todas aquelas processadas com água desionizada, que serviram de padrão H₂O45S5, H₂O58S e H₂O77S.

Todos os géis com capacidade formadora de vidro foram obtidos transparentes, incolores e homogéneos opticamente, exceto as amostras 45S5 utilizadas no sistema quaternário, como mostrado na figura 18. O facto dos géis do sistema quaternário apresentarem-se opacos deve-se à adição do sódio no processo sol-gel.

Tabela 13: Tempo de gelificação das diferentes amostras

Amostra	Gelificação
	T. ambiente
H₂O 45S5	3 dias
Azeda 45S5	2 dias
Azeda Rebentão 45S5	5 dias
Miguel Henriques 45S5	6 dias
Caldeirão 45S5	Não gelifica
Prata 45S5	6 dias
H₂O 58S	3 dias
Azeda 58S	2 dias
Azeda Rebentão 58S	3 dias
H₂O 77S	3 dias
Azeda 77S	2 dias

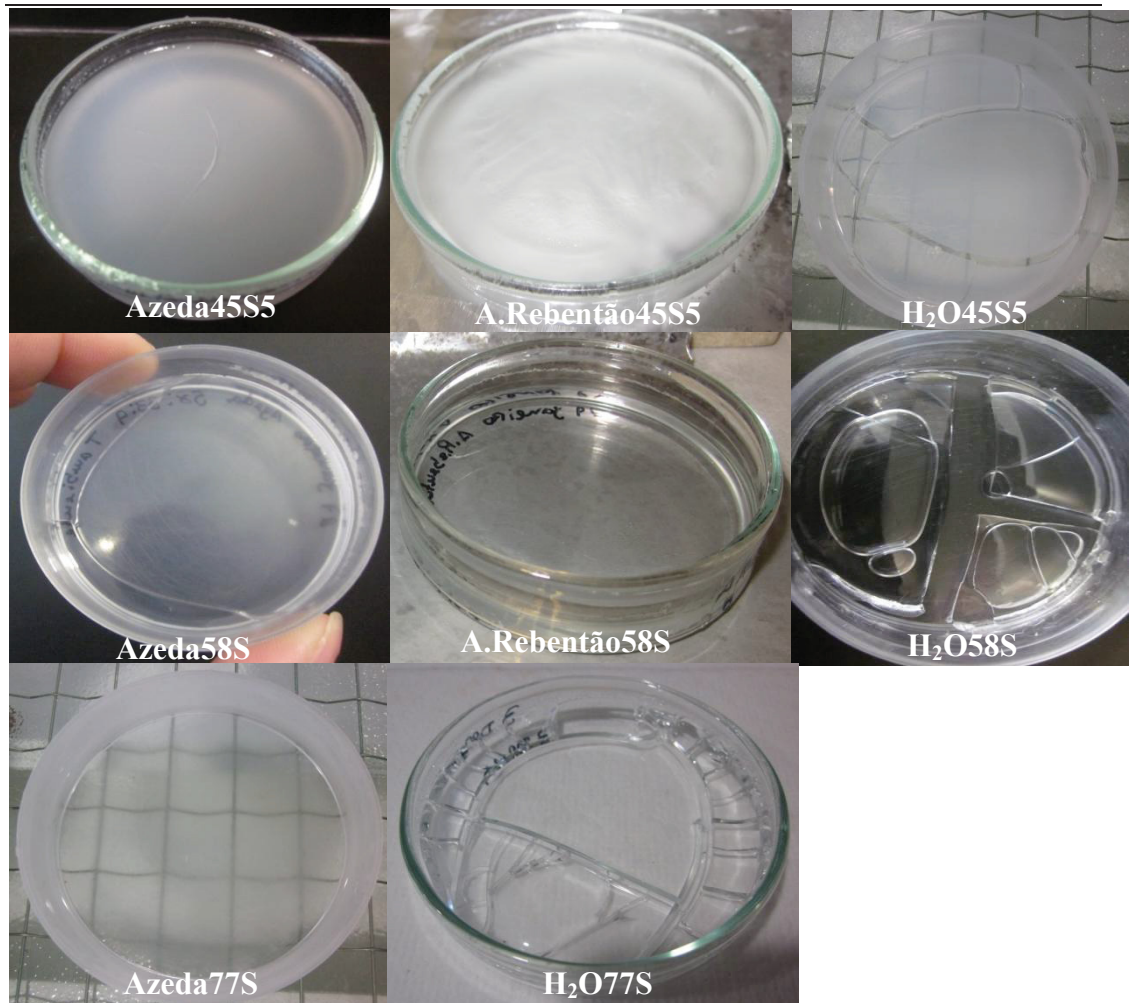


Figura 18: Amostras obtidas na etapa sol-gel após gelificação à temperatura ambiente

2 - Tratamento térmico

A temperatura do tratamento térmico final foi ajustada para 700°C e mantida durante 2 horas. Os trabalhos realizados por Bretcanu *et al.*, 2009 e Lefebvre *et al.*, 2007 mostraram que vidros 45S5 tratados a 700°C exibiam perda de massa atribuída à evaporação da água livre e solventes orgânicos, até cerca de 100°C, e à perda de nitratos residuais e de grupos OH⁻ geralmente até temperaturas próximas de 400°C. Possíveis fenômenos de cristalização em vidros com estas composições ocorrem geralmente abaixo dos 850°C. Portanto, a temperatura de 700°C, selecionada para promover a densificação do vidro, foi escolhida por se encontrar sensivelmente a meio do intervalo entre estas duas temperaturas de referência.

3 - Bioatividade

A bioatividade das amostras foi avaliada considerando a formação de uma camada de hidroxiapatite (HCA) na sua superfície. A taxa de dissolução das amostras foi medida imergindo as amostras obtidas (na forma de pós) em solução SBF, durante 216 e 336 horas e, conseqüentemente, estudada a taxa de formação da camada de hidroxiapatite sobre estas. Análises de XRD, FTIR e SEM-EDS foram realizadas nas amostras imersas, sem e com tratamento térmico a 700°C. Estas amostras ainda foram comparadas com amostras preparadas pelo mesmo processo, mas contendo na etapa de hidrólise água destilada e desionizada.

3.1 - Variação do pH da solução ao longo do tempo

Durante o ensaio de bioatividade *in vitro*, foram feitas leituras de pH em função do tempo para a avaliação da dissolução das amostras na presença de SBF. Durante este ensaio foi observado o aumento do pH (tabela 15), o que indica o aumento da saturação da solução.

Tabela 15: Medição do pH no ensaio de bioatividade

Ensaio	0h	3h	24h	72h	144h	192h	312h	336h
pH	7.45	8.15	8.25	8.42	8.51	8.73	8.80	8.89

4 - Resultados *in vitro* - Difração raio-X

A figura 19 mostra o padrão de raio-X da hidroxiapatite.

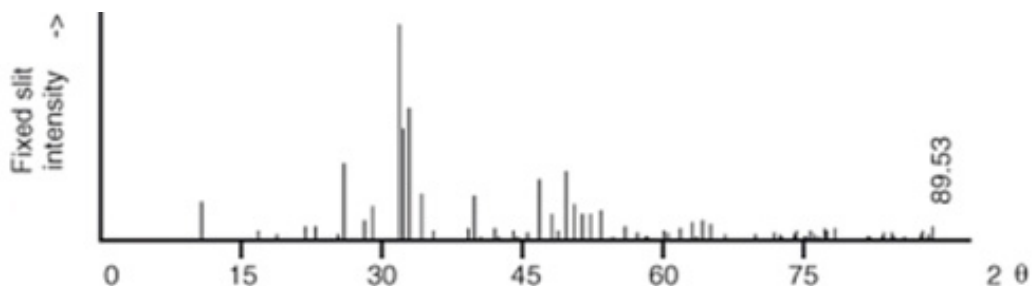


Figura 19: Padrão de raio-X da hidroxiapatite (Leng 2013)

4.1 - Azeda45S5

Os resultados de XRD das amostras da série Azeda45S5 imersas em SBF durante 216 e 336 horas são mostrados na figura 20.

A amostra tratada termicamente a 700°C exibe uma baixa cristalinidade, pela existência no seu difratograma de uma banda larga predominante que não apresenta uma formação efetiva de picos de difração, o que caracteriza os materiais amorfos, ou seja, materiais que não apresentam uma estrutura organizada. Contudo, também apresenta sinais de cristalização, verificando-se alguns picos de difração, que embora possuam uma baixa intensidade, indicam um ordenamento na sua estrutura cristalina, mesmo sem o vidro ter sido submetido a tratamentos térmicos posteriores. A presença desses picos deve-se à precipitação das fases cristalinas de $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$, $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Ca}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$, antes da imersão em SBF (0h). Esta natureza pseudo-cristalina já era esperada devido à composição do biovidro 45S5. Este silicato ao conter modificadores de rede, tais como o sódio e o cálcio permite-lhe acomodar esses íons alcalinos aleatoriamente na rede de sílica, o que aumenta o poder de desvitrificação da amostra.

Após a imersão da amostra durante 336 horas em SBF, a análise de XRD revelou uma menor intensidade do pico cristalino de $\text{Ca}_3\text{O}_5\text{Si}$, também detetado antes de imersão, diminuindo de intensidade após a reação da superfície do vidro com o SBF. Este decréscimo poderá estar relacionado com uma eventual tendência para o $\text{Ca}_3\text{O}_5\text{Si}$ se dissolver na presença de SBF.

De acordo com os resultados, pode-se observar que após 216 h de imersão a camada superficial de hidroxiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, foi obtida com sucesso, uma vez que se obtém uma sobreposição coincidente entre o difratograma padrão (Figura 19) e o difratograma obtido, no que se refere aos principais picos característicos. Por outro lado, de acordo com a evolução dos difratogramas de raios-X mostrados na Figura 20, é ainda possível observar a importância do processo de dissolução do biovidro na obtenção da estrutura da hidroxiapatite, pois à medida que o tempo de contato com a solução SBF aumenta (336h), ou seja, com o aumento da alcalinidade do meio, a camada de hidroxiapatite torna-se mais ordenada, o que é observado pelo aumento na intensidade dos seus principais picos de difração. Isto provavelmente ocorre devido à maior presença de íons cálcio e fósforo em solução provenientes do vidro. Por outro lado, a intensidade dos principais picos de difração dos restantes

fosfatos de cálcio e silicatos de cálcio foi reduzida com o aumento da alcalinidade do meio.

Assim, após 336 h em SBF, a estrutura cristalina da camada superficial do biovidro é maioritariamente constituída por hidroxiapatite e alguns vestígios de dicálcio hidrogeno trifosfato ($\text{Ca}_2\text{HP}_3\text{O}_{10}$). Também se verifica um aumento na intensidade dos picos de hidroxiapatite relativamente à amostra padrão ($\text{H}_2\text{O45S5}$) em condições experimentais análogas (figura 21). Contudo, o pico da fase $\text{Ca}_2\text{HP}_3\text{O}_{10}$ que se forma a partir de 216 horas em SBF e que se intensifica após 336 horas, não se verifica na amostra padrão.

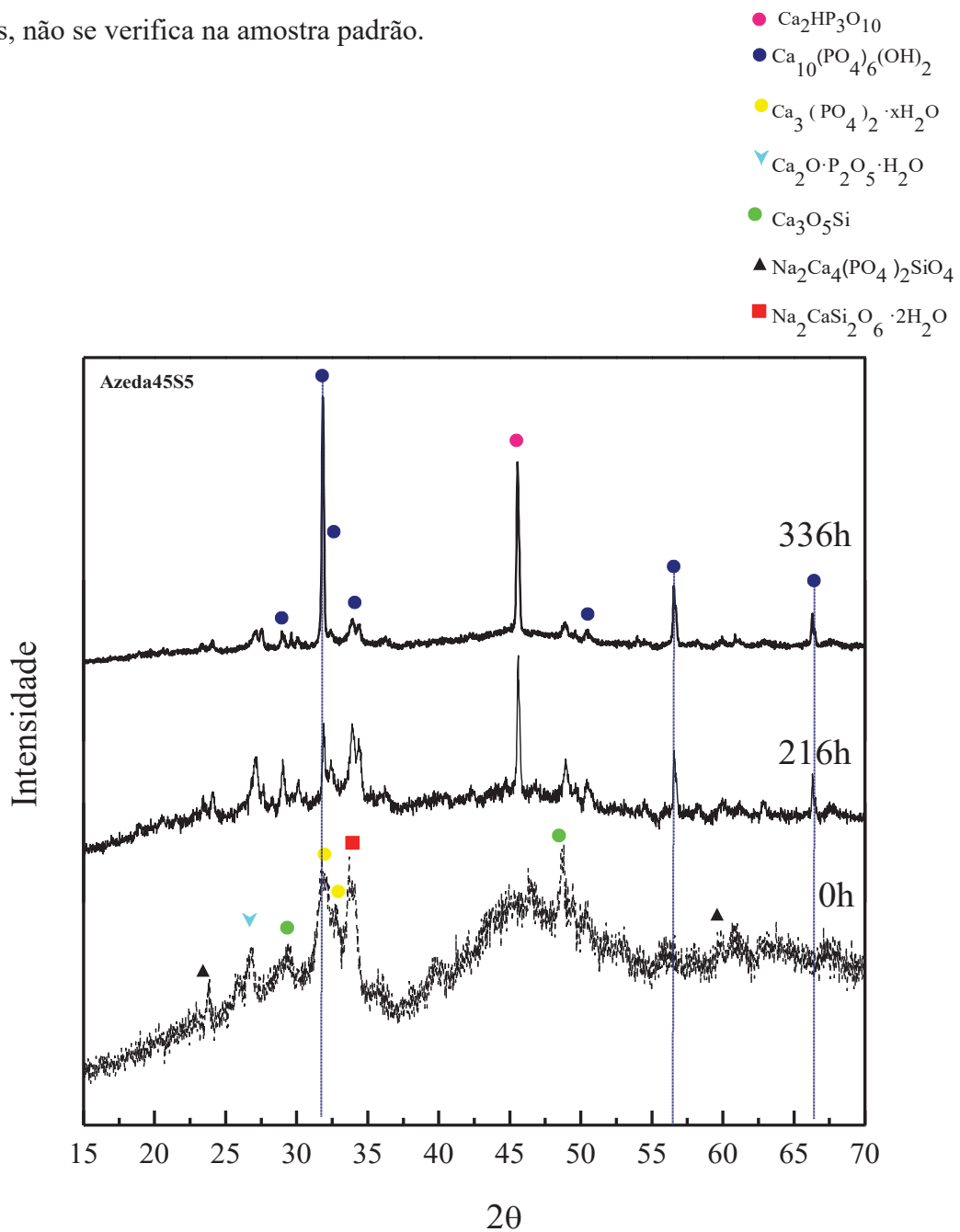


Figura 20: Padrão de Raio-X da amostra Azeda45S5 imersa em fluido corporal simulado (SBF) em função do tempo.

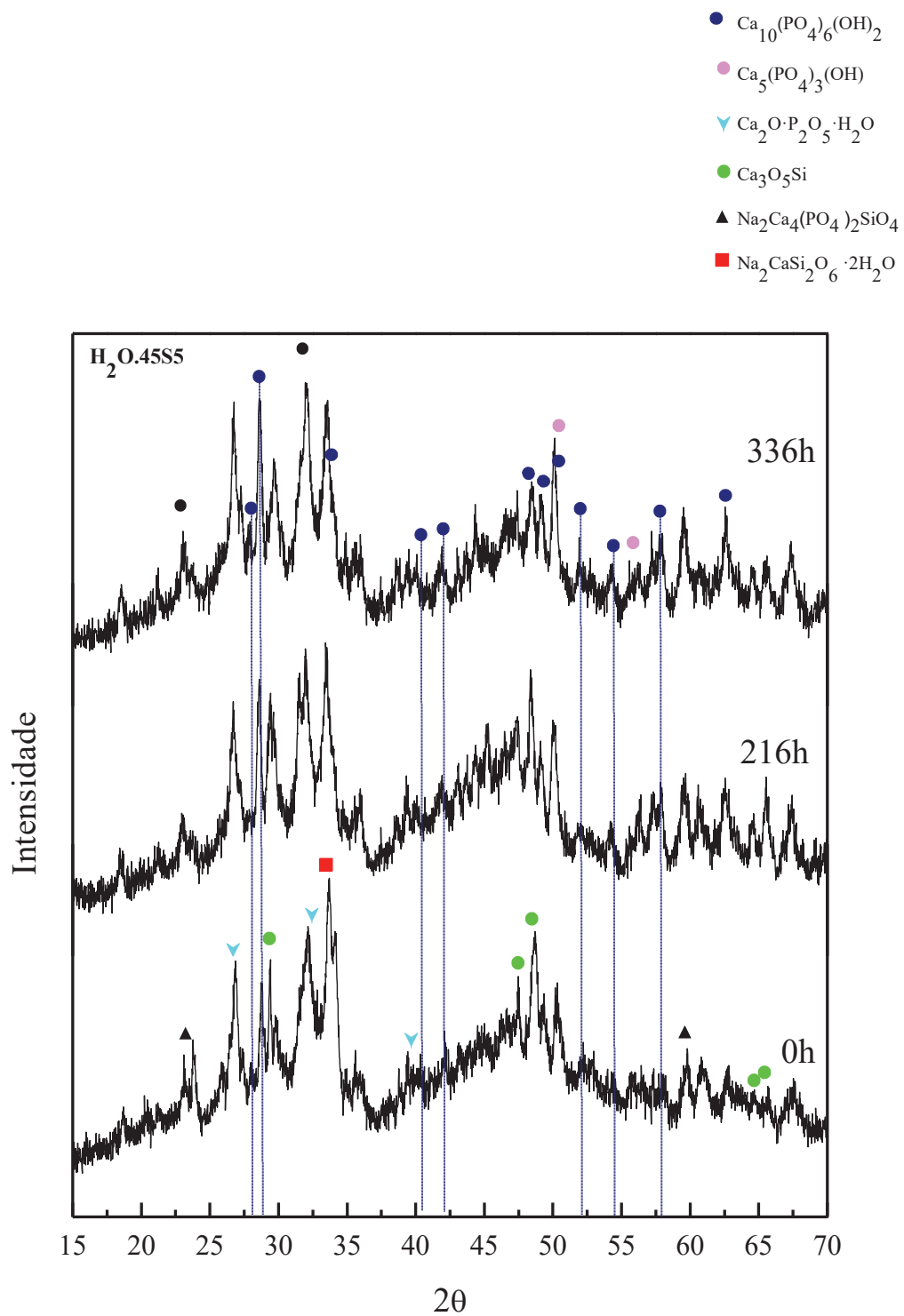


Figura 21: Padrão de Raio-X da amostra padrão H₂O.45S5 imersa em fluido corporal simulado (SBF) em função do tempo.

4.2 - A.Rebentão45S5

Os resultados de XRD das amostras da série A.Rebentão45S5 imersas em SBF durante 216 e 336 horas são mostrados na figura 22.

A amostra tratada termicamente a 700°C, exibe picos cristalinos de $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$, $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Ca}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ antes da imersão em SBF (0h), os quais deixam de ser detetados após 336 horas devido à possível reação com o SBF. Com efeito, uma das propriedades mais importantes dos fosfatos de cálcio, a qual pode determinar o seu comportamento *in vivo*, é a solubilidade em água. Geralmente, quanto maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade. A solubilidade da hidroxiapatite (Ca/P=1.67) é menor que, por exemplo, a do fosfato de cálcio $\text{Ca}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Ca/P=1).

A fase cristalina de $\text{Ca}_3\text{O}_5\text{Si}$ é também detetada antes de imersão, verificando-se uma diminuição na intensidade do seu principal pico de difração devido à posterior reação com o SBF. Assim, após 216 horas, à semelhança da amostra Azeda45S5, ocorre a formação da camada de hidroxiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, cujos picos exibidos no difratograma aumentam de intensidade se o vidro for imerso em SBF durante mais tempo (336h).

Comparando a intensidade dos picos de hidroxiapatite da amostra A.Rebentão45S5 com a amostra padrão (figura 21), verifica-se que estas são semelhantes, embora as características deste difratograma indiquem um menor grau de cristalinidade quando comparados com a amostra Azeda45S5.

Foi também detetado um pico ($\text{Ca}_2\text{HP}_3\text{O}_{10}$) de menor intensidade, à semelhança na amostra Azeda45S5, a formar-se ligeiramente a partir de 216 horas em SBF que se intensifica a 336 horas, o qual não se verifica na amostra padrão.

Nesta amostra, A.Rebentão45S5, deteta-se um pico cristalino intenso de $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ quando imerso em SBF que se intensifica ao longo do tempo, o qual não se verifica nem na amostra padrão, nem na Azeda45S5.

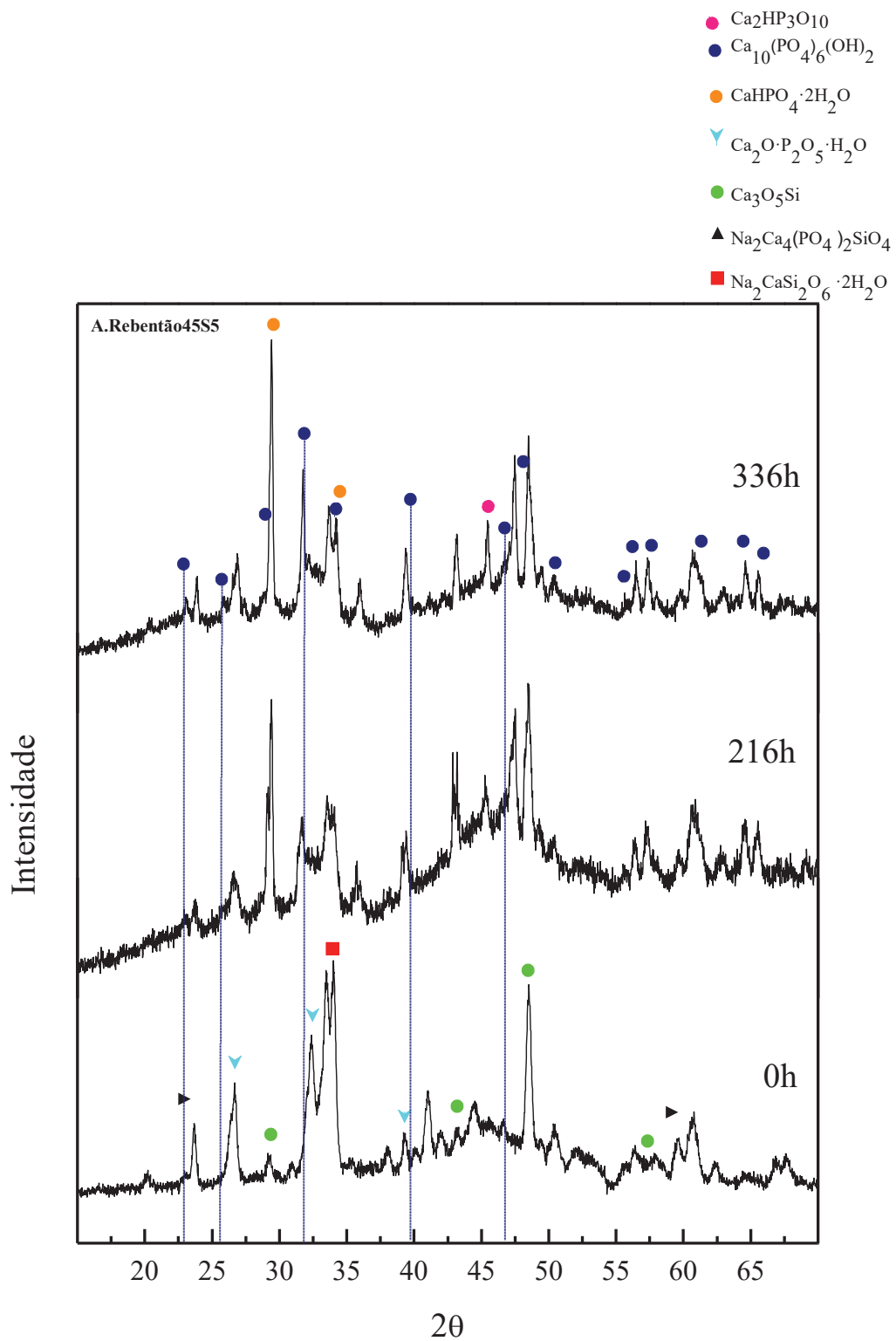


Figura 22: Padrão de Raio-X da amostra padrão A.Rebentão45S5 imersa em fluido corporal simulado (SBF) em função do tempo.

