

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

PABLO NABUCO PORTES

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE *IN VITRO* DO SISTEMA  
VÍTREO:  $60\text{B}_2\text{O}_3 - 5\text{CaF}_2 - (20-x)\text{Na}_2\text{O} - (15-x)\text{CaO} - 2x\text{P}_2\text{O}_5$  ( $x= 0, 1, 2$ )**

Maringá  
2018

PABLO NABUCO PORTES

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE *IN VITRO* DO SISTEMA  
VÍTREO:  $60\text{B}_2\text{O}_3 - 5\text{CaF}_2 - (20-x)\text{Na}_2\text{O} - (15-x)\text{CaO} - 2x\text{P}_2\text{O}_5$  ( $x= 0, 1, 2$ )**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Francielle Sato  
Coorientadora: Profa. Dra. Franciana Pedrochi

Maringá  
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

P114c Portes, Pablo Nabuco  
Caracterização e avaliação da bioatividade in vitro  
do sistema vítreo:  $60\text{B}_2\text{O}_3-5\text{CaF}_2-(20-x)\text{Na}_2\text{O}-(15-x)$   
 $\text{CaO}-2x\text{P}_2\text{O}_5$  ( $x=0,1,2$ ) / Pablo Nabuco Portes.  
- Maringá, 2018.  
122 f.; Il. Graf.

Orientadora: Profa. Dra. Francielle Sato.  
Coorientadora: Profa. Dra. Franciana Pedrochi.

Tese (Doutor em Física) - Universidade  
Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas,  
Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação  
em Física -PFI.

1.Física da matéria condensada. 2.Fenômenos  
fototérmicos. 3.Vidros bioativos -vidros borato.  
4.Biomateriais. 5. Hidroxicarbonato de  
apatita.I.Sato,Francielle, orient. II.Pedrochi,  
Franciana, coord. III. Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências Exatas,Departamento de  
Física, Programa de Pós-graduação em Física- PFI.  
IV. Título.

535.012 21.ed.

Cicilia C. Maria  
CB9 1066  
CC-003947

PABLO NABUCO PORTES

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE *IN VITRO* DO SISTEMA  
VÍTREO:  $60\text{B}_2\text{O}_3 - 5\text{CaF}_2 - (20-x)\text{Na}_2\text{O} - (15-x)\text{CaO} - 2x\text{P}_2\text{O}_5$  ( $x= 0, 1, 2$ )**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor.

Aprovado em: 28 de maio de 2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Francielle Sato  
Universidade Estadual de Maringá

---

Profa. Dra. Franciana Pedrochi  
Universidade Federal do Maranhão

---

Profa. Dra. Taiana Gabriela Moretti Bonadio  
Universidade Estadual do Centro-Oeste

---

Prof. Dr. Ivair Aparecido dos Santos  
Universidade Estadual de Maringá

---

Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso  
Universidade Estadual de Maringá

Dedico este trabalho aos meus pais, Marlene e Nabuco, a minha irmã, Carolina, e minha sobrinha, Catarina.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha Orientadora, Professora Dra. Francielle Sato, pela dedicação, paciência e conhecimentos compartilhados durante os quatro anos de doutorado. Sem sua ajuda este trabalho não seria completo.

À Professora Dra. Franciana Pedrochi, pela orientação, disponibilidade, por toda a ajuda no desenvolvimento do trabalho e pela recepção durante minha visita a UFMA.

Aos Professores, Dr. Alysson Steimacher e Dr. Márcio José Barboza, assim como aos alunos integrantes do LEOF, por toda ajuda na confecção das amostras utilizadas neste trabalho e pela recepção calorosa (literalmente) durante a estadia em Imperatriz.

A todas as Professoras e Professores do departamento de Física da UEM, em especial aos professores Dr. Wilson Weinand e Dr. Antonio Medina Neto, pelas importantes contribuições, tanto em meu desenvolvimento acadêmico quanto para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do DFI, principalmente a Mônica Loiola.

A todos os amigos do cafézinho tirado na carta depois do almoço, Elton, Otávio Augusto, Marcelo, Raquel, Vitor, Rafa, Michel, Anderson, Renan, Gabriel, Robson, Vinicius, Thiago Moreno e Thiago Petrucci. Obrigado pelos momentos de descontração e pelo apoio durante todo o doutorado.

Aos colegas do GOPT/GEFF, Adriane, Camilla, Fabio, Hugo, Mariana, Raquel e Lidiane, Daniel, Nilson, Vinicius. Assim como a todos os demais colegas que fiz durante todo o período acadêmico. Obrigado pelos bons momentos vividos na UEM.

Aos amigos, Rica, Rafa, Mágico, Leandro, Jackes, Alex, Polly e Julia. E ainda, as turmas do “Churrasco na Vanda” e “Brotherhood”. Sem vocês esse período não seria tão divertido e, com certeza, seria muito mais difícil.

Aos membros de honra da memorável república da firma, Vini, Patrick e Douglas, que nesses doze anos de companheirismo tornaram-se mais do que simples colegas de apartamento.

A minha namorada, Milena, pela paciência, amor e carinho que sempre tem comigo. Por aturar minhas excentricidades e me apoiar quando precisei. Sem dúvidas, ter você ao meu lado, compartilhando esses momentos, tornou tudo muito mais fácil.

Aos meus familiares, mãe (Marlene), pai (Nabuco), irmã (Carolina), sobrinha (Catarina) e cunhado (Cris), isso mesmo, até o cunhado, por todo incentivo, amor, carinho e por serem a certeza de um porto seguro.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Às agências financiadoras, CNPq, Capes, Finep, Fundação Araucária e COMCAP pela bolsa de doutorado e demais financiamentos.

## RESUMO

O presente trabalho propõe o desenvolvimento de novos vidros borato com propriedades bioativas. Foram propostas três composições do seguinte sistema vítreo (em % de massa):  $60\text{B}_2\text{O}_3 - 5\text{CaF}_2 - (20-x)\text{Na}_2\text{O} - (15-x)\text{CaO} - 2x\text{P}_2\text{O}_5$  ( $x = 0, 1, 2$ ). A adição de  $\text{P}_2\text{O}_5$  foi investigada como possível facilitadora de nucleação da hidroxicarbonato de apatita (HCA). As propriedades térmicas e espectroscópicas das amostras foram caracterizadas via calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e micro-Raman. Os vidros foram então submetidos a testes *in vitro* por meio de sua imersão em fluido corpóreo simulado (SBF) durante diferentes períodos de tempo. Depois de retirados do fluido, a formação da camada da HCA foi avaliada por meio das técnicas de difração de raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), FTIR e micro-Raman. Como critério de comparação, amostras do vidro 45S5, primeiro vidro bioativo e considerado padrão ouro, foram produzidas e submetidas aos mesmos procedimentos que os vidros borato. Todas as técnicas comprovaram a formação da HCA nos vidros borato, a qual ocorre por um mecanismo contínuo de degradação das amostras e é diferente do convencional, visto para o 45S5, além do respectivo caráter bioativo dos vidros borato propostos no trabalho. Dentre eles, o vidro com 2% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  apresentou os resultados mais semelhantes aos do 45S5, com a cristalização mais rápida da camada de HCA entre os vidros borato, após cerca 48 horas de imersão. Alterações no pH do SBF utilizado também foram monitoradas, mostrando que a composição sem  $\text{P}_2\text{O}_5$  é a que libera maior quantidade íons no fluido e, conseqüentemente, a que degrada com maior facilidade, enquanto a amostra com 2% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  aparenta ter a maior resistência ao ataque da solução. A comprovada bioatividade e as diferenças em seus processos de degradação, permitem afirmar que os vidros borato desenvolvidos neste trabalho podem potencialmente ser aplicados como biomateriais.

**Palavras-chave:** Vidros bioativos, Vidros borato, Biomateriais, Teste *in vitro*, Hidroxicarbonato de apatita.

## ABSTRACT

This work aims to support the development of new borate glasses with bioactive properties. There were developed three different configurations of the following glass system (wt %):  $60\text{B}_2\text{O}_3 - 5\text{CaF}_2 - (20-x)\text{Na}_2\text{O} - (15-x)\text{CaO} - 2x\text{P}_2\text{O}_5$  ( $x = 0, 1, 2$ ). The addition of  $\text{P}_2\text{O}_5$  was investigated as a possible facilitator of the hydroxycarbonate apatite (HCA) nucleation. The thermal and spectroscopic properties of the samples were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared (FTIR) and micro-Raman spectroscopy. The glasses were undergone *in vitro* tests by their immersion in simulated body fluid (SBF) throughout different periods of time. After taken out of the fluid, the HCA layer formation was evaluated by X-ray diffraction (DRX), scanning electron microscopy (MEV), FTIR and micro-Raman spectroscopy. As a standard of comparison, the samples of the glass 45S5, the first bioactive glass and considered gold standard, were produced and undergone the same procedures of the borate glass. All the techniques assured the HCA formation on the borate glasses, which occurs by a continuous mechanism of degradation of the samples and, is different from the conventional one, seen for the 45S5, besides the respective bioactive character of the borate glasses aimed in the work. Among the borate glasses, the one with 2% of  $\text{P}_2\text{O}_5$  presented results with higher similarity with the 45S5, with a faster crystallization of the HCA layer after 48 hours of immersion. pH changes in the SBF were also monitored, showing that the free  $\text{P}_2\text{O}_5$  composition is the one that releases the higher number of ions, and consequently, degrades easier, while the sample with 2% of  $\text{P}_2\text{O}_5$  shows higher resistance in the solution. The proven bioactivity and the differences among their degradation processes, allows saying that the borate glasses, developed in this work, have e potencial application as biomaterials.

**Keywords:** Bioactive glasses, Borate glasses, Biomaterials, *In vitro* test, hydroxycarbonate apatite.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estatística nacional do número de internações por ferimentos graves em acidentes de trânsito no período de 2002 a 2016. Dados atualizados até a data de 11/02/2017. Adaptado da referência [1].....	1
Figura 2: (A) Número de publicações por ano contendo o termo biomateriais como palavra chave. (B) Número de publicações por ano contendo o termo vidros bioativos como palavra chave. Acesso realizado na data: 28/02/2018 [7]. .....	4
Figura 3: Foto de um fragmento de mandíbula com implantes de conchas marinhas. Adaptado da referência [11].....	6
Figura 4: Exemplos de biomateriais na atualidade: (A) Hidroxiapatita porosa e (B) Cimento de hidroxiapatita utilizados para reconstrução da estrutura facial [17]; (C) Placa de vidro bioativo utilizados para reconstrução da estrutura facial [17]; (D) Implantes de polietileno poroso utilizado na reconstrução auricular [17]; (E) Prótese de polietileno utilizado para implante de queixo [17]; (F) Implante mandibular de copolímero randômico linear de 82% de ácido poli-L-lático (PLLA) e 18% de ácido poliglicólico (PGA) [17]; (G) Dispositivos de titânio utilizados para reconstrução da estrutura facial [17]; (H) Ligas metálicas como elementos estruturais na estabilização de fraturas ósseas [18]; (I) Polímeros utilizados como membranas e implantes de cirurgia artroscópica e espinha [19].....	9
Figura 5: Representação do arranjo atômico da hidroxiapatita. Adaptado da referência [23].	12
Figura 6: Estrutura (A) cristalina e (B) vítrea da sílica. Adaptado da referência [39]. .....	15
Figura 7: Mudanças de volume que podem ocorrer durante o resfriamento de um líquido. Adaptado da referência [38]. .....	16
Figura 8: Estruturas formadas em vidros puramente boratos. Adaptado da referência [36]. ...	18
Figura 9: Superestruturas encontradas em vidros borato. Os círculos cortados representam pontes de oxigênio. Adaptado das referências [42,43]. .....	19
Figura 10: (A) Variações da temperatura de transição vítrea em função da concentração de óxidos modificadores em vidros binários $B_2O_3.M_2O$ com $M = Li, K$ e $Na$ . (B) Mudanças da taxa de dissolução de vidros borato $B_2O_3.Li_2O$ em função da quantidade de $Li$ para duas temperaturas diferentes. Adaptado da referência [31]. .....	21
Figura 11: Índice bioatividade para regiões do sistema $CaO-SiO_2-Na_2O$ , todas contendo 6% de massa de $P_2O_5$ . Região A (branca) pertence a vidros com maiores bioatividades; região B	

(verde) é referente a vidros não bioativos; região C (amarela) é referente a vidros reabsorvíveis; região D não forma vidro. Adaptada da referência [46].	23
Figura 12: Imagem de MEV de uma microesfera oca de HCA, feita a partir da reação de vidros borato em solução de fosfato. A microesfera com cerca de 150 µm de diâmetro foi quebrada intencionalmente para mostrar seu interior oco. Adaptado da referência [8].	26
Figura 13: (a) Um tufo de nanofibras de biovidro borato; (b) Imagem de MEV das fibras; (c) Uma ferida de um paciente com diabetes aberta, antes do tratamento; (d) A mesma ferida fechada com as nanofibras de vidro borato. Adaptada da referência [8].	27
Figura 14: Representação da formação da camada de HCA em vidros bioativos silicato.(A) Lixiviação iônica e quebra da rede silicato; (B) Repolimerização da rede de silício e liberação de íons de fosfato e de cálcio; (C) Deposição dos íons de fosfato de cálcio na superfície do vidro e formação da camada de fosfato de cálcio amorfo; (D) Cristalização da HCA. Adaptada da referência [54].	31
Figura 15: (A-C) vidros borato recém-preparados; (D) vidro silicato - Bioglass® recém preparado; (E) vidros após processo de corte e polimento.	37
Figura 16: Etapas do procedimento de imersão das amostras. (A) Amostra fixada no suporte para mantê-la verticalmente posicionada durante imersão em SBF. (B) Amostra posta em contato com o SBF dentro do tubo plástico. (C) Amostras resguardadas no banho térmico durante o procedimento <i>in vitro</i> .	38
Figura 17: Resultado de DSC das três amostras de vidros borato quando submetidas ao aquecimento com taxa de 10 °K/min. Os pontos utilizados para o cálculo das temperaturas específicas estão demarcados.	42
Figura 18: Variação do pH do SBF em que as amostras BV0, BV2, BV4 e 45S5 ficaram imersas pelos diferentes períodos de tempo do procedimento <i>in vitro</i> .	45
Figura 19: Fotos das amostras do vidro BV0 após os diferentes períodos de imersão em SBF..Setas e círculos marcam os resquícios da amostra imersa por 28 dias.	46
Figura 20: Fotos das amostras do vidro BV2 após os diferentes períodos de imersão em SBF.	46
Figura 21: Fotos das amostras do vidro BV4 após os diferentes períodos de imersão em SBF.	47
Figura 22: : Fotos das amostras do vidro 45S5 após os diferentes períodos de imersão em SBF.	47
Figura 23: Espectros Raman dos vidros borato antes de serem postos em imersão em SBF...	50

Figura 24: Espectros Raman da amostra BV0 após os diferentes períodos de imersão do procedimento <i>in vitro</i> . Junto estão expostos o espectro da HA sintética para comparação, bem como as atribuições das principais bandas. A letra “h” representa o período de imersão marcado em horas, enquanto “d” faz referência a dias. ....	53
Figura 25: Espectros Raman da amostra BV2 após os diferentes períodos de imersão do procedimento <i>in vitro</i> . Junto estão expostos o espectro da HA sintética para comparação, bem como as atribuições das principais bandas. A letra “h” representa o período de imersão marcado em horas, enquanto “d” faz referência a dias. ....	54
Figura 26: Espectros Raman da amostra BV4 após os diferentes períodos de imersão do procedimento <i>in vitro</i> . Junto estão expostos o espectro da HA sintética para comparação, bem como as atribuições das principais bandas. A letra “h” representa o período de imersão marcado em horas, enquanto “d” faz referência a dias. ....	55
Figura 27: Espectros normalizados pela banda referente ao fosfato $\nu_1$ , provenientes da camada crescida sobre as amostras BV0, BV2 e BV4 após o procedimento de imersão em SBF. O destaque é dado para região de interesse, quando a banda atinge $960\text{ cm}^{-1}$ e representa a cristalização da HCA. ....	56
Figura 28: Comportamento da largura à meia altura da banda referente ao fosfato $\nu_1$ para os vidros boratos e o 45S5 comparados a HA sintética (inserida em $t = 0$ , pois não passou pelo teste de bioatividade). ....	57
Figura 29: Espectros normalizados da superfície da amostra BV2 imersa pelos períodos de tempo compreendidos entre 48 horas e 28 dias. Em destaque estão as regiões onde surgem as bandas que representam carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), em $690, 715, 750$ e $1070\text{ cm}^{-1}$ , além do fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) em $1076\text{ cm}^{-1}$ . ....	58
Figura 30: Espectros Raman da amostra 45S5, antes e após ela passar pelo procedimento <i>in vitro</i> . Junto estão expostos o espectro da HA sintética para comparação, bem como as atribuições das principais bandas. A letra “h” representa o período de imersão marcado em horas, enquanto “d” faz referência a dias. ....	60
Figura 31: Espectros de absorção de infravermelho dos vidros antes de serem postos em imersão em SBF. No canto superior direito é exposta a relação entre o número de unidades borato quadrado-coordenadas e a porcentagem molar de óxidos modificadores nos vidros, calculadas por meio da equação 11. ....	62
Figura 32: Espectros de absorção de infravermelho da camada crescida na superfície de BV0 durante os dez períodos de imersão. Para comparação são expostos os espectros do vidro antes ser posto em imersão e da HA sintética. ....	64

Figura 33: Espectros de absorção de infravermelho da camada crescida na superfície de BV2 durante os dez períodos de imersão. Para comparação são expostos os espectros do vidro antes ser posto em imersão e da HA sintética.....	65
Figura 34: Espectros de absorção de infravermelho da camada crescida na superfície de BV4 durante os dez períodos de imersão. Para comparação são expostos os espectros do vidro antes ser posto em imersão e da HA sintética.....	65
Figura 35: Ampliação da região correspondente a formação das bandas de fosfato $\nu_4$ para os espectros normalizados das três amostras, durante os períodos de imersão compreendidos entre 48 horas e 28 dias. ....	66
Figura 36: Espectros de absorção de infravermelho da camada crescida na superfície do 45S5 durante os dez períodos de imersão. Para comparação são expostos os espectros do vidro antes ser posto em imersão e da HA sintética.....	67
Figura 37: Gráfico relacionando os valores calculados do IC para as camadas formadas sobre os vidros borato e o 45S5 após o procedimento de imersão em SBF. Por não participar do processo de imersão, o valor calculado para a HA sintética foi posicionado para o tempo 0..	68
Figura 38: Difratomogramas dos vidros borato e do 45S5 antes de serem postos em imersão. ...	70
Figura 39: Difratomogramas das camadas crescidas sobre as amostras do vidro BV0 após o processo de imersão por 96 horas (h), 7, 14, 21 e 28 dias (d). O difratograma da HA está exposto para comparação, e (*) representa a Halite. Apenas os planos cristalográficos correspondentes a HA e vistos na nas amostras da camada crescida sobre os vidros, são demarcados .....	71
Figura 40: Difratomogramas das camadas crescidas sobre as amostras do vidro BV2 após o processo de imersão por 96 horas (h), 7, 14, 21 e 28 dias (d). O difratograma da HA está exposto para comparação, e (*) representa a Halite. Apenas os planos cristalográficos correspondentes a HA e vistos na nas amostras da camada crescida sobre os vidros, são demarcados. ....	72
Figura 41: Difratomogramas das camadas crescidas sobre as amostras do vidro BV4 após o processo de imersão por 96 horas (h), 7, 14, 21 e 28 dias (d). O difratograma da HA está exposto para comparação. Apenas os planos cristalográficos correspondentes a HA e vistos nas amostras da camada crescida sobre os vidros, são demarcados. ....	72
Figura 42: Difratomogramas das camadas crescidas sobre as amostras do vidro 45S5 após o processo de imersão por 96 horas (h), 7, 14, 21 e 28 dias (d). O difratograma da HA está exposto para comparação, junto das demarcações para a calcite (*). Apenas os planos cristalográficos correspondentes a HA e vistos na nas amostras da camada crescida sobre os vidros, são demarcados .....	75

Figura 43: Imagens de MEV com magnificação de 20000x da superfície da amostra BV0 antes de imersão (A), e da camada crescida nela depois de 96 horas (B), 7 (C) e 28 dias (D).....	76
Figura 44: Imagens de MEV com magnificação de 20000x da superfície da amostra BV2 antes de imersão (A), e da camada crescida nela depois de 96 horas (B), 7 (C) e 28 dias (D).....	76
Figura 45: Imagens de MEV com magnificação de 20000x da superfície da amostra BV4 antes de imersão (A), e da camada crescida nela depois de 96 horas (B), 7 (C) e 28 dias (D).....	77
Figura 46: Imagens de MEV com magnificação de 20000x da superfície da amostra 45S5 antes de imersão (A), e da camada crescida nela depois de 96 horas (B), 7 (C) e 28 dias (D).....	77
Figura 47: Representação de um equipamento genérico para análise térmica via DTA e DSC. A) DTA; B) DSC com fluxo de calor; C) DSC com compensação de potência. Adaptado da referência [112].....	86
Figura 48: Representação de um equipamento genérico para análise térmica via DTA e DSC. A) DTA; B) DSC com fluxo de calor; C) DSC com compensação de potência Adaptado da referência [8].....	86
Figura 49: DSC típico mostrando os efeitos térmicos sofridos pelos biovidros 45S5, S53P4 e 13-93. Adaptado da referência [31].....	87
Figura 50: Diferentes tipos de modos vibracionais. Na parte de cima estão os estiramentos (a) simétrico e (b) assimétrico. Na parte de baixo, à esquerda estão os dobramentos realizados no mesmo plano que une os três átomos, dados pelo tipo (c) tesoura e (d) balanço. À direita estão os dobramentos realizados fora do plano, dados pelo tipo (e) abano e (f) torção. Setas tracejadas representam movimentos com direção perpendicular ao plano da página. Adaptado da referência [122].....	90
Figura 51: Esquema dos componentes de um equipamento utilizado para aplicação da técnica de FTIR. Adaptado da referência [119].....	92
Figura 52: Parte do espectro de infravermelho de uma apatita sedimentar exemplificando como é o cálculo do IC feito por Shemesh. Adaptada da referência [124]. ....	93
Figura 53: Diagrama dos níveis de energia para exemplificar o efeito Raman decorrente do espalhamento de radiação por um material. ....	95
Figura 54: Espectro Raman típico da cumarina mostrando os espalhamentos Rayleigh, Raman Stokes e Anti-Stokes. Adaptado da referência [125].....	96
Figura 55: Esquema representando os componentes e a configuração convencional de um equipamento micro-Raman. Adaptado da referência [128].....	97
Figura 56: Representação da interação entre raios-X e os planos cristalográficos de um sólido cristalino. Adaptado da referência [130]. ....	100

Figura 57: Esquema representando os componentes e a configuração convencional de um difratômetro de raios-X com geometria $\theta$ - $2\theta$ . Adaptado da referência [132]. .....	101
Figura 58: Esquema dos componentes internos de um MEV convencional. Adaptado da referência [134].....	104
Figura 59: Ilustração dos efeitos gerados pela interação do feixe de elétrons incidente em uma amostra durante uma análise de MEV. Adaptado da referência [136].....	104
Figura 60: Imagens de Nanohastes de Ni/Au formadas pelo sinal de (a) elétrons secundários e (b) elétrons retroespalhados. Adaptado da referência [134].....	106
Figura 61: Ilustração que representa o processo de fabricação de SBF. Adaptado da referência [60]. .....	109
Figura 62: Exemplos de posicionamento de amostras em imersão em SBF.(A) Como é sugerido o posicionamento e (B) como deve ser evitado. Adaptada da referência [35].....	110

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Biomateriais, suas vantagens, desvantagens e aplicações [20]. .....	10
Tabela 2: Propriedades físicas do 45S5 (Bioglass®) [8].....	22
Tabela 3: Composições de diferentes vidros bioativos (mol%). Adaptado das referências [8,24,31,39]. .....	29
Tabela 4: Nomenclatura e composição (% em massa e % mol) das amostras preparadas.....	36
Tabela 5: Temperaturas e parâmetros obtidos por meio do DSC dos vidros borato e DTA do vidro 45S5. ....	42
Tabela 6: Concentração iônica nominal e pH do SBF comparados com o plasma sanguíneo. Adaptada da referência [35]. .....	108
Tabela 7: Ordem, reagente, quantidade e pureza dos reagentes para preparar 1 l de SBF. Adaptado da referência [35]. .....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Fosfato de cálcio amorfo
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
BO	Ponte de oxigênio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	Charge Coupled Devices
CMP	Metafosfato de cálcio
CPP	Pirofosfato de cálcio
CPPD	Pirofosfato de cálcio di-hidratado
DATASUS	Departamento de informática do Sistema Único de Saúde
DCP	Mono-hidrogênio fosfato de cálcio
DCPD	Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado
DRX	Difração de raios-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise térmica diferencial
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
FA	Fluorapatita
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GFA	Habilidade de formação vítrea
GS	Estabilidade vítrea
HA	Hidroxiapatita
HCA	Hidroxicarbonato de apatita
HCl	Ácido clorídrico
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
HCP	Fosfato heptacálcico
I <sub>b</sub>	Índice de bioatividade
IC	Índice de cristalinidade
ICDD	International Center for Diffraction Data
ICSD	Inorganic Crystal Structure Database
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
K <sub>gl</sub>	Coefficiente de Hruby
MCMP	Fosfato monocálcico mono-hidratado
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NBO	Ponte de oxigênio não-ligante
N <sub>c</sub>	Network connectivity
NMR	Ressonância magnética nuclear
OCP	Fosfato octacálcico
PCL	Poli 3-caprolactona
PE	Polietileno
PGA	Ácido poliglicólico
PHB	Polihidroxibutirato
PLA	Ácido polilático
PLLA	Ácido poli-L-lático
PMMA	Polimetilmetacrilato
PP	Polipropileno
PU	Poliuretanos
SBF	Simulated body fluid

SUS	Sistema Único de Saúde
TCP	Fosfato tricálcico
Tc	Temperatura do pico de cristalização
TDHP	Di-hidrogênio fosfato tetracálcico
TeCP	Fosfato tetracálcico
Tg	Temperatura de transição vítrea
T <sub>L</sub>	Temperatura de início de fusão
T <sub>m</sub>	Temperatura do pico de fusão
TRIS	Tris hidroximetil amino metano
T <sub>x</sub>	Temperatura de início da cristalização

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>6</b>
2.1 BIOMATERIAIS .....	6
2.2 HIDROXIAPATITA .....	11
2.3 VIDROS .....	14
2.3.1 Conceitos gerais sobre vidros .....	14
2.3.2 Vidros Borato .....	18
2.4 VIDROS BIOATIVOS.....	21
2.4.1 Breve história sobre os vidros bioativos.....	21
2.4.2 Conceitos básicos sobre biovidros.....	24
2.4.3 Vidros bioativos borato .....	25
2.4.4 Diferentes composições e produtos a base de biovidros comercializados .....	27
2.4.5 Mecanismo de formação da HCA .....	30
2.4.5.1 Mecanismo de formação da HCA em vidros silicato proposto por Hench e Anderson.....	30
2.4.5.2 Mecanismo de formação da HCA sugerido para vidros borato.....	33
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	35
3.2 TESTE DE BIOATIVIDADE <i>IN VITRO</i> .....	37
3.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	38
3.3.1 DSC e DTA .....	39
3.3.2 FTIR .....	39
3.3.3 Micro-Raman.....	39
3.3.4 DRX.....	39
3.3.5 MEV .....	40
3.3.6 pH .....	40
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
4.1 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL .....	41
4.2 VARIAÇÕES DE pH DURANTE O TESTE <i>IN VITRO</i> .....	44
4.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	50
4.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO COM TRANSFORMADA DE FOURRIER..	61

4.5 DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X .....	69
4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	75
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>PERSPECTIVAS PARA ESTUDOS FUTUROS.....</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>84</b>
<b>TÉCNICAS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>84</b>
A.1 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL .....	84
A.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO .....	87
A.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	94
A.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X .....	99
A.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	102
A.6 TESTE <i>IN VITRO</i> COM SOLUÇÃO SBF .....	106
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>111</b>

# 1 Introdução e objetivos

A curiosidade e a característica investigativa do Homem são qualidades intrínsecas à sua existência. Movido por essa natureza, toda a ciência e a consequente tecnologia desenvolvida por ela, fez-se e faz-se cada vez mais rápida e necessária para a humanidade. Tentar sobrepor-se aos fenômenos naturais ou às adversidades causadas pelo cotidiano sempre foram as chamadas que motivaram a evolução do pensamento e da criatividade humana. Em um desses desafios, o homem deu início a saga de tentar repor ou reconstruir partes perdidas ou defeituosas de seu corpo. Nasce aí a história dos biomateriais.

Os problemas físicos, antes causados por trabalhos braçais excessivos, confrontos com animais e eventualmente em guerras, hoje foram substituídos por acidentes gerados pela industrialização, por fatalidades no trânsito e pelo aumento da expectativa de vida, que leva a um maior desgaste dos tecidos do corpo. Guerras infelizmente ainda fazem parte da sociedade contemporânea e não podem ser excluídas do quadro de causadoras de mutilações.

Uma maneira didática de exemplificarmos o quão susceptíveis estamos a estas mazelas é por meio da observação de dados referentes a acidentes de trânsito. No Brasil, estes foram a causa de mais de 200.000 casos de internações por ferimentos graves no ano de 2016. Podemos confrontar estes números com os referentes aos anos anteriores por meio da figura 1. Segundo consta no banco de dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS), é visível o contínuo aumento do número de acidentes e, conseqüentemente, a demanda gerada pela necessidade de se tratar as sequelas provenientes destes eventos [1].

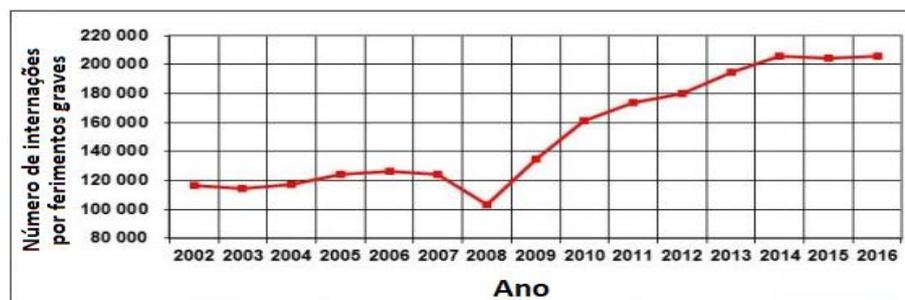


Figura 1: Estatística nacional do número de internações por ferimentos graves em acidentes de trânsito no período de 2002 a 2016. Dados atualizados até a data de 11/02/2017. Adaptado da referência [1].

Em busca de soluções, não somente para problemas causados por acidentes de trânsito, o desenvolvimento de tecnologias voltadas a cuidados com a saúde tem se tornado cada vez maior e é refletido diretamente na economia. A criação e aprimoramento de materiais utilizados em dispositivos médicos ou que têm contato direto com sistemas biológicos, compõe uma parte importante dos cerca de 300.000 produtos para uso na área da saúde [2]. Utilizando o final do século passado como base de análise, somente no ano 2000 o mercado mundial desses chamados biomateriais foi estimado em 23 bilhões de dólares, com taxa de crescimento de 12% ao ano, o que significaria, em 2015, ter ultrapassado os 100 bilhões de dólares. A participação dos EUA se situava entre 35-45% do mercado mundial, enquanto o mercado europeu era responsável por cerca de 25% [2]. No Brasil, dados de 2004 mostram que os gastos do Sistema Único de Saúde (SUS) com ortopedia totalizaram cerca de 60 milhões de reais, com 6.337 itens (exceto insumos) fornecidos por 39 empresas e preços de lista variando entre 3,17 e 48.000,000 reais. Somado a isso, houve, somente em 2004, cerca de 1500 cirurgias de revisão, responsáveis por um gasto adicional de quase 7 milhões de reais em próteses [2].