4.3 - Azeda58S

Os resultados de XRD das amostras Azeda58S imersas em SBF durante 216 e 336 horas são mostrados na figura 23.

As amostras tratadas a 700°C mostram picos cristalinos de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ e de $\text{Ca}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ antes da imersão em SBF (0h), deixando de ser detetados após 336 horas devido à possível reação com o SBF. Um pico cristalino de $\text{Ca}_3\text{O}_5\text{Si}$ é também detetado antes de imersão, aumentando ligeiramente a sua intensidade quando imerso a 216 horas.

Após 216 horas verifica-se a formação da camada de hidroxiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, aumentando ligeiramente de intensidade quando imerso em SBF durante mais tempo (336h).

A intensidade dos picos de hidroxiapatite na amostra Azeda58S é semelhante à amostra padrão (figura 24).

Na amostra padrão (figura 24) após 336 horas imerso em SBF, foi detetado um pico de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ o qual não aparece na amostra em estudo, mas aparece na amostra $\text{H}_2\text{O}.45\text{S5}$ (figura 21).

Pode-se salientar que a cristalinidade do sistema 58S é mais baixa que a do 45S5. Os difratogramas da Figura 23 têm como característica principal a presença de uma banda larga em torno de 2θ 35,00° a 2θ 55,00° de baixa intensidade, característica de materiais de baixa cristalinidade.

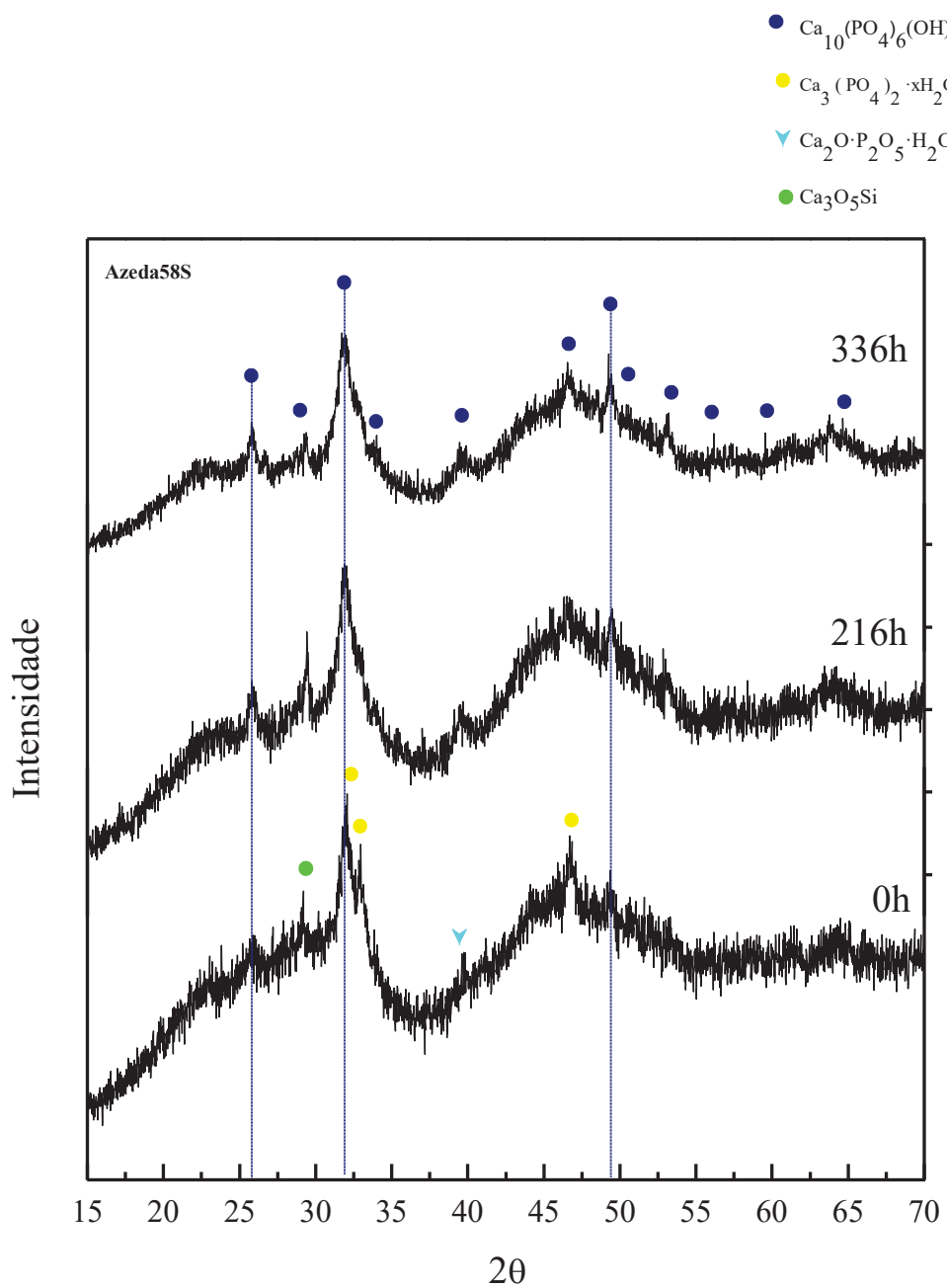


Figura 23: Padrão de Raio-X da amostra padrão Azeda58S imersa em fluido corporal simulado (SBF) em função do tempo.

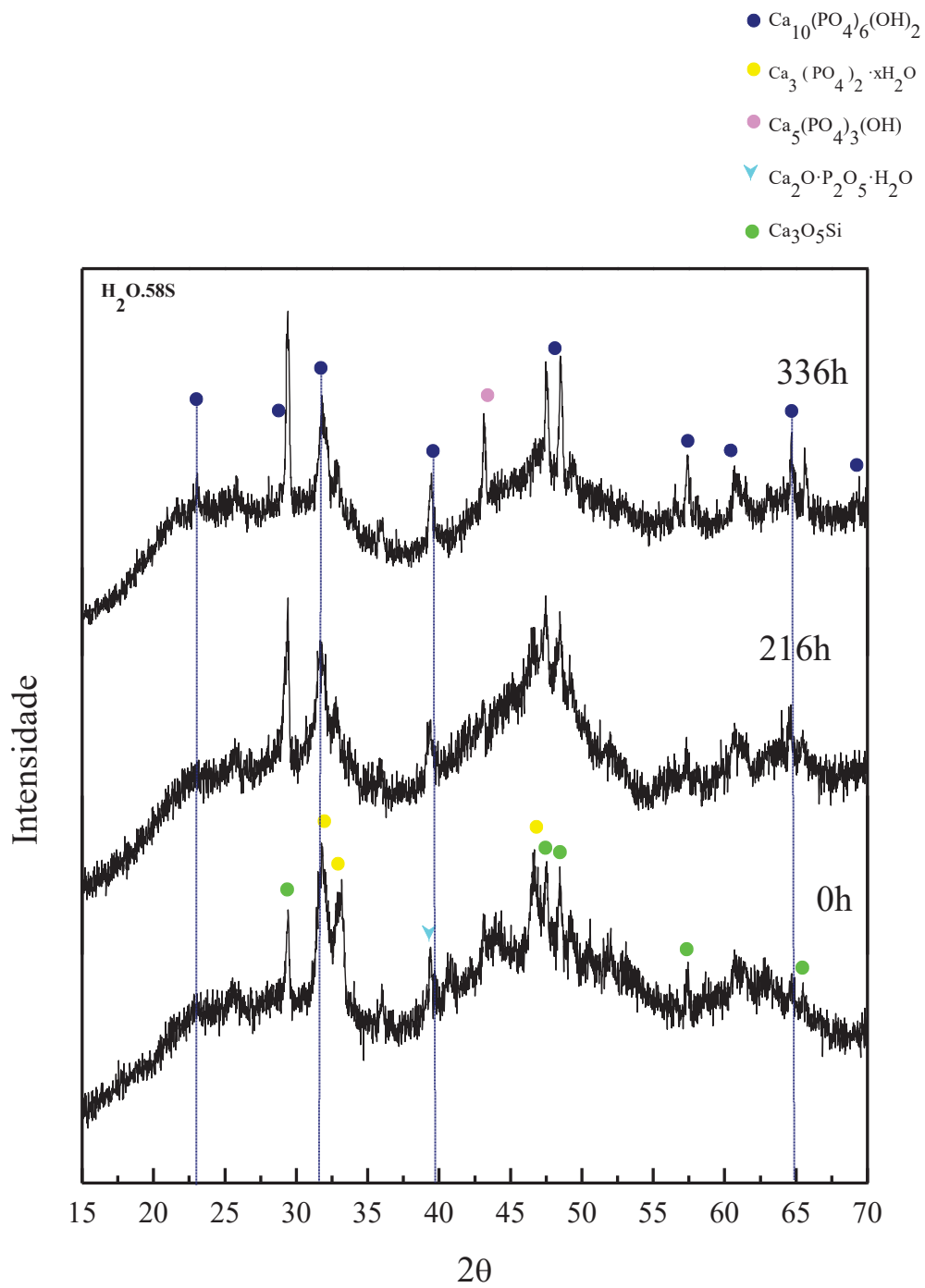


Figura 24: Padrão de Raio-X da amostra padrão H₂O.58S imersa em fluido corporal simulado (SBF) em função do tempo.

4.4 - A.Rebentão58S

Os resultados de XRD das amostras A.Rebentão58S imersas em SBF durante 216 e 336 horas são mostrados na figura 25.

As amostras tratadas a 700°C mostram picos cristalinos de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ e de $\text{Ca}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ antes da imersão em SBF (0h), deixando de ser detetada após 336 horas devido à reação com o SBF. Um pico cristalino de $\text{Ca}_3\text{O}_5\text{Si}$ é também detetado antes de imersão, aumentando a sua intensidade após 216 e 336 horas em SBF como acontece na amostra padrão (figura 24).

Após 216 horas verifica-se a formação da camada de hidroxiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, mantendo a intensidade quando imerso em SBF durante mais tempo (336h).

A intensidade dos picos de hidroxiapatite na amostra A.Rebentão58S é semelhante à amostra padrão e à amostra Azeda58S.

Como verificado na amostra padrão, nesta amostra (A.Rebentão58S) também foi detetado um pico de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, começando a formar-se a partir das 216 horas em solução SBF.

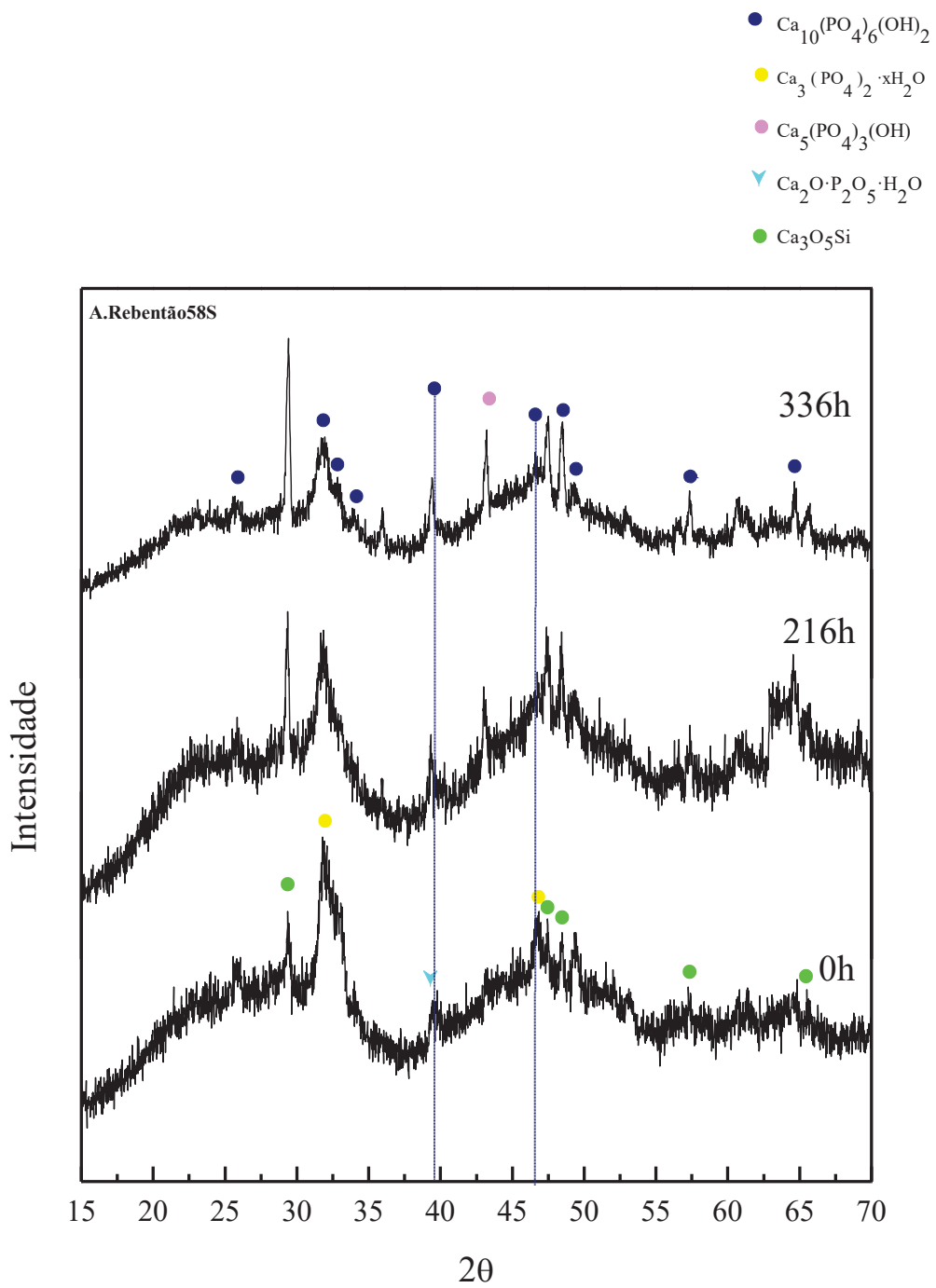


Figura 25: Padrão de Raio-X da amostra padrão A.Rebentão58S imersa em fluido corporal simulado (SBF) em função do tempo.

4.5 - Azeda77S

Os resultados de XRD das amostras Azeda77S imersas em SBF durante 216 e 336 horas são mostrados na figura 26.

As amostras Azeda 77S não apresentaram picos agudos no padrão de XRD antes da imersão, evidenciando, deste modo, a sua estrutura amorfa, o que não acontece com a amostra padrão (figura 27), que apresenta picos cristalinos de $\text{Ca}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e de $\text{Ca}_3\text{O}_5\text{Si}$.

Após 216 horas de imersão em SBF aparecem picos de hidroxiapatite na amostra aumentando ligeiramente a intensidade quando imerso em SBF durante mais tempo (336h).

Os picos de hidroxiapatite na amostra Azeda77S são muito mais intensos, revelando maior cristalinidade, quando comparados com a amostra padrão.

Após 216 horas imerso em SBF foi detetado um pico de $\text{Ca}_2 \text{HP}_3\text{O}_{10}$, o qual não sucede na amostra padrão.

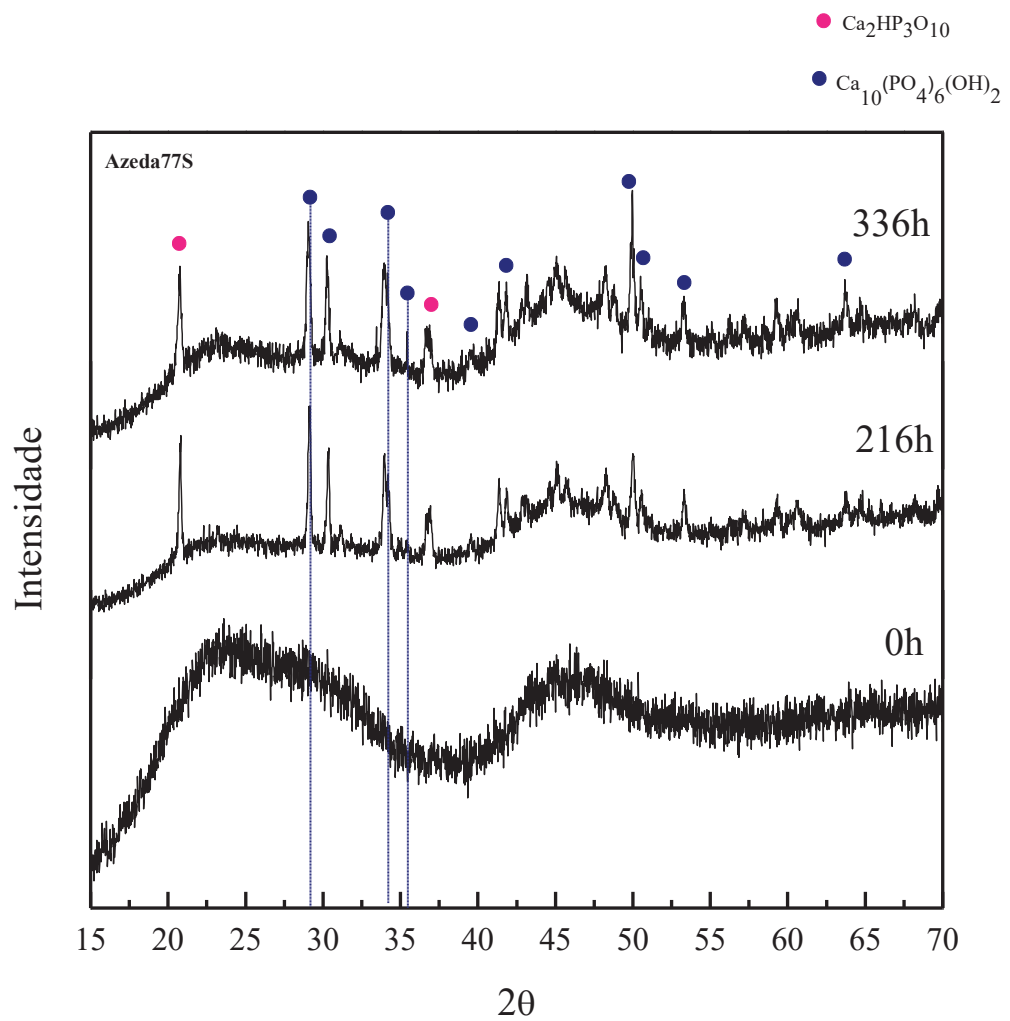


Figura 26: Padrão de Raio-X da amostra padrão Azeda77S imersa em fluido corporal simulado (SBF) em função do tempo.

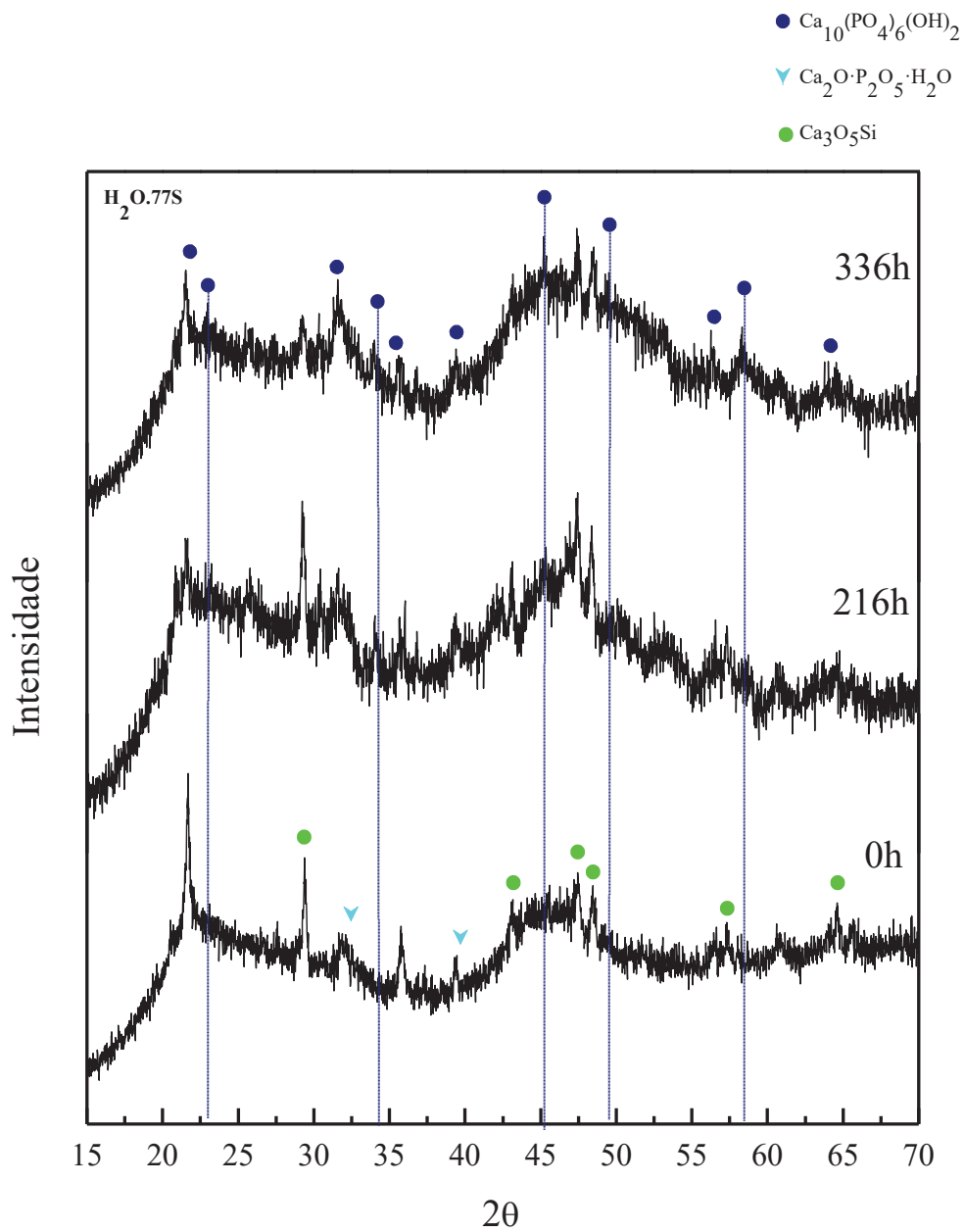


Figura 27: Padrão de Raio-X da amostra padrão H₂O.77S imersa em fluido corporal simulado (SBF) em função do tempo.

5 - Resultados *in vitro* - FTIR

Testes de FTIR foram realizados para verificar os resultados de XRD, mais especificamente, o estudo evolutivo da estrutura do vidro, incluindo o estudo semi-quantitativo do desenvolvimento da camada de hidroxiapatite. Os resultados estão ilustrados no modo de absorvância. A tabela 16 descreve resumidamente as bandas detetadas em FTIR.

Tabela 16: Correlação dos picos realizada pela técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (adaptado de Pirayesh & Nychka 2013)

	Pico (cm ⁻¹)	Correlação
Vidro amorfo	460	Si-O flexão
	926	Si-O distensão
	1024	Si-O distensão
	935	Si-O distensão
	1040	Si-O distensão
Fases cristalinas	460	Si-O flexão
	575	P-O flexão
	620	P-O flexão
	880	Si-O distensão
	926	Si-O distensão
Superfície mineral	800	Si-O distensão (silanol)
	1100	P-O distensão (CaP)
	560	P-O flexão
	604	P-O flexão
	870	C-O distensão

As principais bandas de absorção que representam um biovidro amorfo são as bandas que correspondem às ligações em flexão Si-O a 460cm⁻¹ e Si-O em distensão a 926 e a 1024cm⁻¹.

Bandas relacionadas, na sua maioria, com a estrutura cristalina são:

- Uma banda forte em flexão Si-O a 460cm⁻¹ que indica o desenvolvimento de cristais. Esta banda pode estar relacionada com a estrutura amorfa ou cristalina.
- Uma banda fraca em flexão P-O a 575cm⁻¹ e outra a 620cm⁻¹, que mostram uma fase rica em fosfato cristalino que se forma a aproximadamente 800°C. Estas bandas são detetáveis em amostras estabilizadas a 700°C, mas com menor intensidade.

A banda em distensão Si-O a 880cm⁻¹, refere-se à formação da fase rica em fósforo-apatite.

A presença de bandas em distensão a 935 e a 1040cm^{-1} são atribuídas a ligações Si-NBO, pelo que a maioria das ligações Si-O contém pelo menos um NBO, possibilitando também a ocorrência de cristalização (Pirayesh & Nychka 2013).

A presença de duas pequenas bandas duplas a 696 e 729cm^{-1} são correlacionadas com a distensão simétrica Si-O-Si no silicato cristalino.

Durante o período de imersão em SBF, a presença de uma banda pequena em distensão Si-O a 800cm^{-1} representa a formação de silanóis Si-OH amorfos nas fases iniciais da reação. A banda larga em distensão P-O a 1100cm^{-1} , representa a formação de fosfato de cálcio.

Após a imersão em SBF, tornam-se evidentes novas bandas de ligações P-O, que representam a cristalização da hidroxiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Três destas bandas em 560 , 604 , e por volta de 1100 surgem após imersão. Como a ligação em distensão P-O a 1100 é sobreposta sobre as ligações em distensão Si-O correspondentes ao biomaterial, torna-se difícil a sua distinção. Portanto, duas bandas em flexão P-O a 560 e 604cm^{-1} são as bandas principais utilizadas para a caracterização da camada de hidroxiapatite. (Pirayesh & Nychka 2013).

A presença de Ca ligado a átomos de oxigênio não-em-ponte (NBO) é confirmada pela presença de bandas em flexão Si-O-Si no intervalo $940-1040\text{cm}^{-1}$, não ultrapassando os 1100cm^{-1} .

A presença de nitratos residuais e subprodutos de condensação pode ser evidenciada pela banda a 1328cm^{-1} , atribuída a vibrações de distensão NO_3^{3-} (Mukundan *et al.*, 2013).

Por fim, a presença de bandas em distensão C-O a 870cm^{-1} , demonstra a presença de iões CO_3^{2-} o que pode ser indicativo da formação de camada de hidroxiapatite carbonatada (Mukundan *et al.*, 2013; Pirayesh & Nychka 2013).

5.1 - Sistema quaternário 45S5

Todas as amostras pertencentes ao sistema quaternário, Azeda45S5 (figura 27), A.Rebentão45S5 (figura 28) e $\text{H}_2\text{O}.45\text{S5}$ (padrão, figura 29) apresentam a banda em flexão Si-O a 460cm^{-1} , a partir dos 550°C .

A amostra A.Rebentão45S5 apresenta a banda em distensão Si-O a 926cm^{-1} , representativa de estrutura amorfa, mas não apresenta a banda a 1024cm^{-1} . No entanto, apresenta uma banda em flexão P-O a 575cm^{-1} e outra a 620cm^{-1} , a partir dos 700°C , o que indica uma fase rica em fosfato cristalino. A amostra Azeda45S5 e

a amostra padrão apresentam a banda em flexão P-O a 575cm^{-1} , mas não apresentam a banda em flexão P-O a 620cm^{-1} .

Nenhuma das amostras do sistema quaternário apresenta a banda em distensão Si-O a 880cm^{-1} . Mas todas apresentam as bandas em distensão Si-O a 1040cm^{-1} , o que implica a ocorrência de cristalização. Também apresentam a banda em distensão Si-O a 935cm^{-1} , à exceção da amostra A.Rebentão45S5.

Todas as amostras apresentam uma banda em distensão Si-O a 800cm^{-1} .

Em todas as amostras, a banda em distensão P-O a 1100cm^{-1} não é evidente devido à sobreposição de ligações em distensão Si-O a 1040cm^{-1} . No entanto, apresentam uma banda em flexão P-O a 604cm^{-1} , uma das principais bandas utilizadas para a caracterização da camada de hidroxiapatite. Além disso, a amostra A.Rebentão45S5, ao contrário das amostras Azeda45S5 e padrão, apresenta uma banda C-O, característica da formação da hidroxiapatite carbonatada.

As amostras em estudo Azeda45S5 e A.Rebentão45S5, ao contrário da amostra padrão, apresentam duas pequenas bandas duplas a 696 e 729cm^{-1} que confirmam a presença de silicato cristalino ($\text{Ca}_3\text{O}_5\text{Si}$ e $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

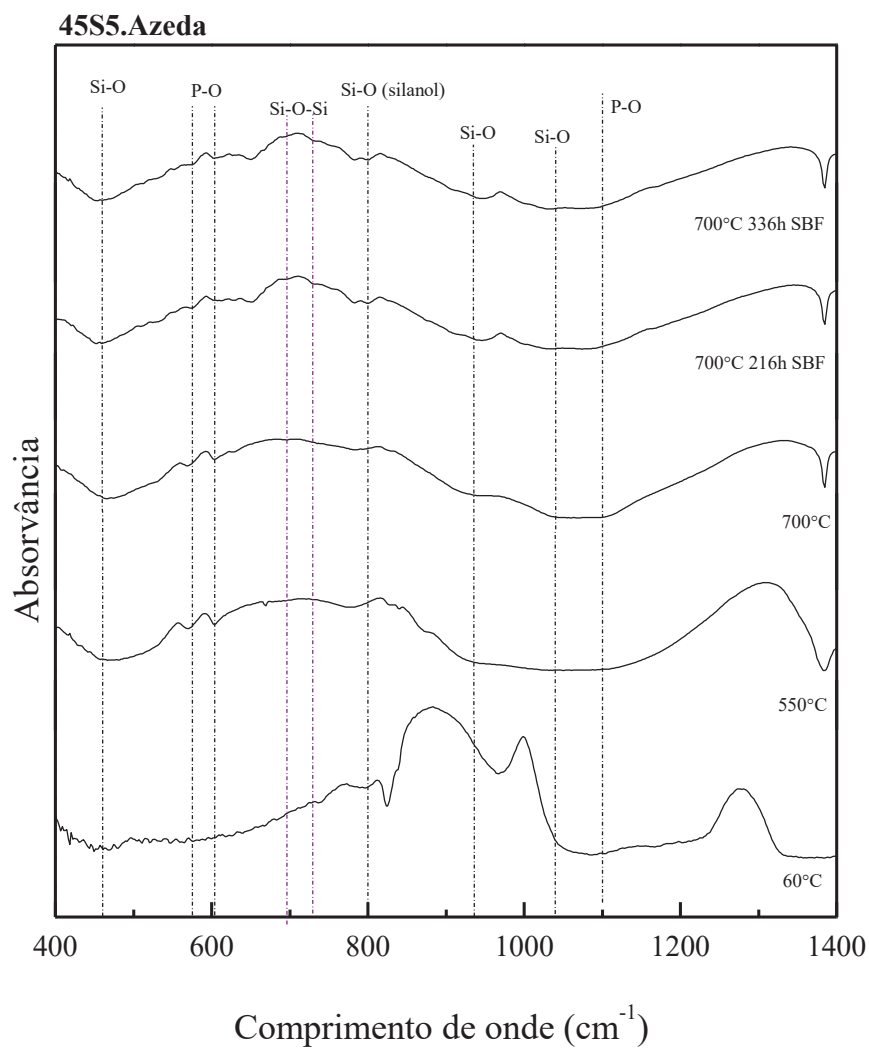


Figura 27: Espectro de infravermelho da amostra Azeda45S5 a 60, 550 e 700°C, e após imersão em SBF (216 e 336horas).

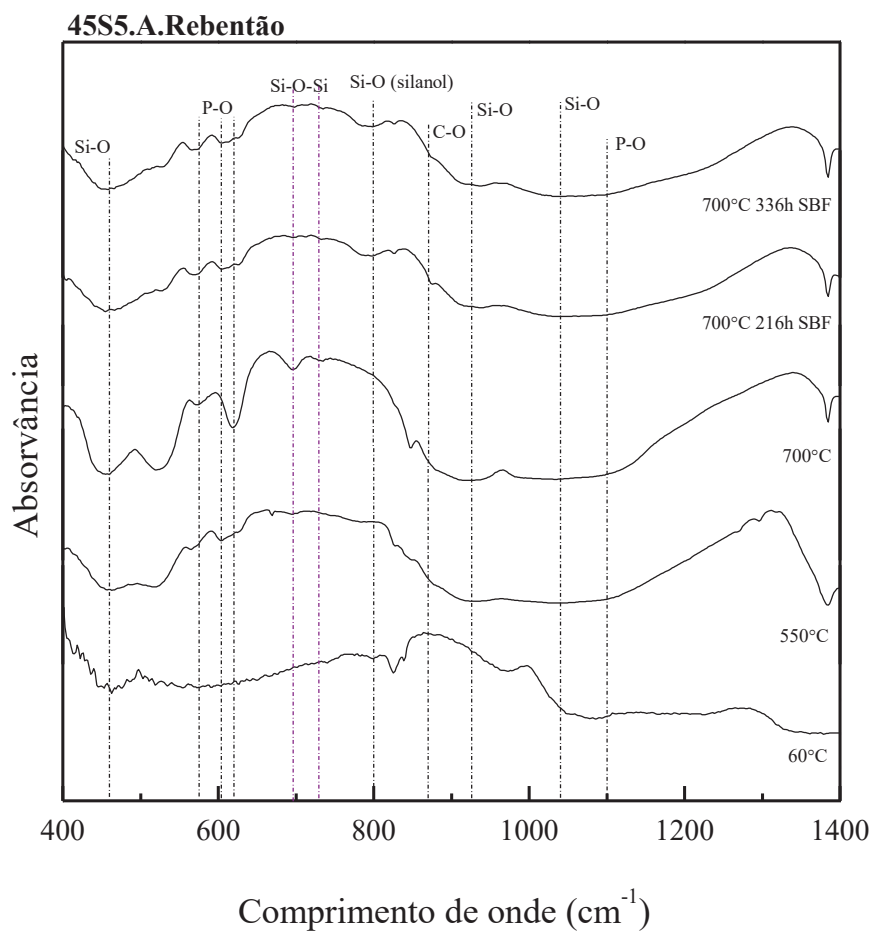


Figura 28: Espectro de infravermelho da amostra A.Rebentão45S5 a 60, 550 e 700°C, e após imersão em SBF (216 e 336horas).

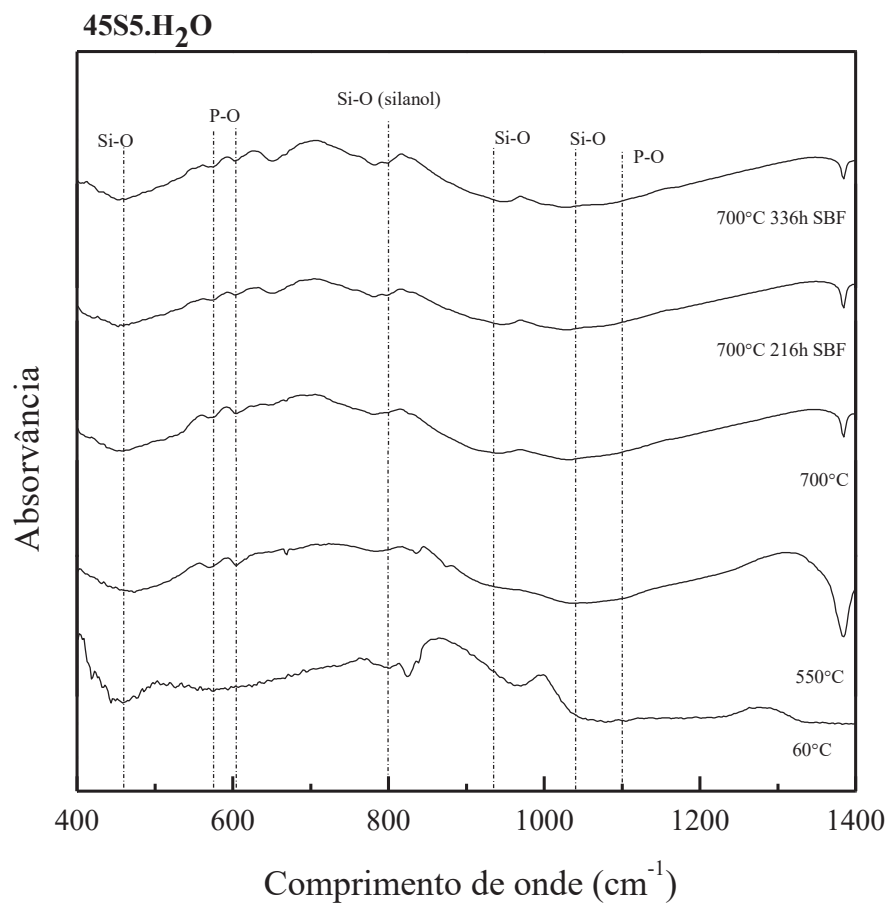


Figura 29: Espectro de infravermelho da amostra padrão H₂O45S5 a 60, 550 e 700°C, e após imersão em SBF (216 e 336horas).

5.2 - Sistema ternário 58S

Todas as amostras pertencentes ao sistema ternário, Azeda58S (figura 30), A.Rebentão58S (figura 31) e H₂O.58S (padrão, figura 32) apresentam a banda em flexão Si-O a 460cm⁻¹, a partir dos 550°C. Não apresentam as bandas em distensão Si-O a 926 e a 1024cm⁻¹, o que comprova, desde já, que não são amostras com estruturas amorfas.

Nenhuma das amostras apresenta a banda em flexão P-O a 620cm⁻¹. A amostra Azeda58S apresenta uma banda em flexão P-O a 575cm⁻¹, a partir dos 700°C, o que indica uma fase rica em fósforo cristalino.

Todas as amostras do sistema ternário 58S apresentam a banda em distensão Si-O a 880cm⁻¹, que se refere à formação da fase rica em fósforo-apatite, e a banda a 1040cm⁻¹, o que implica a ocorrência de cristalização.

Todas as amostras apresentam uma banda em distensão Si-O a 800cm⁻¹.

Nas amostras Azeda58S e na amostra padrão, a banda em distensão P-O a 1100cm⁻¹ não é evidente devido à sobreposição de ligações em distensão Si-O a 1040cm⁻¹. Esta banda é mais evidente na amostra A.Rebentão58S.

Todas as amostras deste sistema, apresentam uma banda em flexão P-O a 560 e a 604cm⁻¹, as bandas principais utilizadas para a caracterização da camada de hidroxiapatite.

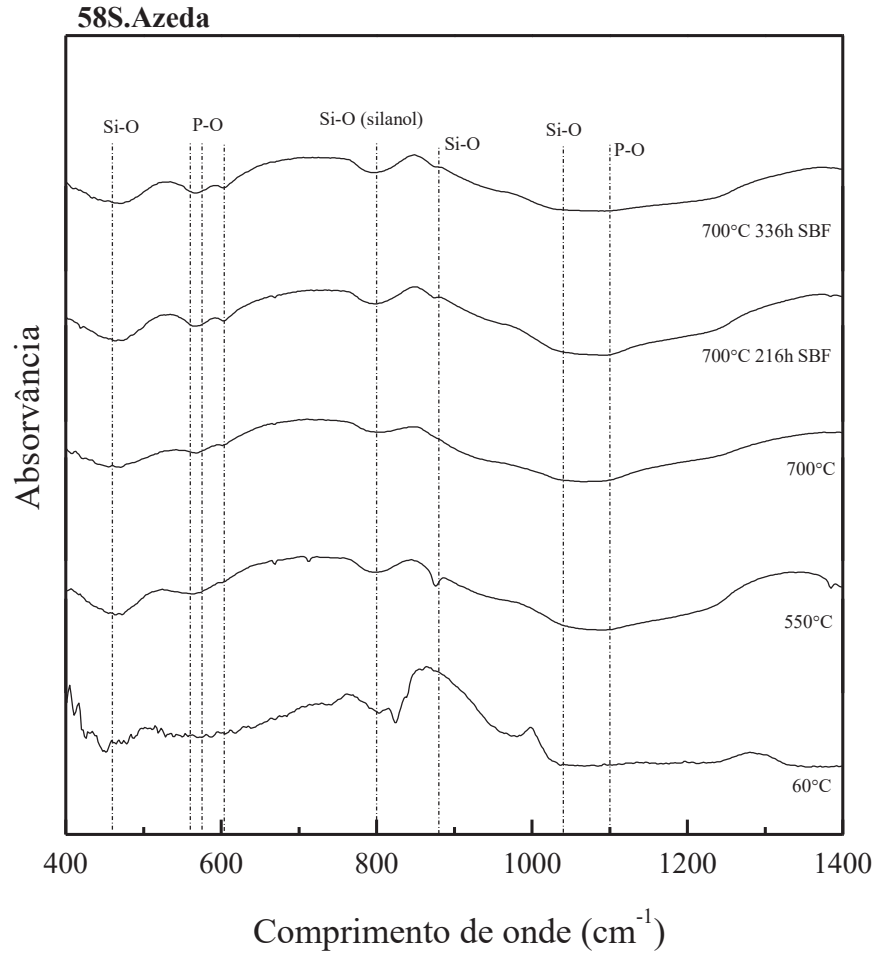


Figura 30: Espectro de infravermelho da amostra padrão Azeda58S a 60, 550 e 700°C, e após imersão em SBF (216 e 336horas).

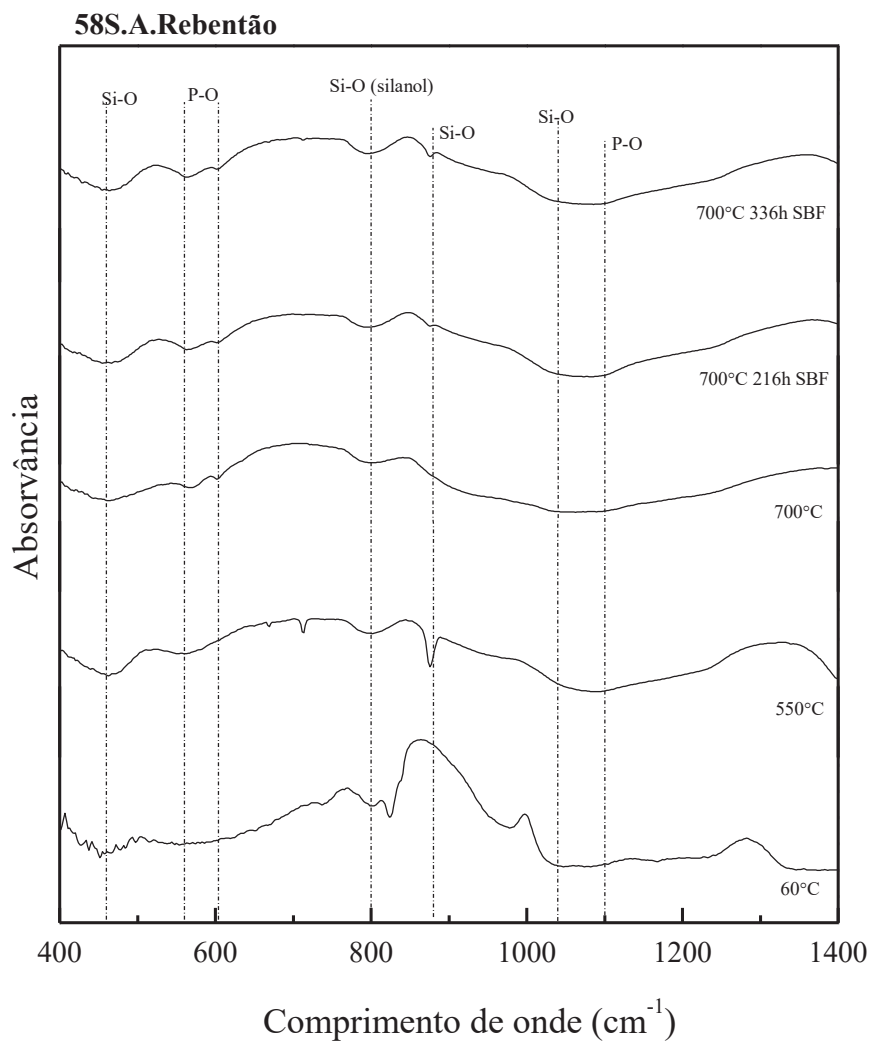


Figura 31: Espectro de infravermelho da amostra padrão A.Rebentão58S a 60, 550 e 700°C, e após imersão em SBF (216 e 336horas).

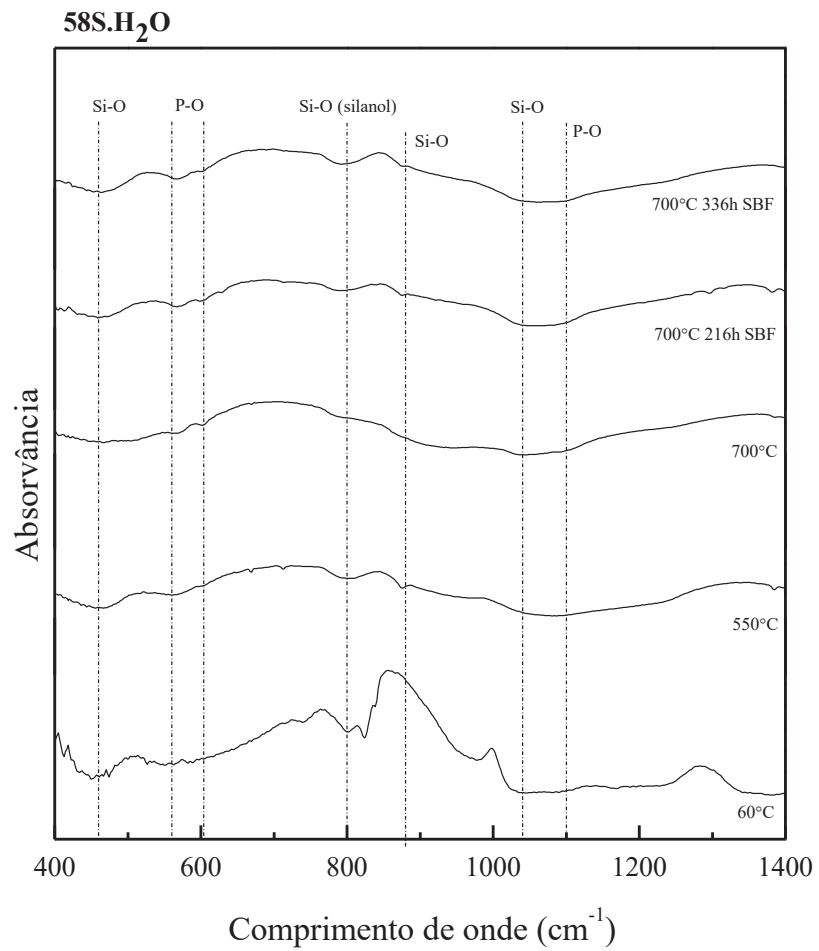


Figura 32: Espectro de infravermelho da amostra padrão H₂O.58S a 60, 550 e 700°C, e após imersão em SBF (216 e 336horas).

5.3 - Sistema ternário 77S

Todas as amostras pertencentes ao sistema ternário, Azeda77S (figura 33) e H₂O.77S (padrão, figura 34) apresentam a banda em flexão Si-O a 460cm⁻¹, a partir dos 550°C. Ambas apresentam a banda em distensão Si-O a 926cm⁻¹, representativa da estrutura amorfa, mas não apresenta a banda a 1024cm⁻¹.

A amostra Azeda77S apresenta uma banda em flexão P-O a 575cm⁻¹ após imersão em SBF, o que indica uma fase rica em fosfato cristalino. A amostra padrão não apresenta esta banda. Nenhuma das amostras apresenta a banda em flexão P-O a 620cm⁻¹.

A amostra Azeda77S, ao contrário da amostra padrão, apresenta a banda em distensão Si-O a 880cm⁻¹, que se refere à formação da fase rica em fósforo-apatite, mas não apresenta a banda a 1040cm⁻¹, que é ligeiramente detetada na amostra padrão.