Para termos noção da abrangência de atuação destes biomateriais, eles podem ser categorizados como dispositivos biomédicos, materiais implantáveis, dispositivos para a liberação controlada de medicamentos, órgãos artificiais e curativos, compreendendo exemplares que vão desde válvulas cardíacas, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise, suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, telas ou malhas, lentes e dentes, até estruturas mais complexas na forma de filmes, implantes subdérmicos e partículas, biossensores, coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões e pele, dentre muitos outros [3].

O campo de estudo sobre biomateriais é extremamente vasto e a necessidade de desenvolver abordagens interdisciplinares na concepção de novos exemplares é inevitável. Seu desenvolvimento exige a sinergia de grupos de pesquisa em ciência de materiais, biologia, química, física e medicina [4]. A evolução natural dos estudos levou ao surgimento de áreas como a bioengenharia, engenharia biomédica, biotecnologia, biomecânica, engenharia de tecidos entre outras. Por serem áreas relativamente novas, suas definições nem sempre são claras, sendo praticamente impossível evitar a superposição entre os temas [2]. Dentre elas devemos destacar a engenharia de tecidos, ramo da ciência que se especializou em buscar práticas para induzir o corpo a se autorregenerar em vez de promover a substituição de partes danificadas. Um conceito baseado na ideia de, a longo prazo, tornar os sistemas de reparação e de substituição de partes defeituosas por formas genéricas não

humanas, os quais podem ser fornecidos, sob requisição, para aplicações terapêuticas de enxertos de pele ou reposição de órgãos [4,5] .

A engenharia de tecidos é hoje fundamental ao exercício da medicina regenerativa, e o mercado potencial de produtos por ela desenvolvidos, como pele, osso e cartilagem, é estimado em mais de 100 bilhões de dólares ao ano [2]. Mesmo assim ela ainda esbarra em muitas dificuldades naturais. Os ossos, por exemplo, possuem a capacidade de regenerar-se formando um novo tecido com a mesma estrutura do original. Entretanto, esta capacidade é limitada por dois fatores importantes. O primeiro é a extensão da lesão, que pode levar a necessidade de preenchimentos realizados com enxertos do próprio paciente, mas que acaba sendo limitada pela quantidade de material. O outro é a utilização de materiais artificiais, na maioria das vezes inertes, que podem causar rejeições e transmissões de doenças ao hospedeiro. Desafios como esses movem a engenharia de tecidos a estudar e desenvolver materiais com propriedades físicas, mecânicas e biológicas compatíveis com a dos tecidos vivos, de forma a estimular respostas adequadas aos sistemas anfitriões [6].

Pesquisas e publicações científicas, tendo como tema biomateriais, se tornam cada vez mais relevantes a cada ano. Em uma rápida busca por periódicos disponíveis na base de dados *web of science* [7], por meio do acesso ao portal CAPES, é possível observar a quantidade de trabalhos que possuem *biomaterials* como palavra-chave. A figura 2-A apresenta o número de publicações em função dos últimos 17 anos, e demonstra o notório e crescente interesse em se estudar os mecanismos que concedem propriedades singulares a estes materiais, bem como a ênfase no aprimoramento e criação de outros novos. Dentre estes os vidros bioativos, tema principal deste trabalho, seguem a mesma tendência como apontado na relação de publicações que contém a palavra-chave *bioactive glasses* [7], exposto na figura 2-B.

Esses vidros que possuem propriedades bioativas, ou seja, capazes de interagir e estimular uma resposta biológica do organismo hospedeiro, quando implantado *in vivo*, tem sido alvo de interesse para aplicações biomédicas desde o início dos anos 70. Por serem altamente versáteis, esses também chamados “biovidros” continuam sendo amplamente investigados, e com o auxílio do surgimento da engenharia de tecidos, projetos que vão desde a confecção de nanoesferas para liberação controlada de medicamentos, fibras que ajudam na cicatrização de feridas em diabéticos e até produtos já comercializados como pastas para redução de sensibilidade nos dentes têm sido impulsionados [8].

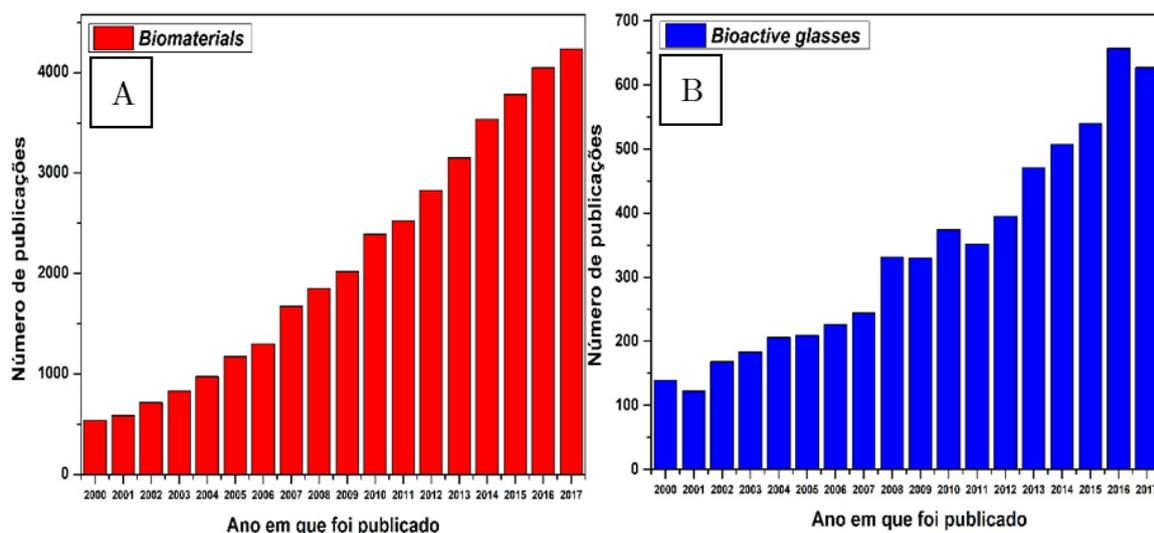


Figura 2: (A) Número de publicações por ano contendo o termo biomateriais como palavra chave. (B) Número de publicações por ano contendo o termo vidros bioativos como palavra chave. Acesso realizado na data: 28/02/2018 [7].

Ao longo dos últimos cinquenta anos, os avanços feitos no desenvolvimento de dispositivos confeccionados com o objetivo de promover a restauração e substituição dos tecidos biológicos foram notáveis e amplamente aplicados. Porém, ainda há muitos problemas a serem resolvidos e o sucesso desses grandes esforços claramente exigem maior compreensão de vários conceitos, como biocompatibilidade, resposta do hospedeiro e interação célula-biomaterial [4].

Este trabalho busca o desenvolvimento de novos vidros que possam ser aplicados como biomateriais, olhando por um viés que foge àqueles já bem consolidados em nosso grupo de pesquisa e, assim, tenta estimular a interdisciplinaridade e o esforço em conjunto de áreas do conhecimento que são complementares e podem ser muito frutíferas.

A escolha por estudar vidros da base borato foi feita por estas serem composições ainda pouco utilizadas, quando comparadas aos seus semelhantes silicato, e por possuírem propriedades muito promissoras para diversas aplicações como biomaterias. Vidros borato são altamente reativos e possuem menor durabilidade química que silicatos, podendo, em alguns casos, apresentar maior bioatividade do que seus análogos de silício [9]. Algumas das aplicações mais interessantes para vidros bioativos borato se concentram em tirar proveito da capacidade de liberação de íons que podem estimular a angiogênese e o controle de pH do meio, além de suas propriedades térmicas permitirem sua confecção em fibras ou

*scaffolds*<sup>1</sup> de forma mais fácil, ofertando inúmeras possibilidades de se expandir a aplicabilidade destes vidros [8].

O objetivo principal deste trabalho é estudar vidros borato utilizando três composições com concentrações variadas de óxido de fósforo, avaliando seu potencial bioativo mediante testes *in vitro* com a imersão das amostras em fluido corpóreo simulado (SBF), por diferentes períodos de tempo. Para analisar mudanças nas características morfológicas e estruturais apresentadas durante o procedimento *in vitro*, as amostras foram submetidas às técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de absorção no infravermelho via transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman e difração de raios-X (DRX). O pH do fluido em que os vidros foram imersos foi monitorado ao longo de todo o processo, assim como também foram analisadas as propriedades térmicas para os vidros por meio da calorimetria exploratória diferencial (DSC).

De modo a garantir uma melhor avaliação dos resultados obtidos, amostras do vidro 45S5, o primeiro vidro bioativo desenvolvido e considerado até o hoje o mais bioativo [6], foram submetidas aos mesmos procedimentos que os vidros borato, com o intuito de comparar as características apresentadas por cada um, antes e após o teste *in vitro*.

Este trabalho se divide em 5 capítulos. O primeiro e corrente, trata de contextualizar o interesse pelo estudo abordado e os objetivos. O segundo traz o embasamento teórico com ênfase em biomateriais e vidros bioativos. O terceiro apresenta os materiais e métodos utilizados no trabalho. O quarto relaciona os resultados e discussões decorrentes dos procedimentos aplicados no capítulo precedente. O quinto e último aborda as conclusões e perspectivas obtidas da realização do trabalho. Além disso, informações suplementares sobre assuntos relacionados às técnicas experimentais utilizadas, estão contidas no apêndice A.

---

<sup>1</sup> São estruturas de suporte para crescimento e regeneração de tecidos em aplicações biomédicas. Concedem uma arquitetura funcional para o desenvolvimento e diferenciação celular enquanto se degradam.

## 2 Revisão bibliográfica

Este capítulo faz um apanhado geral sobre temas importantes no desenvolvimento deste trabalho. Ele conta com tópicos que servem como guia para uma melhor compreensão do que se pretende estudar, abordando situações e resultados que podem ser esperadas na pesquisa de vidros bioativos.

### 2.1 Biomateriais

Embora atualmente sejam amplamente difundidos e estudados, a utilização de materiais para repor partes perdidas ou danificadas do corpo humano remonta a períodos históricos de 2500 anos a.C.. A prática de substituir dentes e partes ósseas por materiais como ouro, marfim, madeira e até pedras preciosas é relatada em antigos textos orientais de medicina. Todavia, os prováveis precursores no uso de implantes aloplásticos<sup>2</sup> em vida tenham sido os maias. Esse costume, datado do início do século VII, pôde ser confirmado por um fragmento de mandíbula encontrado por Wilson Popenoe, na “Playa de los Muertos”, Honduras, em 1931. A mandíbula que Popenoe achou continha pedaços de conchas substituindo dentes e pode ser vista na figura 3. Testes radiográficos posteriores concluíram que, devido a osteointegração<sup>3</sup> entre as conchas e o osso, os implantes foram feitos com o paciente vivo [10,11].



Figura 3: Foto de um fragmento de mandíbula com implantes de conchas marinhas. Adaptado da referência [11].

---

<sup>2</sup> O termo aloplástico, em medicina, refere-se a um material capaz de ser colocado dentro de um organismo vivo (favorecendo sua forma, moldando parte dele) e que mesmo sendo diferente possa comportar-se de maneira semelhante ao tecido próprio do organismo, sendo tolerado por este.

<sup>3</sup> Ancoragem direta de um implante pela formação de tecido ósseo ao seu redor sem crescimento de tecido fibroso na interface osso-implante.

Com o passar dos anos e a evolução da medicina, as técnicas de esterilização e assepsia<sup>4</sup> foram aperfeiçoadas, permitindo que, em meados de 1860, fossem feitos implantes aloplásticos com maior segurança e menores riscos de infecções. Desde então, inúmeros outros tipos de materiais foram pesquisados e confeccionados de modo a apresentar compatibilidade e nenhuma rejeição do corpo humano [12].

Durante conferências organizadas pela *European Society for Biomaterials Biomaterials* (Sociedade Européia para Biomateriais, em tradução livre), feitas com o intuito de buscar definições para o termo biomateriais, chegou-se, na primeira edição realizada em 1986, ao seguinte consenso: “*Biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, que não sejam drogas, de origem animal ou sintética que pode ser usada por um período de tempo, como parte ou como um todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo*”. Mais tarde, no segundo encontro, em 1991, a definição foi readaptada e passou a ser: “*Materiais com propósito de interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou repor qualquer tecido, órgão ou função do corpo*” [5].

Os anos de experiência no desenvolvimento e aplicação dos biomateriais produziram consensos acerca das necessidades a serem atendidas. Concluiu-se que os biomateriais devem apresentar propriedades especiais para se adaptarem às aplicações a que os destinam. Basicamente, devem resistir a interação com o organismo, sem se degradar nem produzir qualquer resposta biológica adversa, local ou sistêmica<sup>5</sup>, independente da maneira como reagirá quando aplicado *in vivo*. Dentre os requisitos essenciais para a seleção e emprego de um material comum como biomaterial, têm-se [6,13]:

- **Biocompatibilidade:** depois de implantado, o material deve resistir ao ataque do sistema biológico sem sofrer a liberação de substâncias nocivas ao hospedeiro, bem como perda de seu propósito.
- **Biofuncionalidade:** o material deve apresentar propriedades físicas e mecânicas que o permitam desempenhar a função planejada.

---

<sup>4</sup> Assepsia é o conjunto de procedimentos que visam impedir a introdução de germes patogênicos em determinado organismo, ambiente e objetos.

<sup>5</sup> Capaz de afetar inteiramente um organismo.

- Esterilização: quando submetido a técnicas de esterilização que podem conter uso de radiação gama, gás oxí-etileno e autoclavagem<sup>6</sup>, as propriedades do material não devem ser afetadas.
- Manufatura: o formato e o conforto do material implantado devem ser garantidos sem comprometimentos em suas propriedades.

Os biomateriais podem ser classificados em três grupos de acordo com a aplicação a que se destinam. Estes são: substituição de tecidos moles<sup>7</sup>, substituição de tecidos duros<sup>8</sup> e materiais para o sistema cardiovascular. Na ortopedia e odontologia foram definidas três gerações conceituais distintas em relação à resposta apresentada pelo biomaterial após o implante [6,11,14].

Devido à pouca experiência, a primeira geração foi voltada para materiais que combinassem propriedades físicas com a mínima resposta imunológica do tecido hospedeiro. Dentre estes se destacam os materiais metálicos, cerâmicos e poliméricos. Alguns exemplos são: aço inoxidável, ligas de titânio e cobalto-cromo, zircônia, alumina, silicone, polietileno (PE), poliuretanos (PU), polimetilmetacrilato (PMMA), polipropileno (PP), resinas acrílicas entre outros [15,16].

A geração seguinte é caracterizada pela utilização de biomateriais com capacidade de melhorar a resposta biológica e a ligação tecido hospedeiro/implante, bem como pela criação de materiais com degradação progressiva durante a regeneração do novo tecido, os chamados materiais reabsorvíveis. Essa fase é marcada por exemplos como os biovidros, as bio-vitrocerâmicas, os fosfatos de cálcio, o ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), o poli 3-caprolactona (PCL), polihidroxibutirato (PHB), o ácido hialurônico, a quitosana e os hidrogéis [15,16].

A terceira e última geração combina conceitos de bioatividade e biodegradabilidade sem substituir totalmente os materiais das gerações anteriores. Com o intuito de regenerar o tecido e não simplesmente substituí-lo, encontramos os seguintes produtos: cimentos

---

<sup>6</sup> Consiste em manter o material contaminado a uma temperatura elevada, por meio do contato com vapor de água, durante um período de tempo suficiente para destruir todos os agentes patogênicos.

<sup>7</sup> Refere-se à classe de tecidos animais com matriz extracelular rica em fibras de colágeno e elastina. Incluem tecidos epiteliais, muculares e conjuntivos não mineralizados.

<sup>8</sup> Refere-se ao tecido mineralizado que se tornou firme e trabalha no corpo como mecanismo de apoio e proteção. Estes incluem ossos, dentes e esmalte

ósseos reabsorvíveis, proteínas morfogenéticas<sup>9</sup> ósseas (como BMP2) associadas a cerâmicas de fosfato de cálcio, cartilagem para regeneração de articulações (*Carticel*<sup>®</sup>, *Genzyme Co.*), pele artificial (*Intergra*<sup>®</sup> *Life Science*) e *scaffolds* de cerâmicas e vidros bioativos [15,16]. Na tabela 1 são citados biomateriais, suas características e aplicações [15,16]. Enquanto alguns exemplos podem ser vistos nas fotos expostas na figura 4.

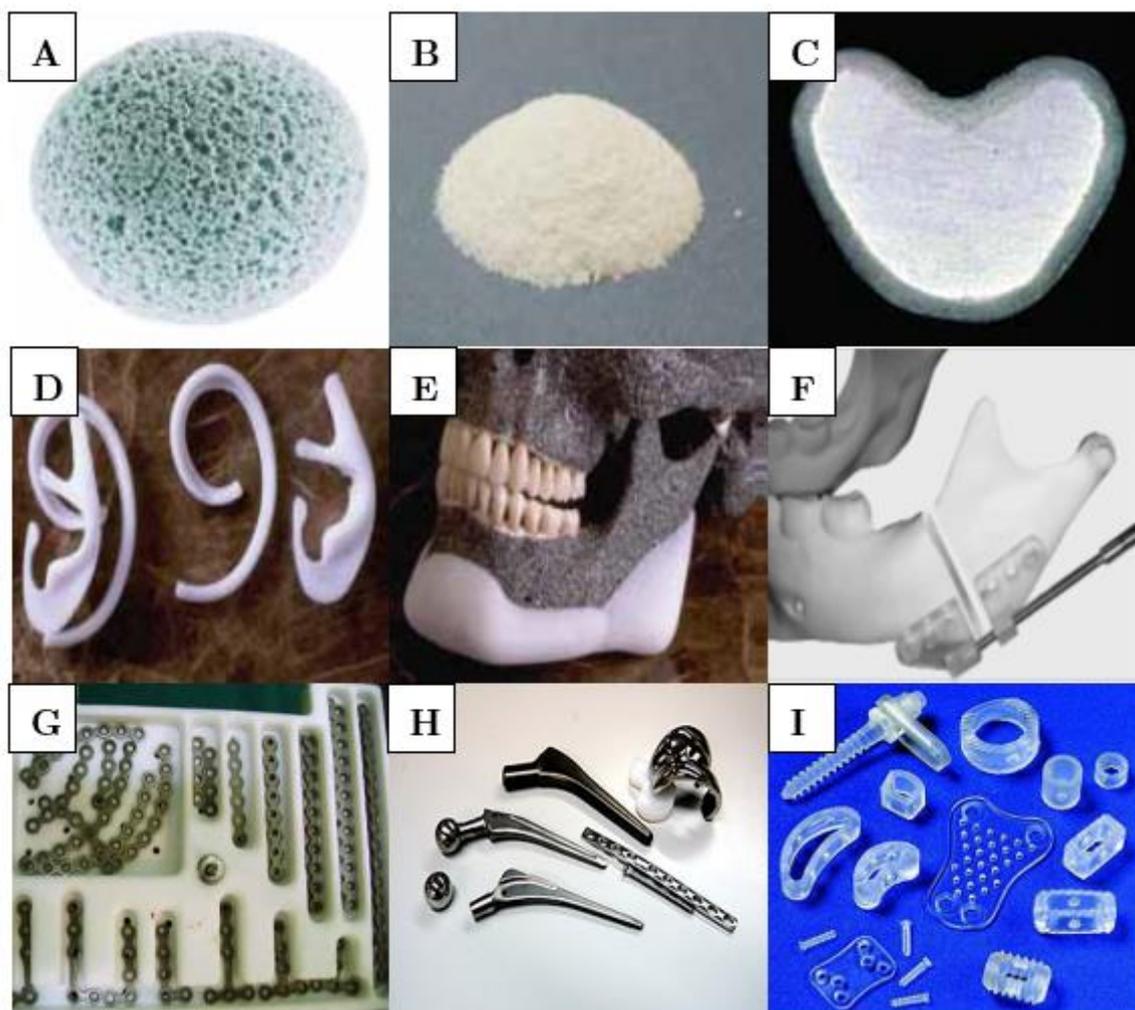


Figura 4: Exemplos de biomateriais na atualidade: (A) Hidroxiapatita porosa e (B) Cimento de hidroxiapatita utilizados para reconstrução da estrutura facial [17]; (C) Placa de vidro bioativo utilizados para reconstrução da estrutura facial [17]; (D) Implantes de polietileno poroso utilizado na reconstrução auricular [17]; (E) Prótese de polietileno utilizado para implante de queixo [17]; (F) Implante mandibular de copolímero randômico linear de 82% de ácido poli-L-lático (PLLA) e 18% de ácido poliglicólico (PGA) [17]; (G) Dispositivos de titânio utilizados para reconstrução da estrutura facial [17]; (H) Ligas metálicas como elementos estruturais na estabilização de fraturas ósseas [18]; (I) Polímeros utilizados como membranas e implantes de cirurgia artroscópica e espinha [19].

<sup>9</sup> É uma proteína capaz de induzir a transformação de células mesenquimais (indiferenciadas) em cartilagem e osso.

Tabela 1: Biomateriais, suas vantagens, desvantagens e aplicações [20].

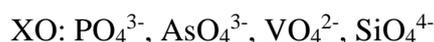
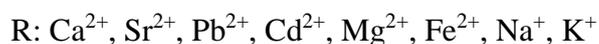
<b>Biomaterial</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Aplicações</b>
<b>Polímeros</b>			
Polietilenos, Poliéster, Poliuretano, Polimetilmetacrilato, Politetrafluoretileno e Silicone	Elasticidade, fácil fabricação, baixa densidade	Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo	Suturas, artérias, veias; maxilofacial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula, dente), tendão artificial, oftalmologia
<b>Metais e Ligas</b>			
Aço inoxidável, Titânio, Tântalo, Liga de Níquel-Cromo, Liga de Titânio e Liga Cobalto-Cromo	Alta resistência a tensão, alta resistência ao desgaste, alta energia de deformação	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda das propriedades mecânicas com tecidos conectivos moles, alta densidade	Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios, hastes); implantes dentários
<b>Cerâmicas e Vidros</b>			
Alumina, Zircônia, Carbono, Fosfatos de cálcio, Porcelana e Vidros bioativos	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, alta resistência à compressão	Baixa resistência a tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade, alta densidade	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traqueias artificiais
<b>Compósitos</b>			
Fibra de carbono-resina termofixa, Fibra de carbono-termoplástico, Carbono-carbono e Fosfato de Cálcio-colágeno	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, alta resistência a tensão	Dificuldades com incompatibilidade entre os materiais	Válvula cardíaca artificial, implantes de juntas de joelho

Uma última forma de classificar um biomaterial é de acordo com o mecanismo de resposta de sua interação interfacial com o tecido vivo. Desta forma, podemos rearranjá-los como [6]:

- Inerte: necessita de fixação morfológica com auxílio de parafusos, sutura ou até cimentação. Apresenta pequena aderência com formação apenas de uma cápsula fibrosa. Exemplos: metais, zircônia, alumina e polietileno (PE).
- Poroso: forma uma fixação do tipo biológica com possível osteocondução<sup>10</sup>, podendo desenvolver crescimento de tecido para dentro dos seus poros providenciando uma boa ligação mecânica. Exemplos: hidroxiapatita porosa e metais revestidos com hidroxiapatita.
- Bioativo: quando implantado *in vivo*, este material desencadeia mecanismos de crescimento de uma camada de hidroxicarbonato de apatita (HCA) em sua superfície. Esta camada biologicamente ativa, possui estrutura e estequiometria similar a fase mineral do osso natural, e é capaz de desenvolver uma forte ligação junto ao colágeno. Exemplos: hidroxiapatita sintética, biovidros, biocerâmicas e bio-vitrocerâmicas.
- Reabsorvível: diferente dos outros biomateriais, depois de implantados estes se dissolvem, são lentamente absorvidos e substituídos por tecido fibroso, desde que a taxa de sua reabsorção seja metabolicamente estável. Exemplos: beta fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP), polímeros biodegradáveis, ácido poli-L-lático (PLLA) e sais de fosfato de cálcio.

## 2.2 Hidroxiapatita

Apatita é a denominação genérica de uma série de minerais isomorfos<sup>11</sup> com estrutura hexagonal e pertencentes ao grupo espacial  $P6_3/m$ , geralmente representada pela fórmula  $R_{10}(XO_4)_6J_2$ , que podem corresponder a [14]:



<sup>10</sup> É a capacidade do implante agir como um guia para o crescimento do tecido ósseo novo, proveniente do hospedeiro.

<sup>11</sup> Minerais de composição química diferente, mas análoga, que cristalizam no mesmo sistema.

Esses compostos são encontrados na natureza em várias partes do mundo como constituintes de rochas ígneas<sup>12</sup> e metamórficas<sup>13</sup>, especialmente em calcários cristalinos e também em fósseis [21]. Quando na forma de fosfato de cálcio hidratado, a apatita recebe o prefixo “hidroxi” relativo à hidroxila  $\text{OH}^-$ , passando a se chamar Hidroxiapatita [22]. Esta forma de apatita possui fórmula estequiométrica definida por  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  e razão entre átomos de cálcio e fósforo (razão molar Ca/P) igual a 1,67, sendo o fosfato de cálcio mais estável e um dos menos solúveis [14].

Com cristalografia e estequiometria características, a hidroxiapatita pertence ao sistema hexagonal com grupo espacial  $P6_3/m$ , definido por uma simetria perpendicular aos três eixos “a” equivalentes ( $a_1$ ,  $a_2$  e  $a_3$ ) que formam entre si um ângulo de  $120^\circ$ . A hidroxiapatita possui os parâmetros de rede de sua célula unitária dados por: “a” = “b” = 0,9432 nm e “c” = 0,6881 nm, e tem a representação de seu arranjo atômico ilustrado na figura 5. Como podemos ver, ela é composta por seis tetraedros fosfato e dez íons de cálcio, com duas hidroxilas posicionadas nas arestas da célula [21,23].

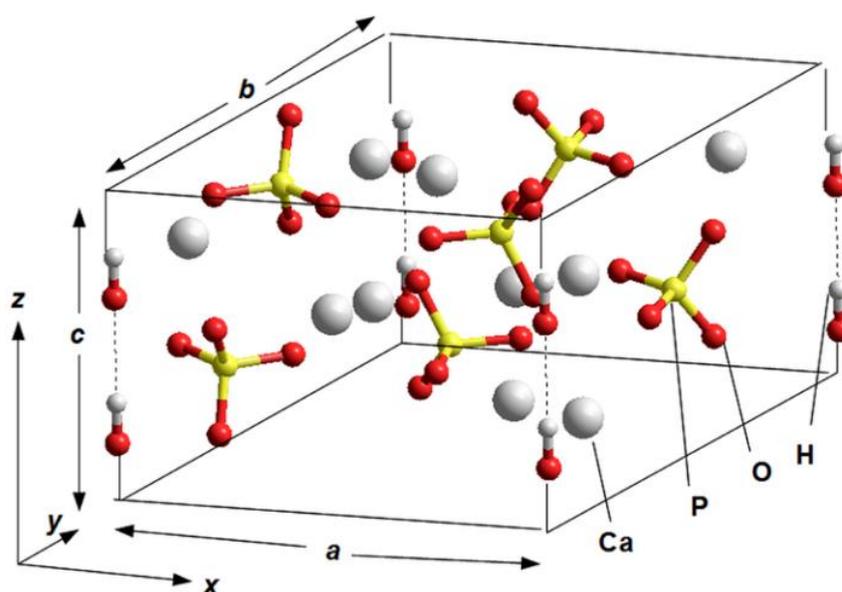


Figura 5: Representação do arranjo atômico da hidroxiapatita. Adaptado da referência [23].

Os parâmetros de rede, a cristalinidade, a estabilidade, a solubilidade e outras propriedades da hidroxiapatita podem ser alteradas por meio de substituições catiônicas e aniônicas em sua estrutura. Os sítios de  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser substituídos por cátions metálicos ou vacâncias, os grupos fosfatos podem dar lugar a carbonatos e vanadatos, enquanto as

<sup>12</sup> São aquelas resultantes da consolidação do magma.

<sup>13</sup> Resultam da transformação de outras rochas preexistentes, agora, sob novas condições de temperatura e pressão.

hidroxilas têm sua troca feita por flúor, cloro e também carbonato. As substituições em que o carbonato é incorporado à rede acontecem em maior quantidade. Aquela em que ele entra no lugar do fosfato é conhecida como substituição do tipo B, enquanto a tipo A representa sua troca com a hidroxila [6,14,21,24].

Um dos principais constituintes do osso é a água, entretanto, se seco, cerca de dois terços do seu peso tem origem na sua fase mineral, a qual é composta por fosfato de cálcio na forma de apatita carbonatada com baixa cristalinidade e dimensões nanométricas. O terço restante é a fração orgânica que inclui várias proteínas, sendo a principal delas o colágeno tipo I [14]. Além dos principais íons que compõe a apatita biológica ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{OH}^-$ ), ela sempre contém cerca de 4,5% de íons  $\text{CO}_3^{2-}$ , assim como uma série de outros em escalas bem menores, como  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ . Deficiente em cálcio, a apatita biológica tem razão molar Ca/P sempre menor que 1,67, mas se aproximando desse valor conforme o organismo envelhece, ao mesmo tempo que aumenta sua cristalinidade [14].

Outra curiosidade sobre a apatita biológica diz respeito a diferença na formação dos tecidos ósseos dos dentes. Esses possuem uma parte mais externa, o esmalte, formada por mais de 90% de matéria inorgânica, majoritariamente por hidroxicarbonato de apatita. A característica especial do esmalte dentário, quando comparado com os demais ossos, são seus cristais muito maiores, com formas prismáticas e fortemente orientados. Não existe material biológico que pode se comparar com o esmalte em termos de dureza e durabilidade. Entretanto, ele não pode se regenerar [14,25].

Devido ao crescente interesse nas propriedades da hidroxiapatita, um grande número de técnicas vêm sendo desenvolvidas para sua sintetização [21]. As mais conhecidas utilizam de precipitação em soluções aquosas [26] ou reações no estado sólido [27], mas também pode-se encontrar métodos mais baratos e ecologicamente viáveis como o desenvolvido por Weinand [28], no qual o pó da hidroxiapatita é obtido por meio da limpeza, calcinação e moagem de ossos de peixe. Durante os processos de síntese da hidroxiapatita em soluções, condições como pH e temperatura podem influenciar o surgimento de fases precursoras a sua formação, como o fosfato de cálcio amorfo (ACP) [29]. Tido como deficiente em cálcio, o ACP pode eventualmente ser convertido de forma direta em hidroxiapatita ou, de maneira indireta, dar origem a uma fase intermediária como fosfato octacálcico (OCP) [30].

Como citado no tópico anterior, a bioatividade de um material implica a sua capacidade em desenvolver uma ligação interfacial com o tecido hospedeiro por meio de uma camada de HCA [31]. Do ponto de vista espectroscópico, a comprovação do surgimento desta camada na superfície do material pode ser feita pela observação de bandas na região do infravermelho referentes a grupos fosfato e carbonato, presentes em posições específicas do espectro [32]. Além disso, algumas características podem denotar o quão cristalina é HCA formada, como o estreitamento ou melhor separação espectral de certas bandas [33]. No caso de medidas de DRX, o fato destas camadas serem normalmente muito finas e pouco cristalinas acaba prejudicando sua detecção, entretanto, quando seu crescimento acontece sobre superfícies amorfas como de vidros bioativos, os picos ainda que largos e pouco intensos da HCA se sobressaem [34]. Uma última análise pode ser feita por meio de imagens de MEV da superfície das amostras, porém, neste caso, as imagens servem mais como um complemento do que uma comprovação em si [35].