Ambas as amostras apresentam uma banda em distensão Si-O a 800cm⁻¹.

Ambas as amostras deste sistema, apresentam uma banda em flexão P-O a 560cm⁻¹ e a banda em distensão P-O 1100cm⁻¹, bandas utilizadas para a caracterização da camada de hidroxiapatite.

Após a imersão em SBF, na amostra Azeda77S aparece uma banda a aproximadamente 527cm⁻¹ (indicado por uma seta), banda a qual não aparece na amostra padrão, nem em nenhuma das amostras dos outros sistemas referidas anteriormente. Esta banda representa ligações P-OH, que corresponde ao PO₄³⁻. É de se notar que para a mesma amostra no espectro de raio-X foi detetado um pico de Ca₂HP₃O₁₀, o qual não sucede na amostra padrão, no entanto aparece nas amostras Azeda45S5 e A.Rebentão45S5, as quais não apresentam esta banda a 527cm⁻¹.

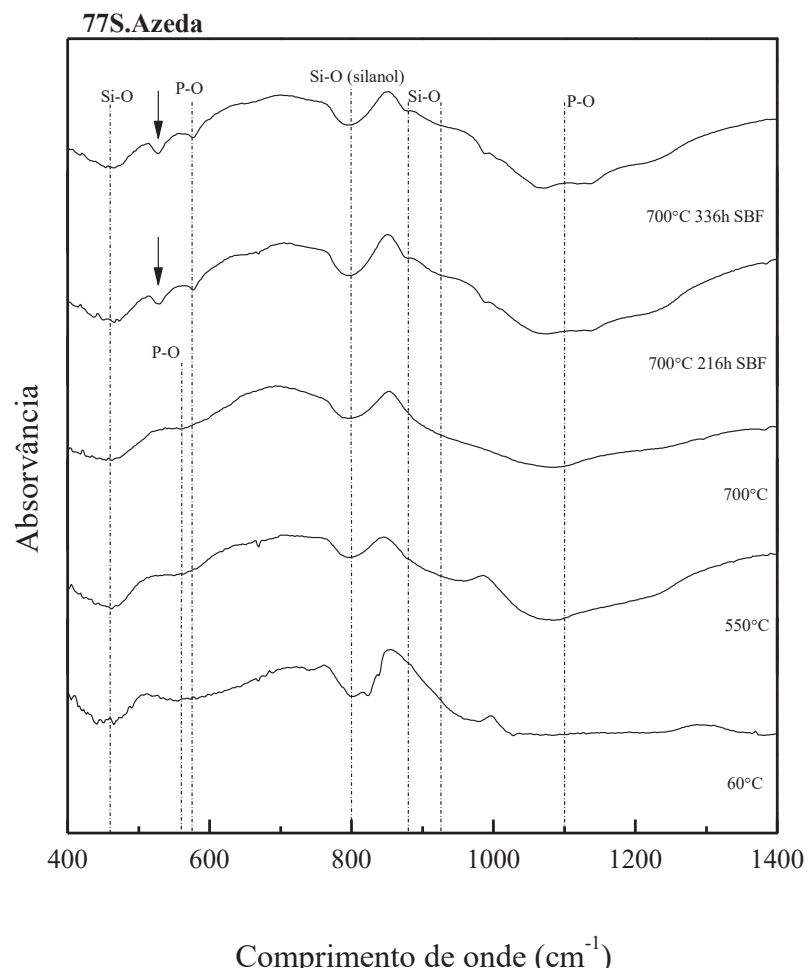


Figura 33: Espectro de infravermelho da amostra padrão Azeda77S a 60, 550 e 700°C, e após imersão em SBF (216 e 336horas).

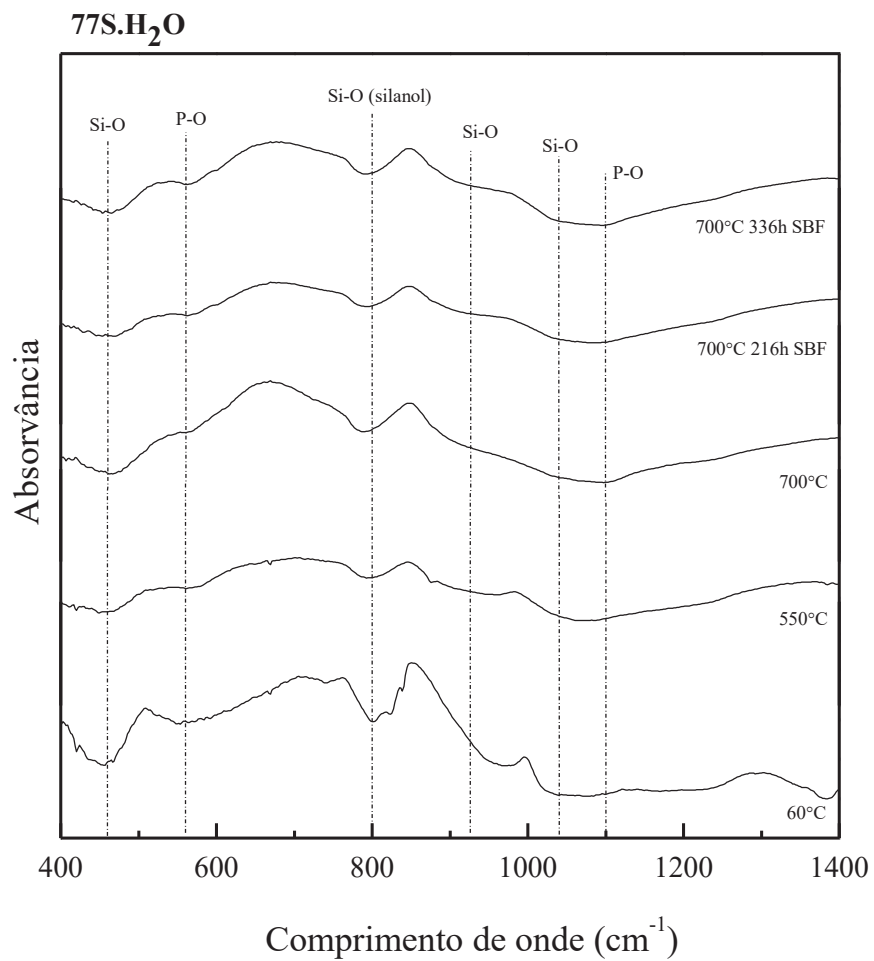


Figura 34: Espectro de infravermelho da amostra padrão H₂O.77S a 60, 550 e 700°C, e após imersão em SBF (216 e 336horas).

6 - Resultados *in vitro* - SEM-EDS

A microscopia eletrónica de varrimento é um método prático para compreender a morfologia da superfície das amostras e a camada de hidroxiapatite que se forma depois da imersão em SBF.

6.1 - Azeda45S5

As figuras 35 e 35.1 ilustram as imagens de SEM e os respetivos gráficos de análise química de elementos, obtidos por EDS, da amostra Azeda45S5. Através da figura 35(A) consegue-se notar a presença de duas zonas nas amostras Azeda45S5 tratadas a 700°C, uma zona mais clara e uma zona mais escura. Segundo o EDS, figura 35.1(1 e 2), a zona mais clara apresenta uma maior quantidade de silício e de oxigénio, comparativamente à zona mais escura. Após imersão em SBF (figura 35 B e C), as duas zonas continuam mais ou menos visíveis. Na zona mais escura, a composição de silício e oxigénio mantém-se inalterada (figura 35.1 a) e na zona mais clara a concentração de sódio aumenta ligeiramente (figura 35.1 b e I).

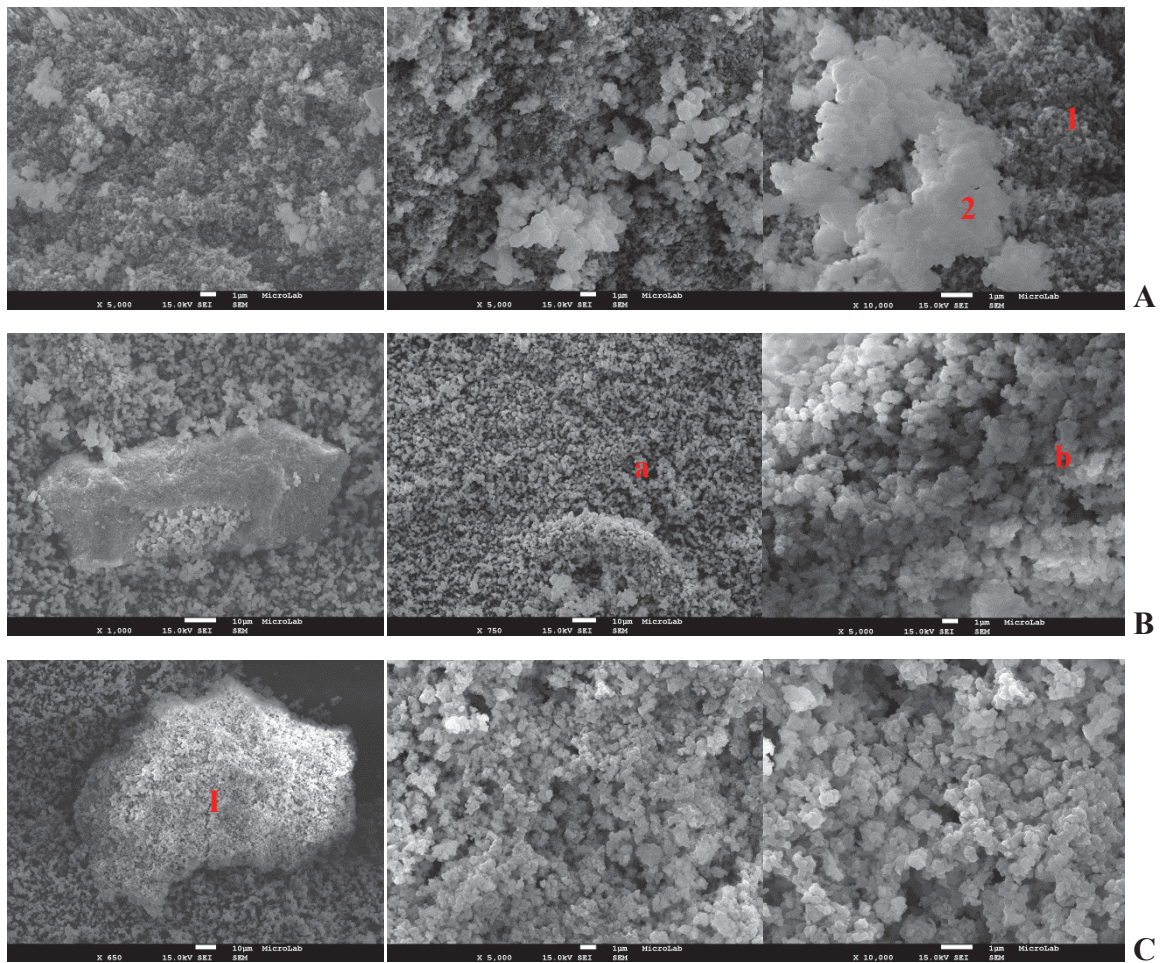


Figura 35: Micrografias de microscopia eletrônica de varrimento da amostra Azeda45S5 em pó, a 700°C (A), após 216 horas (B) e 336 horas (C) horas em SBF.

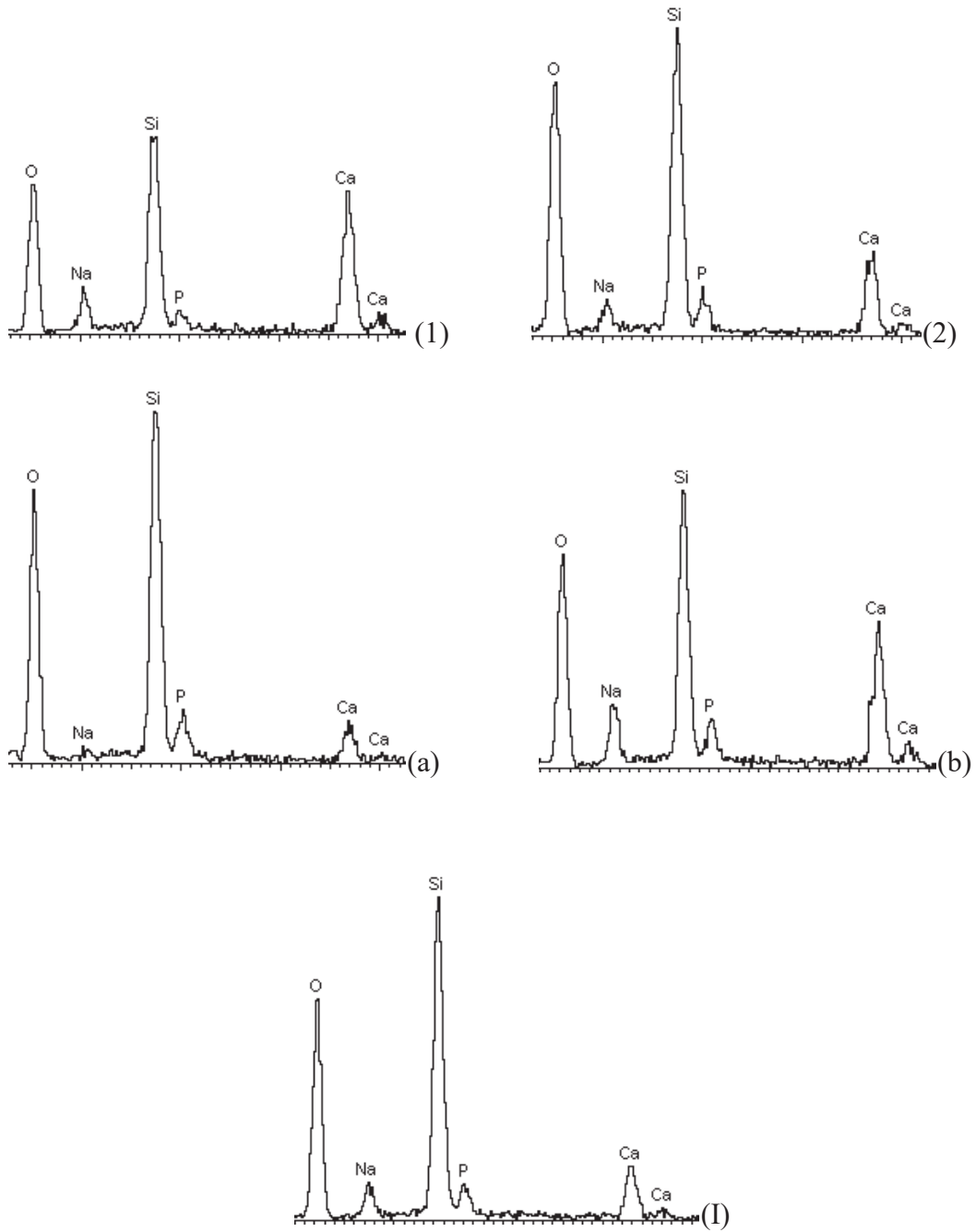


Figura 35.1: Resultados do EDS da amostra Azeda45S5, a 700°C (1 e 2), após 216 (a e b) e 336 (I) horas em SBF.

6.2 - H₂O.45S5

As figuras 36 e 36.1 ilustram as imagens de SEM e os respectivos gráficos de análise química de elementos, obtidos por EDS, da amostra H₂O.45S5 a 700°C. Através da figura 36 verifica-se que se trata de uma amostra heterogênea. As zonas mais lisas (1 e 2) são ricas em silício e oxigênio, contendo também quantidades razoáveis de cálcio e sódio. Sobre as estruturas lisas, há a presença de algumas agulhas (3) ricas em oxigênio e sódio.

Após a imersão em SBF (figura 36.2 A-216horas e B-336horas; figura 36.3) verificam-se estruturas porosas internamente (1) ricas em silício e sódio e lisas no seu exterior com alguns depósitos de cloreto de sódio (4), que ao longo do tempo em SBF (figura 36.3 B) vão sendo cobertas com depósitos ricos em cálcio em forma de tufos.

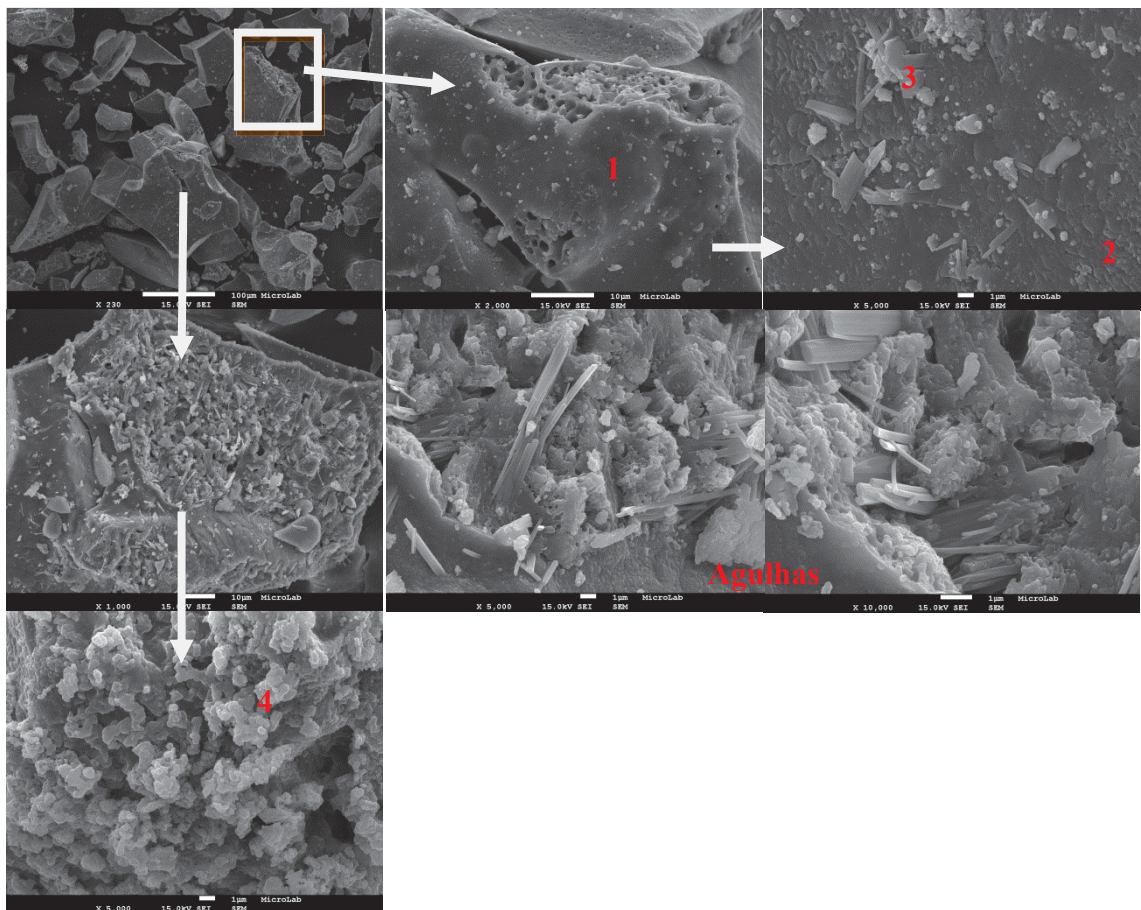


Figura 36: Micrografias de microscopia eletrônica de varrimento da amostra H₂O.45S5 em pó, a 700°C, mostrando ser uma amostra heterogênea.

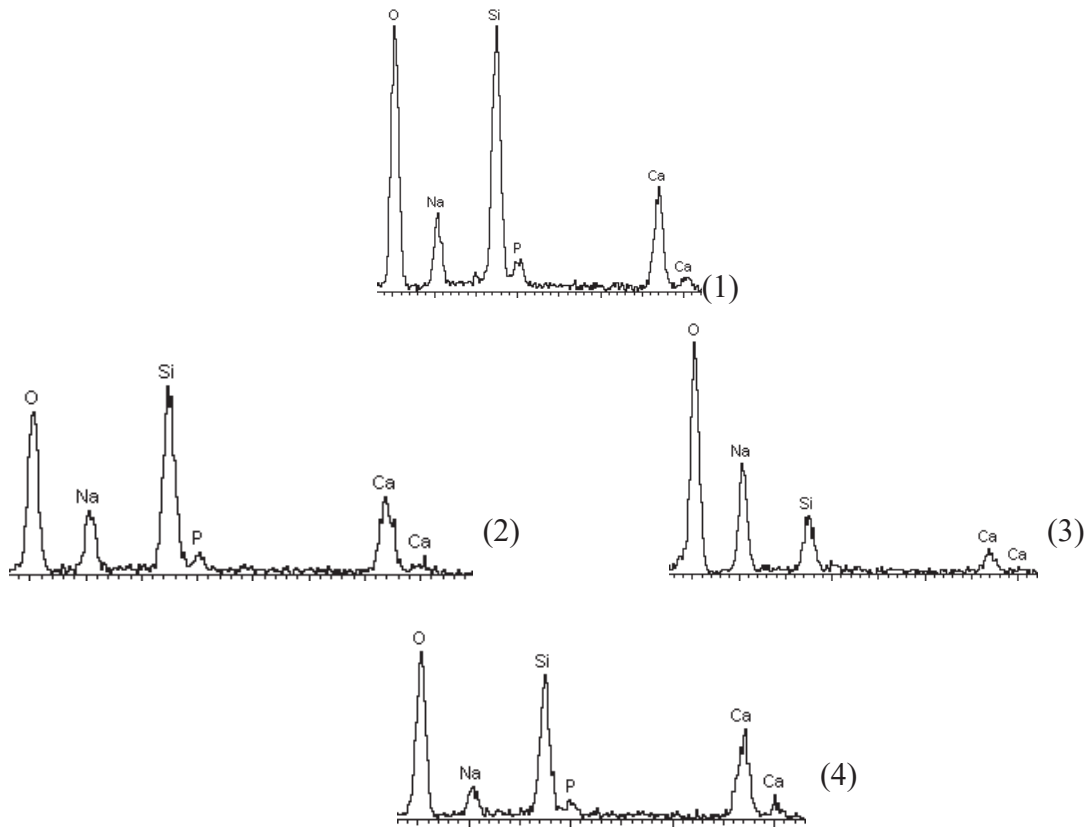


Figura 36.1: Resultados do EDS dos diferentes sítios da amostra H₂O.45S5 tratados a 700°C.