## 2.3 Vidros

### 2.3.1 Conceitos gerais sobre vidros

Os materiais vítreos estão entre os mais utilizados pelo Homem, tanto que sua presença data desde os primeiros registros históricos das civilizações. Facilmente encontrados no nosso dia a dia e aplicados das mais diversas formas, os vidros são utilizados tanto na confecção de objetos simples como janelas e utensílios domésticos, quanto na fabricação de recipientes para conter substâncias altamente corrosivas e filtros para revestimento de estruturas aeroespaciais [36]. Para línguas anglo saxãs, a origem da palavra vidro, “*glas*” ou “*glass*”, é derivada do Latin “*glacies*”, que significa gelo. Por meio dela vemos a referência direta a uma das características que mais chamavam a atenção sobre os vidros, a transparência [8]. Essa é apenas uma das peculiaridades destes materiais que os distingue de tantos outros. Mas como são formados e por quê os vidros apresentam tantas singularidades quando comparados a outros materiais ?

Tentando entender melhor sobre materiais vítreos, Zachariasen publicou, em 1932, o famoso artigo “*The Atomic Arrangement in Glass*” [37]. Estendendo ideias empíricas de Goldschmidt, este artigo se tornou a base para os mais variados modelos de estrutura dos vidros e é, provavelmente, o artigo mais citado na literatura de vidros inorgânicos [36,38].

Zachariasen propunha que: “o arranjo atômico em vidros era caracterizado por uma rede tridimensional estendida, a qual apresentava ausência de simetria e periodicidade”. Ainda segundo o pesquisador, a presença ou ausência de periodicidade e simetria em uma rede tridimensional, seria o fator de diferenciação entre um cristal e um vidro [37]. A figura 6-A traz a representação bidimensional do arranjo cristalino simétrico e periódico de um cristal de sílica ( $\text{SiO}_2$ ), enquanto a figura 6-B mostra um esquema bidimensional para uma rede vítrea do mesmo material, caracterizando a ausência de simetria e periodicidade [39].

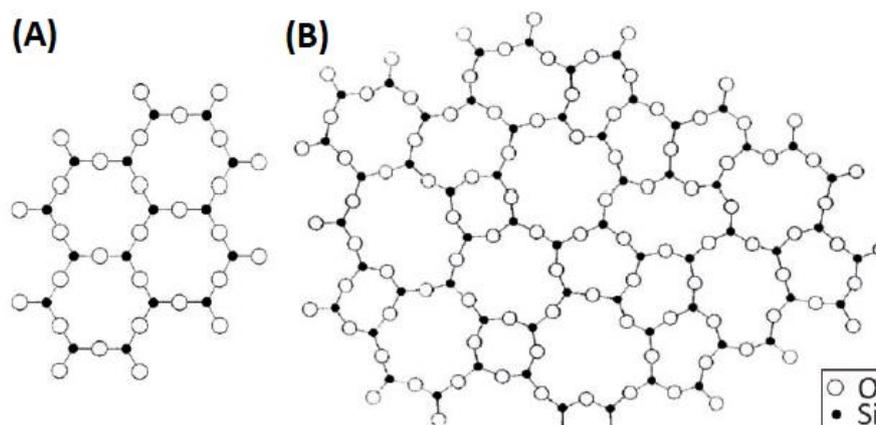


Figura 6: Estrutura (A) cristalina e (B) vítrea da sílica. Adaptado da referência [39].

Na grande maioria dos casos, à temperatura ambiente, vidros apresentam rigidez mecânica e se comportam como sólidos. Entretanto, microscopicamente estes materiais demonstram estrutura muito semelhante a de líquidos e, por isso, os termos “sólido não-cristalino” e “líquido super-resfriado” são usados para designá-los [40]. Na definição dada por Shelby consta que: “*Vidro é um sólido amorfo com ausência completa de ordem a longo alcance e periodicidade, exibindo uma região de transição vítrea. Qualquer material, inorgânico, orgânico ou metal, formado por qualquer técnica, que exhibe um fenômeno de transição vítrea é um vidro.*” [36].

Os vidros diferem do que conhecemos como um sólido cristalino de várias maneiras. Se aquecermos um sólido cristalino puro e de uma única fase, em certo ponto ele fundirá em uma temperatura bem definida. Quando isto ocorre, existe uma mudança abrupta do estado sólido para o líquido. Diferentemente, se tentarmos repetir o mesmo experimento para uma peça de vidro, não notaremos uma temperatura específica de transição de estados, mas sim uma conversão mais suave do sólido para o líquido, provavelmente um líquido bastante viscoso [8].

A figura 7 mostra as mudanças de volume para temperaturas características durante o processo de formação de um vidro. Ao longo do resfriamento o material tem seu volume diminuído gradualmente.  $T_m$  é a temperatura em que sólido e líquido possuem a mesma energia livre de Gibbs, isto é, uma quantidade infinitamente pequena de cristais está termodinamicamente em equilíbrio com o líquido. Abaixo desta temperatura o resfriamento contínuo apresenta dois caminhos possíveis. O primeiro, da cristalização, leva a uma brusca diminuição do volume do material e caracteriza o processo de solidificação. O segundo caminho, o qual leva à formação do líquido super-resfriado, geralmente se dá devido a alta taxa de resfriamento, levando as moléculas do material tornarem-se cada vez menos móveis, até que seus grupos não possam mais se rearranjar em velocidade rápida o suficiente para alcançar o volume característico daquela temperatura. A sequência deste resfriamento com temperatura abaixo da curva de transformação, leva a formação do estado vítreo [36].

A transição vítrea do vidro sólido para o vidro líquido viscoso é uma importante propriedade [8]. Como citado na definição de Shelby, ela é um fenômeno crucial para classificarmos um material como vidro. Ainda mais curioso sobre ela é o fato de que, ao contrário de um ponto de fusão, a extensão sobre a qual acontece e sua temperatura de início,  $T_g$ , dependem de como o vidro foi feito, da taxa de resfriamento e se o vidro passou ou não por tratamentos térmicos [36,40].

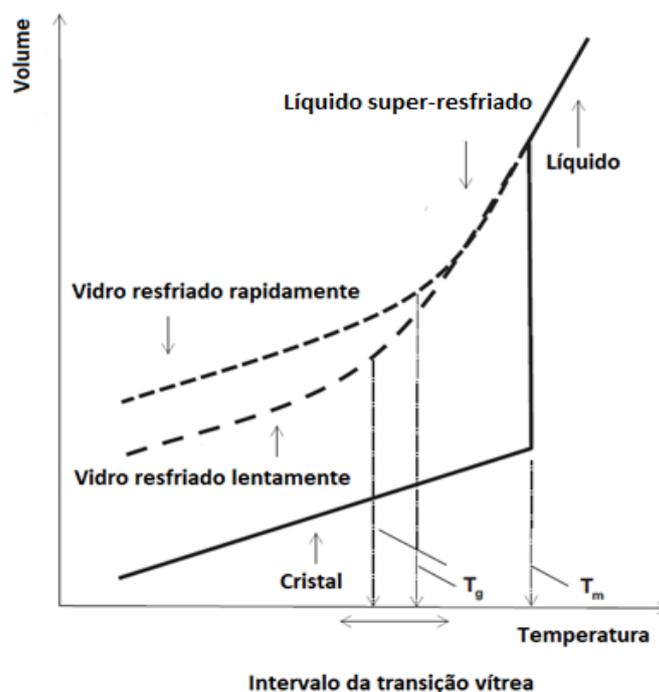


Figura 7: Mudanças de volume que podem ocorrer durante o resfriamento de um líquido. Adaptado da referência [38].

Do ponto de vista da teoria cinética de formação dos vidros, o determinante na origem de um vidro pode ser considerado em termos de uma competição entre as velocidades de cristalização e de resfriamento. A cristalização se refere à combinação de dois processos: nucleação e crescimento de cristais. As duas etapas podem ocorrer simultaneamente, mas são distintas com relação à lei de velocidades que obedecem [38]. Na nucleação, uma quantidade suficiente de átomos forma uma primeira estrutura ordenada, os núcleos. Esta etapa é muito importante, pois se não houver núcleos presentes a cristalização jamais ocorrerá. Depois disso, o crescimento de cristais facilita a formação de novas camadas de átomos ao redor dos núcleos. O crescimento desses núcleos, se impedido, pode deixá-los com tamanho muito reduzido, a ponto de não serem detectados ou, em termos práticos, permitindo a vitrificação do material. Neste contexto, as velocidades de nucleação e crescimento, juntamente da taxa de resfriamento, determinam se um vidro será ou não formado [31,38].

Existem vários métodos de produzir um vidro, dentre eles o que se destaca por ser mais utilizado na confecção de vidros bioativos [41] é também o mais comum, conhecido como fusão e resfriamento. Este método envolve a seleção de matérias-primas, cálculo das proporções relativas, pesagem e mistura dos reagentes para obtenção de um material de partida homogêneo [38]. Em seguida estes precursores são aquecidos a altas temperaturas até atingir o estado líquido. O material fundido é então resfriado rapidamente em contato com água, vertido em um molde ou até extraído em fibras contínuas, de acordo com o formato final desejado [36].

Na produção de vidros via fusão e resfriamento, caso das amostras utilizadas neste trabalho, a escolha dos reagentes é de suma importância. Cada constituinte do vidro pode desempenhar uma função específica no seu processo de fabricação e, no geral, são divididos em cinco categorias, as quais são: o agente formador, agente fundente, agente modificador, agente de cor e de refino. É importante ressaltar que o mesmo reagente pode ser classificado em diferentes categorias quando utilizado para diferentes propósitos. O óxido de alumínio, por exemplo, atua como formador em vidros aluminatos, mas é considerado um modificador na maioria dos vidros silicato [36,38].

Os formadores de vidro são essenciais e responsáveis pela criação da rede tridimensional estendida aleatória, com os maiores representantes desta categoria dados pelo  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$  e  $\text{B}_2\text{O}_3$ . Os vidros podem conter mais de um formador desempenhando esta função, além destes componentes serem a base para nome genérico do vidro. Os fundentes têm a

função de reduzir a temperatura de processamento para valores inferiores a 1600 °C, sendo os mais comuns os óxidos de metais alcalinos como o cálcio, lítio, sódio e potássio. O agente modificador controla efeitos colaterais causados pela adição dos fundantes, como a diminuição de sua durabilidade química. É por meio da introdução de modificadores que as propriedades de um vidro são alteradas e orientadas para uma dada aplicação. Exemplos desta classe incluem os óxidos de metais alcalinos terrosos e de transição, embora óxidos de metais alcalinos também sejam constantemente enquadrados nessa categoria. Os agentes de cor, como o próprio nome sugere, são utilizados para conferir cor aos vidros, e são usualmente produzidos pela adição de compostos de metais de transição com subnível incompleto. Por último, os agentes de refino são adicionados para promover a remoção de bolhas geradas no fundido. Incluem-se aí os óxidos de antimônio e arsênio,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaF}_2$ ,  $\text{NaF}$ ,  $\text{Na}_3\text{AlF}_6$  e alguns sulfatos [36,38].

### 2.3.2 Vidros Borato

Embora possuam um arranjo atômico marcado pela falta de simetria e periodicidade a longo alcance, os átomos que constituem um vidro podem manter uma ordem de curta escala dependente de sua composição. Variações na razão entre óxidos formadores e modificadores influenciam na estrutura e polimerização da rede vítrea, afetando diretamente as propriedades do material. Entender um pouco mais sobre essas estruturas pode nos fornecer uma boa ferramenta para interpretar dados experimentais dos vidros, bem como permitir o aprimoramento de características específicas como solubilidade, liberação iônica e bioatividade [31,36].

Por serem a base dos materiais analisados neste trabalho, daremos destaque para os vidros borato. Vidros formados apenas por  $\text{B}_2\text{O}_3$  são compostos por grupos trigonais planares  $\text{B}\text{O}_3$ , no qual “O” representa átomos de oxigênio de ligação, majoritariamente estruturados como anéis boroxol de seis átomos como mostra a figura 8. Unidades  $\text{B}\text{O}_3$  que se situam fora dos anéis e conectam uns aos outros são chamados  $\text{B}\text{O}_3$  isolados [31].

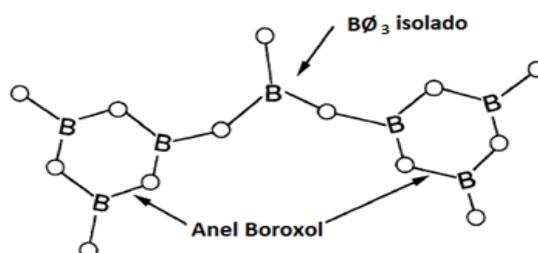


Figura 8: Estruturas formadas em vidros puramente boratos. Adaptado da referência [36].

As ligações covalentes B-O-B entre essas estruturas são chamadas de pontes de oxigênio (BO), e o número médio dessas BO's por átomo formador de rede define sua conectividade [31]. Ao contrário do que acontece com vidros silicato e fosfato, a adição inicial de óxidos modificadores ao vidro borato não produz a quebra de pontes de oxigênio, em vez disso, grupos trigonais  $B\text{O}_3$  sofrem uma mudança de coordenação e passam a gerar grupos tetraédricos  $B\text{O}_4^-$  negativamente carregados, com um cátion modificador para equilibrar a carga.

Os novos grupos formados podem se rearranjar em anéis com um ou dois tetraedros  $B\text{O}_4^-$  e até mesmo em estruturas maiores como diboratos, exemplificadas na figura 9. Por possuir agora uma estrutura tridimensional, o vidro torna-se mais polimerizado, ou seja, adquirir maior conectividade entre suas componentes [31,36]. Todavia, se a adição de modificadores à composição continuar, ocorrerá a conversão de grupos tetraédricos em trigonais, mas agora com a formação de pontes de oxigênio não ligantes (NBO's). Primeiramente se formarão anéis e cadeias metaborato e, em seguida, surgirão espécies piroboratos [31]. Esse processo que começa a acontecer quando a concentração de modificadores atinge cerca de 33% da composição molar do vidro, leva a um aumento de sua despolimerização [36].

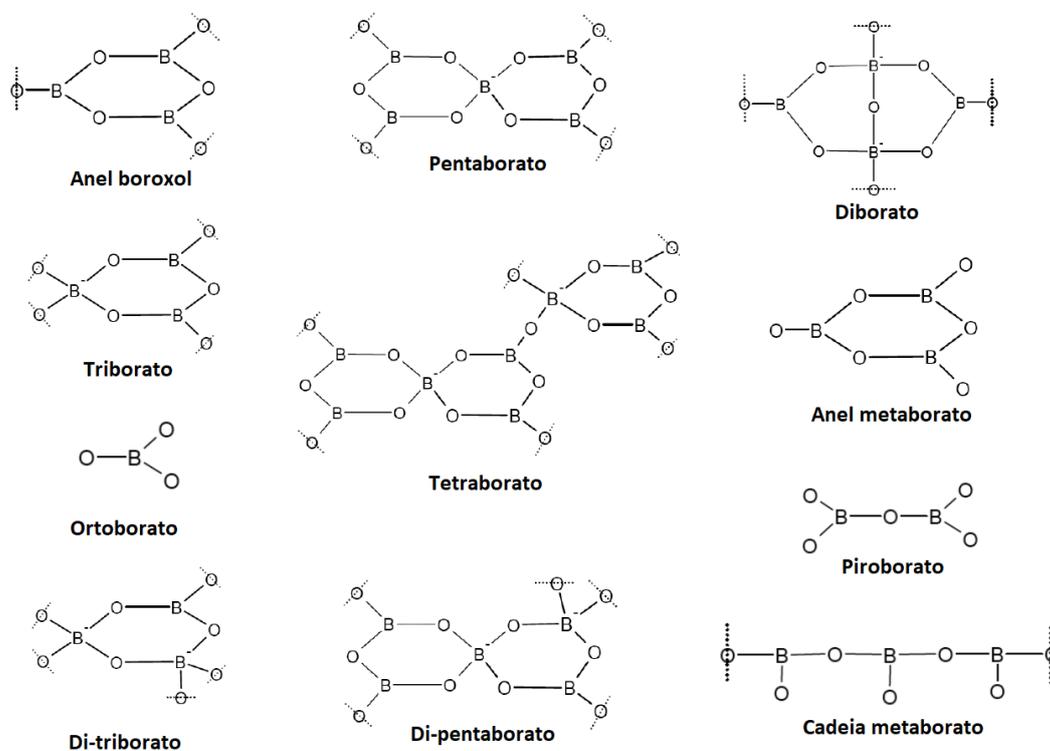


Figura 9: Superestruturas encontradas em vidros borato. Os círculos cortados representam pontes de oxigênio. Adaptado das referências [42,43].

Assim como nas composições a base de silício e fósforo, é possível fazer uma análise das quantidades relativas de grupos estruturais presentes nos vidros borato. Estudos com as técnicas de ressonância magnética nuclear (NMR) e FTIR, mostraram que vidros do sistema  $M_2O-2B_2O_3$  (com  $M_2O$  representando óxidos alcalinos) tem a formação de isômeros trigonais favorecida conforme se aumenta o raio do cátion modificador, desde  $Li^+$  a  $Cs^+$ . Por meio do cálculo de sua conectividade ou  $N_C$  (*network connectivity*), o grau de polimerização da rede borato pode ser estimado de forma similar a feita para os vidros silicato e fosfato. Para composições em % mol do sistema binário  $xM_2O-(100-x)B_2O_3$  que contenham  $x < 33\%$ , a conectividade da rede é dada em função da fração de boros quadri-coordenados ( $N_4$ ) por meio de expressão 1, enquanto para valores de  $x > 33\%$  ela pode ser calculada pela equação 2 [8,36,44]:

$$N_4 = \frac{x}{(100-x)} \quad (1)$$

$$N_4 = \frac{300-4x}{(500-5x)} \quad (2)$$

As mudanças não lineares na conectividade da rede borato, conforme se acrescenta óxidos modificadores em sua estrutura, têm reflexo direto em suas características físicas e por isso este fenômeno é comumente chamado de anomalia do boro [36]. Em contraste com vidros silicato e fosfato, boratos podem apresentar valores máximos ou mínimos de suas propriedades conforme se varia a razão  $M_2O/B_2O_3$ . Como exemplos podemos citar a robustez da rede vítrea e a  $T_g$ , os quais crescem com o aumento do número de grupos tetraédricos e caminham em sentido oposto a solubilidade, exemplo visto na figura 10-A e 10-B. É importante citar que os valores mínimos e máximos de cada propriedade também dependem da capacidade do cátion modificador em criar fortes ligações cruzadas. A figura 10-A também apresenta variações que podem ocorrer nesses parâmetros de acordo com o óxido modificador utilizado.

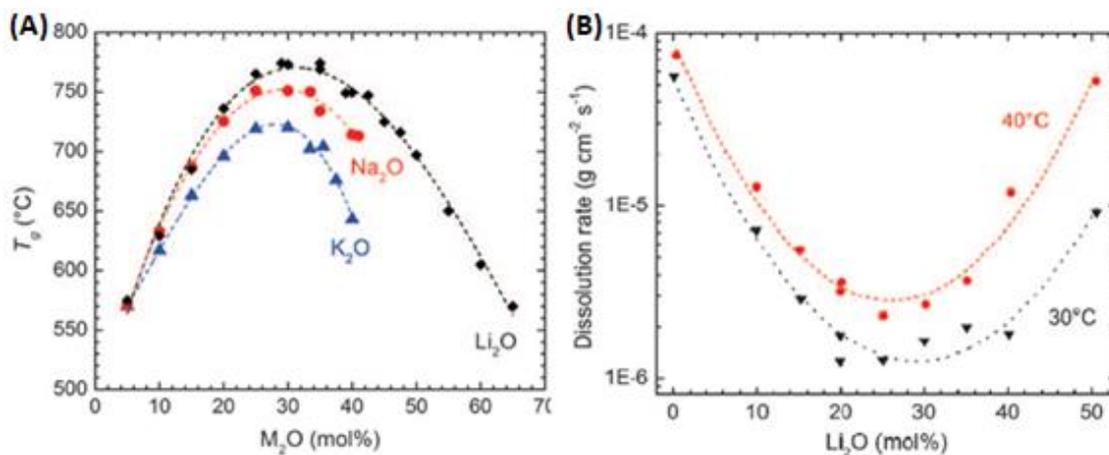


Figura 10: (A) Variações da temperatura de transição vítrea em função da concentração de óxidos modificadores em vidros binários  $B_2O_3.M_2O$  com  $M = Li, K$  e  $Na$ . (B) Mudanças da taxa de dissolução de vidros borato  $B_2O_3.Li_2O$  em função da quantidade de  $Li$  para duas temperaturas diferentes. Adaptado da referência [31].

## 2.4 Vidros Bioativos

### 2.4.1 Breve história sobre os vidros bioativos

*“Em uma conferência de pesquisas em materiais do exército americano, realizada no verão de 1967, em Sagamore (Flórida), eu compartilhei uma viagem de ônibus com um Coronel do exército que tinha retornado recentemente aos Estados Unidos depois de uma viagem de serviço no Vietnã, como oficial de alimentação com o Corpo Médico do Exército. Coronel Klinker ouviu pacientemente a minha descrição entusiástica de nossos experimentos de raios gama nos semicondutores de fosfato de vanádio. Quando fiz uma pausa, ele fez uma pergunta que mudou a minha vida: "Se você pode fazer um material que irá sobreviver à exposição a alta energia de radiação, você pode fazer um material que sobreviva à exposição ao corpo humano?"” [41]. (HENCH, 1969)*

Estas foram as palavras de Larry. L. Hench descrevendo o momento que lhe serviu de inspiração e incentivo para desenvolver o primeiro biovidro [41].

Movido pela indagação do Coronel Klinker, Hench deu início em seus estudos no ano de 1969. Até então se acreditava que quando materiais feitos pelo homem fossem implantados no corpo humano, resultariam na formação de uma interface não aderente com o tecido e, conseqüentemente, facilitariam a reação de rejeição do organismo. Assim, a ênfase inicial de Hench foi buscar materiais que fossem o mais inerte possível quando expostos em meios fisiológicos [41].

Depois de observar que o corpo humano rejeitava metal e polímeros sintéticos formando tecido cicatricial, Hench notou que isto acontecia porque os tecidos vivos não são compostos de tais materiais. Ele então propôs utilizar componentes contidos no próprio osso, como fosfatos de cálcio que, em tese, não deveriam ser rejeitados pelo corpo [41]. Nasceu aí a composição especial do vidro que alterou irreversivelmente a história ditada pela primeira geração de biomateriais.

O vidro feito por Hench e implantado em fêmur de ratos pelo Doutor Ted Greenlee e seus colegas da Universidade da Flórida, tinha sua composição formada por 45% de  $\text{SiO}_2$ , com modificadores de rede dados por  $\text{Na}_2\text{O}$  e  $\text{CaO}$  na mesma proporção, 24,5%, e adição de 6% de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , para simular a razão Ca/P mais próxima da hidroxiapatita. A porcentagem dos reagentes utilizados era dada em quantidade de massa [41,45].

O vidro recebeu o nome 45S5 para representar sua quantidade significativa de sílica (45S) e a razão molar Ca/P, esta igual a 5. Esse vidro não formou tecido cicatricial na interface de ligação com o osso de forma que o isolasse do fêmur do hospedeiro. Segundo palavras do próprio Doutor Greenlee, o implante não sairia do lugar mesmo que se fizesse qualquer tipo pressão sobre ele. Anos depois, uma avaliação quantitativa da resistência ao cisalhamento interfacial, em modelos de ratos e de macacos, viria mostrar que a resistência da ligação interfacial entre o agora comercialmente nomeado Bioglass<sup>®</sup> e osso cortical, era igual ou maior do que a resistência do osso hospedeiro [41]. Na tabela 2 são apresentadas algumas propriedades do 45S5.

Tabela 2: Propriedades físicas do 45S5 (Bioglass<sup>®</sup>) [8].

<b>Propriedade</b>	<b>Valor</b>
<b>Densidade</b>	2,7g/cm <sup>3</sup>
<b>Temperatura de transição vítrea</b>	538 °C
<b>Temperatura de início de cristalização</b>	677 °C
<b>Temperatura de fusão</b>	1224 - 1264 °C
<b>Coefficiente de expansão térmica</b>	15,1 x 10 <sup>-6</sup> °C <sup>-1</sup>
<b>Índice de refração</b>	1,59
<b>Tensão de ruptura</b>	42 MPa
<b>Módulo de Young</b>	35 MPa
<b>Módulo de cisalhamento</b>	30,7 GPa
<b>Tenacidade à fratura</b>	0,6 MPa m <sup>1/2</sup>
<b>Dureza Vickers</b>	5,75 GPa

A criação do Bioglass<sup>®</sup>, em 1969, foi publicada em um artigo de 1971 [45], no qual é descrita a composição do vidro e a evidência da sua capacidade de ligação com o tecido

ósseo por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET). O conceito do biovidro levou ao desenvolvimento de uma nova classe de biomateriais, que hoje são conhecidos como materiais bioativos, usados em implantes ou próteses para reparar ou substituir ossos, articulações e dentes.

Visando quantificar a bioatividade dos biovidros e vitrocerâmicas baseadas no sistema ternário  $\text{CaO-SiO}_2\text{-Na}_2\text{O}$ , Hench desenvolveu o diagrama expresso na figura 11 [41]. Nele observamos regiões demarcadas para distinguir as diferentes quantidades de cada reagente do sistema ternário, o qual também continha 6% em porcentagem de massa de  $\text{P}_2\text{O}_5$  para todas as composições. Hench então definiu um  $I_b$ , índice de bioatividade, para cada ponto do diagrama. Este índice mede o nível de bioatividade do material e é definido como o inverso do tempo necessário para que mais de 50% da superfície da amostra desenvolva ligação com o tecido hospedeiro [6].

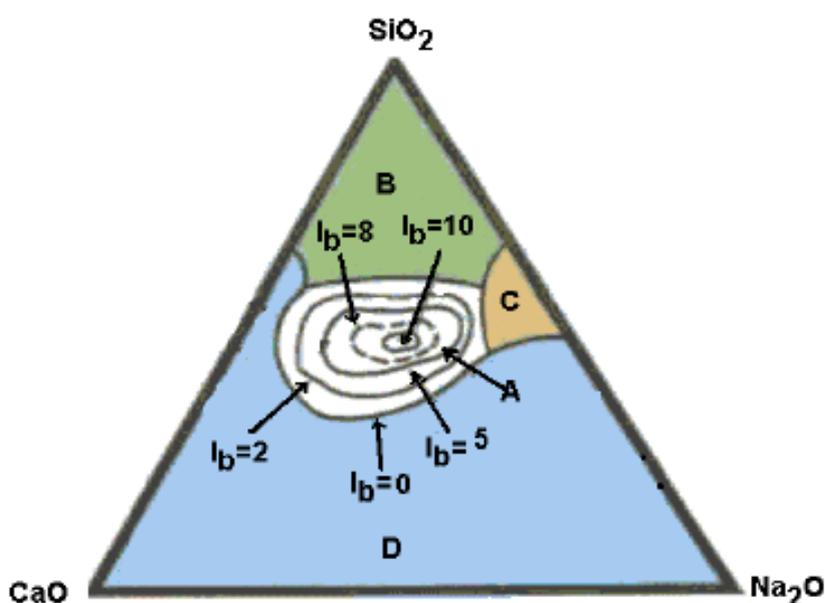


Figura 11: Índice bioatividade para regiões do sistema  $\text{CaO-SiO}_2\text{-Na}_2\text{O}$ , todas contendo 6% de massa de  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Região A (branca) pertence a vidros com maiores bioatividades; região B (verde) é referente a vidros não bioativos; região C (amarela) é referente a vidros reabsorvíveis; região D não forma vidro. Adaptada da referência [46].

Vidros e vitrocerâmicas com composição dentro da região A (parte branca) desenvolvem uma camada de hidroxicarbonato de apatita que facilita sua ligação com tecidos vivos, tanto em testes *in vitro* como *in vivo*. Composições no círculo mais interno da parte A possuem os maiores índices de bioatividade e são representadas pelo 45S5. As que estão dentro da linha tracejada também permitem ligação com tecido mole (colágeno). Materiais

contidos na região B são inertes, e aqueles na região C são altamente reabsorvíveis. A região D não permite a formação de vidro [6,46].

## 2.4.2 Conceitos básicos sobre biovidros

De forma geral, os vidros bioativos são compostos pelos mesmos óxidos convencionais utilizados na fabricação de vidros de janelas, porém em proporções diferentes. Quando comparados a vidros comuns, sua maior distinção é a baixa durabilidade química proveniente da menor conectividade de sua rede vítrea. Essa característica concede aos biovidros uma alta taxa de degradação quando em contato com meios aquosos [31]. Uma rede altamente conectada que contenha grandes proporções de pontes de oxigênio, possui menor solubilidade *in vivo* e, conseqüentemente, não desencadeia as reações que garantem bioatividade ao material [8,31].

Por meio do cálculo do  $N_C$  do Bioglass<sup>®</sup>, o valor obtido é igual a 2,12. Isso representa uma rede formada majoritariamente por grupos  $Q^2$  e alguns poucos  $Q^3$  (pela notação  $Q^n$ , “n” representa o número de BO’s por tetraedro  $SiO_4$ ). Vidros bioativos tendem a ter um  $N_C$  entre 2 e 2,6. Para valores superiores o material não apresenta boa bioatividade devido a sua resistência à dissolução [31,47].

Quando implantados, os biovidros degradam produzindo estímulos à diferenciação de células progenitoras em osteoblastos. Este fenômeno expressa o caráter osteoindutivo destes biomateriais. Sua propriedade osteointegradora garante uma forte ligação com o osso hospedeiro e induz o crescimento de um novo tecido ósseo sobre sua superfície, ou seja, a osteocondução [8].

Análises das diferenças na taxa de regeneração óssea *in vivo* [48] indicaram que existem duas classes de biomateriais. A “classe A” permite a osteocondução e osteoestimulação como consequência de respostas intra e extracelulares rápidas na interface do vidro com o meio fisiológico. E a “classe B”, que estimula apenas a osteocondução. As consequências clínicas dessas diferenças são vistas diretamente na taxa de crescimento ósseo [6].

A conexão entre o biovidro e o tecido ósseo se dá pela formação de uma camada de hidroxicarbonato de apatita na superfície do vidro, a qual acontece logo nas primeiras horas após a implantação. Essa camada de HCA tem uma composição similar a fase mineral do osso natural e desenvolve uma resistente ligação com o tecido hospedeiro graças à interação, via processos celulares, entre sua topografia de escala nanométrica e fibras de

colágeno [8]. Quanto mais rápido for o processo de formação da HCA, melhor é a ligação entre o vidro e o tecido hospedeiro e maior será seu  $I_b$  [31].

Para garantir uma boa aplicação clínica, a dissolução dos biovidros devem ter uma taxa compatível com os processos celulares que sustentam a regeneração e o crescimento de um novo tecido, contrária a característica inerte dos vidros tradicionais. Sua fragilidade mecânica é seu ponto fraco, que o impede de ser utilizado em aplicações que requerem sustentação de cargas [31].

### 2.4.3 Vidros bioativos borato

Vidros bioativos baseados em silicatos como o 45S5 têm sido amplamente estudados desde o início dos anos 70, por isso possuem muitas de suas propriedades já bem definidas [41,49]. Em contraste, a aplicação de vidros a base de boro para tentar desempenhar as mesmas funções começou a ser investigada com maior ênfase a partir da década de 90, ou seja, é bem mais recente [31]. Devido ao foco central deste trabalho tratar do desenvolvimento de vidros bioativos borato, explanaremos com maior atenção sobre composições vítreas similares e diferentes aplicações que podem servir como comparação e estímulo para futuras abordagens.

A primeira tentativa de utilizar um vidro com boro para aplicações biomédicas foi feita por Brink em 1997 [24,50]. Com o intuito de melhorar a manufatura dos biovidros sem diminuir sua bioatividade, Brink fez a introdução de boro em vidros silicato. De forma similar, Huang e colaboradores [51] utilizaram a mesma base e, em passos, substituíram porções de  $\text{SiO}_2$  por  $\text{B}_2\text{O}_3$ , obtendo um acréscimo na conversão do vidro em HCA quando em contato com soluções de fosfato.

Por possuírem propriedades térmicas diferentes dos vidros silicato, vidros borato permitem sua aplicação como vidros bioativos de formas menos convencionais. Uma maneira de explorar ainda mais o potencial clínico desses materiais é por meio de sua confecção em formas e estruturas diferentes. Além de seu uso tradicional como pedaços maciços ou em pó, é possível fabricar fibras, esferas, *scaffolds* e até usá-los como recobrimento na superfície de outros materiais [6].

Com a quantidade certa de cálcio em sua composição, fibras de vidros bioativos borato têm a capacidade única de formar cavidades ocas em curtos períodos de tempo. Por serem feitas de um material biocompatível, essas fibras permitem o crescimento de tecidos

moles em seu interior com direção preferencial e, assim como podem ser usadas para estimular os processos de cura, também auxiliam o transporte de vasos sanguíneos para regiões específicas [8].

De forma similar, microesferas de biovidros borato podem reagir com soluções que contenham fosfato para formar interiores ocos e cobertos por uma camada de HCA. Essa camada é porosa e pode ser carregada com uma droga específica. Uma vez implantada, a microesfera sofrerá a permeação da droga para o tecido da região em que se encontra. Esta aplicação explora o conceito de *drug delivery*, o qual potencializa a utilização de altas doses de medicamento sem prejudicar o corpo inteiro e evitando os riscos do paciente desenvolver dependência [8]. A imagem de uma microesfera oca pode ser vista na figura 12.

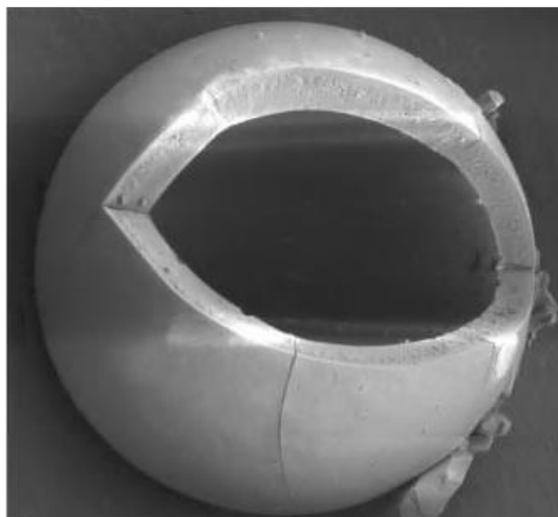


Figura 12: Imagem de MEV de uma microesfera oca de HCA, feita a partir da reação de vidros borato em solução de fosfato. A microesfera com cerca de 150  $\mu\text{m}$  de diâmetro foi quebrada intencionalmente para mostrar seu interior oco. Adaptado da referência [8].

Por meio de técnicas como *Eletrospinning* é possível se fabricar nanofibras de biovidros. Aliadas às propriedades angiogênicas dos vidros borato, essas nanofibras vêm sendo investigadas para aplicação na cicatrização de feridas, como pode ser visto no exemplo da figura 13. A estrutura da fibra age separando o conteúdo sólido do sangue de sua fração líquida. Esta separação é altamente eficaz na formação de coágulos sanguíneos necessários no processo de cicatrização de feridas e, ainda, devido ao aumento do pH da região com a qual a fibra interage, também concede propriedades antimicrobianas [8].

Estudos em biovidros da família dos boratos também permitiram o descobrimento de um outro fenômeno. Jung e Day [52] perceberam que a adição de elementos como zinco, estrôncio e ferro tendem a inibir a nucleação da HCA favorecendo a formação de carbonato

de cálcio quando em testes *in vivo*. O carbonato de cálcio é um precursor da HCA e pode ser dissolvido por osteoclastos numa taxa mais rápida. Isto significa que o corpo pode remodelar o biomaterial de forma mais rápida sem deixar evidências de que o implante esteve ali [8].

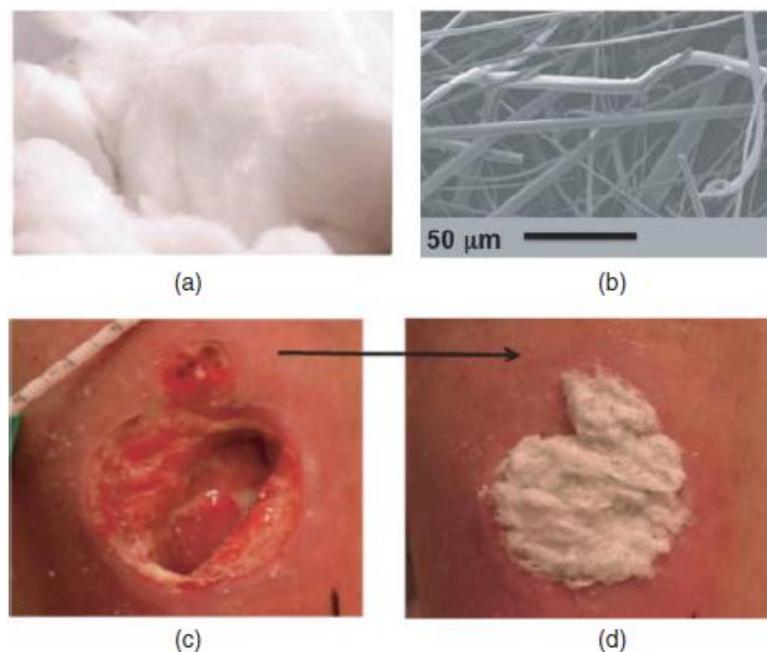


Figura 13: (a) Um tufo de nanofibras de biovidro borato; (b) Imagem de MEV das fibras; (c) Uma ferida de um paciente com diabetes aberta, antes do tratamento; (d) A mesma ferida fechada com as nanofibras de vidro borato. Adaptada da referência [8].

Os trabalhos mais recentes com biovidros borato se concentram em confeccioná-los como *scaffolds* utilizados na engenharia de tecidos. Os primeiros deste tipo, derivados de vidros borato, foram feitos em 2005, usando tratamento de sinterização e pressão suave. Um outro exemplo é o vidro 13-93B2, um dos mais promissores materiais utilizados na fabricação de *scaffolds* tipo espuma. Produzido pela técnica de *Polymer foam replication*, esses *scaffolds* de vidro borato possuem microestrutura e comportamento mecânico quase idêntico ao do osso trabecular humano, o que o torna um dos mais promissores candidatos para aplicações clínicas como enxertos ósseos [24].

#### 2.4.4 Diferentes composições e produtos a base de biovidros comercializados

Apesar da enorme gama de composições testadas *in vitro* e *in vivo*, apenas algumas poucas são comercialmente disponibilizadas para aplicações médicas [53]. A principal consiste em utilizar os vidros bioativos como enxerto ósseo na ortopedia e periodontia. Em

ambos os casos o vidro é usado para regenerar e curar defeitos ósseos que podem surgir devido ao resultado de traumas<sup>14</sup>, doenças como osteoporose, defeitos congênitos ou causados pela remoção de tumores e cistos. Problemas periodontais geralmente acontecem no osso maxilar próximo a raiz do dente [8,47]. Contudo, se comparado ao osso cortical, o Bioglass® e outros vidros bioativos possuem aspectos mecânicos inferiores, como menor resistência a tração e maiores módulos de Young e cisalhamento, o que não os tornam indicados para implantes em defeitos ósseos que precisam suportar carga, mas sim para reparar regiões cercadas por osso hospedeiro [8].

Hoje em dia a maioria dos produtos a base de vidros bioativos comercializados são manufaturados como partículas de diferentes tamanhos ou como pequenos monólitos. Os pós de biovidros são normalmente obtidos pela versão do vidro fundido em água, dando origem a pequenos grânulos que são então secos e peneirados nos tamanhos desejados [31].

Talvez o produto baseado em vidros bioativos de maior sucesso comercial tenha sido o PerioGlas® (NovaBone Products LLC, Alachua, FL). Utilizadas no reparo do tecido periodontal, essas finas partículas de biovidros como o Bioglass® e o BoneAlive® (S53P4) são normalmente misturadas com sangue da região do defeito e transformadas em um tipo de massa que pode ser pressionada para recobri-lo. O sangue também age introduzindo células e fatores de crescimento que ajudam na regeneração da parte danificada [6,8].

Inúmeros vidros bioativos têm utilizado variações composicionais para adquirir propriedades físicas ou estimular reações específicas após a interação *in vivo*. Como exemplos temos [24]:

- Titânio e Prata: A adição de óxidos destes elementos permitem a liberação de íons que concedem propriedades antibacterianas ao vidro.
- Alumínio: Apesar de diminuir a bioatividade, a incorporação de alumina fortalece propriedades mecânicas do biovidro, útil em implantes ósseos e dentários.
- Zinco e Magnésio: São capazes de exercer efeito estimulador na proliferação, diferenciação e capacidade de mineralização óssea dos osteoblastos.
- Ferro: Além de aumentar o contraste em imagens de raios-X, as propriedades magnéticas do ferro tem sido utilizadas na fabricação de vidros para tratamento de câncer.

---

<sup>14</sup> É uma lesão ou ferida mais ou menos extensa, produzida por ação violenta, de natureza física ou química, externa ao organismo.

• Cromo e Ítrio: Estudos em vidros borossilicato de cálcio com adição de cromo garantem aumento da resistência a carga do material, enquanto o ítrio melhora a resistência a desvitrificação.

• Estrôncio: Tem mostrado ser benéfico à saúde do crescimento ósseo. Partículas de vidros bioativos contendo o elemento são comercializadas com o nome StronBone® (RepRegen Ltda, UK) [8]. Na tabela 3 são listadas algumas composições de diferentes vidros bioativos.

Tabela 3: Composições de diferentes vidros bioativos (mol%). Adaptado das referências [8,24,31,39].

Vidros	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Na <sub>2</sub> O	CaO	CaF <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> O	MgO	SrO	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	CuO	ZnO	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
45S5 (mol%)	46,1	2,6	24,4	26,9	-	-	-	-	-	-	-	-
45S5 (wt%)	45,0	6,0	24,5	24,5	-	-	-	-	-	-	-	-
45S5F (mol%)	46,1	2,6	24,4	13,45	13,45	-	-	-	-	-	-	-
S53P4 (mol%)	53,9	1,7	22,7	21,8	-	-	-	-	-	-	-	-
S53P4 (wt%)	53	4	23	20								
S53P5 (wt%)	53,0	4,0	23,0	20,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Sr10 (wt%)	44,1	5,9	24,0	21,6	-	-	-	4,4	-	-	-	-
13-93 (mol%)	54,6	1,7	6	22,1	-	7,9	7,7	-	-	-	-	-
13-93 (wt%)	53,0	4,0	6,0	20,0	-	12,0	5,0	-	-	-	-	-
13-93B3 (wt%)	-	4,0	6,0	20,0	-	12,0	5,0	-	53,0	-	-	-
6P61 (mol%)	61,0	2,5	10,0	13,5	-	2,4	10,7	-	-	-	-	-
6P55 (mol%)	54,1	2,5	11,5	15,9	-	3,4	12,6	-	-	-	-	-
6P50 (mol%)	49,4	2,5	14,9	16,6	-	3,5	13,2	-	-	-	-	-
ICIE1 (mol%)	49,46	1,07	26,38	23,08	-	-	-	-	-	-	-	-
ICIE16 (mol%)	49,46	1,07	6,6	36,27	-	6,6	-	-	-	-	-	-
ICIE1-10Sr (wt%)	48,2	2,5	26,5	18,9	-	-	-	3,9	-	-	-	-
1B (wt%)	29,3	-	24,0	23,9	-	-	-	-	17,0	-	-	-
2B (wt%)	14,4	-	23,4	23,4	-	-	-	-	33,1	-	-	-
3B (wt%)	-	-	22,9	22,9	-	-	-	-	48,6	-	-	-
Cu-3 (wt%)	-	3,98	5,98	19,92	-	11,95	4,98	-	52,79	0,4	-	-
CS (wt%)	-	3,9	5,86	19,52	-	11,71	4,88	2,0	51,73	0,4	-	-
CSZ (wt%)	-	3,86	5,8	19,32	-	11,59	4,83	2,0	51,2	0,4	1,0	-
CSZF (wt%)	-	3,84	5,76	19,20	-	11,52	4,8	2,0	50,88	0,4	1,0	0,4
58S (mol%)	60	4		36								

Além dos exemplos citados acima, recentemente o Bioglass® pode ser encontrado como ingrediente ativo em pastas de dente utilizadas para redução de sensibilidade. Sensodyne Repair & Protect (GlaxoSmithKline, UK) está disponível em mais de 20 países e é

dita “potencializada pela NovaMin”. NovaMin® (GlaxoSmithKline, UK) são partículas finas do Bioglass® que ajudam a reduzir a dor sentida nos dentes quando pessoas comem ou bebem coisas quentes ou frias. Essa dor é produto da exposição da dentina e às vezes causada pelo recuo da gengiva. A dentina contém túbulos que levam terminações nervosas. Quando coisas quente ou frias fluem por esses túbulos a dor é estimulada. Pastas de dente tradicionalmente usadas para o tratamento da sensibilidade utilizam sais de potássio que temporariamente anestesiavam as terminações nervosas, enquanto testes clínicos da escovação com NovaMin® indicam que as partículas de vidro liberam íons que aumentam o pH do meio, causando a precipitação de minerais como a HA sobre os túbulos da dentina, bloqueando-os. A similaridade da composição da HA com o esmalte dentário é benéfico ao dente e facilita sua recuperação [8].

## 2.4.5 Mecanismo de formação da HCA

### 2.4.5.1 Mecanismo de formação da HCA em vidros silicato proposto por Hench e Anderson

Como já foi superficialmente abordado, os vidros bioativos são capazes de desenvolver uma forte ligação mecânica com o tecido hospedeiro quando aplicados *in vivo*. Em vez de provocar um encapsulamento fibroso, o biovidro desenvolve em sua superfície uma camada de HCA que tem composição e tamanho de cristalito similar ao encontrado nas apatitas dos ossos e dentina, garantindo uma fixação química com a região do implante [8]. Durante o processo de formação da HCA o biovidro apresenta o caráter osteoestimulante, liberando íons que ativam diferentes famílias de genes. Isto pode desencadear a regulação da osteogênese<sup>15</sup> e a produção de fatores de crescimento, além de proporcionar a regeneração de tecidos moles, a cura de feridas e a angiogênese<sup>16</sup> [31]. A camada de HCA nucleada sobre os vidros bioativos também providencia uma interface de ligação com os tecidos moles, entretanto, o mecanismo de interação entre os biovidros e as células que compõem os diferentes tecidos ainda é pouco compreendido.

Além de determinar o grau de bioatividade de um material, o tempo requerido para a nucleação da HCA depende de fatores como a composição do vidro, sua estrutura e geometria [41]. Para tentar entender melhor todo o processo e explicar o mecanismo de formação da HCA em vidros silicato, Hench e Anderson [6] propuseram dividi-lo em onze

---

<sup>15</sup> É o processo de formação do osso novo proveniente de células específicas.

<sup>16</sup> É o termo usado para descrever o mecanismo de crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes.

estágios que vão desde a exposição do vidro ao tecido, até a mineralização da matriz óssea. Destas, as primeiras cinco etapas são relacionadas ao crescimento da camada de HCA e podem acontecer em testes *in vitro* com a utilização de água destilada, solução tampão, SBF entre outros [6].

A degradação *in vitro* de vidros silicato como o 45S5 acontece de maneira incongruente, ou seja, apresenta a lixiviação seletiva de alguns elementos. Ela também depende do pH da solução e da razão entre a área superficial do vidro e o volume do fluido [31]. A figura 14 traz a representação dos primeiros cinco estágios da interação de um vidro bioativo a base de silício com o SBF.

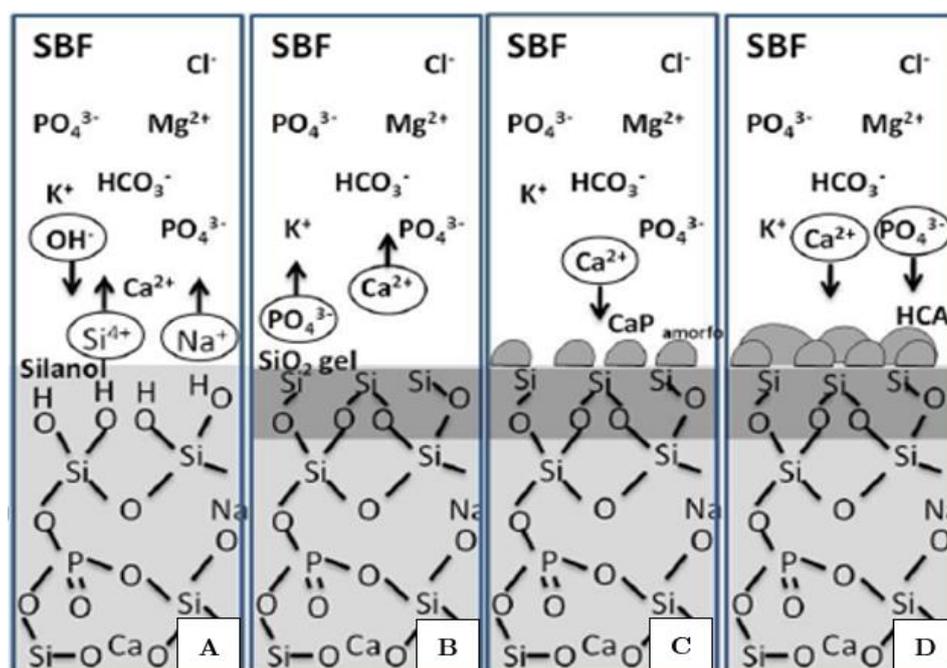
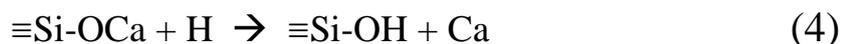
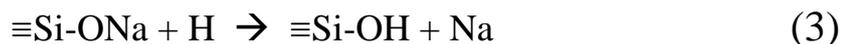
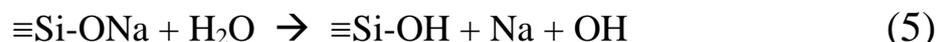


Figura 14: Representação da formação da camada de HCA em vidros bioativos silicato. (A) Lixiviação iônica e quebra da rede silicato; (B) Repolimerização da rede de silício e liberação de íons de fosfato e de cálcio; (C) Deposição dos íons de fosfato de cálcio na superfície do vidro e formação da camada de fosfato de cálcio amorfo; (D) Cristalização da HCA. Adaptada da referência [54].

Para um pH menor que 9, a primeira etapa de reação é dominada por trocas iônicas de íons alcalinos e alcalinos terrosos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ) com cátions da solução ( $\text{H}^+$  ou  $\text{H}_3\text{O}^+$ ). A carga e o raio do íon modificador de rede afetam sua taxa de lixiviação. Íons alcalinos e ligações mais fracas com íons de raio maior são retirados mais facilmente. Como consequência, forma-se um gradiente de concentração de cátions modificadores na superfície do vidro (figura 14-A) [55]. Esta primeira etapa pode ser representada pelas seguintes expressões:



A rede de sílica também pode reagir com a água por meio da hidratação de suas ligações com íons metálicos, como expressa a equação 5:



As hidroxilas formadas nas etapas anteriores agem como catalisadoras no processo de dissolução da rede. Quando o meio atinge valores de pH iguais a 9, a hidrólise domina a despolimerização da rede vítrea e causa a liberação de sílica solúvel no fluido (figura 14-A). A equação 6 demonstra esta etapa:



Todavia, com o decorrer do processo os grupos silanol ( $\equiv\text{Si-OH}$ ) também podem se condensar em uma camada de gel rica em sílica (figura 14-B). Esta camada porosa e hidratada tem sua formação representada por:



Quando a solubilidade dos íons dissolvidos é excedida, tem início a migração de grupos  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  vindos das regiões internas do vidro (figura 14-B) e precipitadas da solução sobre a camada de sílica gel. Esta camada também providencia sítios para a formação do filme de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e age como uma barreira de resistência à dissolução (figura 14-C), o que pode explicar o fato de algumas composições de vidros bioativos manterem um núcleo vítreo intacto após anos de sua implantação [8].

A etapa final do processo que ocorre *in vitro* compreende a gradual cristalização da ACP e a incorporação de íons à sua estrutura cristalina (figura 14-D), como  $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$ , formando assim a HCA ou fluorapatita (FA). Quando o biovidro é altamente bioativo, como o Bioglass<sup>®</sup>, os primeiros cinco estágios de reação acontecem em até 24 horas [6,8,31].

Os seis estágios finais descritos por Hench e Anderson acontecem apenas na presença de tecidos vivos e são caracterizados, em ordem de formação, por: adsorção de proteínas específicas na superfície do vidro, ação de macrófagos<sup>17</sup>, adesão de células indiferenciadas,

---

<sup>17</sup> São as células de grandes dimensões que fagocitam elementos estranhos ao corpo.

diferenciação celular, formação de matriz extracelular e mineralização da matriz. Para os vidros como 45S5 esta evolução leva entre seis e doze dias até ser completa [6,8,31].

#### **2.4.5.2 Mecanismo de formação da HCA sugerido para vidros borato**

Para entendermos o mecanismo de formação da HCA em vidros borato, é determinante a compreensão do processo de dissolução destes materiais. Tendo em vista os inúmeros estudos sobre a degradação de vidros silicato, sabe-se pouco quando comparado o mesmo comportamento de vidros borato. Vidros a base de boro apresentam uma dissolução rápida em soluções aquosas e taxas que decrescem com aumento do pH do meio, ao contrário dos silicatos que dissolvem de forma mais fácil em ambientes básicos [51].

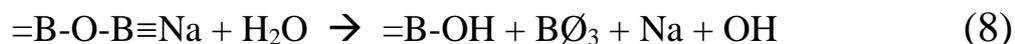
Goetschius e colaboradores [56] estudaram o comportamento da dissolução de vidros borato em água, variando as concentrações de óxidos alcalinos e alcalinos terrosos nas composições. Eles observaram que aqueles com maiores frações de unidades de boro quadri-coordenadas foram os mais duráveis. De fato, como citado no tópico 2.3.2, a solubilidade do vidro borato diminui pela capacidade das unidades de boro tetraédricas criarem mais BO's. Velez e colaboradores [57] estudaram a cinética de dissolução de vidros binários de lítio borato em água e solução tampão com pH igual a 7. Por meio de medidas de perda de massa, observaram que a dissolução desses vidros é linear em relação ao tempo.

Em composições ternárias com óxidos alcalinos e alcalinos terrosos, o efeito na dissolução é discutido em termos da razão carga/raio iônico do cátion modificador. Para composições com quantidades fixas de óxidos alcalinos terrosos, a taxa de degradação aumenta com a incorporação de óxidos alcalinos obedecendo à ordem:  $Li < Na < K$ . O processo inverso, mantendo fixas as proporções de óxidos alcalinos, apresenta taxas de dissolução que crescem de acordo com a presença dos seguinte elementos:  $Mg < Ca < Sr$  [8].

De forma geral os processos que governam a degradação do vidro borato e levam à formação da HCA são muito parecidos com os que acontecem nos silicatos. As diferenças se baseiam em duas características importantes. A primeira é que vidros borato não possuem a capacidade de se repolimerizar e formar camadas de borato gel. A segunda, que é influenciada pela primeira, é que o processo de degradação destes vidros acontece de forma congruente, com a hidratação e a hidrólise da rede vítrea acontecendo ao mesmo tempo [31].

A partir do contato inicial do vidro borato com a solução aquosa, a hidratação das ligações de boros tetraédricos causa a troca de íons alcalinos e alcalinos terrosos por

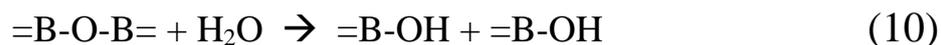
prótons. Quando esta reação ocorre em um boro quadri-coordenado, cria-se uma instabilidade que provoca um rearranjo e conseqüente formação de uma unidade triangular, esquematicamente demonstrados como segue [56]:



Em unidades borato tri-coordenadas a hidratação também produz grupos hidroxil similares, como podemos notar pela expressão 9. Ambas reações de hidratação culminam no aumento de pH do meio [58].



Ao mesmo tempo a hidrólise provoca o ataque da água as BO's da rede vítrea, assim como faz para vidros silicato. Como resultado acaba desencadeando um conseqüente aumento do pH, como representa a seguinte expressão [59]:



O progresso da dissolução do vidro borato se dá pelos contínuos e simultâneos processos de hidratação e hidrólise. Um decréscimo nas taxas de algum destes fenômenos pode causar a diminuição da degradação do vidro, assim como o efeito da dissolução do vidro no pH da solução vai depender de sua composição inicial [58,59]. A partir de então, com a presença de íons de cálcio e fósforo no meio ou sua liberação, em casos de composições que contenham tais elementos, resultará a deposição de fosfato de cálcio na superfície dos vidros. O aumento do tempo de reação permite que a recém-formada camada de fosfato de cálcio amorfo possa cristalizar numa forma mais estável como a HCA [51].

Em geral, vidros borato são mais reativos em ambientes aquosos do que vidros silicato, o que pode ser uma grande vantagem em diversas aplicações biomédicas que requerem liberação controlada de íons [52]. Taxas mais lentas favorecem a reposição óssea em *scaffolds*, enquanto a agilidade do processo auxilia a cicatrização de tecidos moles [8]. Independente da composição do vidro, o desenvolvimento de uma camada de HCA em sua superfície quando submetido a testes *in vitro* é aceito como determinante na potencial bioatividade do material [4,6,8,31].

## 3 Materiais e métodos

Este capítulo aborda a produção das amostras utilizadas no trabalho, bem como especifica os procedimentos de preparo dos vidros para o teste *in vitro*. Ele também contém fotos de várias etapas do desenvolvimento experimental e informações sobre as configurações das técnicas aplicadas. Um conteúdo suplementar e mais detalhado sobre as técnicas aplicadas no estudo dos vidros é exposto no apêndice A.

### 3.1 Preparação das amostras

As quatro amostras apresentadas neste trabalho foram produzidas na Universidade Federal do Maranhão (Campus de Imperatriz) em conjunto e sob a supervisão da Professora Dra. Franciana Pedrochi. As amostras de vidro borato desenvolvidas pertencem ao seguinte sistema:  $60\text{B}_2\text{O}_3 - 5\text{CaF}_2 - (20-x)\text{Na}_2\text{O} - (15-x)\text{CaO} - 2x\text{P}_2\text{O}_5$  ( $x = 0, 1, 2$ ). A amostra do vidro 45S5, utilizada como comparativo, foi produzida para se obter a mesma composição desenvolvida por Hench [41]. As composições de todas as amostras podem ser vistas mais facilmente na tabela 4.

Na confecção dos vidros utilizou-se um forno convencional mantido sob atmosfera ambiente. Os reagentes utilizados foram  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CaF}_2$  e  $\text{SiO}_2$ , todos da marca Sigma Aldrich® e com grau de pureza entre 98 e 99,99%. Previamente os reagentes foram pesados em balança analítica para se obter amostras com massa igual a 7 gramas. O  $\text{CaCO}_3$  passou pelo processo de desgaseificação a 900 °C, com objetivo de promover a liberação de todo o  $\text{CO}_2$  do composto, deixando assim, apenas o óxido de cálcio ( $\text{CaO}$ ). Após a desgaseificação todos os outros componentes foram colocados no cadinho de platina, homogeneizados manualmente e levados ao forno de atmosfera ambiente. A síntese dos vidros foi feita pelo método de fusão e resfriamento, por meio do qual os componentes foram submetidos a altas temperaturas, elevadas acima dos seus respectivos pontos de fusão, chegando a cerca de 1100 °C para os vidros borato e 1300 °C para o silicato, temperatura em que permaneceram por aproximadamente duas horas, a fim de garantir uma maior homogeneidade e eliminar todas as possíveis bolhas existentes. Em seguida, o fundido foi vertido em um molde de aço inoxidável previamente aquecido a temperatura abaixo de suas temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), aproximadamente 450 °C, sofrendo um rápido resfriamento. Posteriormente o material foi colocado em um forno para

tratamento térmico, ajustado em aproximadamente 400 °C, durante 5 horas. Após este procedimento o forno foi desligado, permanecendo a amostra em seu interior até que a temperatura ambiente fosse alcançada. Este processo permite que as tensões internas sejam diminuídas e que o vidro obtenha maior resistência mecânica.

Tabela 4: Nomenclatura e composição (% em massa e % mol) das amostras preparadas.

Reagentes	BV0		BV2		BV4		45S5	
	wt%	mol%	wt%	mol%	wt%	mol%	wt%	mol%
<b>B<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	60	57	60	57,8	60	58,5	---	---
<b>CaF<sub>2</sub></b>	5	4	5	4,1	5	4,2	---	---
<b>Na<sub>2</sub>O</b>	20	21,3	19	20,5	18	19,7	24,5	24,4
<b>CaO</b>	15	17,7	14	16,7	13	15,7	24,5	26,9
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	---	---	2	0,9	4	1,9	6	2,6
<b>SiO<sub>2</sub></b>	---	---	---	---	---	---	45	46,1

Depois de prontos, os vidros foram cortados em discos de aproximadamente 2 mm de espessura e 10 mm de diâmetro (diâmetro do molde), e então seccionados ao meio para aumentar a quantidade de amostras, ambos procedimentos realizados com uma serra diamantada. Cada uma das amostras recebeu polimento em lixas de carbetto de silício nas gramaturas de 400 e 600, respectivamente, de modo a aumentar sua área superficial. Por fim, as amostras seccionadas foram limpas em ultrassom por 30 min utilizando acetona e álcool isopropílico, respectivamente. Pedacos remanescentes dos cortes foram pulverizados em almofariz de ágata para utilização nas medidas de FTIR, DSC e DRX. Os vidros recém-preparados e após serem cortados e polidos podem ser vistos na figura 15.

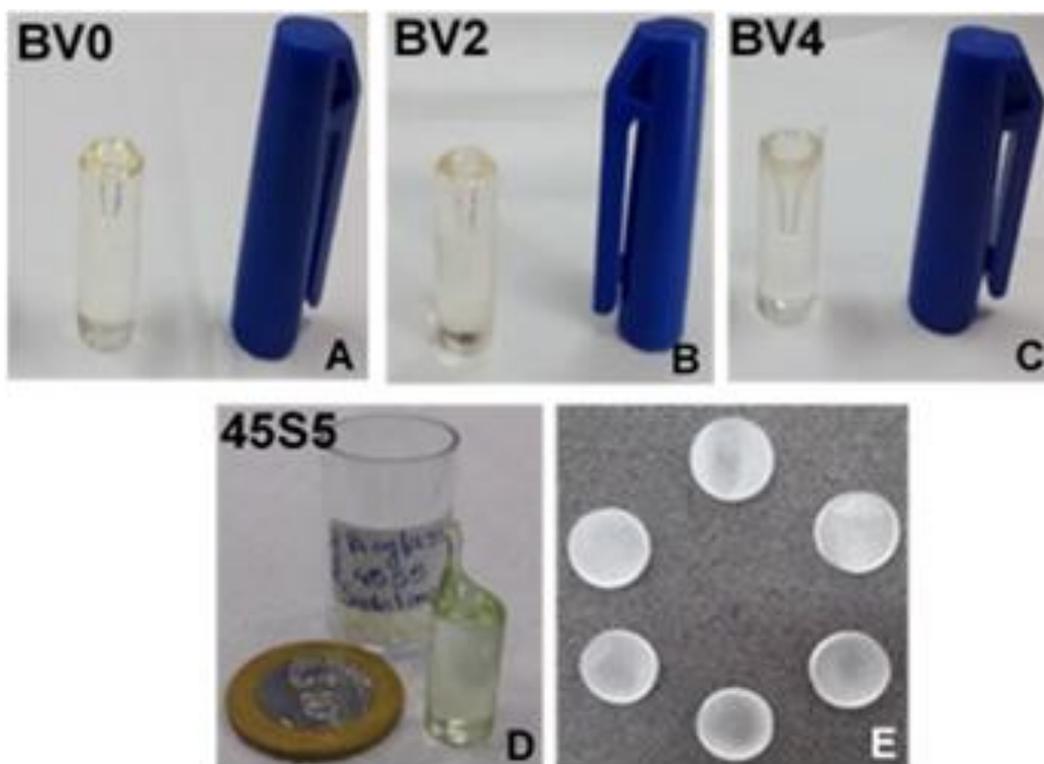


Figura 15: (A-C) vidros borato recém-preparados; (D) vidro silicato - Bioglass® recém preparado; (E) vidros após processo de corte e polimento.