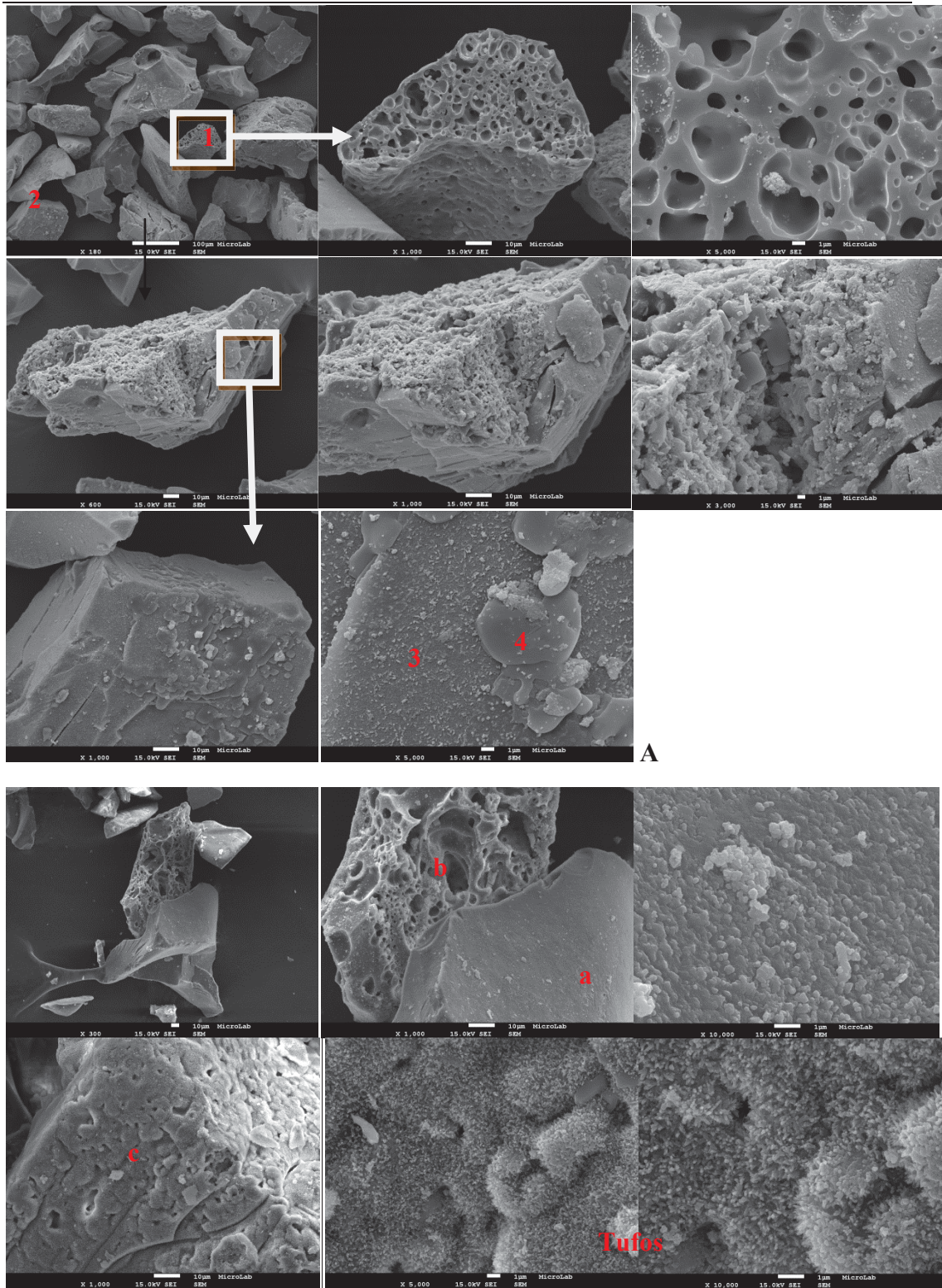


Figura 36.2: Micrografias de microscopia eletrônica de varrimento da amostra H₂O.45S₅ em pó, após 216(A) e 336(B) horas em SBF.

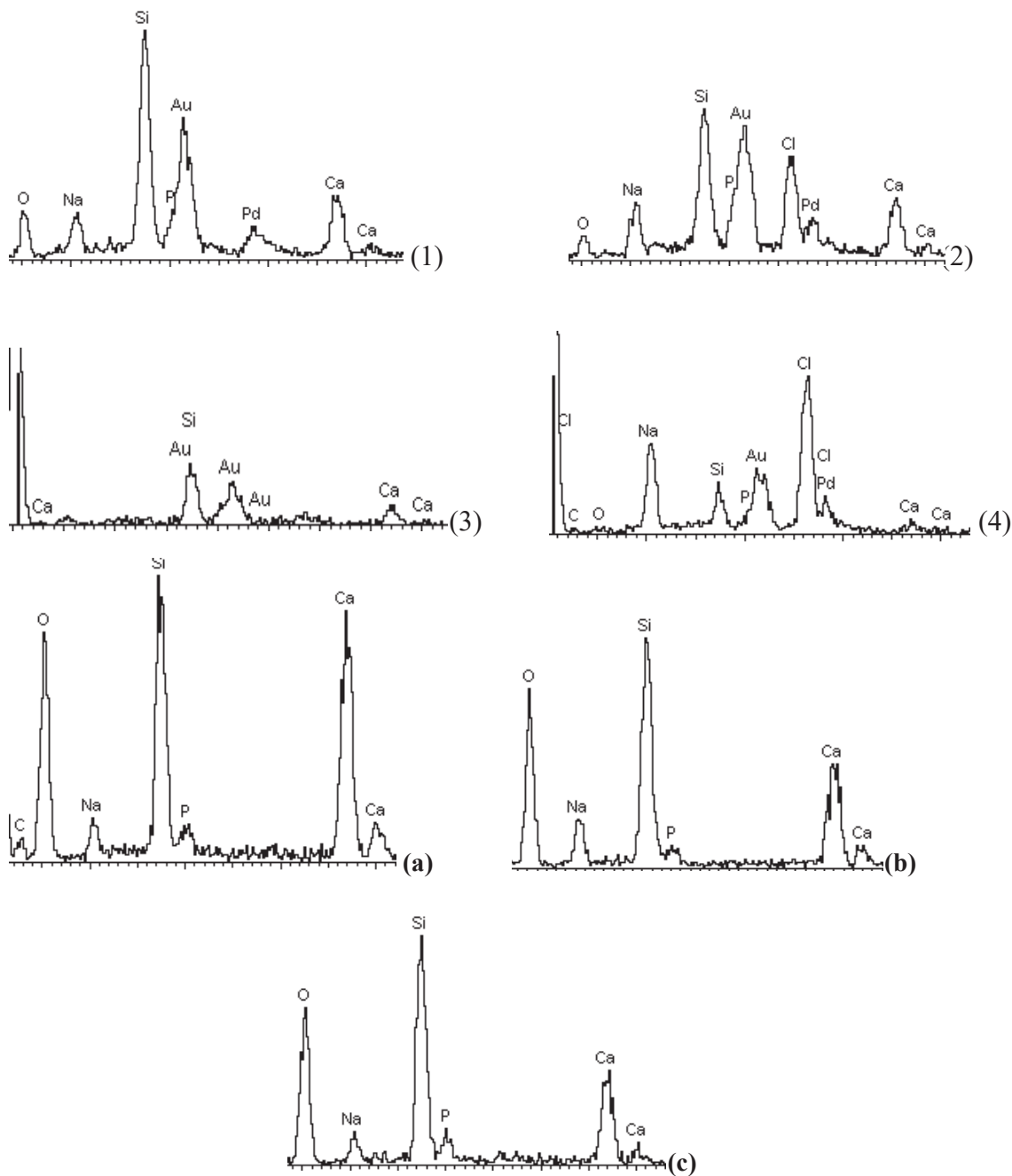


Figura 36.3: Resultados do EDS dos diferentes sítios da amostra H₂O.45S5 após 216 (1, 2, 3 e 4) e 336 (a, b e c) horas em SBF.

6.3 - A.Rebentão45S5

As figuras 37 e 37.1 ilustram as imagens de SEM e os respectivos gráficos de análise química de elementos, obtidos por EDS, da amostra A.Rebentão45S5. Através da figura 37(A) verifica-se que se trata também de uma amostra de morfologia heterogênea, mas com composições mais ou menos constantes (figura 37.1 1 e 2). Após a imersão em SBF (figura 37 B-216horas e C-336horas), ao longo do tempo, verifica-se a deposição de estruturas irregulares ricas em cálcio (figura 37.1 II) por cima das estruturas já existentes.

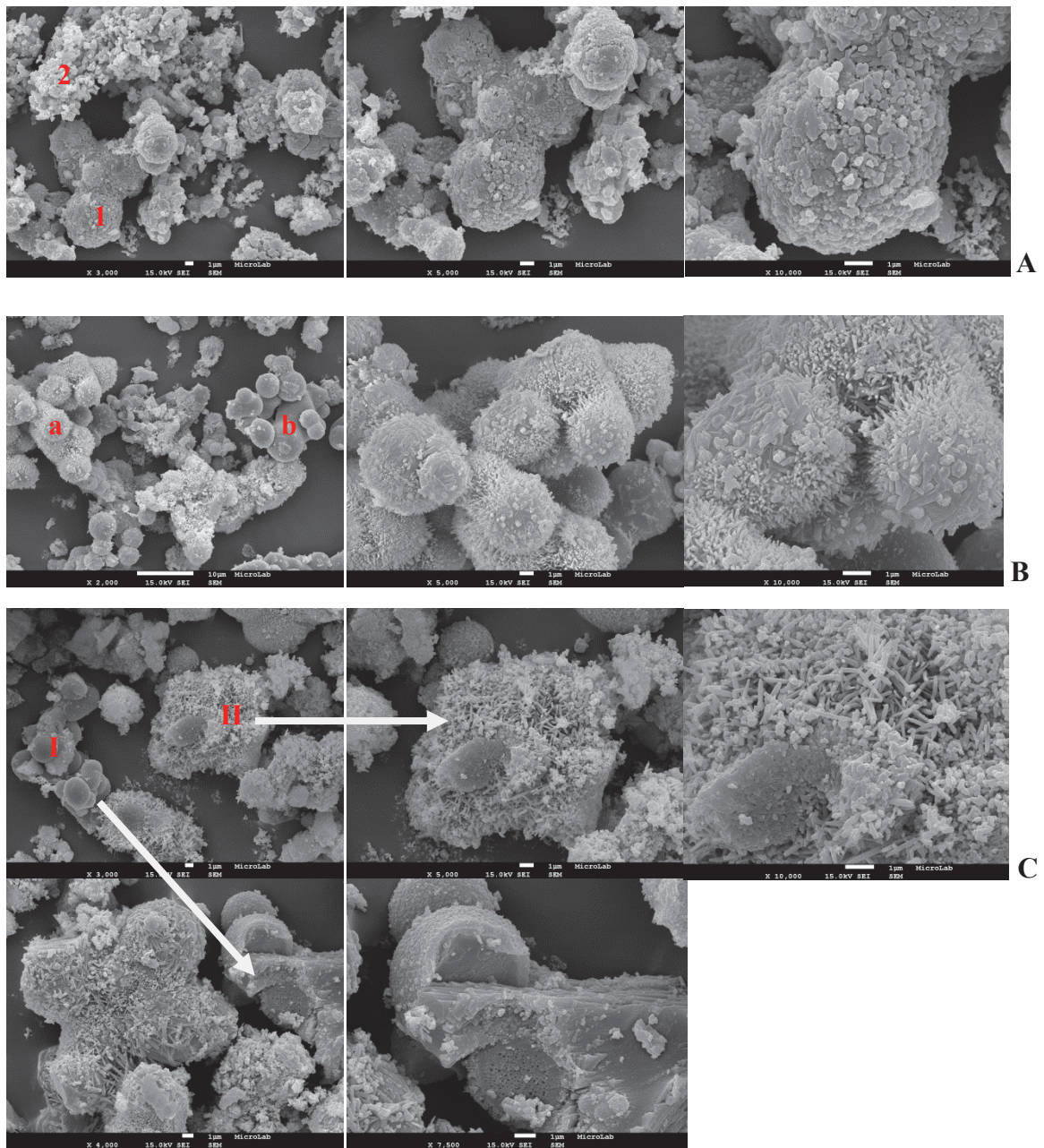


Figura 37: Micrografias de microscopia eletrônica de varrimento da amostra A.Rebentão45S5 em pó, a 700°C (A), após 216 horas (B) e 336 horas (C) horas em SBF.

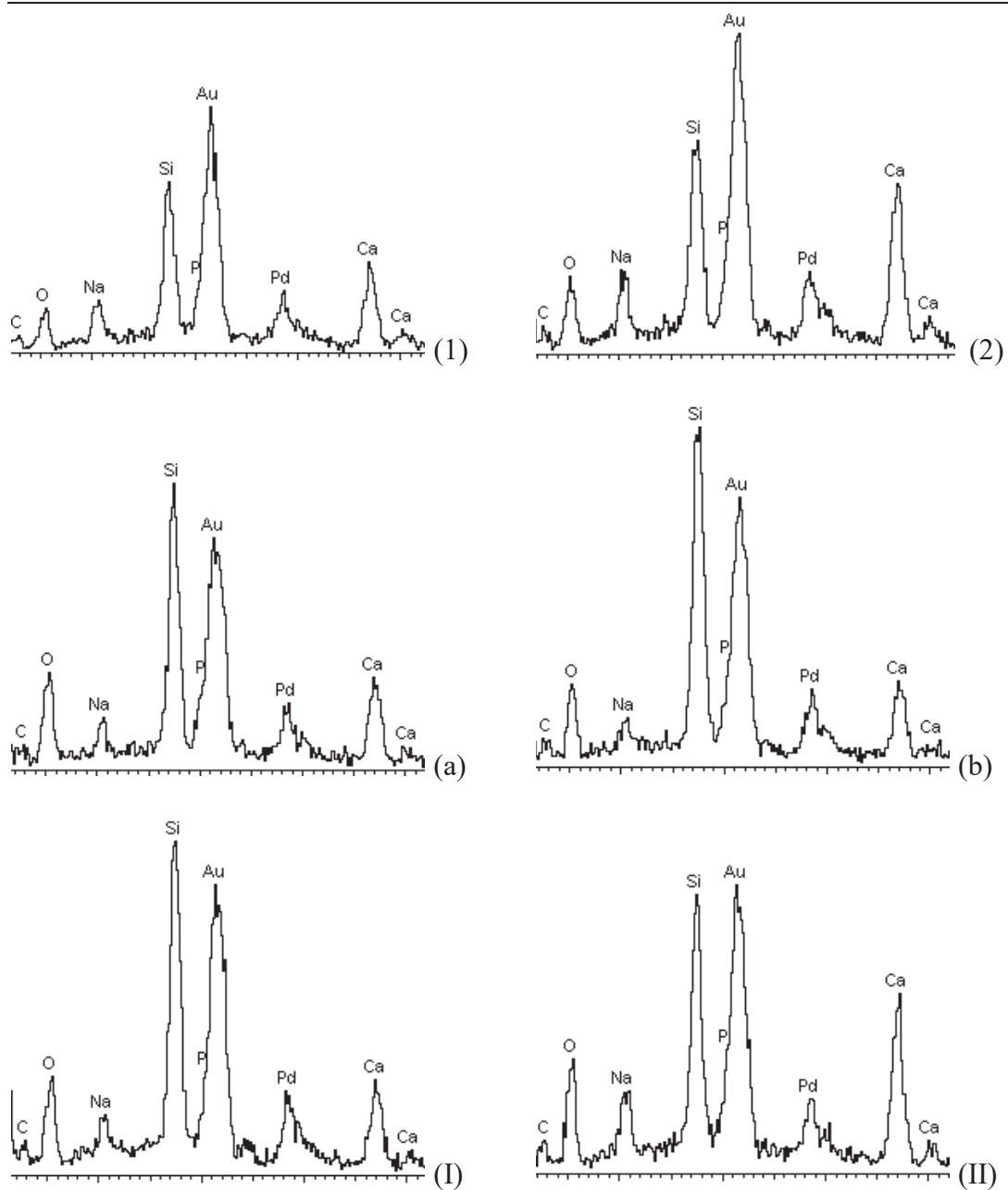


Figura 37.1: Resultados do EDS da amostra A.Rebentão45S5, a 700°C (1 e 2), após 216 (a e b) e 336 (I e II) horas em SBF.

6.4 - Azeda58S

As figuras 38 e 38.1 ilustram as imagens de SEM e os respectivos gráficos de análise química de elementos, obtidos por EDS, da amostra Azeda58S. Através da figura 38(A) verifica-se que se trata de uma amostra também heterogénea, com duas zonas bem visíveis, uma mais escura e lisa (1) rica em silício e oxigénio; e uma mais clara e rugosa (2, 3 e 4) ricas em cálcio (figura 38.1 1-4). Após 216 horas de imersão em SBF (figura 35 B), na zona lisa foi possível a observação de cristais de cloreto de sódio (b). Sobre estes, após 336 horas de imersão em SBF (figura 38 C) verifica-se a deposição de estruturas ricas em cálcio e fósforo (figura 38.1 III).

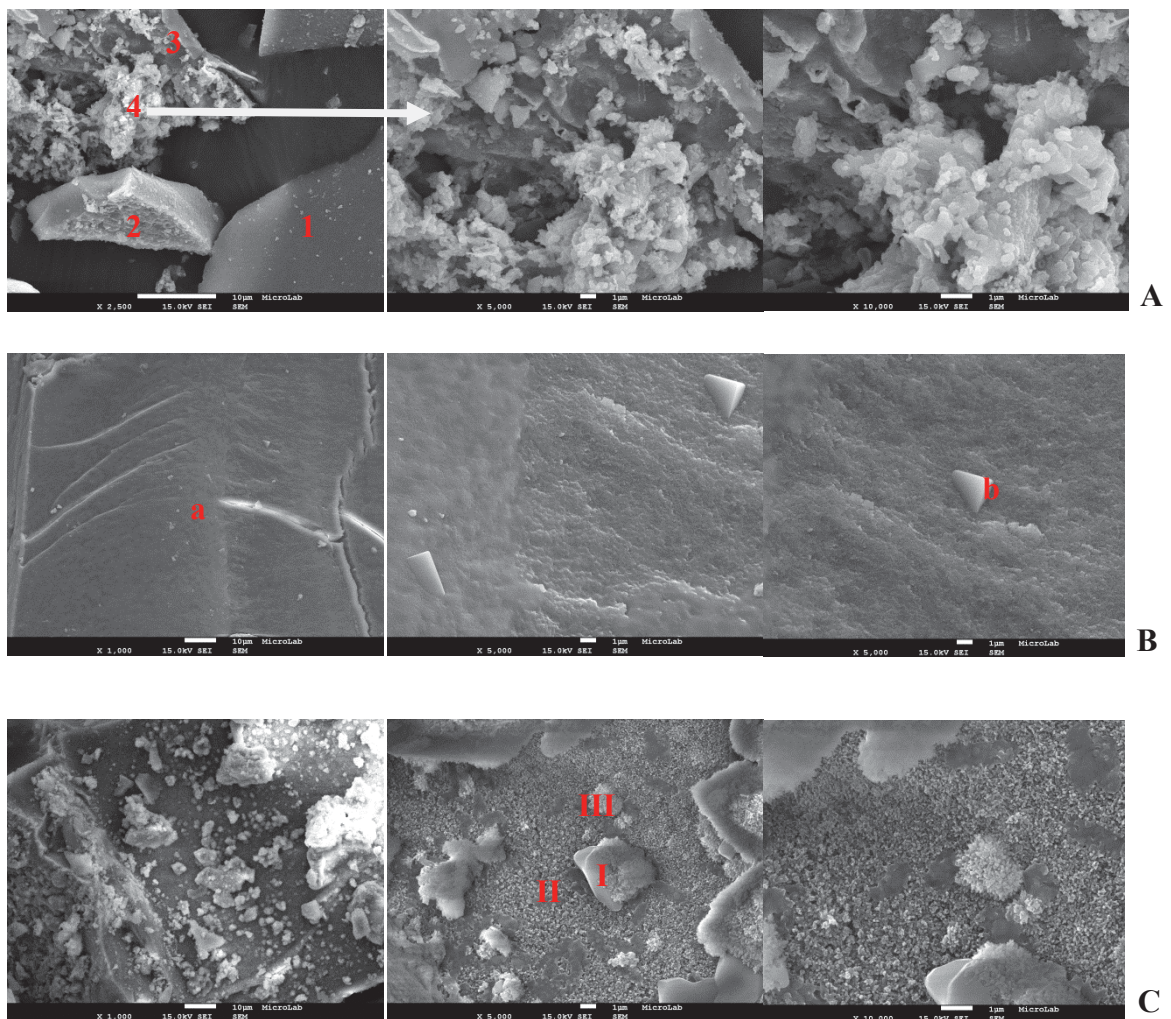


Figura 38: Micrografias de microscopia eletrónica de varrimento da amostra Azeda58S em pó, a 700°C (A), após 216 horas (B) e 336 horas (C) horas em SBF.

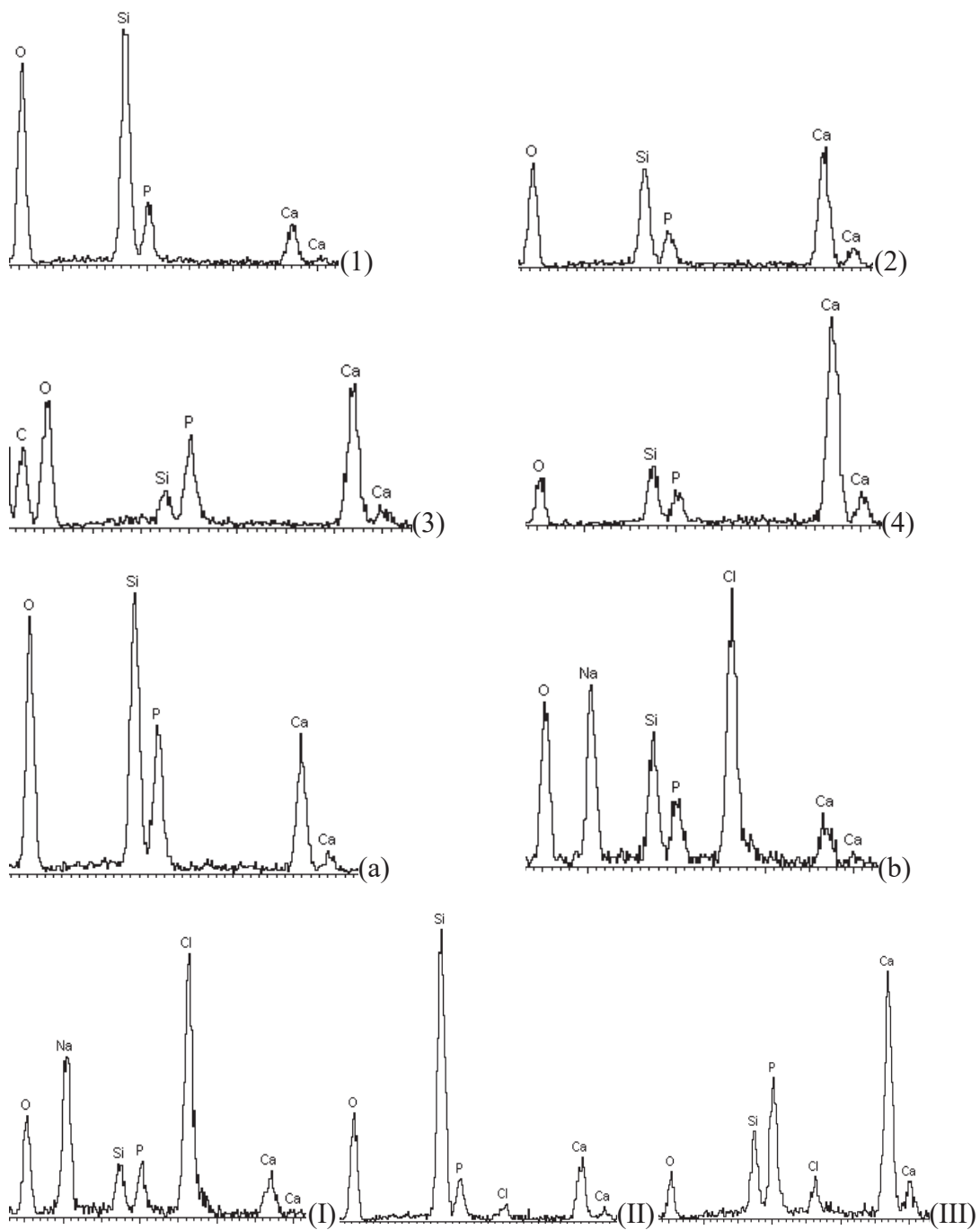


Figura 38.1: Resultados do EDS da amostra Azeda58S, a 700°C (1, 2, 3 e 4), após 216 (a e b) e 336 (I, II e III) horas em SBF.

6.5 - H2O.58S

As figuras 39 e 39.1 ilustram as imagens de SEM e os respectivos gráficos da análise química de elementos, obtidos por EDS, da amostra H₂O.58S a 700°C. Através da figura 39(A) verifica-se que se trata de uma amostra homogênea e lisa (2) com muitos depósitos de cálcio em forma de folhas (1).

Após 216 horas de imersão em SBF (figura 39.2 A), deixa de se observar os depósitos em forma de folhas e começa-se a verificar a deposição de estruturas ricas em cálcio e fósforo na forma de tufo (figura 39.3 1), aumentando a sua concentração ao longo do tempo imerso em SBF-336horas (figura39.2 B).