### 3.2 Teste de bioatividade *in vitro*

Os estudos de bioatividade *in vitro* foram feitos por meio da imersão das amostras em solução SBF, a qual foi preparada de acordo com procedimento desenvolvido por Kokubo [35]. O processo de imersão foi realizado em tubos plásticos de fundo cônico, mantendo a razão do volume de SBF pela área superficial da amostra igual a  $0,1 \text{ ml/mm}^2$  [60], e sem que o vidro tivesse contato com as paredes ou o fundo do tubo. O tubo selado foi posto em um banho térmico, mantido a  $36,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Fotos das etapas do procedimento de imersão das amostras podem ser vistas na figura 16.

Ao término de cada período de imersão, que compreendeu os intervalos de tempo de: 1, 3, 6, 24, 48, 96 horas e 7, 14, 21 e 28 dias, as amostras foram retiradas do contato com o fluido e suavemente enxaguadas com água deionizada, de modo a inibir a continuação da atividade entre o vidro e o SBF. Em seguida as amostras foram condicionadas secas em estufa regulada em  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , e armazenadas até o momento em que fossem submetidas à medidas.



Figura 16: Etapas do procedimento de imersão das amostras. (A) Amostra fixada no suporte para mantê-la verticalmente posicionada durante imersão em SBF. (B) Amostra posta em contato com o SBF dentro do tubo plástico. (C) Amostras resguardadas no banho térmico durante o procedimento *in vitro*.

Para comparação dos resultados pós imersão em SBF, foram utilizadas amostras de HA produzidas pelo Prof. Dr. Wilson R. Weinand, do Departamento de Física da UEM, cujo o processo de produção via calcinação de ossos de peixe tem registro de patente inscrito sob o número de processo PI 0506242-0.

### 3.3 Caracterização das amostras

Com exceção do peagâmetro e do equipamento de DTA, os demais equipamentos utilizados neste trabalho, como DSC, FTIR, micro-Raman, DRX e MEV, pertencem ao COMCAP-UEM (Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa).

### 3.3.1 DSC e DTA

Antes da imersão em SBF os vidros borato foram submetidos à aplicação da técnica de DSC em um calorímetro comercial (modelo STA 409 PC/PG, NETZSCH). Nesta análise, 20 mg do pó de cada amostra foram aquecidos a partir da temperatura ambiente, cerca de 22 °C, até 900 °C, segundo uma taxa de 10 K/min e sob fluxo de gás argônio de 60 ml/min. Não foi possível repetir a aplicação da mesma técnica para a amostra do 45S5 devido à imprevistos técnicos. Para tentar obter uma análise termica mais próxima da que foi realizada para os vidros borato, o biovidro 45S5 foi submetido a técnica de DTA no equipamento comercial (modelo DTG-60 SHIMADZU) pertencente a UFMA do Campus de Imperatriz. Para esta análise, 10 mg do pó do vidro foram aquecidos sob a mesma taxa e intervalo de temperatura dos vidros borato, e submetidos a uma atmosfera de nitrogênio com fluxo de 60 ml/min. Somente a análise térmica não foi realizada com amostras após imersão em SBF.

### 3.3.2 FTIR

A absorção de infravermelho foi realizada nos vidros em pó e na camada raspada que cresceu sobre sua superfície após imersão. A técnica de FTIR foi feita por meio de um espectrômetro no modo de transmitância (modelo Vertex 70V, BRUKER). As amostras foram diluídas e pastilhadas em KBr, na proporção de 199 mg de KBr para 1 mg de amostra. Cada espectro é uma média de 128 varreduras, na faixa espectral de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Todas as medidas foram realizadas em vácuo, minimizando as contribuições atmosféricas e de umidade.

### 3.3.3 Micro-Raman

Os espectros Raman foram obtidos por meio de um espectrômetro Raman confocal (modelo Senterra, BRUKER), com excitação em 532 nm, potência nominal de 20 mW e equipado com uma lente de 20x de magnificação. Cada espectro é uma média de 100 varreduras de 3 s de tempo de integração, compreendendo a região espectral entre 350 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  e com resolução espectral de 3-5  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.3.4 DRX

A difração de raios-X foi feita no pó dos vidros e na camada raspada que se formou em sua superfície após imersão. O instrumento utilizado foi um difratômetro (modelo D8 Advance, BRUKER) com configuração Bragg-Bretano ( $\theta:2\theta$ ), fonte de radiação  $\text{K}\alpha$  do

cobre, tensão de 40 kV e 35 mA de corrente. Cada medida foi feita com passo de 0,01947 ° e com 15 s por passo, no intervalo de 20 ° a 70 °.

### **3.3.5 MEV**

Para obter as micrografias das superfícies das amostras antes de imersão, assim como da camada raspada após a imersão dos vidros pelos períodos de 96 horas, 7 e 28 dias, foi utilizado um MEV (Quanta 250, FEI) configurado com magnificação máxima de 20000x e aceleração do feixe de 15 keV.

### **3.3.6 pH**

As medidas de pH durante o processo de produção do SBF, bem como antes e após a retirada de imersão das amostras decorrentes do procedimento *in vitro*, foram realizadas com um peagâmetro (HI 2223, HANNA Instruments) com precisão de  $\pm 0,005$ . As medidas eram realizadas com o fluido em temperatura ambiente (cerca de 24 °C) e a a calibração do eletrodo foi realizada em pH 4, 7 e 10 em todos os dias de medida.

## 4 Resultados e Discussão

Este capítulo conta com os resultados obtidos por meio da submissão das amostras às técnicas apresentadas no capítulo anterior, tanto antes quanto depois de passarem pelo procedimento de imersão em SBF. Para cada técnica, começaremos com uma abordagem descritiva dos dados obtidos, enunciando os pontos importantes a serem considerados. Em seguida será feita uma discussão acerca dos comportamentos observados para as amostras de vidros borato, bem como sobre as reações desencadeadas após o procedimento *in vitro*.

### 4.1 Calorimetria Exploratória Diferencial

Em todas as análises dos vidros temos de levar em consideração dois fatores importantes. O primeiro é que as três amostras possuem quantidades diferentes de óxidos modificadores em sua composição, variando entre 39,6 e 43 % de sua massa molar. Isso por si só já pode justificar inúmeras mudanças nas propriedades dos vidros, ainda mais se levados em consideração os efeitos causados pela anomalia do boro. O segundo é decorrente da adição de  $P_2O_5$  aos reagentes. Por ser um elemento formador de rede, é difícil prever como o fósforo atuará em conjunto com os demais componentes, sendo disruptor ou agregador da rede borato.

Os resultados obtidos pelo DSC dos vidros borato, durante seu aquecimento, podem ser vistos na figura 17. Utilizando o método de determinação de temperaturas específicas descrito no apêndice A, no tópico sobre calorimetria exploratória diferencial, encontramos as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), início de cristalização ( $T_x$ ) e fusão ( $T_L$ ), bem como os valores das temperaturas dos picos de cristalização ( $T_{c1}$  e  $T_{c2}$ ), fusão ( $T_{m1}$  e  $T_{m2}$ ), os parâmetros  $\Delta T$  ( $T_x - T_g$ ) e o coeficiente de Hrubý ou  $K_{gl}$  ( $T_x - T_g / T_L - T_x$ ) para todas as amostras borato, incluindo os resultados obtidos pelo DTA do 45S5. Os valores estão dispostos na tabela 5.

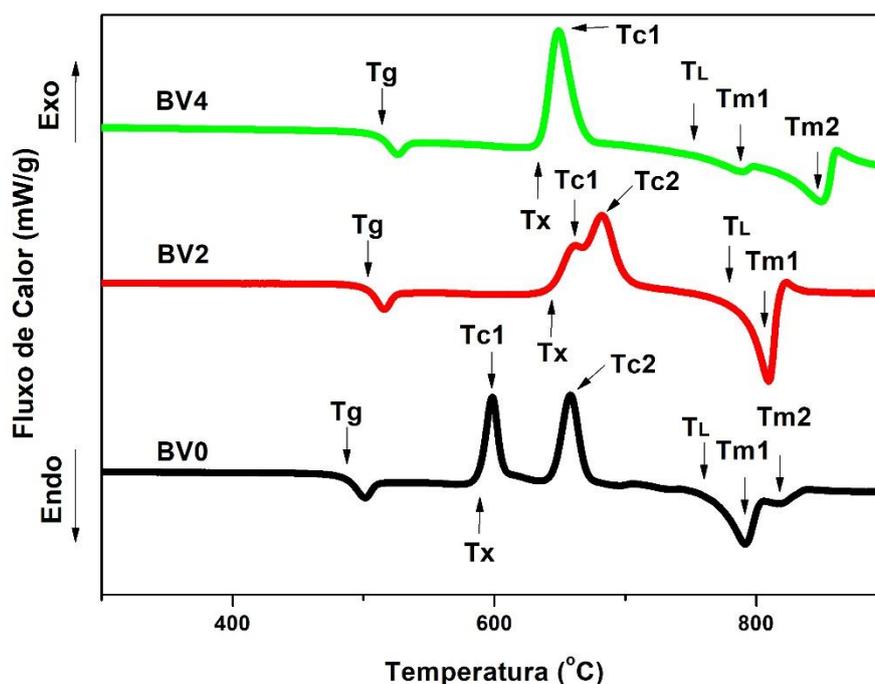


Figura 17: Resultado de DSC das três amostras de vidros borato quando submetidas ao aquecimento com taxa de 10 °K/min. Os pontos utilizados para o cálculo das temperaturas específicas estão demarcados.

Tabela 5: Temperaturas e parâmetros obtidos por meio do DSC dos vidros borato e DTA do vidro 45S5.

Nomenclatura da amostra	T <sub>g</sub> (±5)	T <sub>x</sub> (±5)	T <sub>c1</sub> (±1)	T <sub>c2</sub> (±1)	T <sub>L</sub> (±5)	T <sub>m1</sub> (±5)	T <sub>m2</sub> (±1)	ΔT	K <sub>gl</sub>
BV0	485	587	598	658	768	791	819	102	0,563
BV2	501	642	662	682	791	809	---	141	0,946
BV4	510	636	648	---	748	789	849	126	1,125
45S5	524	615	668	---	---	---	---	91	---

Observando a tabela 5, notamos que a T<sub>g</sub> se desloca para valores mais altos conforme se aumenta a quantidade de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na composição dos vidros borato. Embora seja nítido este padrão de crescimento, os valores de T<sub>x</sub> e T<sub>L</sub> não seguem a mesma tendência. Vemos também que a amostra BV2, a qual contém 2% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> em porcentagem de massa, apresenta as maiores temperaturas de início de cristalização e fusão.

Outra característica que distingue as três composições borato são seus respectivos picos exotérmicos. Em BV0 e BV2 notamos dois picos cada, discriminando a formação de duas fases cristalinas. Esse não é o caso da amostra BV4, a qual contém um único e bem definido pico de cristalização. Em contraponto, os picos exotérmicos de BV0 e BV4 são sucedidos por dois endotérmicos, o que mostra que o processo de fusão é dado em dois

passos distintos, enquanto para BV2 ele é apenas um. Processos térmicos similares, que demonstram a formação de inúmeras fases cristalinas durante o aquecimento dos vidros, são comumente encontrados em estudos de vidros borato com diferentes composições [61]. Entretanto, a determinação de quais fases são formadas durante o processo exige uma abordagem específica feita por meio da aplicação da técnica de DRX, e não faz parte do foco deste trabalho.

No caso do 45S5 encontramos o valor de Tg mais elevado dentre todas as amostras. Além de possuir um único pico de cristalização, para o intervalo de temperatura ao qual foi submetido não foi possível alcançar o ponto de fusão da amostra, inviabilizando o cálculo de seu coeficiente de Hruby. Porém, resultados obtidos na literatura estipulam um  $K_{gl}$  aproximado de 0,17, ou seja, bem menor que os de BV0, BV2 e BV4 [31].

Como primeira observação dos resultados da análise térmica, a existência de uma única transição vítrea revela uma boa homogeneidade dos vidros recém-preparados [62]. A Tg também é uma medida da robustez de um vidro [63], e seu aumento pode ser relacionado a um acréscimo da rigidez da rede vítrea [64]. Para BV0, BV2 e BV4, as mudanças na Tg podem ser provocadas tanto pela adição de  $P_2O_5$ , quanto pela consequente diminuição na concentração molar de óxidos modificadores na composição dos vidros.

Por possuir um raio iônico menor que de íons de cálcio e sódio, a substituição de íons de fósforo pode causar uma compactação da estrutura vítrea, gerando um aumento da Tg. Se assumirmos que a adição de  $P_2O_5$  provoca a incorporação de grupos fosfato à rede borato, e a consequente criação de ligações B-O-P, teremos uma maior conectividade da rede, corroborando, também, para um aumento nos valores de Tg. Além disso, a conversão de grupos  $B\text{O}_3$  em  $B\text{O}_4^-$ , que ocorre durante as mudanças de concentrações de óxidos modificadores no vidro, também podem contribuir para a variação da Tg.

Podemos utilizar o método apresentado no capítulo 2, no tópico sobre vidros borato, para estimar a proporção de unidades borato quadri-coordenadas  $B\text{O}_4^-$  nos vidros. Considerando que a adição de  $P_2O_5$  incorpora unidades fosfato à rede e os demais componentes atuam como modificadores, por meio da equação 2 (seção 2.3.2) encontramos os respectivos valores de  $N_4$  para os vidros borato: BV0 = 0,4491, BV2 = 0,4592 e BV4 = 0,4688. Este acréscimo no número de unidades  $B\text{O}_4^-$  aumenta a densidade de oxigênios na estrutura do vidro, tornando-se um possível responsável pelo aumento dos valores de Tg das amostras [64].

O critério de estabilidade térmica dos vidros borato,  $\Delta T$ , é maior que 100 °C. É sabido que janelas térmicas com valores iguais ou maiores que 70 °C, correspondem a uma formação vítrea razoável, valores maiores indicam formações ainda mais fáceis [65]. Isso permite que o líquido super-resfriado possa existir em uma vasta extensão de temperaturas, resistindo à nucleação de fases cristalinas. Esta estabilidade térmica corrobora na melhora da habilidade de formação vítrea (GFA) [66], facilitando a produção de amostras em pedaços maciços [64] ou sua sinterização em outros formatos [67].

O indício de melhora na GFA dos vidros, dado pelos valores crescentes do coeficiente de Hrubý, calculado conforme descrito na equação 12, do apêndice A, seção A.1, também pode ser explicado em termos da quantidade de superestruturas borato criadas na amostra durante seu processo de fabricação. Inúmeras espécies de superestruturas são produzidas durante as reações de equilíbrio que ocorrem quando a composição está no estado líquido. Assim, para que haja a cristalização, é necessário quebrar essas unidades superestruturais, de modo a criar e reorganizar topologicamente as estruturas apropriadas para a formação de uma fase cristalina. Porém, a energia de ativação para este processo é maior do que para a cristalização do sistema sem unidades superestruturais, o que explica a excelente capacidade de formação de vidros do sistema borato relativamente aos do silicato [44].

Comparados ao 45S5, os três vidros borato apresentaram propriedades térmicas vantajosas. Por exigirem menores temperaturas de fusão durante sua confecção, eles reduzem o tempo de produção. Além disso, os vidros borato apresentaram uma janela térmica maior do que o 45S5. Na produção de fibras de vidro, por exemplo, este fator é importante para controlar o diâmetro desejado para a fibra, além de ajudar a evitar a formação de fases cristalinas que inibem a bioatividade e dificultam a absorção pelo organismo [52]. O mesmo vale quando se deseja fabricar *scaffolds*, pois quanto maior a janela térmica, melhor é o intervalo de temperatura para configurar tamanho e interconectividade de poros [67]. Quando esses parâmetros são comparados apenas entre os vidros borato, BV2 demonstra os melhores resultados, tendo o  $\Delta T$  mais amplo, seguido por BV4 e BV0, respectivamente.

## 4.2 Variações de pH durante o teste *in vitro*

A biodegradação de um material submetido a testes *in vitro* é tida como um processo muito complexo [68]. No caso dos vidros bioativos, desempenha um papel fundamental no

crescimento da camada de HCA e está diretamente relacionada aos valores de pH do meio utilizado [32,69,70]. Além disso, em alguns casos o pH também pode determinar qual fase precursora da HCA será formada sobre a amostra [30].

A figura 18 mostra a variação dos valores de pH do SBF para os diferentes intervalos de tempo em que permaneceram em contato com as amostras de vidro. Observamos que o pH da solução tem um valor inicial de 7,4 (o mesmo que possui assim que é preparado para temperatura de 36,5 °C), com sua maior taxa de crescimento nas primeiras 24 horas, e tendendo a diminuir sua variação para períodos de tempo prolongados.

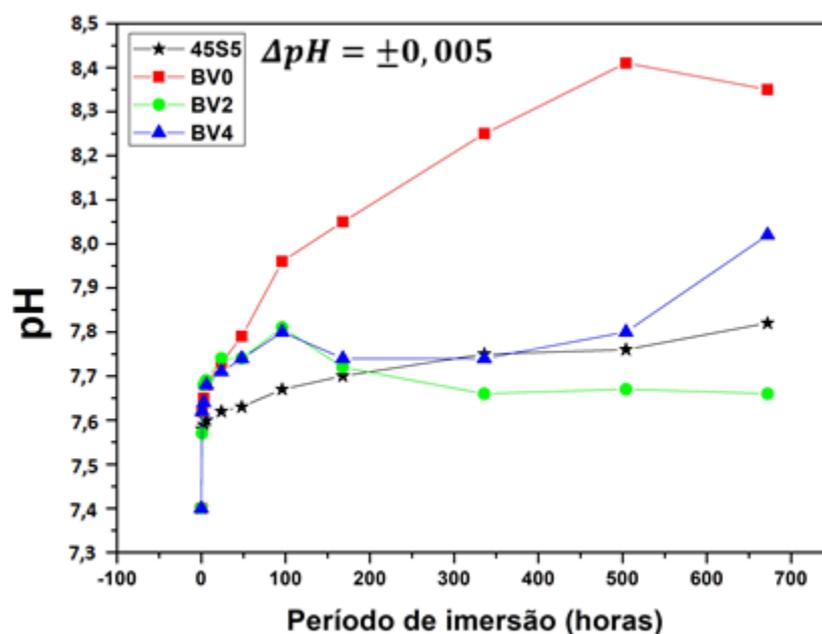


Figura 18: Variação do pH do SBF em que as amostras BV0, BV2, BV4 e 45S5 ficaram imersas pelos diferentes períodos de tempo do procedimento *in vitro*.

O comportamento dos valores de pH do fluido, observado durante todo o procedimento *in vitro* para as quatro amostras, é marcado por um aumento abrupto e uma tendência de estagnação, e está de acordo com resultados encontrados em trabalhos similares, tanto para vidros borato quanto silicato [9,34,71,72]. As fotos das figuras 19 a 22 mostram as mudanças morfológicas notáveis a olho nu nos vidros após o teste *in vitro*. As amostras BV0 imersas por 21 e 28 dias foram praticamente dissolvidas por completo durante o processo, portanto suas fotos possuem um padrão diferente.

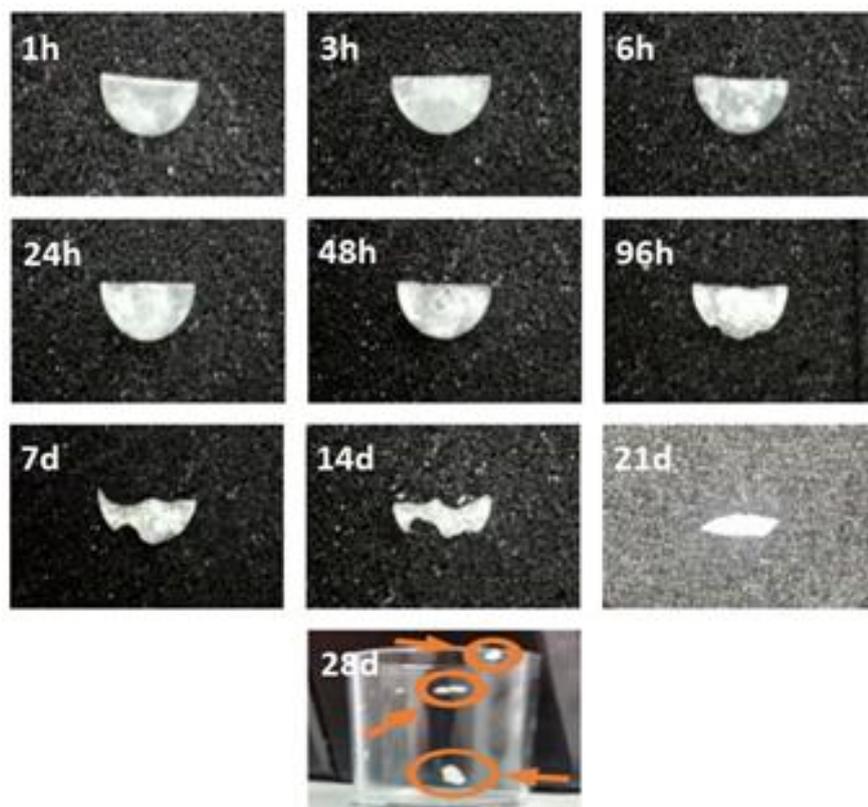


Figura 19: Fotos das amostras do vidro BV0 após os diferentes períodos de imersão em SBF..Setas e círculos marcam os resquícios da amostra imersa por 28 dias.

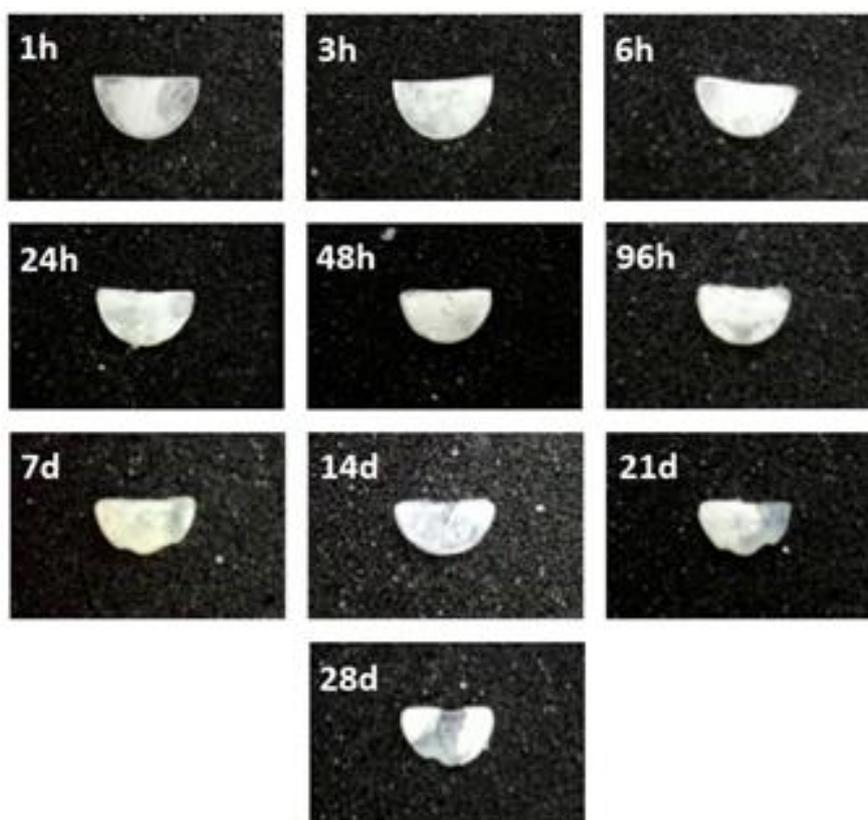


Figura 20: Fotos das amostras do vidro BV2 após os diferentes períodos de imersão em SBF.

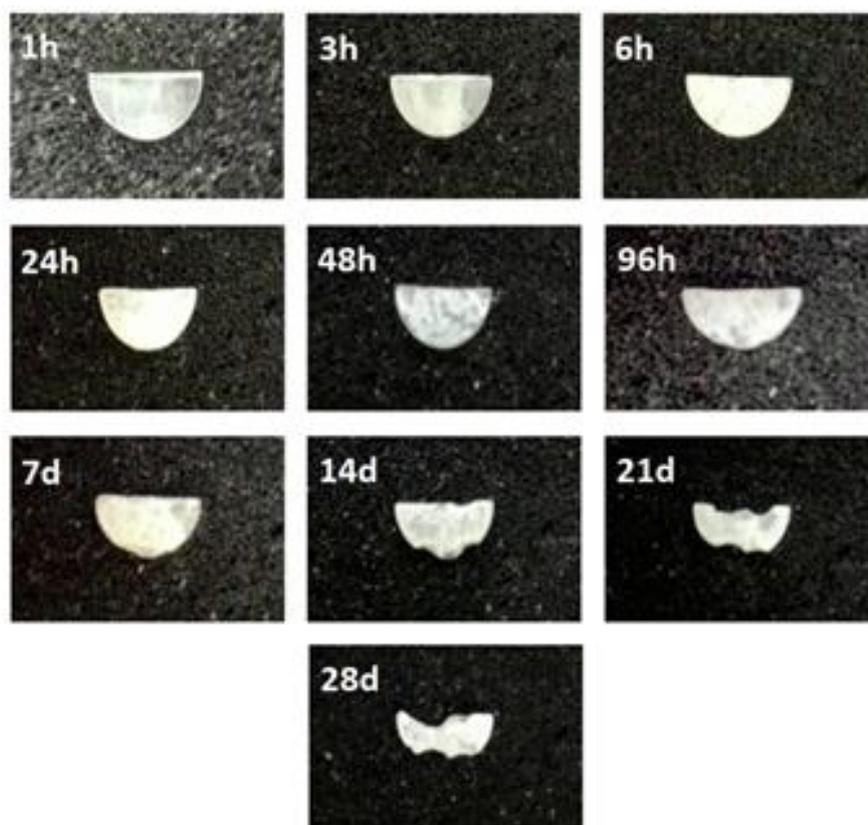


Figura 21: Fotos das amostras do vidro BV4 após os diferentes períodos de imersão em SBF.

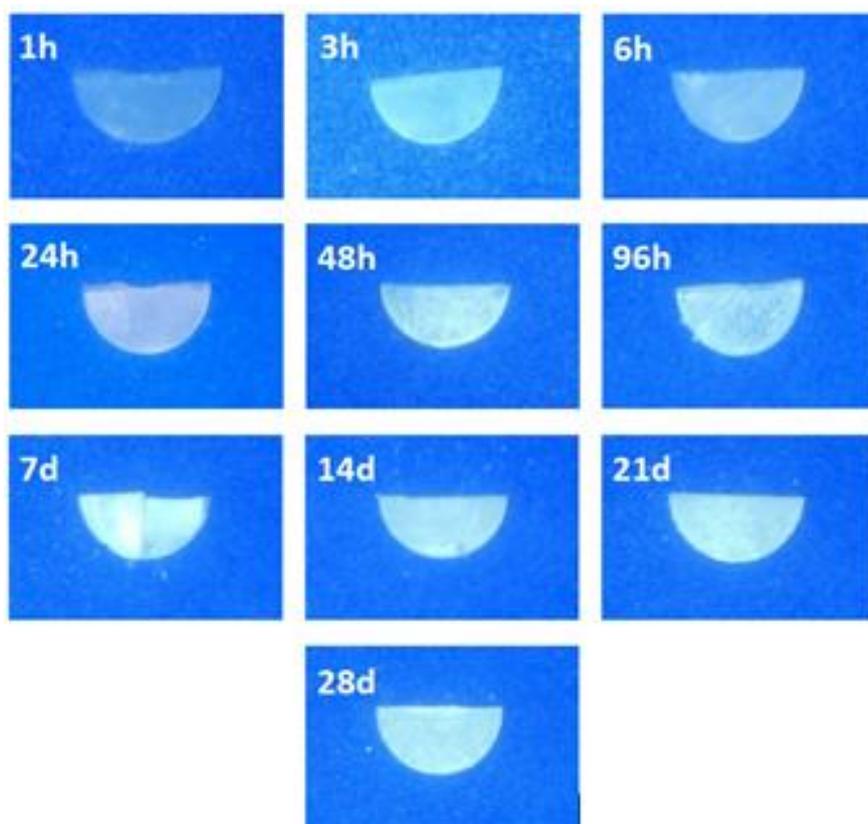


Figura 22: : Fotos das amostras do vidro 45S5 após os diferentes períodos de imersão em SBF.

Para os vidros borato, os resultados sugerem que espécies como  $H^+$ ,  $H_3O^+$  e  $OH^-$ , da solução, atacam a rede vítrea causando a dissolução de boro (presumivelmente como íons borato) e de íons modificadores ( $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $F^-$ ), durante a degradação do vidro. Acoplado a isso, o consumo de íons de fosfato do fluido, incorporados na formação da camada de fosfato de cálcio, completam o processo que desencadeia as mudanças de pH [71,72,73]. Os vidros com menor durabilidade tendem a liberar mais íons no SBF, causando um aumento maior do pH quando comparados aos vidros mais resistentes [73].

É sabido que quando expostos à soluções aquosas, os vidros borato tendem a se dissolver por completo, desde que não haja saturação do sistema [56], e que a taxa de dissolução diminui com o aumento do pH do meio, ao contrário dos silicatos [70]. No caso de BV0, BV2 e BV4, o nível de degradação observado para cada amostra, visualmente notado nas figuras 19, 20 e 21, pode ter uma correlação com os valores de pH alcançados pelo SBF utilizado em suas respectivas imersões.

Nas composições apresentadas, aquela que mostrou a maior variação do pH é a que não possui  $P_2O_5$  entre seus componentes. Comparativamente, a amostra com menor variação de pH possui 2%, em massa, de óxido de fósforo, enquanto a com maior concentração de fosfato obteve a posição intermediária. Alguns trabalhos citam que o aumento do pH do SBF é proporcional à quantidade de  $B_2O_3$  na composição do vidro [9], pois, nestes exemplares, a presença de espécies  $B\emptyset_3$  mais solúveis é favorecida [56]. Também é relatado que a adição de fosfato ao vidro diminui sua durabilidade [74]. No entanto, para nossas amostras não pudemos evidenciar esses padrões.

É importante perceber que existem vários fatores determinantes na degradação dos vidros borato produzidos neste trabalho. Se olharmos pelos valores de  $T_g$  e da proporção de unidades  $B\emptyset_4^-$  de cada vidro, seria esperado que BV4 tivesse a menor degradação. Além disso, se a liberação de íons  $F^-$  da amostra é dada a custa do consumo de  $OH^-$  da solução, teríamos uma redução do pH do fluido [75], e a quantidade de  $CaF_2$  na composição seria mais um aspecto a ser considerado. Um terceiro viés torna-se plausível quando levamos em conta que a incorporação de fosfato ao vidro acontece junto da redução de cálcio para a mesma amostra, um elemento conhecido por ser agregador da rede [76]. Estes fatores nos levam a crer que, para fazermos qualquer correlação mais direta sobre a degradação do vidro e a consequente variação do pH do SBF, seria necessário, primeiro, a realização de medidas de perda de massa da amostra e de concentração iônica da solução durante o

procedimento *in vitro*, além da produção de uma quantidade maior de vidros com variações mais sutis nas concentrações de fosfato.

Thind e colaboradores [73] analisaram testes *in vitro* de vidros borato com composições semelhantes a BV0, BV2 e BV4, mostrando que a amostra que possuía 2%, em massa, de  $P_2O_5$ , apresentou-se mais durável quando comparada a amostras sem fosfato ou com maior porcentagem, desencadeando menores variações de pH da solução em que foi imersa e menores taxas de perda de massa. Isso os fizeram especular que a incorporação de 2% de óxido de fósforo aumentou a durabilidade da rede vítrea de sua amostra, de maneira a torná-la menos degradada com o decorrer do procedimento.