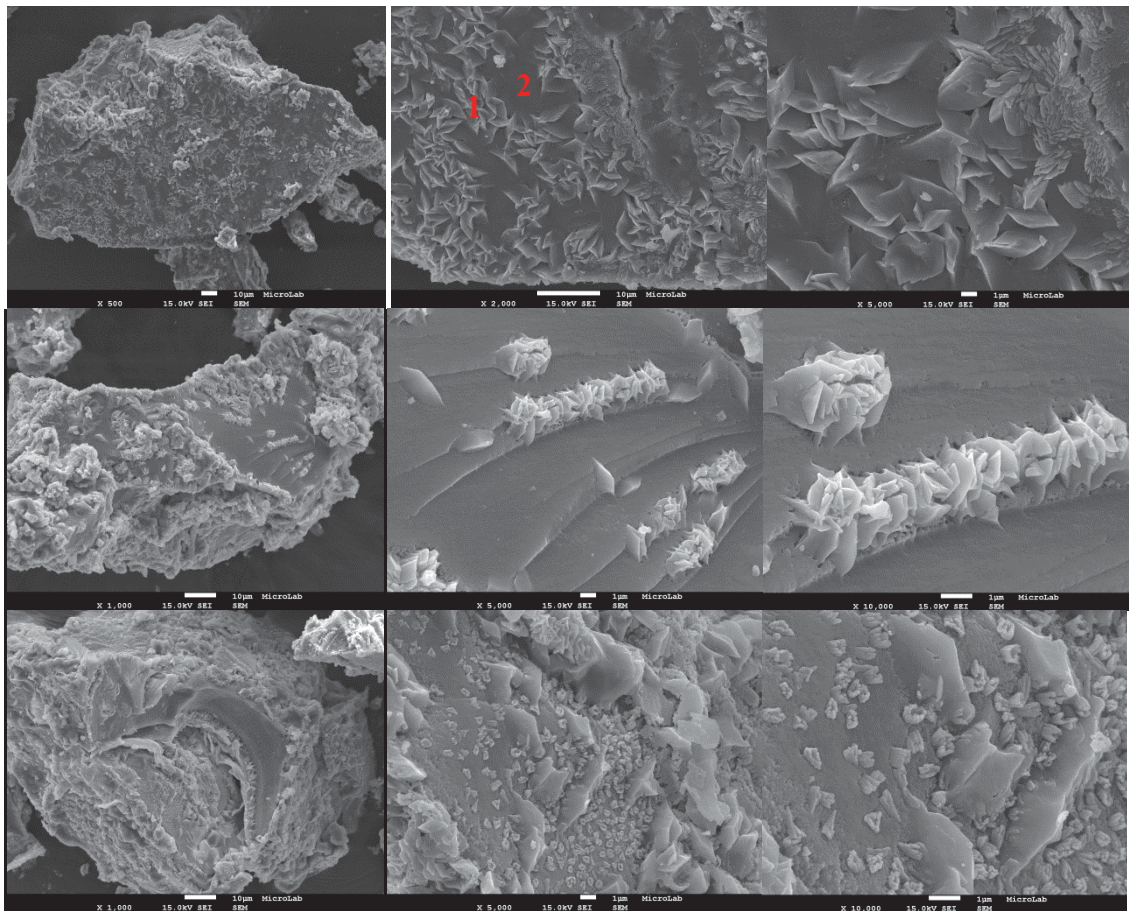


Figura 39: Micrografias de microscopia eletrônica de varrimento da amostra H₂O.58S em pó, a 700°C, mostrando depósitos de cálcio em forma de folhas.

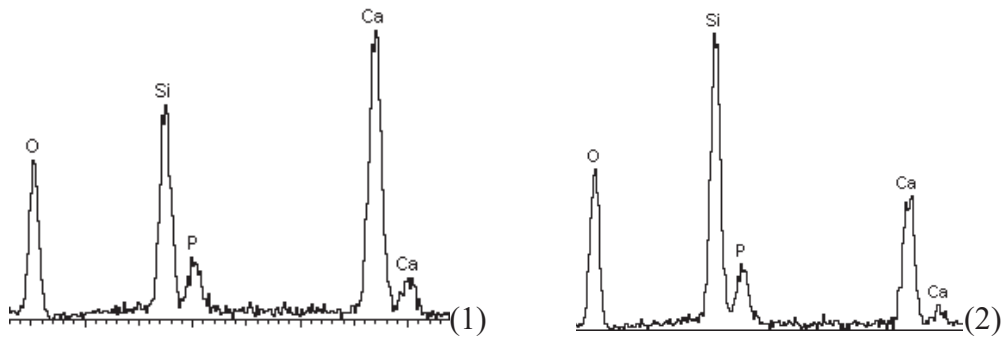


Figura 39.1: Resultados do EDS de dois sítios da amostra H₂O.58S tratada a 700°C.

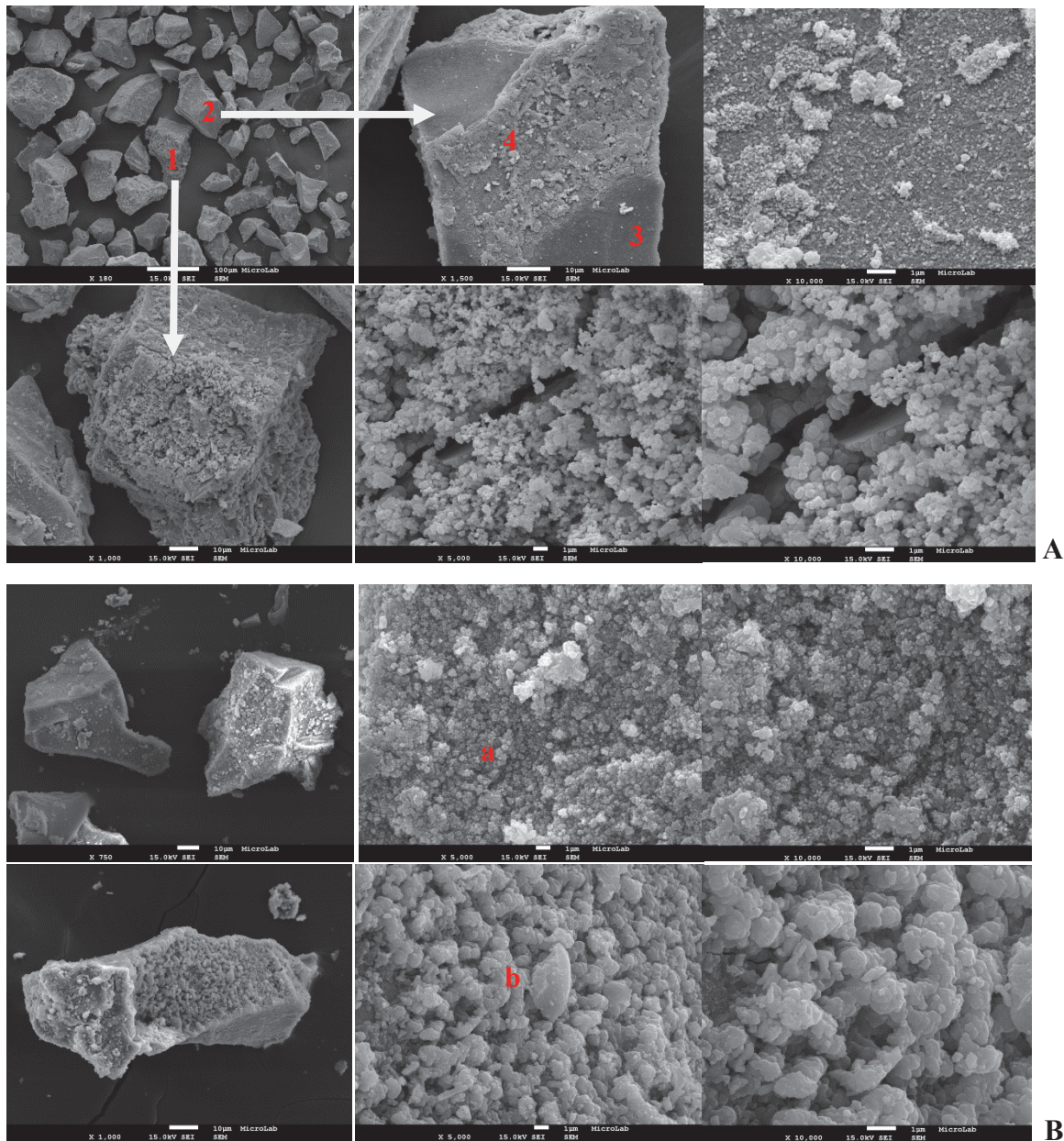


Figura 39.2: Micrografias de microscopia eletrônica de varrimento da amostra H₂O.58S em pó, após 216(A) e 336(B) horas em SBF.

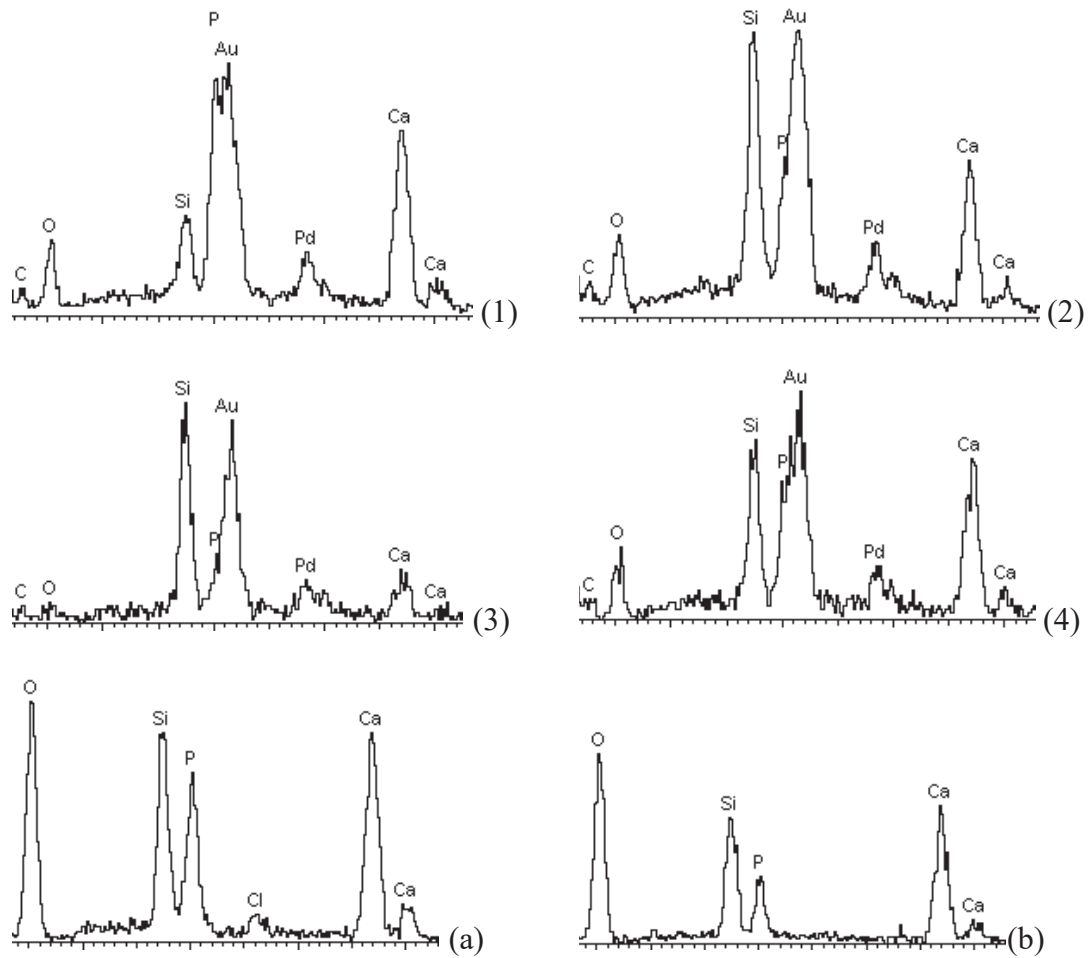


Figura 39.3: Resultados do EDS dos diferentes sítios da amostra H₂O.58S após 216 (1, 2, 3 e 4) e 336 (a e b) horas em SBF.

6.6 - A.Rebentão58S

As figuras 40 e 40.1 ilustram as imagens de SEM e os respectivos gráficos de análise química de elementos, obtidos por EDS, da amostra A.Rebentão58S. A análise da figura 40(A) permite verificar que se trata de uma amostra uniformemente lisa mas com algumas regiões rugosas ricas em cálcio e fósforo (figura 40.1 1). Após 216 horas de imersão em SBF (figura 40 B), observa-se uma concentração semelhante dessa camada rugosa, tornando-se mais visível ao longo do tempo imerso em SBF-336horas (figura 40 C).

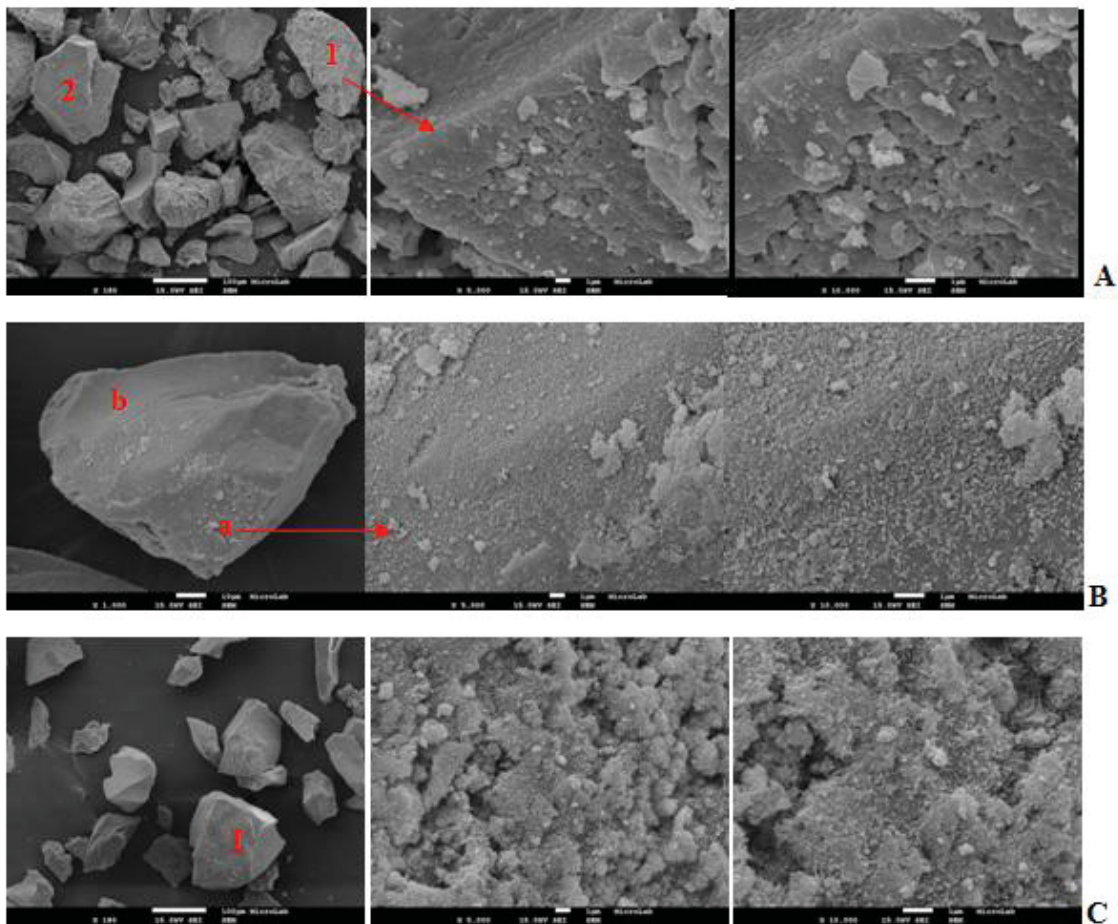


Figura 40: Micrografias de microscopia eletrônica de varrimento da amostra A.Rebentão58S em pó, a 700°C (A), após 216 horas (B) e 336 horas (C) horas em SBF.

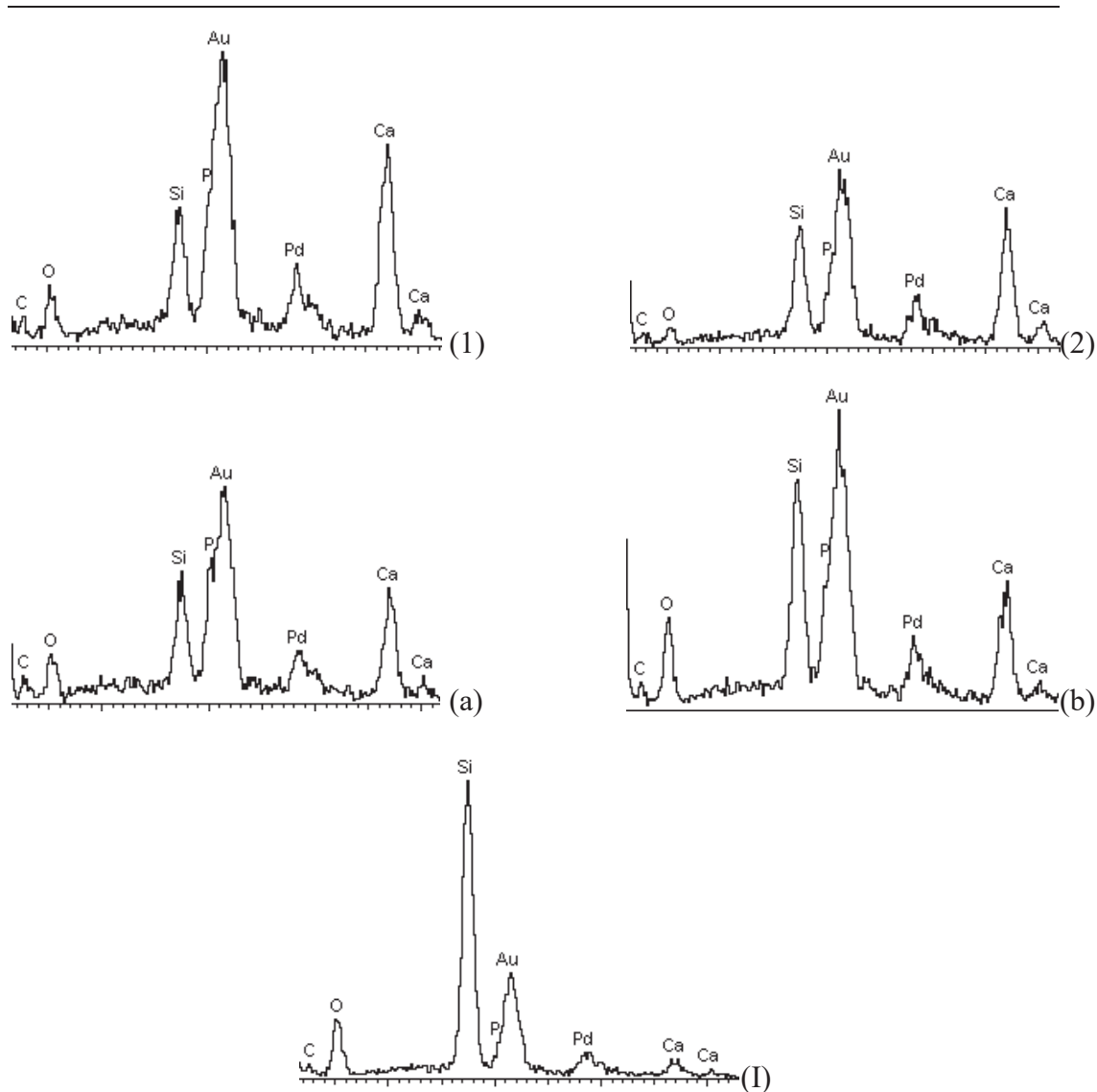


Figura 40.1: Resultados do EDS da amostra A.Rebentão58S, a 700°C (1 e 2), após 216 (a e b) e 336 (I) horas em SBF.

6.7 - Azeda77S

As figuras 41 e 41.1 ilustram as imagens de SEM da amostra Azeda.77S a 700°C e os respectivos gráficos de análise química de elementos, obtidos por EDS.

A análise da figura 41 permite verificar que a amostra apresenta uma estrutura uniformemente lisa e rica em silício, com depósitos de cálcio amontoados e formando círculos.

Após 216 horas de imersão em SBF (figura 41.2 A), observa-se a formação de agulhas ricas em fósforo e cálcio (1) sobre uma superfície rica em sílica (2). Outras estruturas lisas também são observadas com concentrações elevadas de sílica e fósforo (3 e 4). Após 336 horas em SBF (figura 41.2 B), por cima das estruturas lisas (a) e na ponta das agulhas (d) começam a surgir depósitos contendo sódio (figura 41.3 a e d).

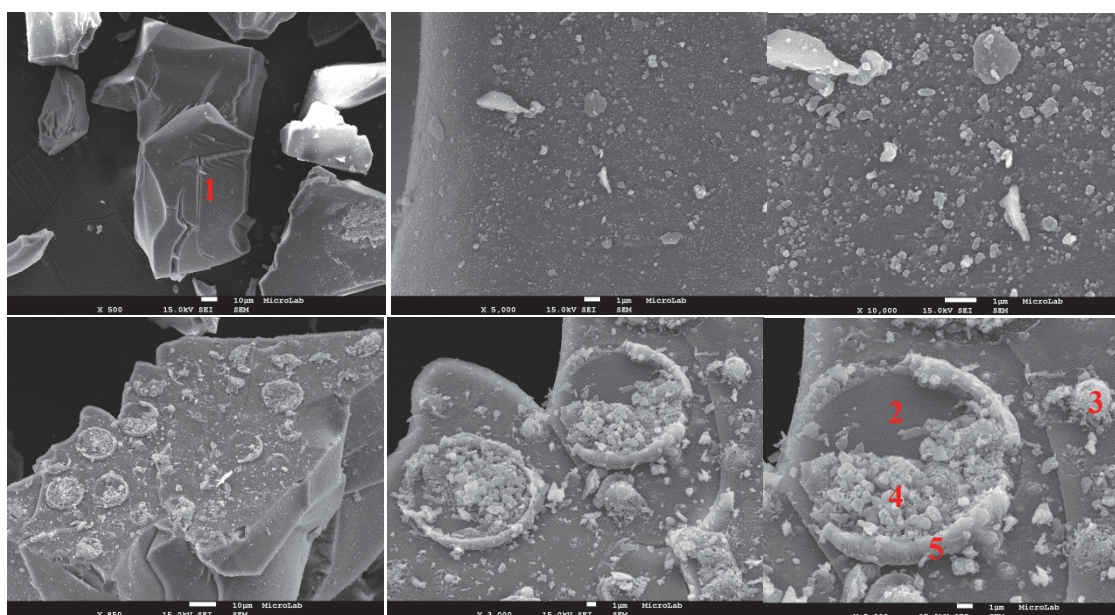


Figura 41: Micrografias de microscopia eletrônica de varrimento da amostra Azeda77S em pó, a 700°C, mostrando depósitos de cálcio amontoados formando círculos.