Em contraste com os vidros borato, o 45S5 apresentou variações de pH intermediárias, com valores finais que ficam entre os encontrados para o BV2 e BV4. O processo de degradação do Bioglass<sup>®</sup> é conhecido e já foi citado na seção 2.4.3.1, ele se dá pela liberação inicial seletiva de íons que causa o aumento do pH da solução e a conseguinte degradação da amostra. Contudo, a capacidade de repolimerização da rede silicato impede que o vidro se decomponha por inteiro, fazendo com que as taxas de variação do pH do fluido decresçam, tendendo a valores de pH constantes.

Em vista da atuação do vidro quando aplicado *in vivo*, caso ele provoque um grande aumento do pH da região do implante pode gerar efeitos nocivos ao organismo [24]. Por sofrer uma variação menor, mantendo o pH do meio mais próximo daquele encontrado em fluidos corporais, BV2 foi o vidro que apresentou resultados mais promissores para aplicação direta no tecido vivo, mantendo valores muito parecidos com os encontrados para o 45S5. Contudo, BV0 e BV4 não podem ter suas aplicações descartadas. Estudos relatam que testes *in vivo*, em animais, mostraram que alterações de pH tendem a ser atenuadas pelo processo contínuo de trocas de fluidos do organismo [77]. Além disso, culturas de células podem ser utilizadas para estimular uma conversão *in vitro* das amostras em HCA, precedente a sua aplicação *in vivo* [78], diminuindo liberações iniciais excessivas de componentes que podem ser prejudiciais ao corpo humano.

## 4.3 Espectroscopia Raman

### Pré-imersão em SBF

Estudos do espectro Raman de vidros baseados em  $B_2O_3$ , mostram a presença de uma rede formada por unidades estruturais  $B\text{O}_3$  e  $B\text{O}_4^-$  que podem coexistir formando superestruturas, tais como anéis boroxol, grupos di-, ditri-, tri-, tetra-, penta-, piro-, orto- e meta-borato, entre outras, como foi descrito no capítulo 2, seção 2.3.2. A concentração destes grupos borato em cada composição vítrea depende da natureza e proporção de óxidos formadores e modificadores de rede [79].

Por meio da figura 23 podemos observar que os espectros Raman das amostras de vidros borato são semelhantes. A diferença mais evidente entre eles se encontra no surgimento de uma banda centrada em  $943\text{ cm}^{-1}$  para BV2 e BV4, com ombros em  $1002\text{ cm}^{-1}$  para BV2 e  $992\text{ cm}^{-1}$  para BV4. As demais distinções observadas, conforme se aumenta a quantidade de  $P_2O_5$  na composição do vidro, tratam de pequenos ombros e deslocamentos de poucos números de onda para as bandas já presentes na amostra sem óxido de fósforo.

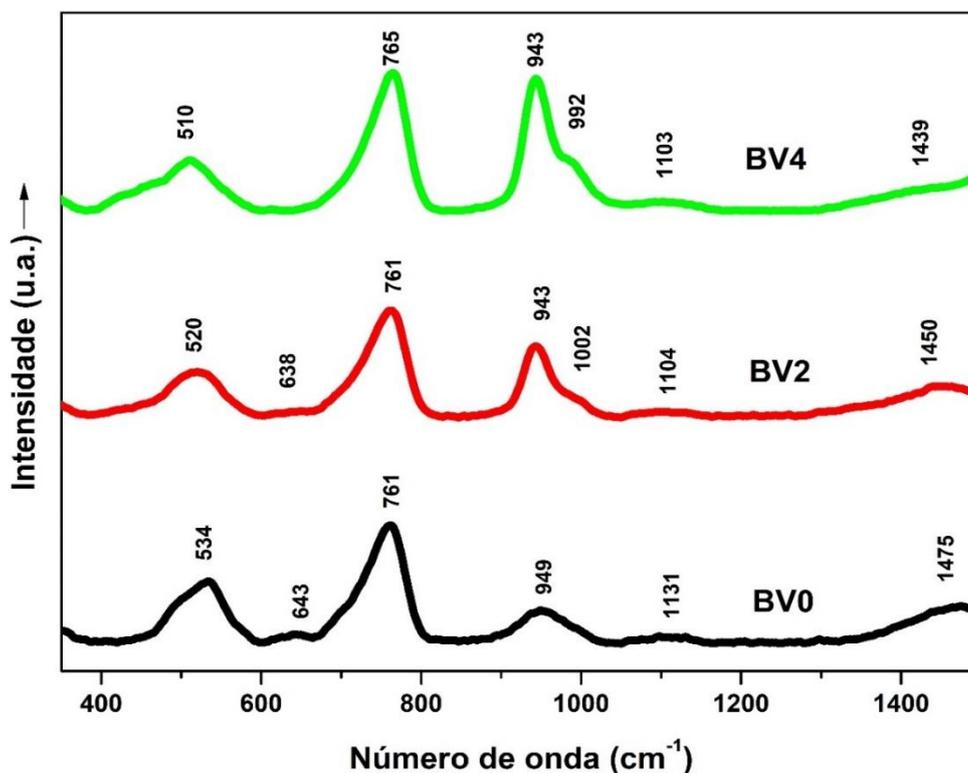


Figura 23: Espectros Raman dos vidros borato antes de serem postos em imersão em SBF.

Espectros Raman de vidros formados por óxido de boro foram extensivamente estudados em diversos trabalhos [42,43,80,81]. Para exemplares com grandes quantidades de

$B_2O_3$  é observada uma intensa banda centrada em  $806\text{ cm}^{-1}$ , que representa vibrações de respiração simétrica de anéis boroxol, formados por grupos trigonais  $B\text{O}_3$  [42,80]. Conforme se acrescenta óxidos modificadores à rede, as características espectrais acabam mudando.

A amostra BV0 contém a menor concentração molar de  $B_2O_3$ , ou seja, mais óxidos modificadores que as demais. Segundo o *Review* sobre a estrutura de vidros borato feito por Meera e J. Ramakrishna [43], o surgimento conjunto das bandas em 534, 643, 761 e  $949\text{ cm}^{-1}$ , se dá pela formação de grupos pentaborato, mediante o aumento da quantidade de modificadores no vidro. Isso também faz com que outras superestruturas comecem a ganhar destaque nos espectros, como é o caso de grupos diborato, representados pela pequena banda em torno de  $1131\text{ cm}^{-1}$  [43], assim como de anéis e cadeias metaborato, marcados pela banda que cresce em torno de  $1475\text{ cm}^{-1}$  [43].

Conforme adicionamos o óxido de fósforo à composição dos vidros borato, notamos algumas mudanças em seus espectros Raman. Para as amostras BV2 e BV4, com 2% e 4% de  $P_2O_5$ , respectivamente, as bandas centradas em 534, 643, 1131 e  $1475\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas em BV0 às superestruturas de borato, sofrem atenuações ou deslocamentos para números de onda menores, além do alargamento da banda em  $510\text{ cm}^{-1}$  em BV4. De acordo com Konijnendijk e Stevels [42], que estudaram mudanças no espectro raman de vidros borato mediante a variações na concentração de óxidos alcalinos e alcalinos terrosos, estas alterações ocorrem devido ao decréscimo da concentração molar de óxidos modificadores nos vidros borato.

Notamos também que a banda centrada em  $761\text{ cm}^{-1}$  em BV0 e BV2, desloca-se para  $765\text{ cm}^{-1}$  em BV4. Kamitsos e Chryssikos [80] atribuem esta banda às superestruturas de pentaborato formadas por dois anéis de seis membros com um tetraedro  $B\text{O}_4^-$  interligando-os. O seu deslocamento progressivo para números de onda menores, caso que acontece em BV0 e BV2, é dado, segundo os autores, pelo aumento da quantidade de  $Na_2O$  na composição de vidros borato.

Além das mudanças nos espectros descritas anteriormente, notamos bandas em  $943\text{ cm}^{-1}$  para os vidros BV2 e BV4, enquanto que para BV0, na mesma região, existe apenas uma banda menor, centrada em  $949\text{ cm}^{-1}$  e, como já citado, atribuída a unidades pentaborato. Larink and Eckert [82] estudaram a troca relativa na proporção de óxido de boro e fósforo em vidros borofosfato. De acordo com sua análise por meio de espectroscopia

Raman e NMR, eles atribuem à banda em  $949\text{ cm}^{-1}$  à formação de ligações B-O-P entre grupos borato e fosfato. Por fim, também temos o surgimento de ombros em  $992$  e  $1002\text{ cm}^{-1}$ , para BV2 e BV4, respectivamente. Estes dois últimos podem ser provenientes de vibrações de estiramento simétrico de ligações P-O, originadas de unidades polifosfato<sup>18</sup> contendo átomos de boro, como consta na análise de biovidros borofosfato feito por Saranti e colaboradores [83,84].

### **Pós-imersão em SBF**

Após serem submetidos ao procedimento *in vitro* em SBF, todos os vidros borato demonstraram espectros Raman diferentes, mesmo para tempos curtos de contato com o fluido. Essas mudanças ocorridas nas superfícies das amostras são indicativos de alterações estruturais significativas.

A figura 24 mostra os espectros Raman das superfícies dos vidros BV0 para diferentes períodos de imersão, e os compara ao espectro da hidroxiapatita sintética (HA) e às suas principais atribuições químicas [63] [83]. Notamos que a partir de 1 hora em exposição ao SBF os espectros tendem a apresentar as mesmas contribuições presentes no espectro da HA. Além disso, a camada formada sobre a superfície dos vidros causa a atenuação das bandas referentes às unidades borato. Como destaque temos o surgimento daquela que vem a ser a mais marcante do espectro, centrada em  $951\text{ cm}^{-1}$ .

Conforme o tempo de contato com o SBF aumenta, observamos que as bandas originárias do vidro, localizadas entre as regiões de  $650\text{-}850\text{ cm}^{-1}$  e  $1250\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ , tendem a ficar ainda menos visíveis. Em contrapartida, o aumento do período de imersão favorece o surgimento de novas bandas, com centros aproximados de  $430$ ,  $590$ ,  $1001$  e  $1070\text{ cm}^{-1}$ . Enquanto isso, a banda antes posicionada em  $951\text{ cm}^{-1}$  se desloca para números de onda mais altos, atingindo  $962\text{ cm}^{-1}$  depois de 96 horas. Ao final dos 28 dias, o espectro da amostra apresenta novas bandas em  $582$ ,  $610$ ,  $619$  e  $1076\text{ cm}^{-1}$ , além do deslocamento das bandas em  $962$  para  $964\text{ cm}^{-1}$  e  $1001$  para  $1003\text{ cm}^{-1}$ , e da maior definição da forma das bandas em  $430$ ,  $590$ .

---

<sup>18</sup> São estruturas formadas a partir de unidades de  $\text{PO}_4$  tetraédrico (fosfato) e ligadas pelo compartilhamento de átomos de oxigênio.

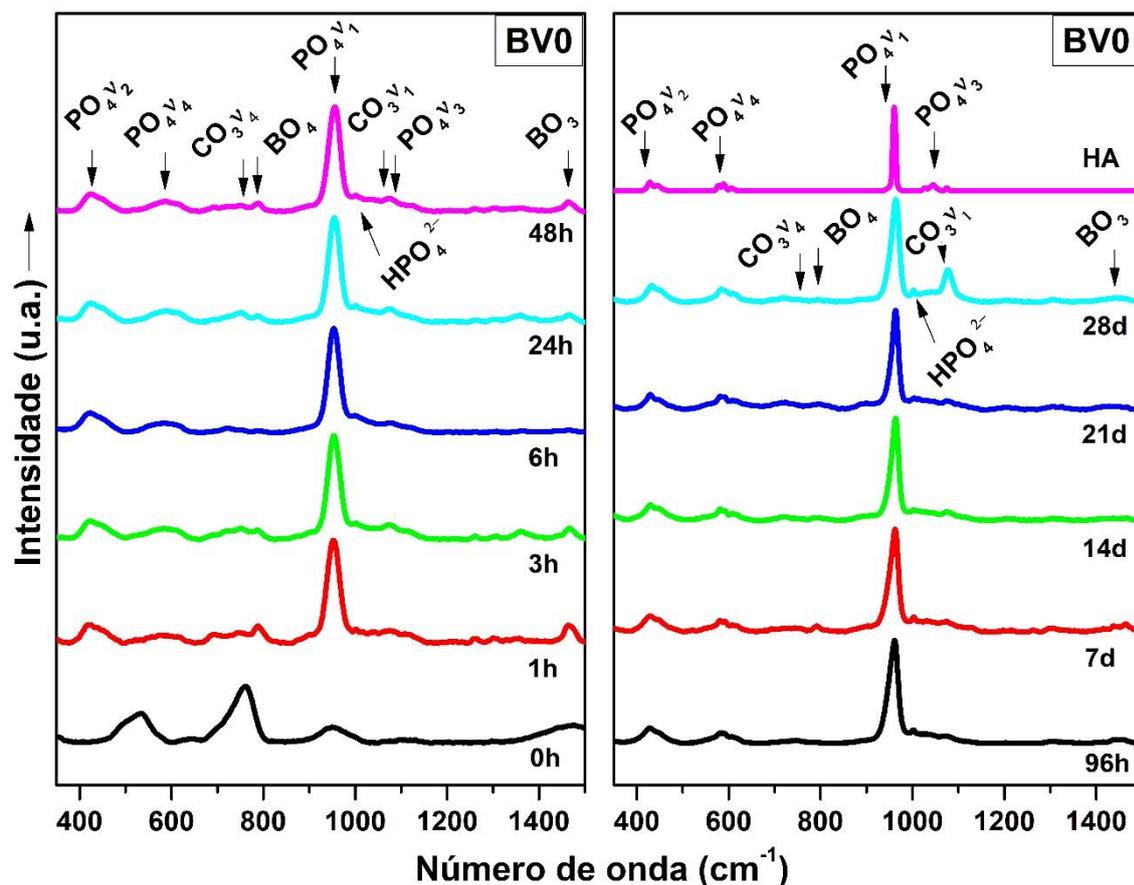


Figura 24: Espectros Raman da amostra BV0 após os diferentes períodos de imersão do procedimento *in vitro*. Junto estão expostos o espectro da HA sintética para comparação, bem como as atribuições das principais bandas. A letra “h” representa o período de imersão marcado em horas, enquanto “d” faz referência a dias.

As amostras BV2 e BV4 demonstraram comportamentos semelhantes a BV0 após os períodos de imersão em SBF. As diferenças se encontram no tempo requerido para que a banda centrada em torno de  $951\text{ cm}^{-1}$ , formada nas amostras depois de 1 hora de imersão, fosse deslocada para  $962\text{ cm}^{-1}$ . Para BV2 isso acontece após 96 horas, enquanto para BV4 só ocorre com 21 dias. Além disso, BV4 desenvolve uma banda em  $1080\text{ cm}^{-1}$  após ficar imersa em SBF por 1 hora, o mesmo não é observado para as demais amostras. Os espectros de BV2 e BV4 depois de passarem pelo procedimento *in vitro* podem ser vistos nas figuras 25 e 26, respectivamente.

Além de todas as características já citadas para as três amostras, há uma outra notável em todos os espectros. Na região entre  $1430$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$ , é possível presenciar o surgimento de uma pequena banda com centro em torno de  $1464\text{ cm}^{-1}$ , sendo mais acentuada em BV0 do que em BV2 e BV4, e que vai desaparecendo para tempos longos de exposição ao SBF.

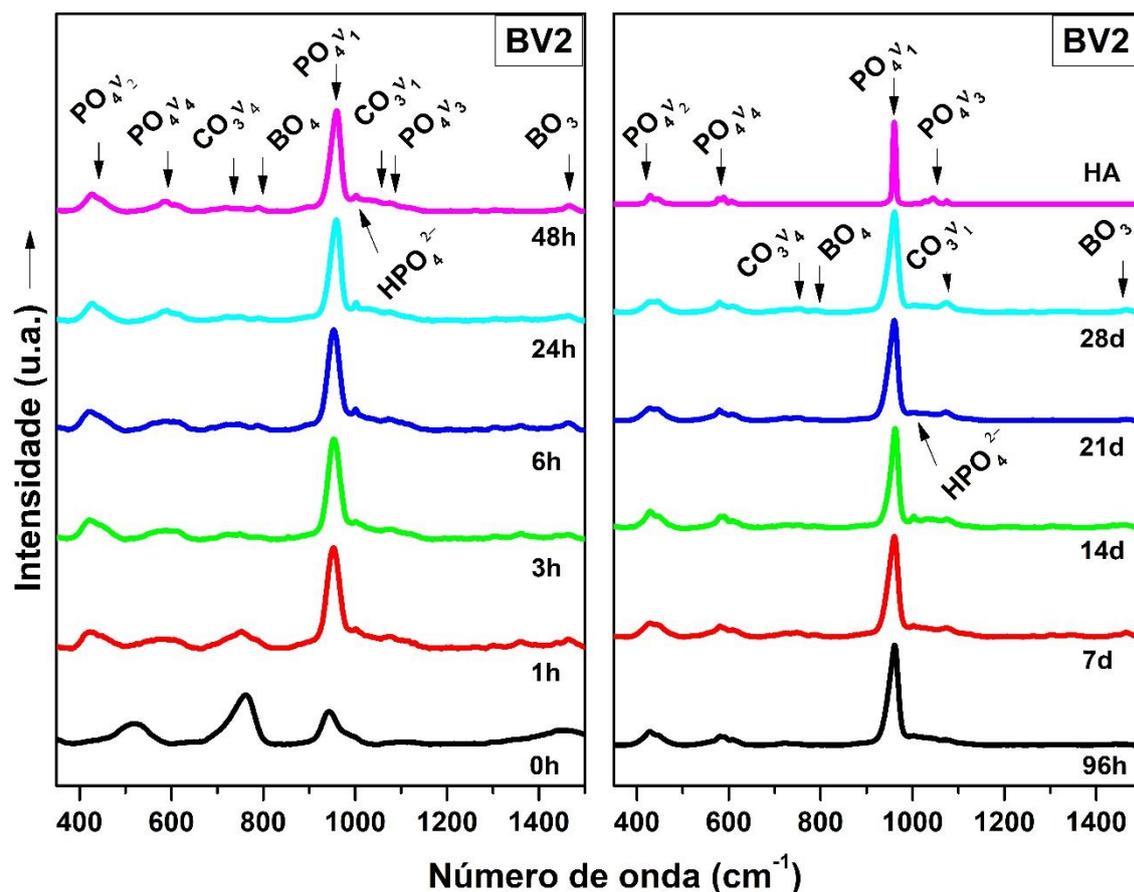


Figura 25: Espectros Raman da amostra BV2 após os diferentes períodos de imersão do procedimento *in vitro*. Junto estão expostos o espectro da HA sintética para comparação, bem como as atribuições das principais bandas. A letra “h” representa o período de imersão marcado em horas, enquanto “d” faz referência a dias.

Como primeira observação sobre os espectros expostos nas figuras 24, 25 e 26, é possível observar que, a partir da primeira hora de contato com o SBF, as bandas de unidades borato, originárias dos vidros inertes, começam a dar lugar a vibrações correspondentes a modos internos de íons  $\text{PO}_4^{3-}$  [83]. Estas vibrações se encontram em quatro regiões do espectro. A primeira delas entre  $400$  e  $500 \text{ cm}^{-1}$ , correspondente a modos de dobramento duplamente degenerados ( $\nu_2$ ) de ligações O-P-O. A segunda está entre  $530$  e  $650 \text{ cm}^{-1}$ , e representa modos de dobramento triplamente degenerados ( $\nu_4$ ) de ligações O-P-O. A banda mais intensa do espectro se posiciona em torno de  $962 \text{ cm}^{-1}$ , e está relacionada a vibração do estiramento simétrico não degenerado ( $\nu_1$ ) de ligações P-. A última compreende o espaço entre  $1025$  e  $1080 \text{ cm}^{-1}$ , referente a modos de estiramento assimétrico triplamente degenerados ( $\nu_3$ ) de ligações P-O [67,85].

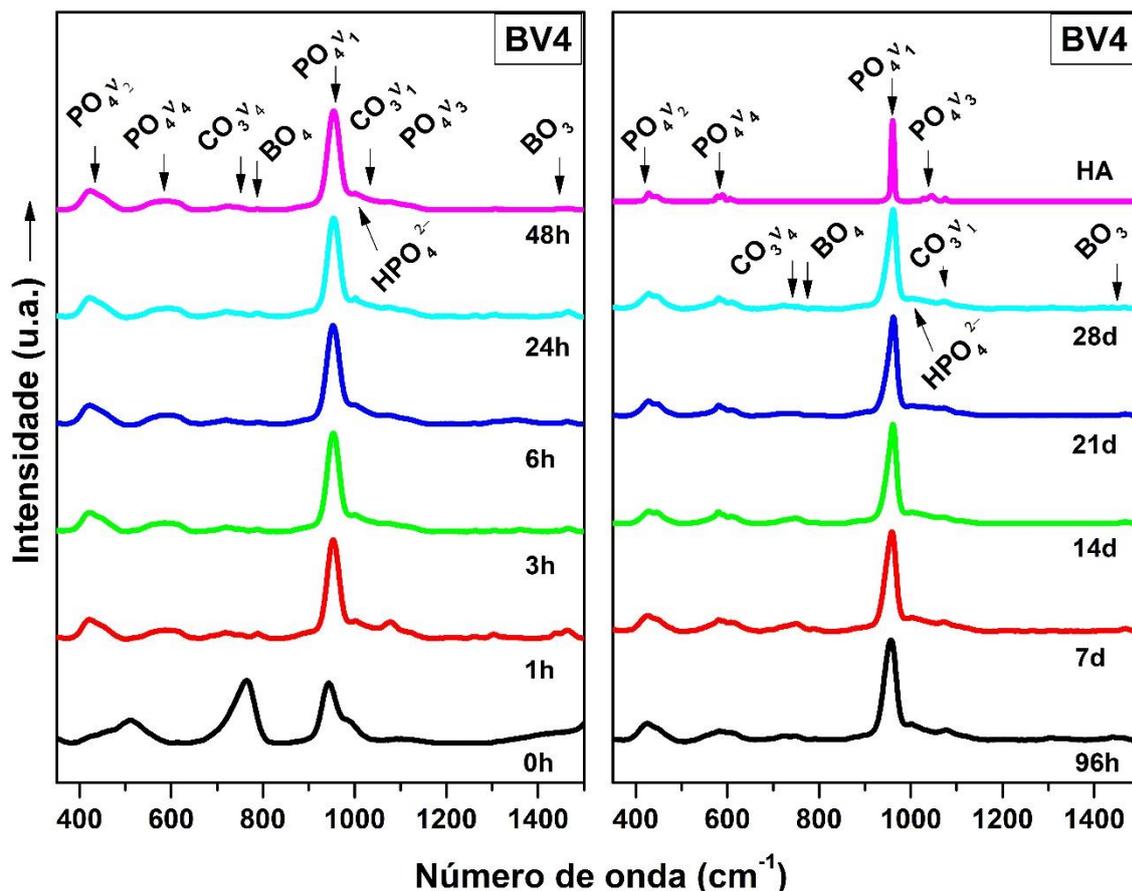


Figura 26: Espectros Raman da amostra BV4 após os diferentes períodos de imersão do procedimento *in vitro*. Junto estão expostos o espectro da HA sintética para comparação, bem como as atribuições das principais bandas. A letra “h” representa o período de imersão marcado em horas, enquanto “d” faz referência a dias.

O surgimento destas bandas no espectro da superfície dos vidros evidencia que a substância ali formada corresponde a HCA [67,83,86], assegurando a potencial bioatividade dos vidros borato deste trabalho. Somado a isto, a definição das bandas de grupos fosfato, apresentada pelo estreitamento diferente em cada amostra, nos revela que a nucleação e cristalização da HCA não é igual para os três vidros.

A diferença mais chamativa é o deslocamento da banda referente ao estiramento simétrico da ligação P-O não degenerada. Em BV0 e BV2 esta banda se desloca para  $962\text{ cm}^{-1}$  após 96 horas de imersão, o que só acontece depois de 21 dias para BV4. Isso demonstra um processo de cristalização mais lento para a HCA nucleada sobre esta amostra [83,87]. Para BV0, entretanto, a banda em  $962\text{ cm}^{-1}$  tende a  $964\text{ cm}^{-1}$  após 28 dias, a qual, de acordo com alguns trabalhos, continua representando vibrações do fosfato  $\nu_1$ , podendo estar posicionada em até  $965\text{ cm}^{-1}$  [88]. Além disso, o surgimento das bandas referentes aos fosfatos  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  e  $\nu_4$ , formadas precocemente em BV0 e BV2 em relação a BV4, também

podem corresponder a um processo de cristalização mais rápido da HCA nucleada para as duas primeiras [87,89]. Para melhor visualizar este deslocamento da banda principal para  $960\text{ cm}^{-1}$ , normalizamos os espectros em relação a banda de fosfato  $\nu_1$  e os apresentamos na figura 27.

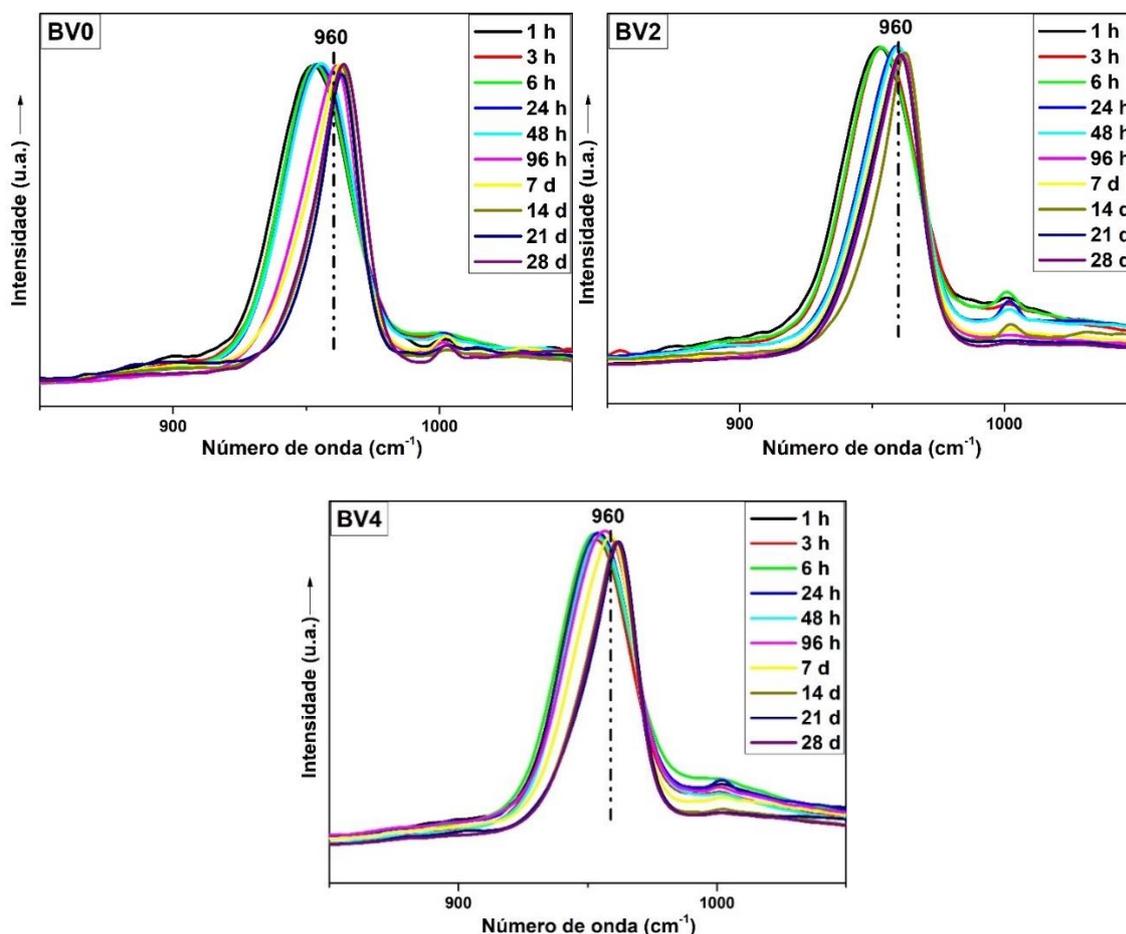


Figura 27: Espectros normalizados pela banda referente ao fosfato  $\nu_1$ , provenientes da camada crescida sobre as amostras BV0, BV2 e BV4 após o procedimento de imersão em SBF. O destaque é dado para região de interesse, quando a banda atinge  $960\text{ cm}^{-1}$  e representa a cristalização da HCA.

Outro ponto que atrai atenção nos espectros é o comportamento da banda em torno de  $1460\text{ cm}^{-1}$ . Notamos que ela chega a crescer para as primeiras horas de imersão, porém vai perdendo intensidade e desaparece para períodos prolongados. Esta banda pode representar vibrações de unidades triangulares  $B\text{O}_3$  que se formam da quebra de estruturas  $B\text{O}_4^-$  mais resistentes [59]. Possivelmente este processo ganha destaque em BV0 por ser a amostra com a degradação mais rápida, como sugerem os resultados de pH. Todavia, conforme o tempo de imersão aumenta, essas formações mais frágeis tendem a ser dissolvidas e sobrepostas também.

Para melhor avaliar o processo de cristalização que ocorre na HCA formada nas amostras, podemos observar o gráfico da figura 28, no qual consta os valores da largura à meia altura da banda referente ao fosfato  $\nu_1$ , para as três amostras borato e o 45S5. O cálculo foi feito apenas após esta banda se posicionar em  $960\text{ cm}^{-1}$ . O método utilizado para o cálculo é descrito no tópico sobre espectroscopia Raman, apresentado no apêndice A, seção A.3.

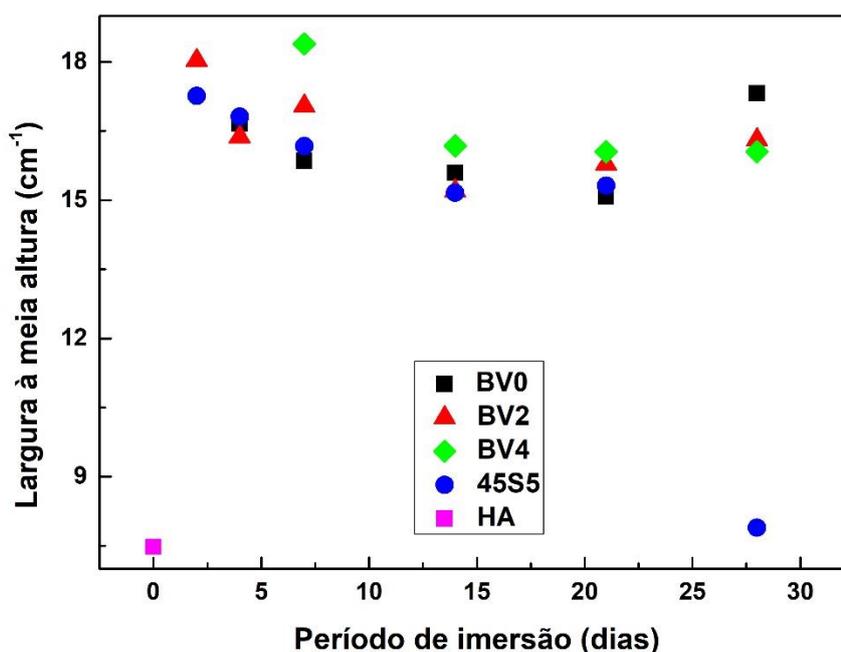


Figura 28: Comportamento da largura à meia altura da banda referente ao fosfato  $\nu_1$  para os vidros boratos e o 45S5 comparados a HA sintética (inserida em  $t = 0$ , pois não passou pelo teste de bioatividade).

O gráfico mostra uma tendência de estreitamento da banda referente a vibração P-O do fosfato  $\nu_1$ . O mesmo cálculo feito para a HA sintética, utilizada como referência, revelou um valor igual a 7,47. Quanto mais cristalina for a HCA, mais estreita será esta banda, e menor será o valor de sua largura à meia altura. Seu posterior alargamento pode ser dado pela redução na perfeição cristalográfica da célula unitária da apatita, conforme carbonatos são incorporados a ela [90].

As bandas atribuídas a grupos carbonato, os quais podem aparecer em torno de  $690\text{-}760$  e  $1070\text{-}1085\text{ cm}^{-1}$  [87,89,91], têm sua presença fracamente demarcada nos espectros Raman, como já relatado em outros trabalhos [91]. Para facilitar a visualização das bandas de carbonatos, utilizamos como exemplo os espectros normalizados pela intensidade da banda em torno de  $961\text{ cm}^{-1}$ , da amostra BV2, a partir de 48 horas de imersão, e expomos

a ampliação das regiões em que esses grupos se encontram, como pode ser visto na figura 29.

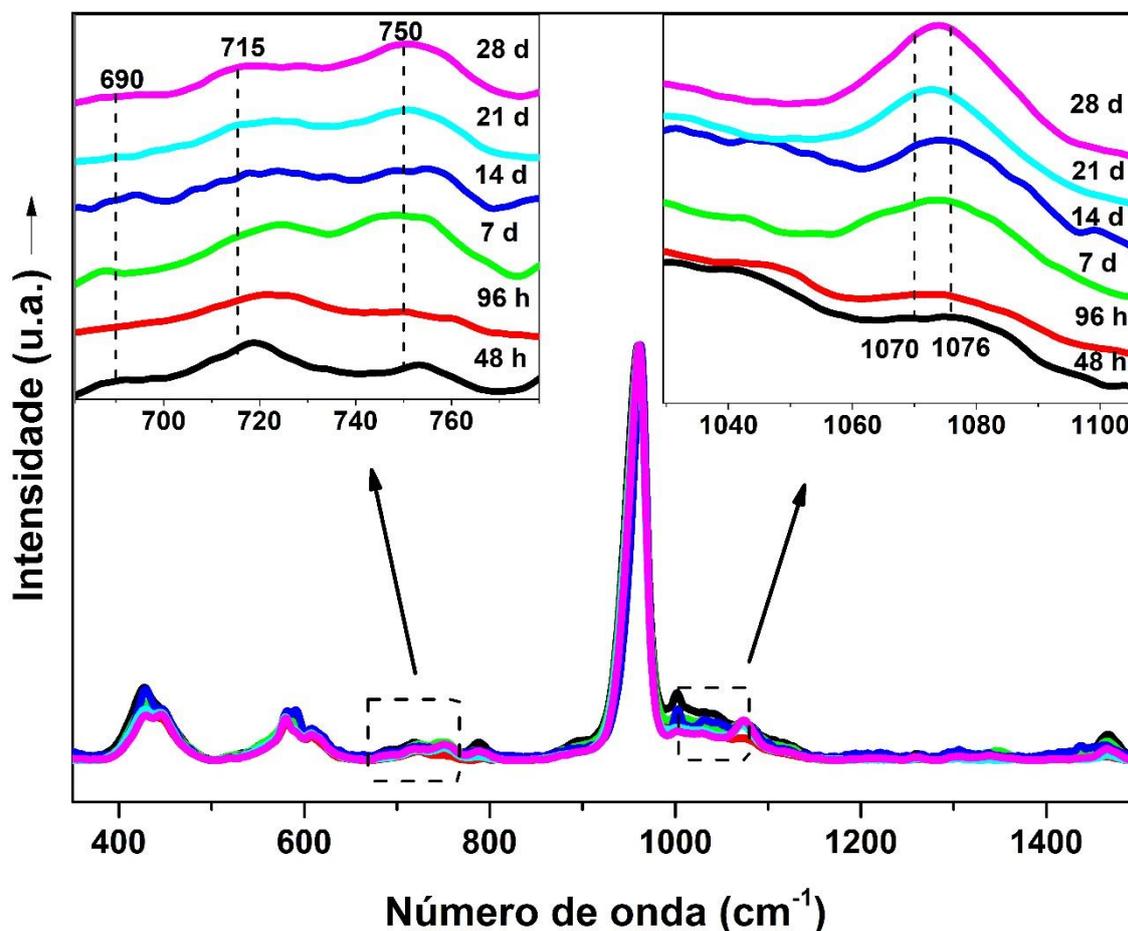


Figura 29: Espectros normalizados da superfície da amostra BV2 imersa pelos períodos de tempo compreendidos entre 48 horas e 28 dias. Em destaque estão as regiões onde surgem as bandas que representam carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), em 690, 715, 750 e 1070  $\text{cm}^{-1}$ , além do fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) em 1076  $\text{cm}^{-1}$ .

Assim como para as demais amostras, as bandas com centros aproximados de 690, 715 e 750  $\text{cm}^{-1}$ , correspondem a modos de vibração  $\nu_4$  em íons  $\text{CO}_3^{2-}$ , podendo as duas primeiras representar a ocorrência de substituições do tipo B, enquanto a última é relativa a substituições do tipo A [90]. A outra banda, demarcada na figura 26 em 1070  $\text{cm}^{-1}$ , é referente a modos de vibração  $\nu_1$  em íons  $\text{CO}_3^{2-}$  [92], e se encontra sobreposta devido à presença próxima da banda relativa a íons  $\text{PO}_4^{3-}$ , em 1076  $\text{cm}^{-1}$ . A observação da figura 29 sugere que o desenvolvimento das bandas de carbonato acompanha o aumento dos valores da largura à meia altura dispostos no gráfico da figura 28, ou seja, conforme o tempo de imersão aumenta, a apatita vai sendo depositada na superfície dos vidros e seus cristais ganham forma e tamanho, fazendo com que as bandas de fosfato comecem a surgir no espectro. Por outro lado, a concomitante incorporação de carbonatos diminui a

cristalinidade da HCA, dando origem às bandas de íons  $\text{CO}_3^{2-}$  vistas em seu espectro. Este processo é desencadeado mais cedo na amostra BV2, não somente por ser aquela que primeiro apresenta a banda posicionada em  $960\text{ cm}^{-1}$ , mas também porque sofre antes os efeitos causados pelas substituições de carbonato, como podemos associar às variações dos valores contidos na figura 28.

Ademais das características já citadas, a singularidade no espectro da amostra BV4 que ficou imersa por uma hora, marcada pela banda em  $1080\text{ cm}^{-1}$ , pode ser dada pela reação entre a liberação inicial de cálcio do vidro e o contato com o  $\text{CO}_2$  da atmosfera, levando à formação de calcite [93]. Com o passar do tempo de imersão, a formação da HCA acaba consumindo a calcite, e esta banda, referente a estiramento de grupos  $\text{CO}_3^{2-}$ , diminui. Além disso, a pequena banda vista em torno de  $1001$  e  $1003\text{ cm}^{-1}$ , pode ser referente a incorporação de íons hidrogenofosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) à estrutura da HCA [85,94]. Assim como acontece para os grupos carbonato, sua presença pode tornar a HCA mais amorfa.

A critério de comparação, os espectros Raman obtidos para as amostras do vidro 45S5, submetidas ao mesmo procedimento *in vitro* pelo qual passaram as amostras de vidros borato, são expostos na figura 30. Antes da imersão em SBF o 45S5 apresenta várias bandas correspondentes a grupos silicato. As bandas centradas em  $640$  e  $860\text{ cm}^{-1}$  são oriundas das vibrações de ligações Si-O-Si em tetraedros  $\text{SiO}_4$ , enquanto aquelas em  $975$  e  $1030\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas a vibrações de ligações Si-O-Si em monômeros  $\text{SiO}_4^{4-}$  e anéis e cadeias  $\text{Si}_2\text{O}_6^{4-}$ , respectivamente. A banda posicionada em  $1068\text{ cm}^{-1}$  é proveniente de estiramentos Si- $\text{O}_{\text{NBO}}$  em tetraedros  $\text{SiO}_4$ . A única banda que não corresponde a grupos silicato é centrada em  $945\text{ cm}^{-1}$  e atribuída a estiramentos simétricos de grupos  $\text{PO}_4$  [89].

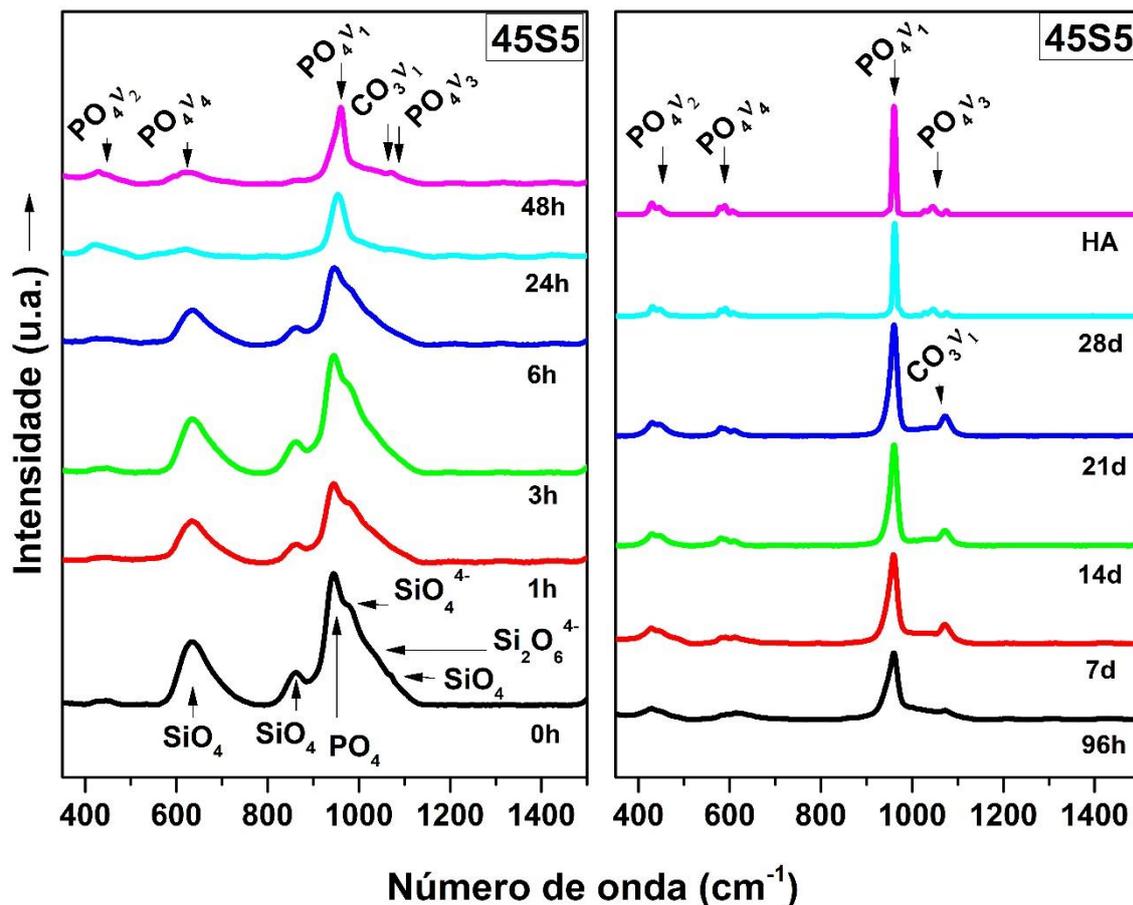


Figura 30: Espectros Raman da amostra 45S5, antes e após ela passar pelo procedimento *in vitro*. Junto estão expostos o espectro da HA sintética para comparação, bem como as atribuições das principais bandas. A letra “h” representa o período de imersão marcado em horas, enquanto “d” faz referência a dias.

Durante os diferentes períodos de imersão, notamos um comportamento de mudança nos espectros similar ao observado para os vidros borato, e de acordo com o que é esperado para o Bioglass<sup>®</sup>, como visto em outros trabalhos [89,91]. Segundo Hench, o 45S5 tem os primeiros cinco estágios de formação da HCA completos entre 2 e 3 horas [6,41]. Entretanto, isto não pode ser notado nos espectros da figura 30, os quais demonstram que esta mesma formação só é completa após 48 horas, assim como eventualmente relatado em outros estudos [89,95]. Essa divergência pode ser dada pela metodologia aplicada para o procedimento *in vitro*, como diferenças na forma da amostra (dimensões da área da amostra ou tamanho de grão em caso de pó), quantidade e trocas do fluido, assim como agitação do sistema. Contudo, o decorrer do processo acaba gerando o crescimento de uma HCA mais cristalina que a observada nos vidros borato, tanto que, após 28 dias, o espectro da camada nucleada sobre o Bioglass<sup>®</sup> é praticamente indistinguível do espectro da HA sintética. Vale

ressaltar que os carbonatos  $\nu_4$  não produzem bandas capazes de serem observadas nos espectros Raman do 45S5.

A comparação entre os resultados do teste *in vitro* dos vidros borato e o do 45S5 nos concede um bom parâmetro de avaliação. Por eles notamos que a amostra borato que desencadeia um processo de formação de HCA mais próximo do Bioglass<sup>®</sup> é BV2, marcada por levar o mesmo período de tempo para que a banda de fosfato  $\nu_1$  se centrasse  $960\text{ cm}^{-1}$ .

Apesar de não demonstrarem os mesmos resultados de BV2, BV0 e BV4 tiveram sua potencial bioatividade comprovada por meio da espectroscopia Raman, com BV0 apresentando reações relativamente mais rápidas que BV4. Apesar de a HCA demorar mais para cristalizar sobre os vidros borato, a resposta destas amostras em contato com o fluido é praticamente instantânea, favorecendo a precipitação de fosfato de cálcio de forma mais rápida do que no 45S5, até a para a amostra que não continha  $\text{P}_2\text{O}_5$  em sua composição.

## 4.4 Espectroscopia no Infravermelho médio com Transformada de Fourier

### Pré-imersão

Os resultados da absorção no infravermelho das amostras borato, antes de imersão em SBF, podem ser observadas na figura 31. Para facilitar a visualização das bandas principais, estas foram demarcadas com setas indicando suas respectivas atribuições.

Os modos vibracionais referentes aos grupos borato são conhecidos por serem ativos em três regiões específicas do espectro: (a)  $1200\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ : originários de estiramentos B–O de unidades trigonais  $\text{B}\text{O}_3$  [69,72,96,97], (b)  $850\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ : originários de estiramentos B–O de unidades tetraédricas  $\text{B}\text{O}_4^-$  [69,72,96,97], (c)  $600\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ : para algumas referências originários de dobramentos de unidades borato  $\text{B}\text{O}_3$  [69,96].

Claramente identificamos quatro regiões de destaque nos espectros. Três delas se repetem para todas as amostras, com bandas centradas em torno de  $705\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas a vibrações de dobramento de unidades borato tri-coordenadas [71] [94],  $945\text{ cm}^{-1}$ , referentes a grupos di-, tri-, tetra e pentaborato [46] [94] e  $1400\text{ cm}^{-1}$ , que representa vibrações de anéis e cadeias metaborato [71]. A quarta se localiza ao redor de  $556\text{ cm}^{-1}$  e é proveniente de dobramentos P–O de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  [71] [93], sendo mais proeminente em BV4 do que

em BV2, e ausente em BV0, acordando com a concentração crescente de  $P_2O_5$  nestas amostras.

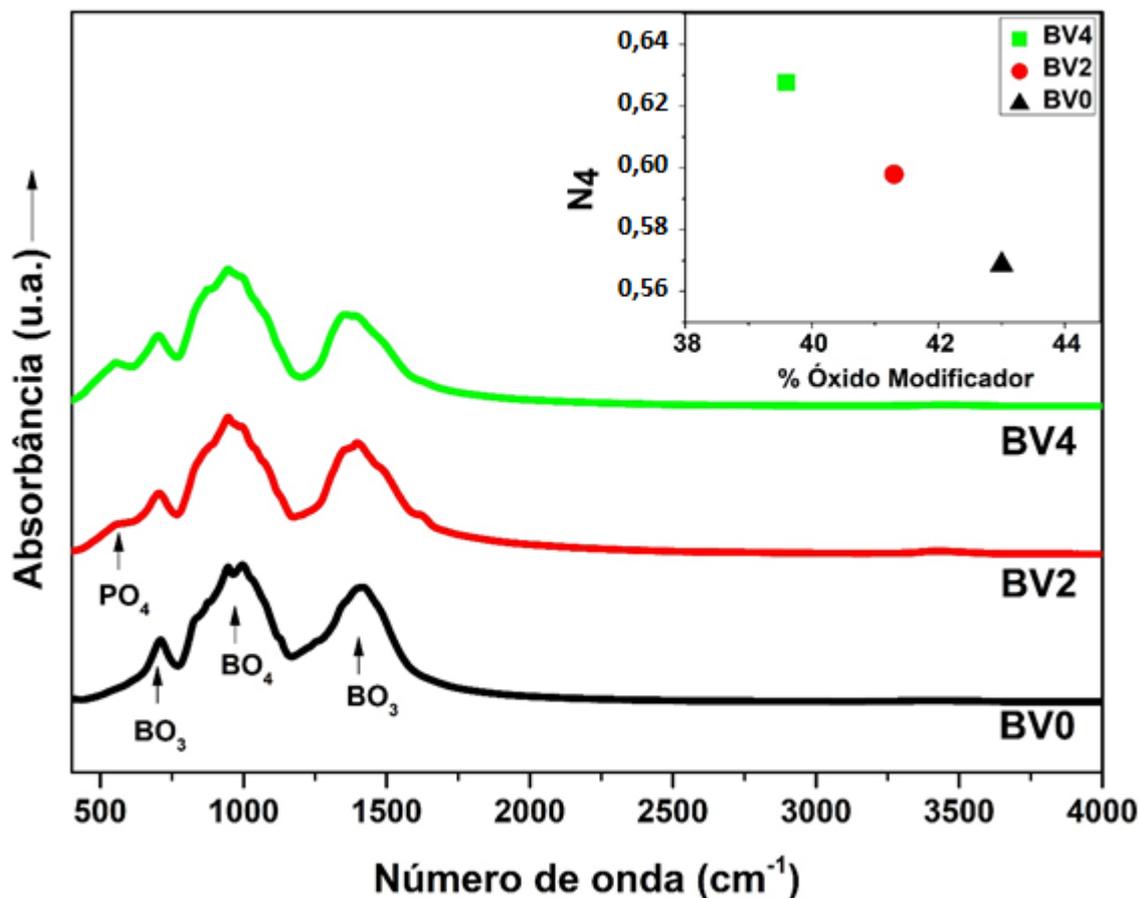


Figura 31: Espectros de absorção de infravermelho dos vidros antes de serem postos em imersão em SBF. No canto superior direito é exposta a relação entre o número de unidades borato quadri-coordenadas e a porcentagem molar de óxidos modificadores nos vidros, calculadas por meio da equação 11.

Assim como na espectroscopia Raman, a espectroscopia de infravermelho permite notarmos a presença de superestruturas borato devido à anomalia do boro, e ao mesmo tempo, vibrações provenientes de unidades  $PO_4$ . Porém não foi possível observar o modo vibracional das ligações de B-O-P nas amostras BV2 e BV4.

Podemos estimar a fração de boros quadri-coordenados  $N_4$  nos vidros boratos por meio da equação 11 [79,98]. Para tal utilizamos o método de integração das áreas que compreendem as regiões entre 770-1170 ( $A_4$ ) e 1170-1500 ( $A_3$ )  $cm^{-1}$ , correspondentes às vibrações de unidades  $B\bar{O}_4^-$  e  $B\bar{O}_3$ , respectivamente.

$$N_4 = \frac{A_4}{A_3 + A_4} \quad (11)$$

O comportamento de  $N_4$  em função dos óxidos modificadores da composição dos vidros borato pode ser visto no detalhe da figura 31. Observamos que a medida que a concentração molar dos óxidos modificadores aumenta,  $N_4$  diminui, ou seja, o número de boros quadri-coordenados é crescente com  $BV0 < BV2 < BV4$ , tal como mostraram os valores estimados nos resultados de DSC.

### **Pós-imersão em SBF**

Da figura 32 à 34 é exposta a evolução temporal dos espectros da camada crescida sobre as amostras borato após os diferentes períodos de imersão em SBF, além do espectro da HA sintética para comparação. As bandas referentes à HA foram discriminadas com suas respectivas atribuições.

Tomando como ponto de partida os resultados de BV0, observamos que as mudanças mais significativas aparecem após as primeiras 96 horas de imersão. É possível notar que as bandas entre  $650-750 \text{ cm}^{-1}$  e  $1280-1560 \text{ cm}^{-1}$ , decrescem em intensidade gradativamente com o aumento do tempo de imersão, enquanto outra surge em torno de  $500-640 \text{ cm}^{-1}$ , com dois centros em  $565$  e  $602 \text{ cm}^{-1}$ . A banda entre  $760-1280 \text{ cm}^{-1}$  é substituída por outra na mesma região, porém com o centro em  $1027 \text{ cm}^{-1}$  e a forma da banda diferente, contendo ombros em  $880$  e  $960 \text{ cm}^{-1}$ . Este processo é contínuo e, ao final dos 28 dias, apresenta a acentuação das mudanças já citadas, além do crescimento de bandas com centros em  $1430$  e  $1480 \text{ cm}^{-1}$ .

Embora apresente mudanças espectrais semelhantes a BV0, após os períodos de imersão, BV2 as desenvolve com apenas 24 horas. Diferenças também podem ser notadas na distinção das bandas em  $565$  e  $602 \text{ cm}^{-1}$ , a qual ocorre com 48 horas de imersão para esta amostra, e na posição das bandas em  $873$  e  $956 \text{ cm}^{-1}$ , deslocadas em relação a BV0.

Complementando os resultados, BV4 foi a amostra que apresentou as mudanças mais rápidas com o procedimento *in vitro*. Após uma hora de imersão, as bandas originais do vidro têm sua forma bastante alterada e, com três horas, surge uma nova banda com centro em torno de  $1037 \text{ cm}^{-1}$ , e ombros em  $873$  e  $952 \text{ cm}^{-1}$ . Também notamos mudanças semelhantes a BV0 e BV2 nas regiões entre  $650-750 \text{ cm}^{-1}$  e  $1280-1560 \text{ cm}^{-1}$ . No entanto, prolongado o tempo de exposição ao SBF, não é possível evidenciar nenhuma outra alteração significativa para esta amostra.

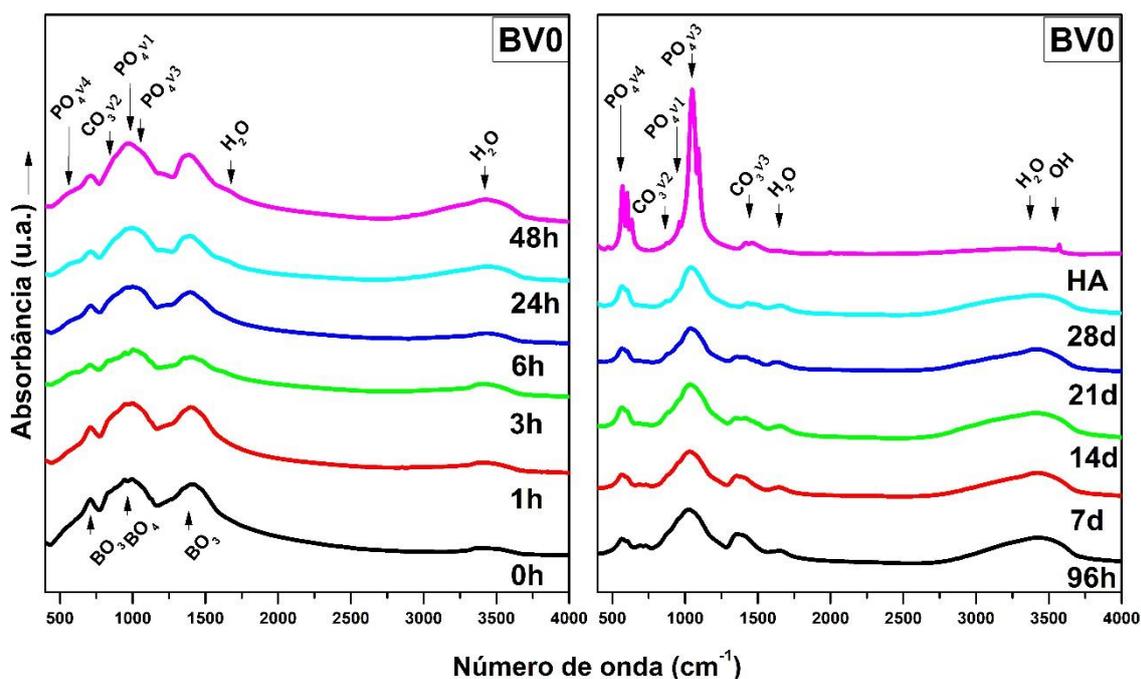


Figura 32: Espectros de absorção de infravermelho da camada crescida na superfície de BV0 durante os dez períodos de imersão. Para comparação são expostos os espectros do vidro antes ser posto em imersão e da HA sintética.

A primeira nota a ser tomada sobre os resultados da absorção no infravermelho, trata da semelhança dos espectros das primeiras horas de imersão com os dos vidros antes do contato com o fluido. Sabendo que as amostras foram obtidas pela raspagem da camada crescida sobre a superfície dos vidros, é possível que partes destes também tenham sido removidas, contribuindo nos espectros pós imersão em SBF. Isso é mais evidente para BV0, pois, por ser a amostra com menor quantidade de  $P_2O_5$  na composição, pode ser a que leva mais tempo para ter a deposição de fosfato de cálcio em sua superfície [73].

As bandas que crescem em torno de 565 e 602  $cm^{-1}$  são atribuídas a modos  $\nu_4$  triplamente degenerados de dobramentos O-P-O em íons  $PO_4^{3-}$  [34,85,96]. O seu surgimento é tido como a comprovação da formação da HCA [34,72,73,97]. No entanto, elas não aparecem de forma igual para as três amostras, como pode ser visto na figura 35. Apesar de ter as variações mais rápidas no espectro, BV4 não desenvolve com clareza a banda em 602  $cm^{-1}$ . A definição desta banda é dada como uma medida da cristalinidade da HCA formada [99,100,101]. A ausência dela ou sua presença em forma de ombro, pode representar uma HCA pouco cristalina ou uma fase amorfa precursora de sua formação, como o fosfato de cálcio amorfo (ACP) [72,73].

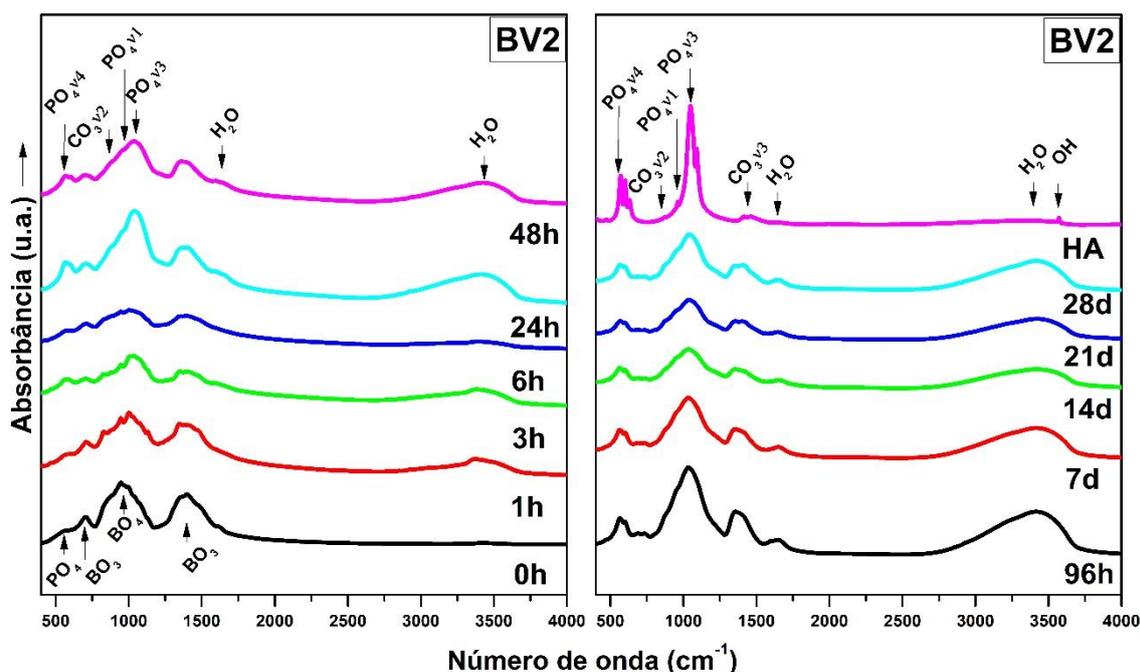


Figura 33: Espectros de absorção de infravermelho da camada crescida na superfície de BV2 durante os dez períodos de imersão. Para comparação são expostos os espectros do vidro antes ser posto em imersão e da HA sintética.

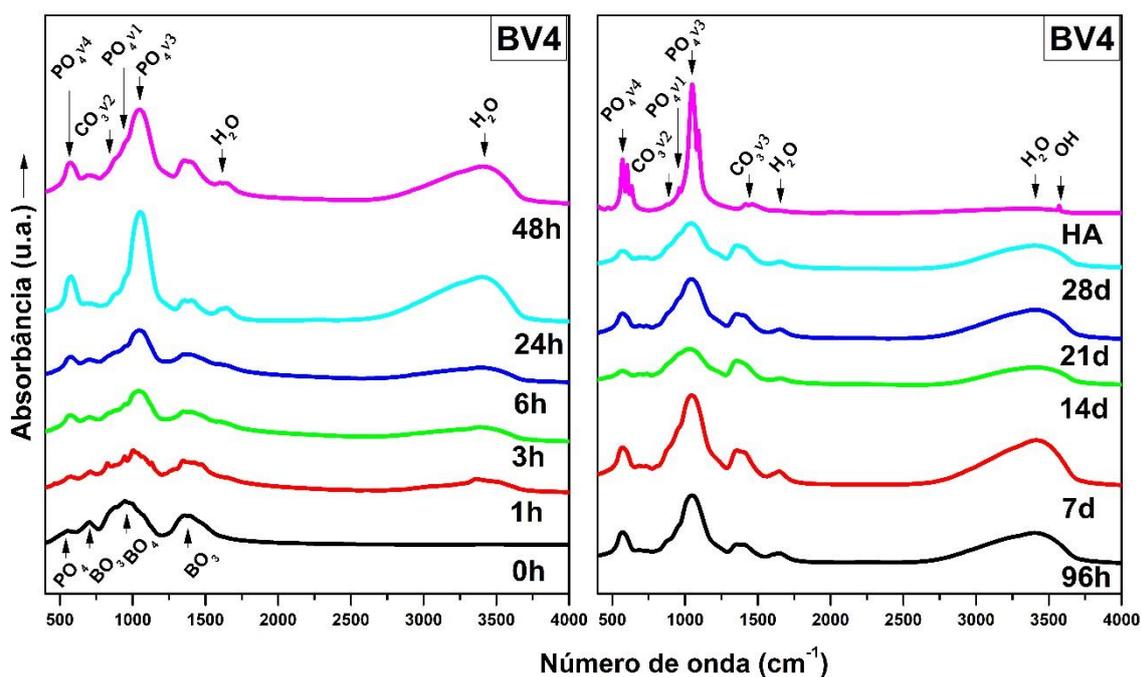


Figura 34: Espectros de absorção de infravermelho da camada crescida na superfície de BV4 durante os dez períodos de imersão. Para comparação são expostos os espectros do vidro antes ser posto em imersão e da HA sintética.

Também podemos notar que a banda centrada em  $1027\text{ cm}^{-1}$ , com ombro adjacente próximo a  $955\text{ cm}^{-1}$ , fica mais proeminente em função do tempo de imersão nas três amostras de borato. Tais contribuições são atribuídas a estiramentos P-O de grupos  $\text{PO}_4^{3-}$ , de

modo  $\nu_3$  degenerado e  $\nu_1$  não degenerado, respectivamente [32,85], e podem ser correlacionadas a melhor formação da HCA.