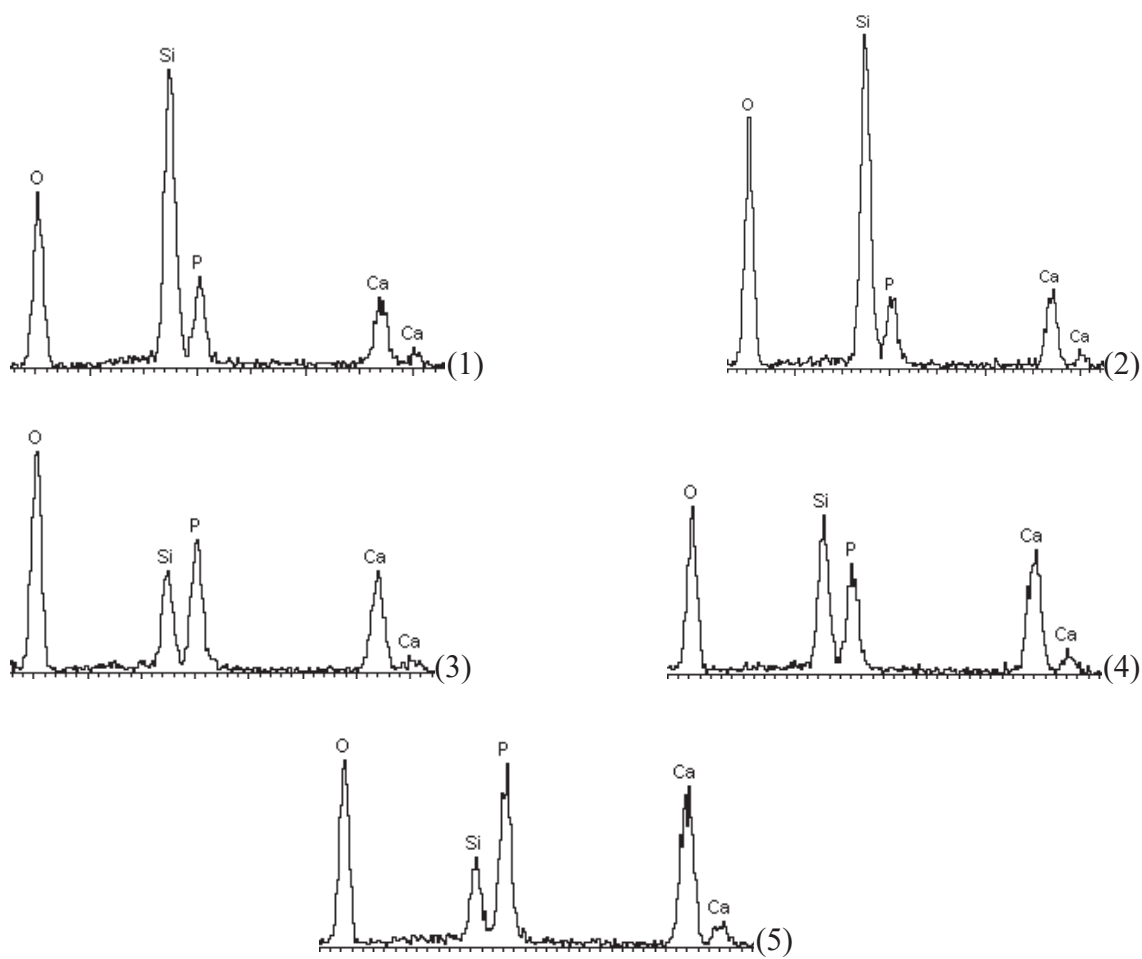


Figura 41.1: Resultados do EDS da amostra Azeda77S tratada a 700°C.

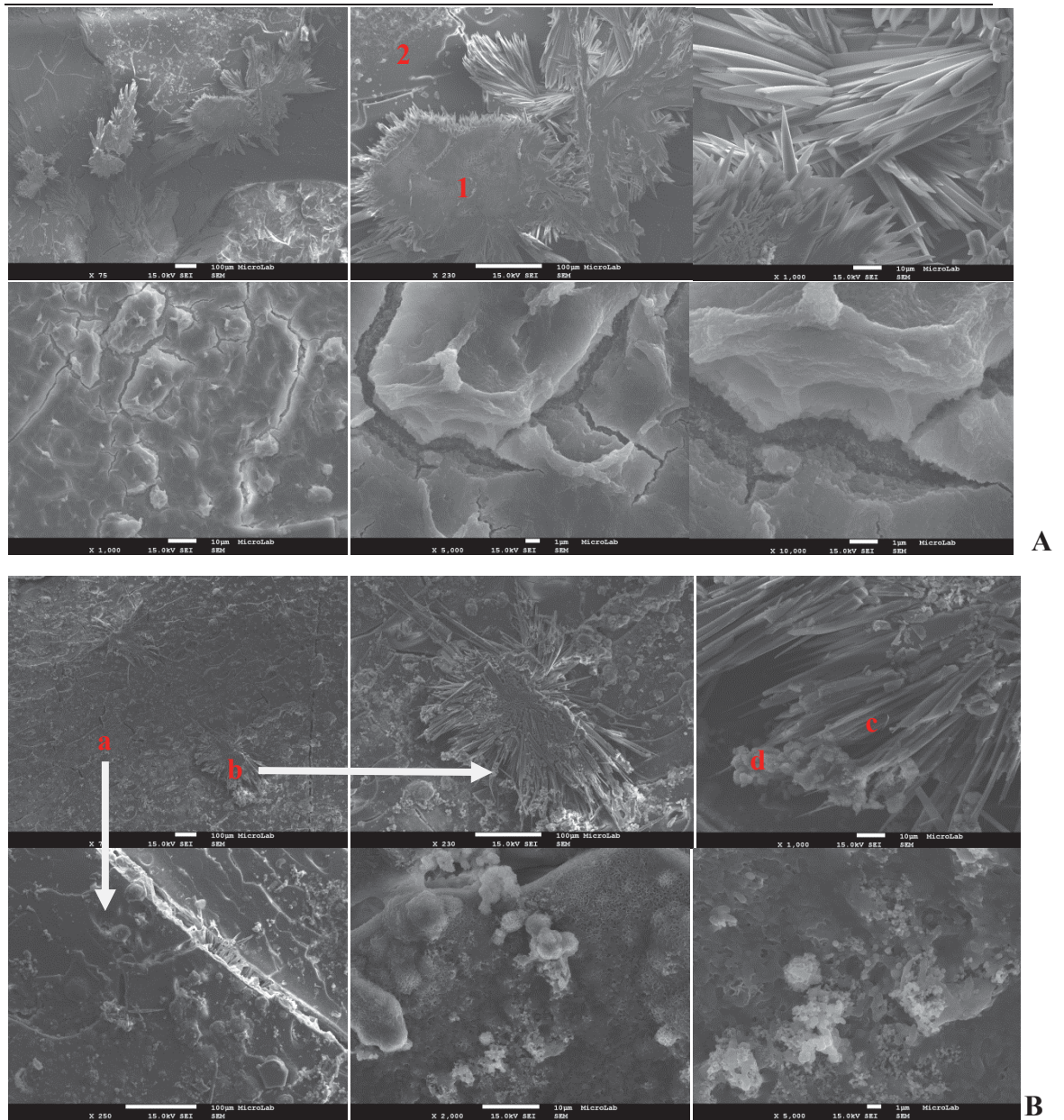


Figura 41.2: Micrografias de microscopia eletrônica de varrimento da amostra Azeda77S em pó, após 216(A) e 336(B) horas em SBF.

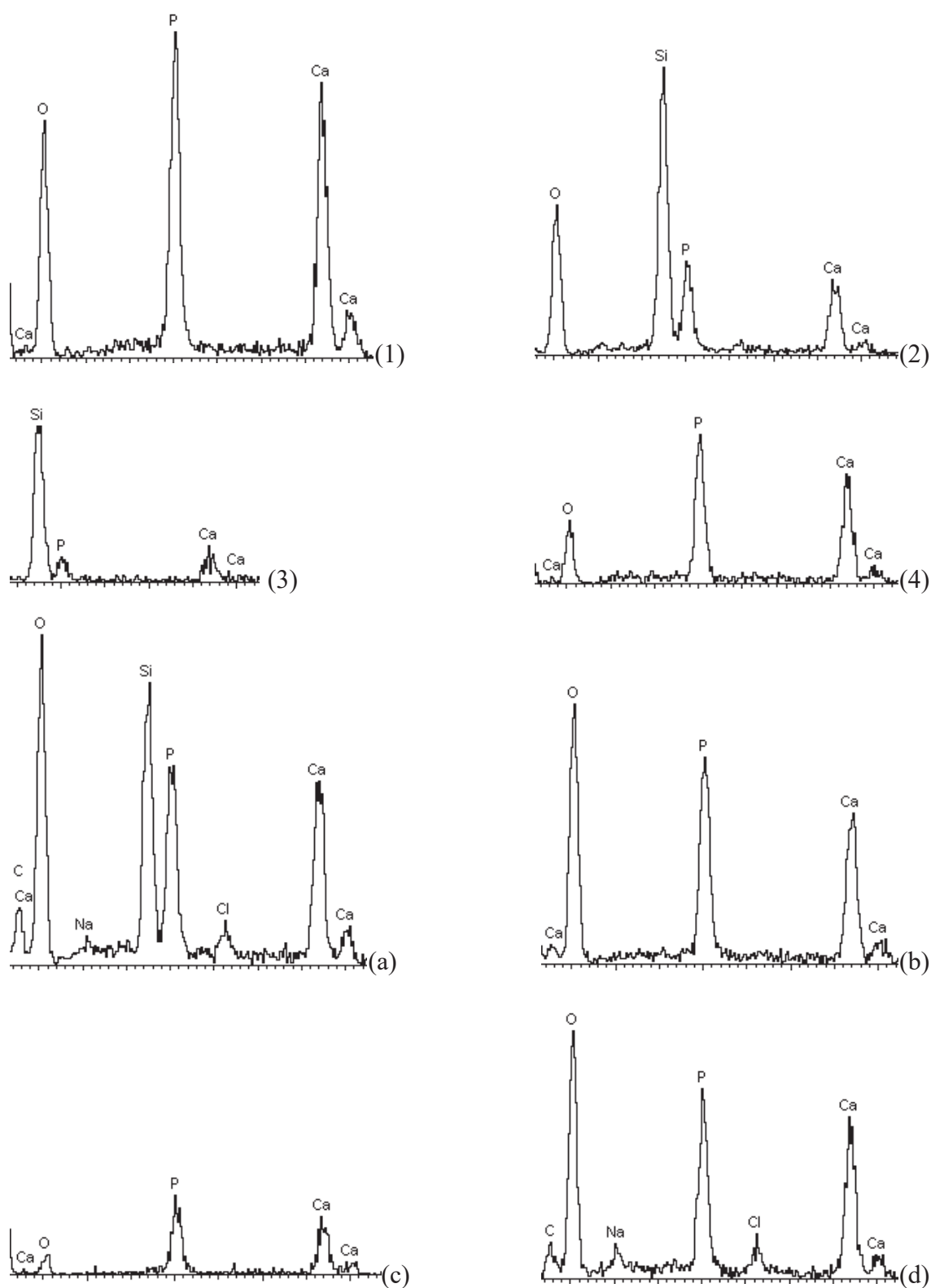


Figura 41.3: Resultados do EDS dos diferentes sítios da amostra Azeda77S após 216 (1, 2, 3 e 4) e 336 (a, b, c e d) horas em SBF.

6.8 - H2O.77S

As figuras 42 e 42.1 ilustram as imagens de SEM da amostra H₂O.77S e os respectivos gráficos de análise química de elementos, obtidos por EDS. A análise da figura 42 A permite verificar que a amostra é heterogênea, apresentando estruturas rugosas ricas em silício e cálcio (1) e estruturas lisas ricas em silício (2). Após 216 horas de imersão em SBF (figura 42 B), a amostra torna-se homogênea, e as estruturas lisas cobrem-se ligeiramente de depósitos ricos em cálcio e fósforo (a), tornando-se mais visível (II) ao longo do tempo imerso em SBF-336horas (figura 42C)

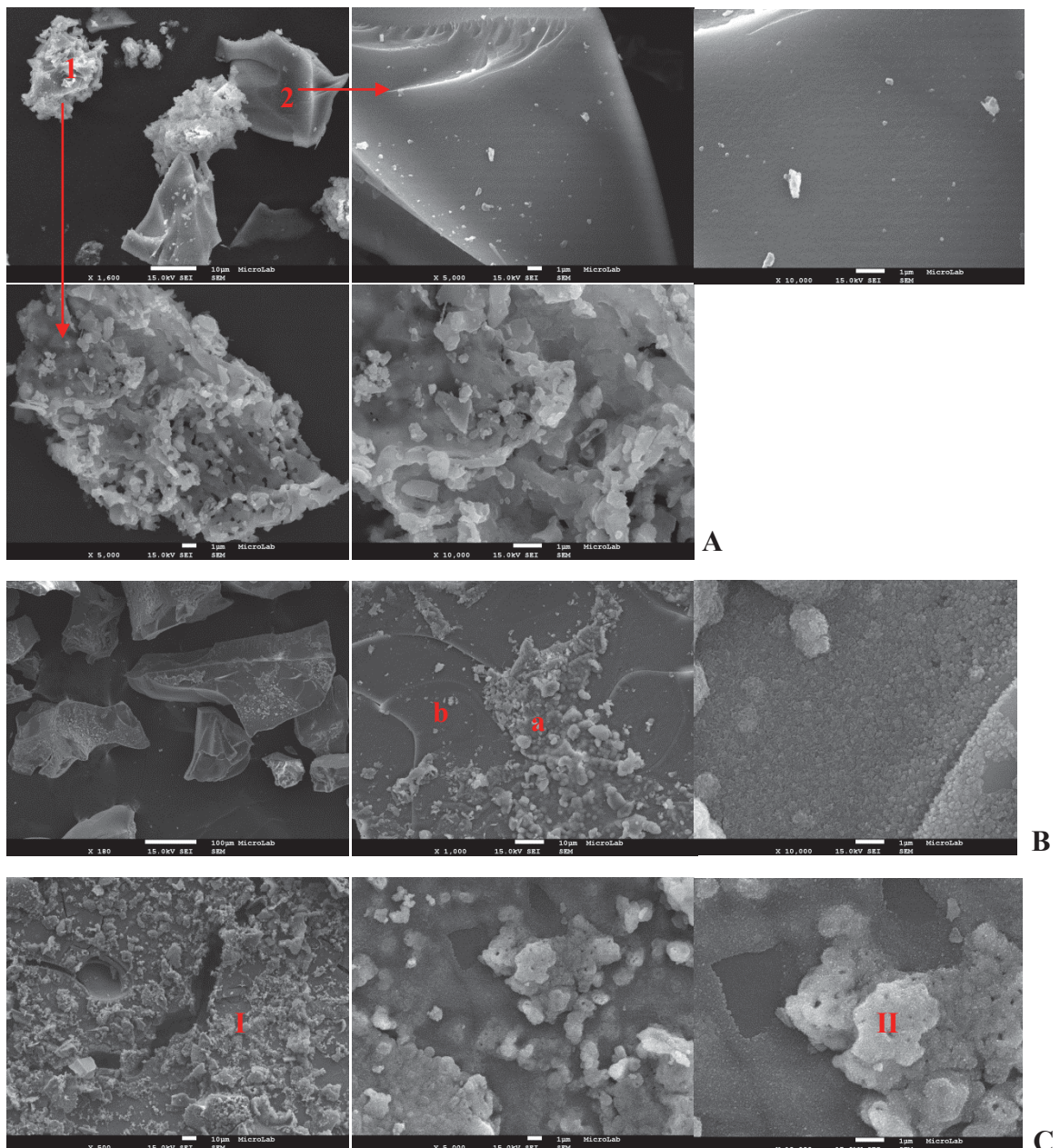


Figura 42: Micrografias de microscopia eletrônica de varrimento da amostra H₂O77S em pó, a 700°C (A), após 216 horas (B) e 336 horas (C) horas em SBF.

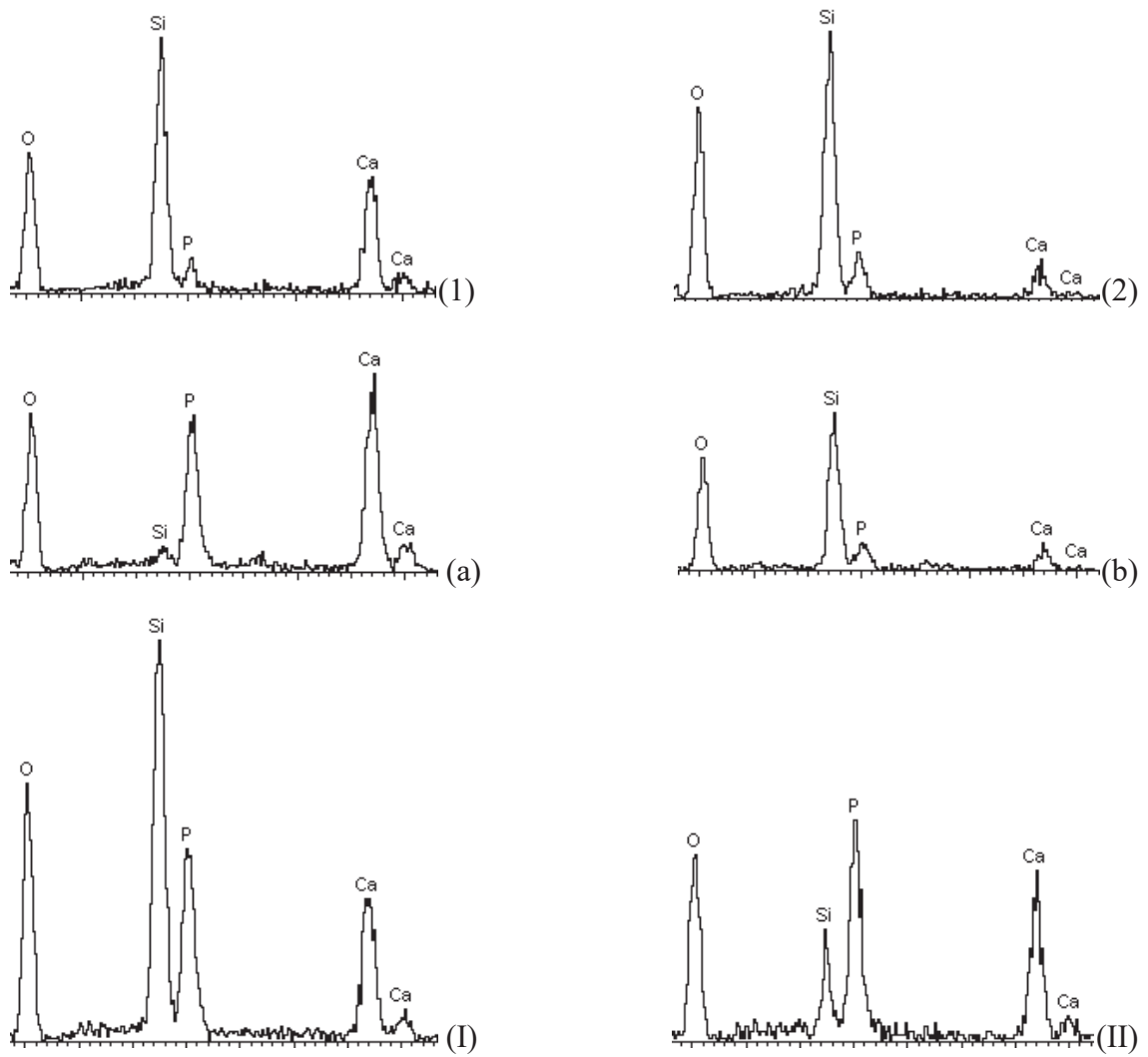


Figura 42.1: Resultados do EDS da amostra H₂O77S, a 700°C (1 e 2), após 216 (a e b) e 336 (I e II) horas em SBF.

Capítulo VI - Conclusões

- Neste trabalho desenvolveram-se e estudaram-se biovidros passíveis de aplicação biomédica com composições dos sistemas ternários 58S e 77S e quaternário 45S5;
- Os biovidros foram sintetizados com sucesso pelo processo sol-gel, utilizando uma abordagem inovadora durante a etapa de hidrólise, designadamente a substituição de água destilada e desionizada por águas minerais de origem vulcânica (Furnas, S. Miguel), tipicamente com baixos valores de pH, dispensando a utilização de catalisadores adicionais (e.g. HCl) para que se realizem as reações de hidrólise e condensação;
- Os biovidros desenvolvidos revelaram interessantes potencialidades bioativas em meio acelular *in vitro*, desenvolvendo camadas de hidroxiapatite em meio fisiológico simulado (SBF, Kokubo & Takadama 2006). Verificou-se que a cristalinidade, morfologia, composição e aderência da camada de hidroxiapatite pode ser mediada com base na tipologia da água usada na síntese sol-gel. Quanto maior o grau de ionização da água maior a cristalinidade dessa camada;
- A amostra Azeda77S foi a única que apresentou uma banda a 527cm^{-1} , atribuída a vibrações de PO_4^{3-} .
- A amostra A.Rebentão45S5 foi a única que apresentou a banda C-O, característica da formação da hidroxiapatite carbonatada.
- A precipitação da camada de hidroxiapatite pode ser regulada mediante tratamentos térmicos prévios, apropriadamente selecionados. Todas as amostras em estudo revelaram picos de cristalização à temperatura de 700°C exceto a amostra Azeda77S, que só revelou os picos de cristalização após mergulhada em SBF.
- Todas as amostras obtidas com águas termais exibiram no difratograma de XRD um pico correspondente à fase FeSi_2 embora sobreposto a outras fases

maioritárias. Este facto pode ser relevante dado que o teor de iões de Fe nas águas minerais utilizadas neste estudo é elevado, variando entre 4160 e 4350mg/L.

- A cristalização dos biovidros foi estudada por XRD. A intensidade dos picos correspondentes à cristalização dos fosfatos de cálcio revelou-se notoriamente dependente da tipologia da água usada no processo sol-gel e dos tempos de imersão em SBF. Ficou patente a concordância entre os resultados obtidos por esta técnica e os resultados obtidos por FTIR e SEM.
- Ocorreu a cristalização superficial de silicatos de cálcio nas amostras Azeda58S, A.Rebentão 58S, Azeda45S5 e A.Rebentão45S5.
- As amostras Azeda45S5 e A.Rebentão45S5 apresentaram duas pequenas bandas duplas a 696 e 729 cm^{-1} que confirmam a presença de silicato cristalino ($\text{Ca}_3\text{O}_5\text{Si}$ e $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o que não aconteceu na amostra padrão.
- Nenhuma amostra apresentou uma banda a 1038 cm^{-1} atribuída a vibrações de distensão NO_3^- , o que significa que a temperatura utilizada (700°C) foi suficiente para a eliminação de nitratos.
- Ficou por demonstrar se ocorreram substituições de iões na estrutura da hidroxiapatite, como por exemplo, iões carbonato (CO_3^{2-}), silício (Si), magnésio (Mg), flúor (F) ou cloro (Cl), oriundos das águas vulcânicas, com efeitos na bioatividade, alterando as características estruturais da camada de hidroxiapatite em meio biológico (SBF).

Capítulo VII - Perspetivas futuras

A estrutura do biovidro, otimizada neste trabalho, mediante a utilização de águas, de origem vulcânica, altamente mineralizadas, apresenta potencialidades que fundamentam a continuação desta investigação promovendo assim, um estudo mais detalhado de otimização e funcionalização dos mesmos em estudos *in vivo*. Considera-se que o presente trabalho foi o início de uma série de estudos sobre os efeitos das águas hidrotermais das Furnas em biovidros processados por sol-gel, e que os resultados obtidos sugerem a investigação adicional em diversas águas, com valores de pH mais baixos (< 5) ou mais elevados (> 7).

O desenvolvimento do trabalho futuro apresentado nesta dissertação pode ser orientado segundo distintas vertentes, atendendo ao seu carácter tipicamente multidisciplinar (envolvendo ciência de materiais, química, física, biologia e medicina). Poderão desenvolver-se estudos relativos à estrutura e caracterização dos vidros base mediante técnicas não utilizadas neste trabalho, nomeadamente espectroscopia fotoeletrónica de raios-X (XPS), espectroscopia Raman, ou espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) recorrendo a isótopos presentes na composição dos biovidros (e.g. ^{43}Ca e ^{17}O). Os estudos relativos à nucleação e crescimento de fases cristalinas poderão também ser desenvolvidos. Por exemplo, através de Análise Térmica Diferencial (DTA) poderá fazer-se uma avaliação mais correta das temperaturas de cristalização a utilizar (eventualmente diferentes de 700°C, a temperatura usada neste estudo) e a otimização da superfície do biovidro antes da imersão em SBF.

Para que uma eventual aplicação prática possa ser concretizada na área dos implantes biomédicos, é necessário prosseguir os ensaios de bioatividade e realizar estudos de bioatividade antimicrobiana e estudos de biotoxicidade em meio celular (*in vitro*), verificando respetivamente a sua capacidade antimicrobiana e os efeitos tóxicos, após o que se seguiria a experimentação animal caso os ensaios anteriormente referidos apresentassem resultados promissores.

A investigação do comportamento químico dos biovidros obtidos deverá prosseguir, designadamente no que diz respeito à solubilidade e ao crescimento e caracterização da camada de hidroxiapatite. A investigação das propriedades físicas de molhabilidade e da adesão interfacial dessa camada poderá também ser

considerada. Assim como a área superficial, volume e distribuição de tamanho de poros dos biovidros, poderão ser determinadas por adsorção de azoto a 77 K.

Finalmente, a possibilidade de testar novas composições obtidas por sol-gel e usando, na respetiva síntese, diversas tipologias de águas vulcânicas, recolhidas não exclusivamente do Vale das Furnas, mas também de outras fontes hidrotermais espalhadas pelas restantes ilhas do arquipélago dos Açores.

Referências Bibliográficas

- Ahmed I., Parsons A., Jones I., Walker G., Scotchford C., Rudd C. (2010) Cytocompatibility and effect of increasing MgO content in a range of quaternary invert phosphate-based glasses. *Journal of Biomaterial Applications* 24(6): 555-575.
- Alfaya A. A. S., Kubota L. T. (2002) The Utilization Of Materials Obtained By The Sol-Gel Process In Biosensors Construction. *Química Nova* 25(5): 835-841.
- Ali S., Farooq I., Iqbal K. (2014) A review of the effect of various ions on the properties and the clinical applications of novel bioactive glasses in medicine and dentistry. *The Saudi Dental Journal* 26(1): 1-5.
- Anderson A., Binions R. (2014) The Effect of Tween[®] Surfactants in Sol-Gel Processing for the Production of TiO₂ Thin Films. *Coatings* 4: 196-809.
- Andersson O. H., Karlsson K. H. (1990) Calcium phosphate formation at the surface of bioactive glass *in vivo*. *Journal of Non-Crystalline Solids* 119(3): 290-296.
- Andrade A. L. Domingues R. Z. (2006) Bioactive ceramics: state of the art. *Química Nova* 29(1): 100-104.
- Aoki H. (1991) *Science and medical applications of hydroxyapatite*. Takayama Press. Tokyo, Japan.
- Araujo, E. B. (1997) Vidro: uma breve história, técnicas de caracterização e aplicações na tecnologia. *Revista Brasileira de Ensino de Física* 19(3): 325-329.
- Balas F., Pérez-Pariente P., Vallet-Regi M. (2003) *In vitro* bioactivity of silicon-substituted hydroxyapatites. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 66(2):364-375.
- Beattie J. H., Avenell A. (1992) Trace element nutrition and bone metabolism. *Nutrition Research Reviews* 5(01): 167-188.
- Bellantone M., Coleman N. J., Hench L. L. (2000) Bacteriostatic action of a novel four-component bioactive glass. *Journal of Biomedical Materials Research* 51(3): 484-490.

-
- Boccaccini A. R., Li W. (2014) *Bioactive glasses: traditional and prospective applications in healthcare*. In: Hot Topics in Biomaterials. Future Science. London 56-68.
- Bohner M., Lemaître J. (2009) Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials* 30: 2175–2179.
- Bretcanu O., Chatzistavrou X., Paraskevopoulos K., Conradt R., Thompson I., Boccaccini A. R. (2009) Sintering and crystallisation of 45S5 Bioglass[®] powder. *Journal of the European Ceramic Society* 29: 3299–3306.
- Brinker C. J., Scherer G. W. (1990) *Sol-Gel Science, The Physics and Chemistry of Sol-gel processing*. Academic Press. San Diego.
- Cao W., Hench L. L. (1996) Bioactive materials. *Ceramics International* 22: 493-507.
- Carvalho A. C. A., Pereira E. S. C., Costa C., Barreto I. C., Madureira L. C., Paim F. R. (2010) Bioengineered tissue regenerative strategies and ethical aspects. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* 9(1): 20-27.
- Chen K. C., Tsuchiya T., Mackenzie J. D. (1986) Sol-Gel Processing of Silica.1. The Role of the Starting Compounds. *Journal of Non-Crystalline Solids* 81(1-2): 227-237.
- Cho S., Nakanishi K., Kokubo T., Soga N., Ohtsuki C., Nakamura T., Kitsugi T., Yamamuro T. (1995) Dependence of apatite formation on silica gel on its structure: effect of heat treatment. *Journal of the American Ceramic Society*. 78(7): 1769–1774.
- Clark A. E., Hench L. L., Paschall H. A. (1976) The influence of surface chemistry on implant interface histology: A theoretical basis for implant materials selection. *Journal of Biomedical Materials Research* 10(2): 161-174.
- Crubzy E., Murail P., Girard L., Bernadou J. P. (1998) False teeth of the Roman world. *Nature* 391: 29.
- Cruz J. V., Freire P., Costa A. (2010) Mineral waters characterization in the Azores archipelago (Portugal). *Journal of Volcanology Geothermal Research* 190: 353-364.

-
- Dearnley P. A. (1999) A review of metallic, ceramic and surface-treated metals used for bearing surfaces in human joint replacements. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine* 213(2): 107-135.
- Diaz C., Valenzuela M. L., Garrido D., Aguirre P. (2012) Sol-gel incorporation of organometallic compounds into silica: useful precursors to metallic nanostructured materials. *Journal of the Chilean Chemical Society* 57(2): 1155-1162.
- Dupree R., Holland D., Williams D. S. (1986) The structure of binary alkali silicate glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids* 81(1-2): 185-200.
- Dupree R., Ford N., Holland D. (1987) An examination of the ^{29}Si environment in the PbO-SiO_2 system by magic angle spinning nuclear magnetic resonance. *Physics and Chemistry of Glasses* 28(2): 78-84.
- Ebelmen M. (1846) Recherches sur les combinaisons des acides borique et silicique avec les éthers. *Annales de Chimie et de Physique* 16: 129-166.
- Ebisawa Y., Kokubo T., Ohura K., Yamamuro T. (1990) Bioactivity of CaO-SiO_2 -based glasses: *in vitro* evaluation. *Journal of materials science: Materials in Medicine* 1: 239-244.
- Fardin A. C., Jardim E. C. G., Pereira F. C., Guskuma M. H., Aranega A. M., Júnior I. R. G. (2010) Bone graft in dentistry: review of literature. *Innovations Implant Journal. Biomaterials and Esthetics* 5(3): 48-52.
- Filgueiras M. R., Torre G. L., Hench L. L. (1993) Solution effects on the surface reactions of a bioactive glass. *Journal of Biomedical Materials Research* 27(4):445-453.
- Gentleman E., Fredholm Y. C., Jell G., Lotfibakhshaiesh N., O'Donnell M. D., Hill R. G., Stevens M. M. (2010) The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts *in vitro*. *Biomaterials* 31(14): 3949-3956.
- Ghersetich I., Lotti T. M. (1996) Immunologic Aspects: Immunology of Mineral Water Spas. *Clinics in Dermatology* 14: 563-566.

-
- Gomes C. S. F., Silva J. B. P. (2007) Minerals and clay minerals in medical geology. *Applied Clay Science* 36: 4-21.
- Graham T. (1864) XXXV.—On the properties of silicic acid and other analogous colloidal substances. *Journal of the Chemical Society* 17: 318-327.
- Guinebretière R. (2007) *X-ray Diffraction by Polycrystalline Materials*. ISTE Newport Beach. USA.
- Heimke G. (1989) Advanced ceramics for biomedical applications. *Advanced materials* 101(1): 111-116.
- Hench L. L. (1980) Biomaterials. *Science* 208: 826-831.
- Hench L. L., West J. K. (1990) The sol-gel process. *Chemical Reviews*. 90(1): 33-72.
- Hench L. L. (1991) Bioceramics: From concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society* 74(7):1487-1510.
- Hench L.L., Wilson J. (1993) *An Introduction to Bioceramics*. In: Advanced Series in Ceramics, vol 1. Singapore World Scientific. USA.
- Hench L.L., West J.K. (1996) Biological applications of bioactive glasses. *Life Chemistry Reports* 13:187-241.
- Hench L. L., Polak J. (2002) Third generation biomedical materials. *Science* 295: 1014- 1017.
- Hench L. L., Xynos I.D., Polak J.M. (2004) Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition* 15(4): 543-562.
- Hench L. L. (2006) The story of Bioglass[®]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 17: 967-978.
- Hench L. L., Day D. E., Holand W., Rheinberger V. M. (2010) Glass and Medicine. *International Journal of Applied Glass Science* 1(1): 104–117.
- Hench L. L. (2013) Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications. *New Journal of Glass and Ceramics*. 3: 67-73.
- Hench L. L., Greenspan D. (2013) Interactions between Bioactive Glass and Collagen: A Review and New Perspectives. *Journal of The Australian Ceramic Society* 49(2): 1-40.

-
- Hill R. (1996) An alternative view of the degradation of bioglass. *Journal of Materials Science Letters* 15(13): 1122-1125.
- Hoppe A., Güldal N. S., , Boccaccini A. R. (2011) A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, *Biomaterials* 32(11): 2757-2774.
- Hynes M. J., Jonson B. (1997) Lead, glass and the environment. *Chemical Society Reviews* 26(2):133-146.
- Ibrahem S., Ibrahem H. (2013) Preparation and study properties of xerogel silica using sol-gel method. *International Journal of Application or Innovation in Engineering & Management* 2(9): 111-116.
- Iler R. K. (1979) *The Chemistry of Silica*. Wiley. New York.
- Izquierdo-Barba I., Salinas A. J., Vallet-Regí M. (1999) *In vitro* calcium phosphate layer formation on sol-gel glasses of the CaO-SiO₂ system. *Journal of Biomedical Materials Research* 47: 243–250.
- Jones J. R., Hench L. L. (2001) Biomedical materials for new millennium: perspective on the future. *Materials Science and Technology* 17(8): 891-900.
- Jones J. R., Clare A. G. (2012) *Bio-Glasses. An Introduction*. Wiley. UK.
- Jones J. R. (2013) Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia* 9: 4457-4486.
- Jugdaohsingh R. (2009) Silicon and bone health. *The Journal of Nutrition Health and Aging* 11(2): 99-110.
- Kawachi E. Y., Bertran C. A., Reis R. R., Alves O. L. (2000) Bioceramics: Tendencies And Perspectives Of An Interdisciplinary Area. *Química Nova* 23(4): 518-522.
- Kim H., Miyaji F., Kokubo T., Ohtsuki C., Nakamura T. (1995) Bioactivity of Na₂O-CaO-SiO₂ Glasses. *Journal of the American Ceramic Society* 78(9): 2405-2411.
- Kokubo T. (1990) Surface chemistry of bioactive glass-ceramics. *Journal of Non-Crystalline Solids* 120(1-3): 138-151.

-
- Kokubo T., Kushitani H., Sakka S., Kitsugi T., Yamamuro T. (1990) Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Materials Research* 24(6), 721-734.
- Kokubo T. (1991) Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials* 12(2):155–163.
- Kokubo T., Kim H. M., Kawashita M. (2003) Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 24(13):2161-2175.
- Kokubo T., Takadama H. (2006) How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27: 2907-2915.
- Krishnan V., Lakshmi T. (2013) Bioglass: A novel biocompatible innovation. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 4(2): 78-83.
- Lam M T., Wu J. C. (2012) Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 10(8): 1039-1049.
- Lefebvre L., Chevalier J., Gremillard L., Zenati R., Thollet G., Bernache-Assolant D., Govin A. (2007) Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments. *Acta Materialia* 55: 3305–3313.
- Leng Y. (2013) *Materials characterization. Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods*. 2nd Ed. Wiley-VCH, Germany.
- Li R., Clark A. E., Hench L. L. (1991) An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *Journal of Applied Biomaterials* 2(4): 231-239.
- Li P., Ohtsuki C., Kokubo T., Nakanishi K., Soga N., Nakamura T., Yamamuro T. (1992) Apatite formation induced by silica gel in a simulated body fluid. *Journal of the American Ceramic Society* 75(8): 2094-2097.
- Li P., Nakanishi K., Kokubo T., Groot K. D. (1993) Induction and morphology of hydroxyapatite, precipitated from metastable simulated body fluids on sol-gel prepared silica. *Biomaterials* 14(13): 963-968.
- López G. D. (1993) Biodeterioration and corrosion of metallic implants and prostheses. *Medicina Buenos Aires* 53(3): 260-274.

-
- Ludwig S. C., Kowalski J. M., Boden S. D. (2000) Osteoinductive bone graft substitutes. *European Spine Journal* 9 (S1) :119-125.
- Lyons A. S. (1987) Ancient Egypt. In: Lyons A. S., Petrucelli R.J. (eds). *Medicine: An Illustrated History*. Harry N. Abrams, New York p.98.
- Machado J. L. M. (2007) Desenvolvimento de cimento ósseo de fosfato de cálcio como suporte para o crescimento de tecidos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- Maia M., Klein E. S., Monje T. V., Pagliosa C. (2010) Facial structure reconstruction by biomaterials: literature review. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica* 25(3): 566-572.
- Manivasagam G., Dhinasekaran D., Rajamanickam A. (2010) Biomedical Implants: Corrosion and its Prevention - A Review. *Recent Patents on Corrosion Science* 2: 40-54.
- Marcus, R., Feldman, D. Kelsey, J. (1997). Osteoporosis. *Journal of bone and mineral research* 12(3): 493.
- Martinez A., Izquierdo-Barba I., Vallet-Regi M. (2000) Bioactivity of a CaO-SiO₂ Binary Glasses System. *Chemistry of Materials* 12(10): 3080-3088.
- Matassi F., Nistri L., Paez D. C., Innocenti M. (2011) New biomaterials for bone regeneration. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 8(1): 21-24.
- Milea C. A., Bogatu C., Dutã A. (2011) The influence of parameters in silica sol-gel process. *Engineering Sciences* 4(1): 59-66.
- Mirtchi A. A., Lemaitre J., Terao N. (1989) Calcium phosphate cements: study of the β -tricalcium phosphate — monocalcium phosphate system. *Biomaterials* 10:475–480.
- Miyaji F., Kono Y., Suyamaet Y. (2005) Formation and structure of zinc-substitute calcium hydroxyapatite. *Materials Research Bulletin* 40(2): 209-220.
- Morais L. S., Guimarães G. S., Elias C. N. (2007) Ion release from metallic biomaterials. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial* 12(6):48-53.

-
- Morais J. M., Papadimitrakopoulos F., Burgess D. J. (2010) Biomaterials/Tissue Interactions: Possible Solutions to Overcome Foreign Body Response. *The AAPS Journal* 12(2): 188-196.
- Moreira P. J. B. (2005) Óptica Integrada em Tecnologia Sol-Gel Híbrido. Dissertação de Doutoramento. Universidade do Porto.
- Mukundan L. M., Nirmal R., Vaikkath D., Nair P. D. (2013) A new synthesis route to high surface area sol gel bioactive glass through alcohol washing. *Biomatter* 3(2): 242288 1-10.
- Nair L. S., Laurencin C. T. (2007) Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 32(8–9): 762–798.
- Navarro A., Michiardi A., Castaño O., Planell J. A. (2008). Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the Royal Society, Interface* 5(27): 1137-1158.
- Nielsen F. H. (1990) New essential trace elements for the life sciences. *Biological Trace Element Research* 26(1): 599-611.
- Notingher I., Jones J.R., Verrier S., Bisson I., Embanga P., Edwards P., Polak J.M., Hench L.L. (2003) Application of FTIR and Raman spectroscopy to characterisation of bioactive materials and living cells. *Spectroscopy* 17: 275–288.
- Ogino M., Ohuchi F., Hench L.L. (1980) Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass. *Journal of Biomedical Materials Research* 14:55–64.
- Ohtsuki C., Kushitani H., Kokubo T., Kotani S. Yamamuro T. (1991) Apatite formation on the surface of ceravital-type glass-ceramic in the body, *Journal of Biomedical Materials Research* 25(11): 1363–1370.
- Oliveira S. M., Mijares D. Q., Turner G., Amaral I. F., Barbosa M. A., Teixeira C. C. (2009) Engineering endochondral bone: in vivo studies. *Tissue Engineering. Part A*. 15(3): 635-643.
- Oyane A., Kim H.M., Furuya T., Kokubo T., Miyazaki T., Nakamura T. (2003) Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *Journal of Biomedical Materials Research*. 65(2):188–195.

-
- Peitl O., Zanotto E. D., Hench L. L. (2001) Highly bioactive P_2O_5 - Na_2O - CaO - SiO_2 glass-ceramics. *Journal of Non-Crystalline Solids* 292(1-3): 115-126.
- Peltola T., Jokinen M., Rahiala H., Levänen E., Rosenholm J. B., Kangasniemi I., Yli-Urpo A. (1999) Calcium phosphate formation on porous sol-gel-derived SiO_2 and CaO - P_2O_5 - SiO_2 substrates *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research* 44(1): 12-21.
- Pereira M. M., Clark A.E. Hench L.L. (1994) Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research* 28: 693-698.
- Pereira M. R. C. (2004) Fotofísica de Porfirinas e Ftalocianinas em Matrizes de TiO_2 preparadas pelo método de Sol-Gel. Dissertação de Doutorado. Universidade do Minho. Braga.
- Pérez-Pariente J., Balas F., Román J., Salinas A. J., Vallet-Regí M. (1999) Influence of composition and surface characteristics on the *in vitro* bioactivity of SiO_2 - CaO - P_2O_5 - MgO sol-gel glasses. *Journal of Biomedical Materials Research* 47: 170-175.
- Pérez-Pariente J., Balas F., Vallet-Regí M. (2000) Surface and Chemical Study of $SiO_2 \cdot P_2O_5 \cdot CaO \cdot (MgO)$ Bioactive Glasses. *Chemistry of Materials* 12: 750-755.
- Pernot F., Zarzycki J., Bonnel F., Rabischong P., Baldet P. (1979) New Glass-ceramics Materials for Prosthetic Applications. *Journal of Materials Science* 14: 1694-1706.
- Pernot F., Baldet P., Bonnel F., Zarzycki J., Rabischong P. (1983) Development of Phosphate Glassceramics for Bone Implants. *Ceramics International* 9(4): 127-131.
- Petrucelli R. J. (1987) The Renaissance. In: Lyons A. S., Petrucelli R.J. (eds). *Medicine: An illustrated history*. Harry N. Abrams, New York pp.369-423.
- Pierre, A. C. (1998) *Introduction to Sol-Gel Processing*. Springer Science, Business Media New York.
- Pinto J. G. S., Ciprandi M. T. O., Aguiar R. C., Lima P. V. P., Hernandez P. A. G., Júnior A. N. S. (2007). Autogenous bone graft x biomaterials in the

-
- treatment of facial fractures and deformities – a review of current concepts. *Revista da Faculdade de Odontologia* 12(3): 79-84.
- Pope E. J. A., Mackenzie J. D. (1986) Sol-Gel Processing of Silica.2. The Role of the Catalyst. *Journal of Non-Crystalline Solids* 87 (1-2): 185-198.
- Porter A. E., Patel N., Skepper J. N., Best S. M., Bonfield W. (2004) Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodelling processes at the bone-implant interface. *Biomaterials* 25(16): 3303-3314.
- Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemmons J. E. (2004) *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*. 2^a ed. Elsevier Academic Press, Boston.
- Ravaglioli A., Krajewski A. (1992) *Bioceramics: Materials, Properties, Applications*. Chapman & Hall, New York, USA.
- Rebelo F. S. S. (2010) Densitometria óssea radiológica: viabilidade para a implementação de um equipamento na unidade de mirandela. Dissertação de Mestrado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Rezwan K., Chen K. Z., Blaker J. J., Boccaccini A. R. (2006) Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27(18): 3413-3431.
- Rieu J. (1993) Ceramic formation on metallic surfaces (ceramization) for medical applications. *Clinical Materials* 12(4): 227-235.
- Rieu J., Goeuriot P. (1993) Ceramic composites for biomedical applications. *Clinical Materials* 12(4): 211-217.
- Roy R. (1956) Aids in Hydrothermal Experimentation: II, Methods of Making Mixtures for Both “Dry” and “Wet” Phase Equilibrium Studies. *Journal of the American Ceramic Society* 39(4): 145–146.
- Salinas A. J., Roman J., Vallet-Regi M., Oliveira J. M., Correia R. N., Fernandes M. H. (2000) *In vitro* bioactivity of glass and glass-ceramics of the 3CaO x P₂O₅-CaO x SiO₂-CaO x MgO x 2SiO₂ system. *Biomaterials* 21(3): 251-257.
- Saltman P. D., Strause L.G. (1993) The role of trace minerals in osteoporosis. *Journal of the American College of Nutrition* 12(4): 384-389.

-
- Saravanapavan P., Jones J.R., Pryce R.S., Hench L.L. (2003) Bioactivity of gel-glass powders in the CaO-SiO₂ system: a comparison with ternary (CaO-P₂O₅-SiO₂) and quaternary glasses (SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O). *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 66(1):110-119.
- Seeley R. R., Stephens T. D., Tate P. (2003) *Anatomia & Fisiologia*. 6^aed. Lusociência. Portugal.
- Shelby J. E. (2005) Introduction to Glass Science and Technology. 2^aEd. RSC. USA.
- Shtilman M. I. (2003) *New Concepts in Polymer Science. Polymeric Biomaterials Part I. Polymer Implants*. UTRECHT. Boston.
- Siqueira R. L. (2010) Processamento Sol-Gel de pós bioativos vítreos e cristalinos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Paulo.
- Siqueira R. L., Zanotto E. D. (2011) Biosilicate®: Historical Of A Highly Bioactive Brazilian Glass-Ceramic. *Química Nova* 34(7): 1231-1241.
- Stokes D. J. (2003) Recent advances in electron imaging, image interpretation and applications: environmental scanning electron microscopy. *The Royal Society* 361: 2771-2787.
- Suchanek W. Yoshimura M. (1998) Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *Journal of Materials Research* 13(1): 94-117.
- Takadama H., Hashimoto M., Mizuno M., Kokubo T. (2004) Round-Robin test of SBF for *in vitro* measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. *Phosphorous Research Bulletin* 17: 119-125.
- Tilocca A. (2009) Structural models of bioactive glasses from molecular dynamics simulations. *Proceedings of the Royal Society of London A* 465: 1003-1027.
- Tilocca A., Cormack A. N. (2011) The initial stages of bioglass dissolution: a Car-Parrinello molecular-dynamics study of the glass-water interface. *Proceedings the royal society A* 467: 2102-2111.
- Välimäki V.V., Yrjans J.J., Vuorio E.I., Aro H.T. (2005) Molecular biological evaluation of bioactive glass microspheres and adjunct bone morphogenetic

-
- protein 2 gene transfer in the enhancement of new bone formation. *Tissue Engineering* 11(3-4): 387-394.
- Vallet-Regí M., Izquierdo-Barba I., Salinas A. J. (1999) Influence of P₂O₅ on crystallinity of apatite formed *in vitro* on surface of bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research* 46: 560-565.
- Vallet-Regí M., Arcos D. (2005) Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants. *Journal of Materials Chemistry* 15(15): 1509-1516.
- Vallet-Regí M., Salinas A. J., Arcos D. (2006) From the bioactive glasses to the star gels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 17:1011-1017.
- Varshneya A. K. (1994) *Fundamentals of inorganic glasses*. Academic Press. New York.
- Vasconcelos C. (2012) New Challenges in the Sintering of HA/ZrO₂ Composites. In: Lakshmanan A. *Sintering of Ceramics - New Emerging Techniques*. ISBN: 978-953-51-0017-1, InTech.
- Wallace K.E., Hill R.G., Pembroke J.T., Brown C.J., Hatton P.V. (1999) Influence of sodium oxide content on bioactive glass properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 10(12): 697-701.
- Williams D. F. (1999) *Williams dictionary of biomaterials*. University Press. Liverpool.
- Xynos I. D., Edgar A.J., Buttery L.D., Hench L.L., Polak J.M. (2001) Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research* 55(2): 151-157.
- Zachariasen W. H. (1932) The atomic arrangement in glass. 54(10): 3841-3851.
- Zarzycki J. (1991) *Glasses and the Vitreous State*. Cambridge University Press. USA.
- Zhong J., Greenspan D. C. (2000) Processing and Properties of Sol–Gel Bioactive Glasses. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 53: 694-701.

Zhou w., Wang Z. L. (2006) *Scanning Microscopy for Nanotechnology. Techniques and applications*. Springer. New York.