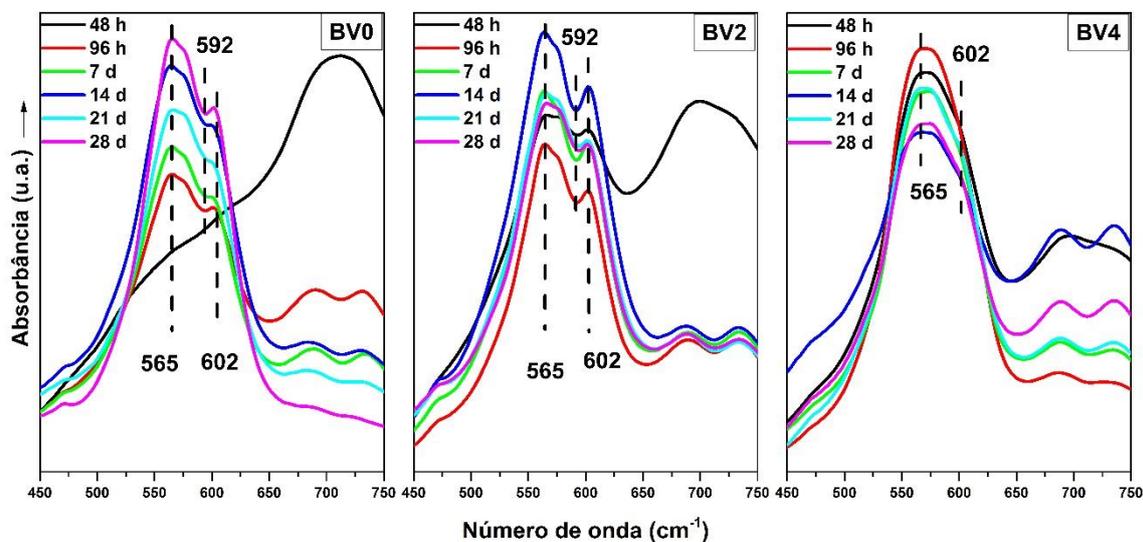


Figura 35: Ampliação da região correspondente a formação das bandas de fosfato  $\nu_4$  para os espectros normalizados das três amostras, durante os períodos de imersão compreendidos entre 48 horas e 28 dias.

Todas as amostras apresentaram o crescimento de um ombro em  $873\text{ cm}^{-1}$ , atribuído a modos  $\nu_2$  de dobramentos de ligações C-O em íons  $\text{CO}_3^{2-}$  [17]. Estes íons podem ser incorporados à célula unitária no lugar de  $\text{OH}^-$  e responsáveis por substituições do tipo A, assim como também podem ser provenientes da adsorção de compostos de carbonato à superfície da amostra [102,103]. Além disso, BV0 é o único que apresenta bandas de carbonato com centros aproximados de  $1430$  e  $1480\text{ cm}^{-1}$ , referentes a modos  $\nu_3$  de estiramentos de ligações C-O em íons  $\text{CO}_3^{2-}$  [32,103], responsáveis por substituições tipo B, quando os carbonatos ocupam sítios  $\text{PO}_4^{3-}$  [102]. É possível que esse grupo também esteja presente nos vidros BV2 e BV4, porém em menor quantidade e com suas bandas deslocadas para números de onda menores.

Após o procedimento *in vitro*, bandas correspondentes a água ganham destaque nos espectros, podendo ser resultado da hidrólise que ocorre durante as trocas iônicas entre o vidro borato e o fluido [73]. De forma geral, todas as transformações que ocorrem na superfície dos vidros tendem a fazer seu espectro convergir ao da HCA [32]. Como citado na literatura, esta é a característica principal que denota a potencial bioatividade aos vidros [9,104].

Para comparar o desenvolvimento da camada de HCA formada sobre os vidros borato, podemos acompanhar a evolução dos espectros da camada nucleada sobre o 45S5, contidos na figura 36, após ele ser submetido ao mesmo procedimento *in vitro*. O espectro da amostra que precede a imersão em SBF é marcado por bandas que remetem aos grupos  $\text{SiO}_4$  presentes na estrutura do vidro silicato. As bandas em torno de 500 e 1030  $\text{cm}^{-1}$ , correspondem a vibrações de estiramentos simétricos e assimétricos de ligações Si-O-Si, respectivamente [105,106]. Ombros em 850 e 930  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas à vibrações de ligações Si-O<sub>NBO</sub> em tetraedros  $\text{SiO}_4$  com pontes de oxigênio não ligantes [104], enquanto a banda em torno de 700  $\text{cm}^{-1}$  é proveniente de dobramentos em ligações Si-O [104]. Também podemos notar vibrações correspondentes a ligações P-O em tetraedros  $\text{PO}_4$ , responsáveis pelo tênue ombro visto em torno de 600  $\text{cm}^{-1}$  [105].

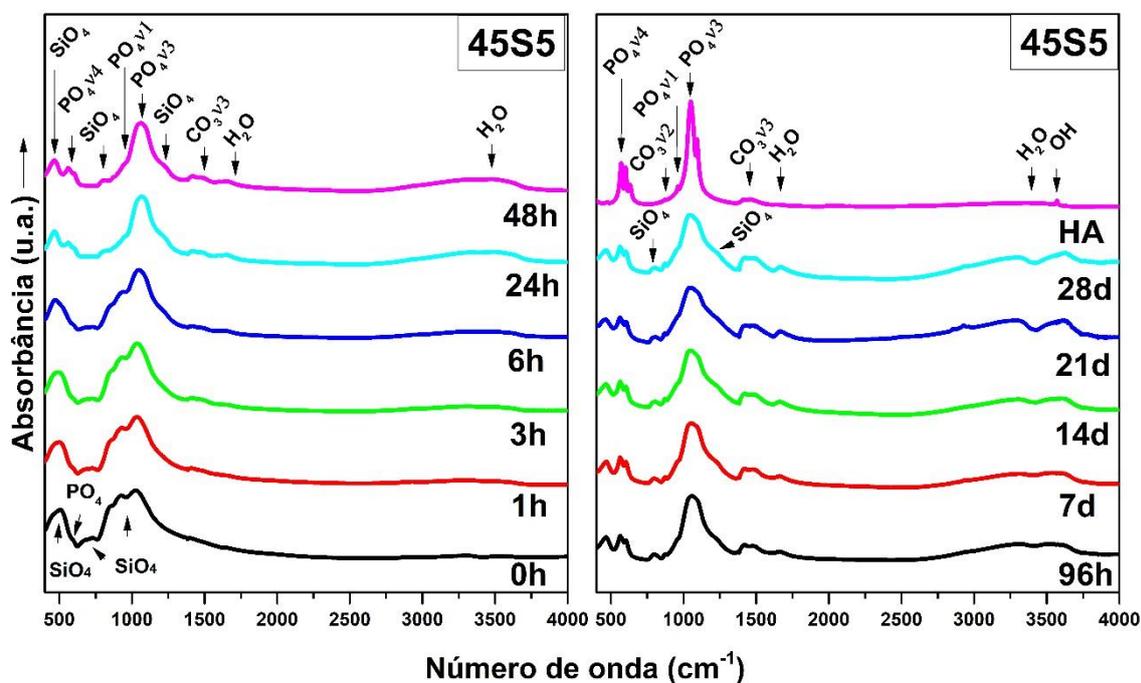


Figura 36: Espectros de absorção de infravermelho da camada crescida na superfície do 45S5 durante os dez períodos de imersão. Para comparação são expostos os espectros do vidro antes ser posto em imersão e da HA sintética.

Como mostra a figura 36, a HCA começa a sobrepor suas bandas às originárias do vidro a partir do espectro de 24 horas, já apresentando as vibrações de dobramento O-P-O, em 565 e 602  $\text{cm}^{-1}$ , bem distintas. Com o decorrer do processo, o que se nota é o surgimento das bandas de carbonato e a tendência do espectro se assemelhar cada vez mais com o da HA sintética. Além disso, algumas bandas de silicato tornam-se mais aparentes durante o processo de dissolução do vidro, como é caso daquelas próximas a 460, 1200 e 800  $\text{cm}^{-1}$ . Enquanto as duas primeiras são provenientes de estiramentos de ligações Si-O-Si em

tetraedros silicato, a terceira corresponde a camada de sílica gel que se repolimeriza no decorrer do procedimento *in vitro*, representada por dobramentos de ligações Si-O-Si [87,106].

Os resultados obtidos para o Bioglass<sup>®</sup> estão de acordo com os encontrados na literatura [99,102,104], comprovando sua grande bioatividade e rapidez no desenvolvimento de uma camada de HCA cristalina. Para avaliar o processo de cristalização das camadas de fosfato de cálcio formadas nos vidros borato e silicato, podemos realizar o cálculo do índice de cristalinidade (IC) para as amostras geradas nos diferentes tempos de imersão, maiores detalhes sobre como é feito o cálculo do IC podem ser encontrados no apêndice A, seção A.2. Pelos valores calculados para o IC, expressos no gráfico da figura 37, notamos que a cristalinidade da camada crescida sobre as amostras varia durante todo o procedimento *in vitro*, sendo marcada, provavelmente, tanto pelo desenvolvimento e organização dos cristais como pela incorporação de carbonatos a sua estrutura.

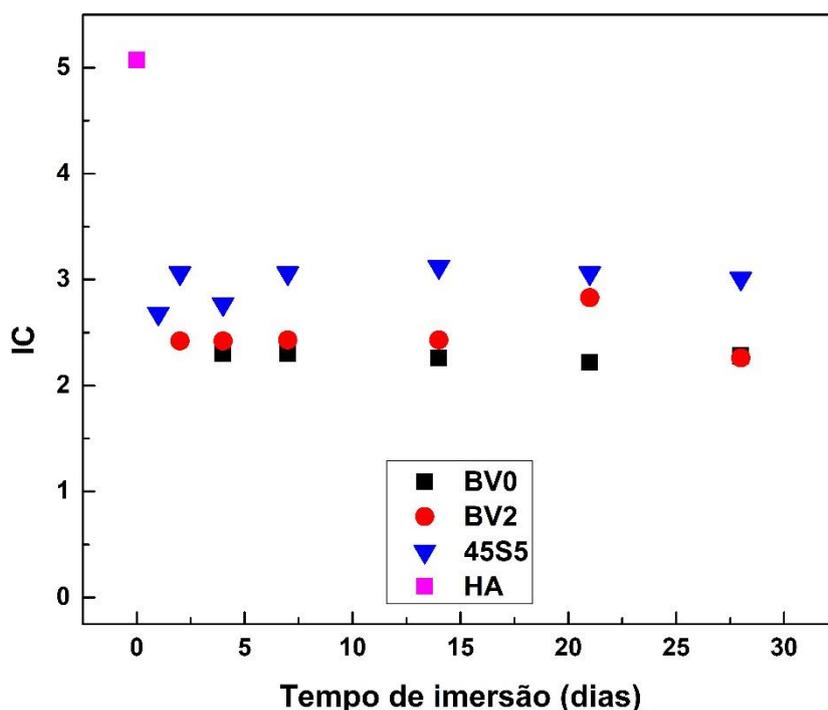


Figura 37: Gráfico relacionando os valores calculados do IC para as camadas formadas sobre os vidros borato e o 45S5 após o procedimento de imersão em SBF. Por não participar do processo de imersão, o valor calculado para a HA sintética foi posicionado para o tempo 0.

O gráfico nos mostra que o 45S5 é amostra que alcança os maiores IC's, ficando abaixo apenas do calculado para a HA sintética. Para intervalos de tempo em que permaneceram imersas em SBF, a amostra borato que desenvolveu uma HCA com o IC mais próximo dos do 45S5 foi BV2. Além disso, esta também é a amostra que primeiro da

indícios de cristalização da HCA, apenas 24 horas depois do Bioglass<sup>®</sup>. Enquanto BV0 demora 96 horas para começar a sofrer as mesmas reações de BV2, BV4 demonstrou formar a camada de fosfato de cálcio mais amorfa dentre as três, impossibilitando a estimativa de seu IC.

É importante esclarecer que ambas as análises que propomos para qualificar a cristalinidade da HCA nucleada sobre os vidros, tanto pela espectroscopia Raman quanto FTIR, são normalmente utilizadas em apatitas com grande cristalinidade [107]. Mesmo nestes casos, não há um consenso de qual o melhor critério a ser utilizado, assim como são relatadas ambiguidades quando usados simultaneamente para as mesmas amostras [33,108]. Como estamos tratando de uma apatita em processo de cristalização e carbonatação contínuo e simultâneo, é possível que essas ambiguidades sejam ressaltadas. A análise por meio da espectroscopia Raman depende do ajuste no espectro com uma função não linear, o que pode acarretar mais erros na determinação da largura a meia altura, ao passo que nos espectros de FTIR, a determinação das intensidades relativas para as bandas específicas, pode minimizar erros matemáticos. Contudo, separadamente, as duas análises facilitam a visualização de processos que se tornam difíceis de serem percebidos apenas pela observação dos espectros, devido às características das mudanças serem muito sutis.

## 4.5 Difratometria de raios-X

### Pré-imersão em SBF

Os resultados da DRX nos vidros, antes da imersão em SBF, estão expostos na figura 38. Podemos notar formas alargadas e de baixa intensidade, usualmente vistas em vidros destes tipos (boratos e silicatos) [78,105], que comprovam o caráter amorfo das amostras, garantindo que nenhuma fase cristalina foi formada durante seu processo fabricação.

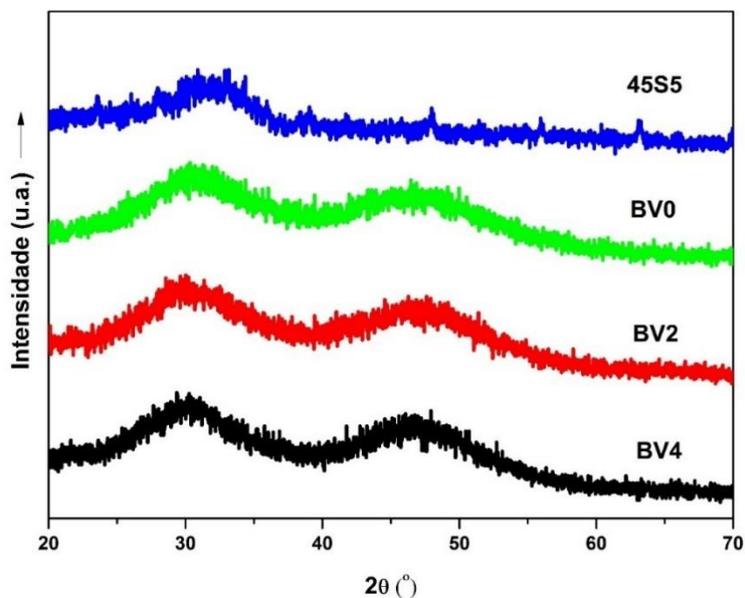


Figura 38: Difratogramas dos vidros borato e do 45S5 antes de serem postos em imersão.

### Pós-imersão em SBF

As figuras 39, 40 e 41 trazem os resultados da DRX da camada crescida sobre os vidros borato após o processo de imersão em SBF, nas quais estão expostas apenas os dados referentes as amostras imersas por 96 horas, 7, 14, 21 e 28 dias, bem como o difratograma da HA sintética para comparação. Os resultados para períodos de imersão menores não apresentaram mudanças significativas em relação ao vidro inerte, por isso não foram apresentados no trabalho.

O padrão dos difratogramas da camada crescida em BV0 apresentou as maiores diferenças em relação as das demais amostras. Para 96 horas inicia-se o desenvolvimento de picos menos intensos ao redor de  $26^\circ$  e entre  $31-34^\circ 2\theta$ . No entanto, entre o sétimo e o vigésimo primeiro dia, dois picos bem estreitos, em torno  $31$  e  $45^\circ 2\theta$ , marcados com “\*” na figura 36, dominam os difratogramas. Um terceiro pico, bem menos intenso que os primeiros, pode ser visto próximo a  $56^\circ 2\theta$  para as três amostras. No difratograma da amostra de 14 dias também podemos notar a presença pouco marcante de um pico em  $26^\circ 2\theta$ . Após o tempo final de imersão, o difratograma tende a aparentar aquele de 96 horas, exibindo bandas amorfas nas mesmas regiões.

Os difratogramas que apresentaram maior semelhança entre si, quando comparados os diferentes tempos de imersão, foram das camadas crescidas sobre BV2. Os picos aproximados de  $26$ ,  $28$ ,  $32-34$ ,  $49$  e  $53^\circ 2\theta$ , podem ser vistos para todas as amostras, com relativa melhora na definição e intensidade conforme se aumenta o tempo de exposição ao

SBF. As amostras correspondentes ao vigésimo primeiro e vigésimo oitavo dias também contém picos em torno de  $31$  e  $45^\circ 2\theta$ .

Diferente dos resultados para as duas amostras anteriores, a camada nucleada em BV4 não apresenta nenhuma mudança notável com 96 horas de imersão. As transformações nos difratogramas começam a ocorrer a partir do sétimo dia, com o surgimento de picos em torno de  $26$ ,  $32$  e  $53^\circ 2\theta$ . Essas mesmas características se reproduzem para as amostras de 14, 21 e 28 dias, mas de forma mais amorfa para esta última. Também é possível notar alguns picos, de baixa intensidade, perto de  $28$  e  $49^\circ 2\theta$  para a amostra de 21 dias, imperceptíveis naquelas de 7, 14 e 28 dias.

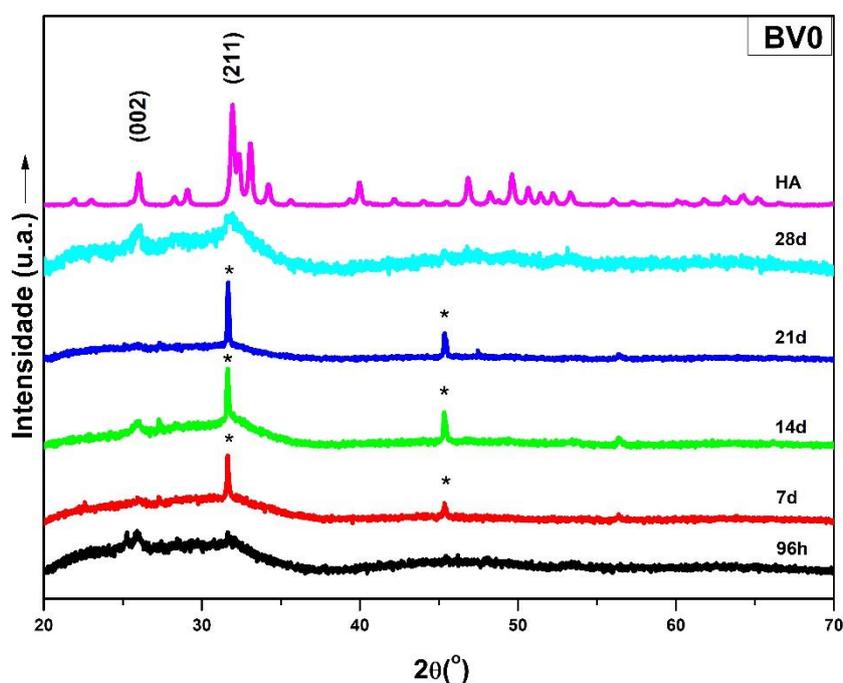


Figura 39: Difratogramas das camadas crescidas sobre as amostras do vidro BV0 após o processo de imersão por 96 horas (h), 7, 14, 21 e 28 dias (d). O difratograma da HA está exposto para comparação, e (\*) representa a Halite. Apenas os planos cristalográficos correspondentes a HA e vistos na nas amostras da camada crescida sobre os vidros, são demarcados

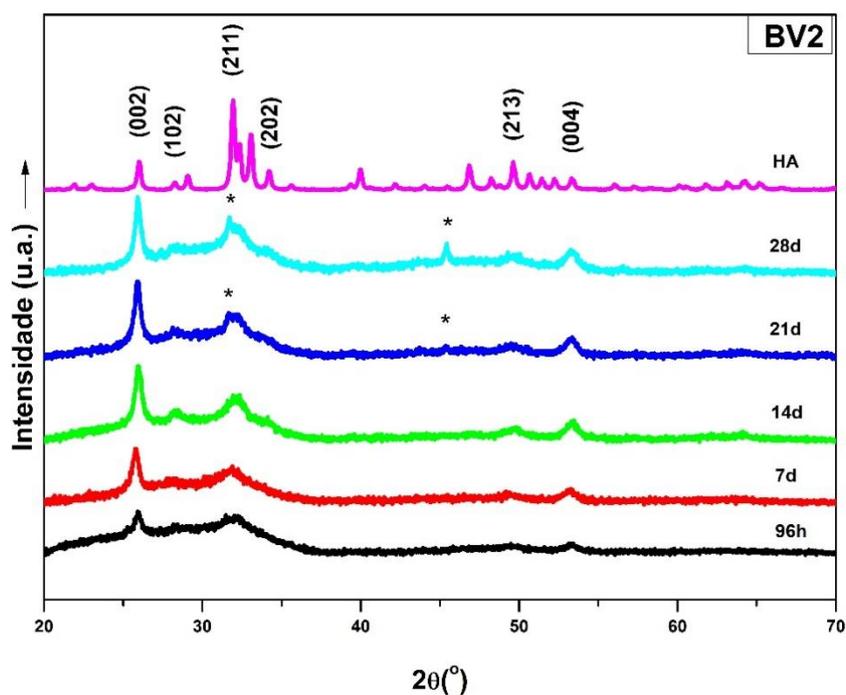


Figura 40: Difratogramas das camadas crescidas sobre as amostras do vidro BV2 após o processo de imersão por 96 horas (h), 7, 14, 21 e 28 dias (d). O difratograma da HA está exposto para comparação, e (\*) representa a Halite. Apenas os planos cristalográficos correspondentes a HA e vistos nas amostras da camada crescida sobre os vidros, são demarcados.

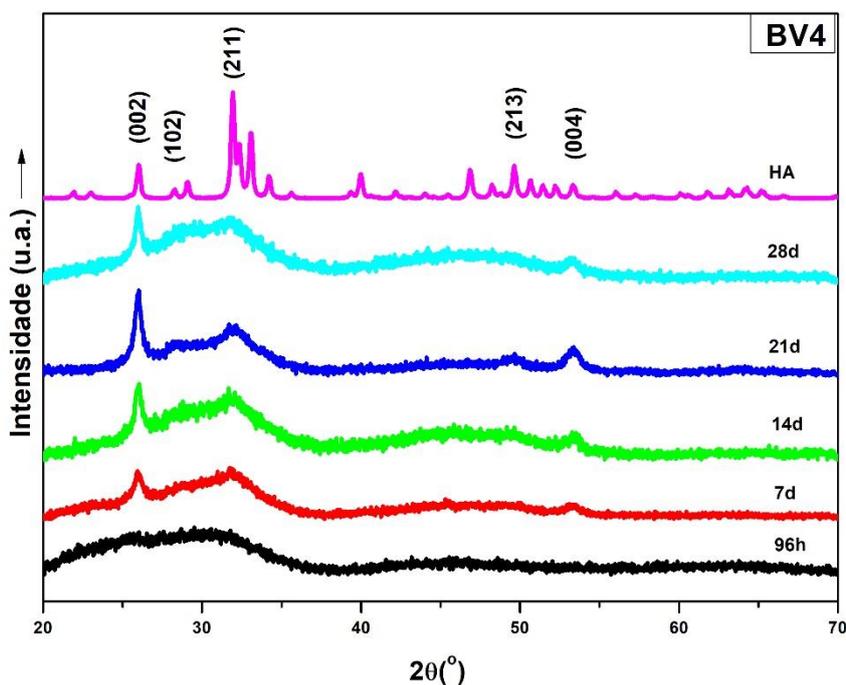


Figura 41: Difratogramas das camadas crescidas sobre as amostras do vidro BV4 após o processo de imersão por 96 horas (h), 7, 14, 21 e 28 dias (d). O difratograma da HA está exposto para comparação. Apenas os planos cristalográficos correspondentes a HA e vistos nas amostras da camada crescida sobre os vidros, são demarcados.

A difratometria de raios-X é uma das técnicas mais comuns para caracterização de materiais cristalinos, e é extensivamente utilizada no estudo de apatitas e outros materiais biomédicos [102]. Entretanto, devido à baixa intensidade do sinal proveniente da fina camada de HCA, sua utilização é limitada para análise de bioatividade [95,102]. Contudo, os resultados de DRX nos permitem atestar a formação de uma nova substância sobre a superfície dos vidros borato, tendo em vista que seu difratograma amorfo começa a ter a presença de diferentes picos. A confirmação de que esta substância se trata da HCA pode ser feita pela identificação daqueles próximos a 26, 28, 32, 34, 49 e 53 ° 2 $\theta$ , referentes aos planos cristalográficos (002), (102), (211), (202), (213) e (004), respectivamente (JCPDS 09-0432). Os picos largos e de baixa intensidade podem indicar uma HCA pouco cristalina, com cristais de escala nanométrica ou uma combinação dos dois fatores [9,32]. Para tempos inferiores a 96 horas a técnica de DRX não se mostrou sensível o suficiente para detectar a HCA, possivelmente devido a pequena quantidade dessa substância crescida na superfície das amostras vítreas, além do seu caráter ainda muito amorfo. Talvez uma readequação da técnica, utilizando o modo de difratometria de raios-X em filmes finos, possa melhorar a detecção da HCA [9,102].

Apesar dos resultados de DRX possuírem certas limitações, ainda contêm informações importantes. Com respeito aos resultados de 7, 14 e 21 dias da amostra BV0, os picos mais intensos que se sobrepõem aos que começam a se formar com 96 horas, são identificados como sendo originários da Halite (JCPDS 05-0628). A halite pode se formar na superfície do vidro graças a liberação de íons Na<sup>+</sup> do próprio material, e íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> presentes no SBF [68]. Deliormanlı e colaboradores [72] relatam que estes resquícios podem permanecer após o procedimento de limpeza da amostra com água destilada. Passados os 28 dias de imersão, no entanto, os picos da HCA voltam a tomar forma, indicando que não houve formação de halite para esta amostra.

A formação de halite também pode ser notada em BV2. Embora de forma menos evidente do que em BV0, os picos referentes aos ângulos de Bragg em 31 e 45 ° 2 $\theta$  estão presentes, porém, neste caso, a HCA se sobrepõe. BV2 também é a amostra que apresenta a formação de uma HCA aparentemente menos amorfa, respaldado pela observação de picos mais estreitos e definidos [9,32]. Para todas as amostras o pico referente a 26 ° 2 $\theta$  é o mais proeminente, o que pode indicar uma direção preferencial de crescimento no eixo cristalográfico “c”, família {001} [102].

Tal como foi realizado para as técnicas de caracterização anteriores, comparamos o comportamento, pós-imersão em SBF, dos vidros borato com o 45S5. Os difratogramas das camadas crescidas sobre as amostras do 45S5 podem ser vistos na figura 42, e estão de acordo com os resultados encontrados na literatura [99]. São observados picos mais intensos em torno de  $26^\circ$ , entre  $32-34^\circ$  e em  $53^\circ 2\theta$ , além de picos menos intensos em torno de  $39$  e  $49^\circ 2\theta$ , todos referentes a planos cristalográficos da HA e especificados na figura (JCPDS 09-0432), porém, mais alargados.

Além dos picos relativos a HA, em alguns difratogramas também é possível notar outros dois. Um deles têm a presença demarcada em  $29^\circ 2\theta$ , e surge a partir dos difratogramas da amostra imersa por 7 dias. Este fenômeno é noticiado na literatura [34,71] e pode ser produto da formação de calcite, que ocorre devido a liberações de altas quantidades de cálcio no fluido, resultando em grandes valores de razão Ca/P e provocando a deposição de  $\text{CaCO}_3$  sobre o vidro [72].

Também pudemos notar que, assim como visto para os vidros borato, o pico em  $26^\circ 2\theta$  aparece como o mais intenso nos difratogramas de períodos curtos de imersão, indicando que a precipitação da HCA ocorre com a mesma direção preferencial [102]. Entretanto, diferente dos demais vidros, para tempos maiores essa direção preferencial é reduzida, e o crescimento contínuo acontece de maneira aleatória, se aproximando do difratograma visto para HA sintética.

Quando comparamos os dados de DRX obtidos dos vidros borato e do 45S5, notamos que alguns pontos corroboram com resultados das espectroscopias de FTIR e Raman. De forma resumida, as técnicas apontam BV2 com resultados mais próximos aos do 45S5, bem conhecido vidro bioativo, enquanto BV0 e BV4 apresentam características menos cristalinas que BV2. A análise feita por meio da DRX também sugere BV4 como a amostra que leva mais tempo para formar uma camada HCA em sua superfície. Percebemos isto pelo seu difratograma de 96 horas, o qual é ausente de picos que possam indicar o início da nucleação. Para tempos prolongados, no entanto, os difratogramas se assemelham aos de BV2, porém aparentam ser menos cristalinos. As amostras dos vidros borato imersas por 28 dias parecem relativamente mais amorfas do que as imersas por 21 dias, o que pode ser decorrente de substituições ocorridas na estrutura da HCA.

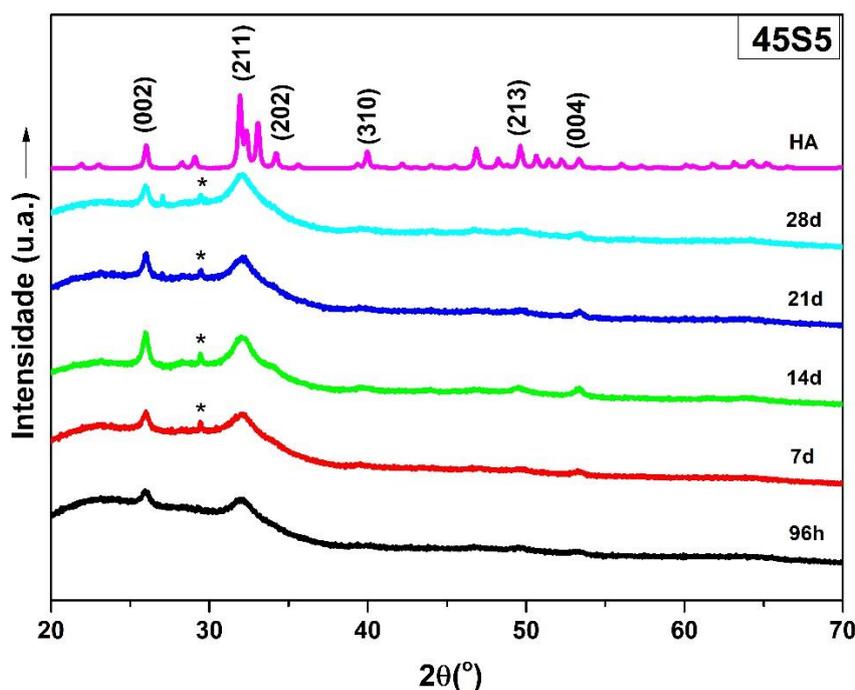


Figura 42: Difratogramas das camadas crescidas sobre as amostras do vidro 45S5 após o processo de imersão por 96 horas (h), 7, 14, 21 e 28 dias (d). O difratograma da HA está exposto para comparação, junto das demarcações para a calcite (\*). Apenas os planos cristalográficos correspondentes a HA e vistos na nas amostras da camada crescida sobre os vidros, são demarcados

## 4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Nas figuras 43, 44, 45 e 46, estão expostas as imagens de MEV da superfície dos vidros antes da imersão em SBF e da camada crescida em suas superfícies após 96 horas, 7 e 28 dias de imersão.

Entre os vidros borato, as mudanças morfológicas observadas em suas superfícies, após imersão em SBF, são muito similares, e marcadas pelo surgimento de cristais em forma de esferoides [96], com diâmetro entre 0,25-3,33  $\mu\text{m}$ . Embora a formação da HCA não possa ser atestada apenas pelas imagens de MEV, por comparação com trabalhos encontrados na literatura é possível especular que as estruturas crescidas na superfície dos três vidros borato são indicadores da presença da HCA [32,35,39], as quais tendem a mudar de tamanho e configuração espacial conforme se aumenta o tempo de exposição ao SBF, o que pode denotar o caráter continuado de seu processo de formação [32].

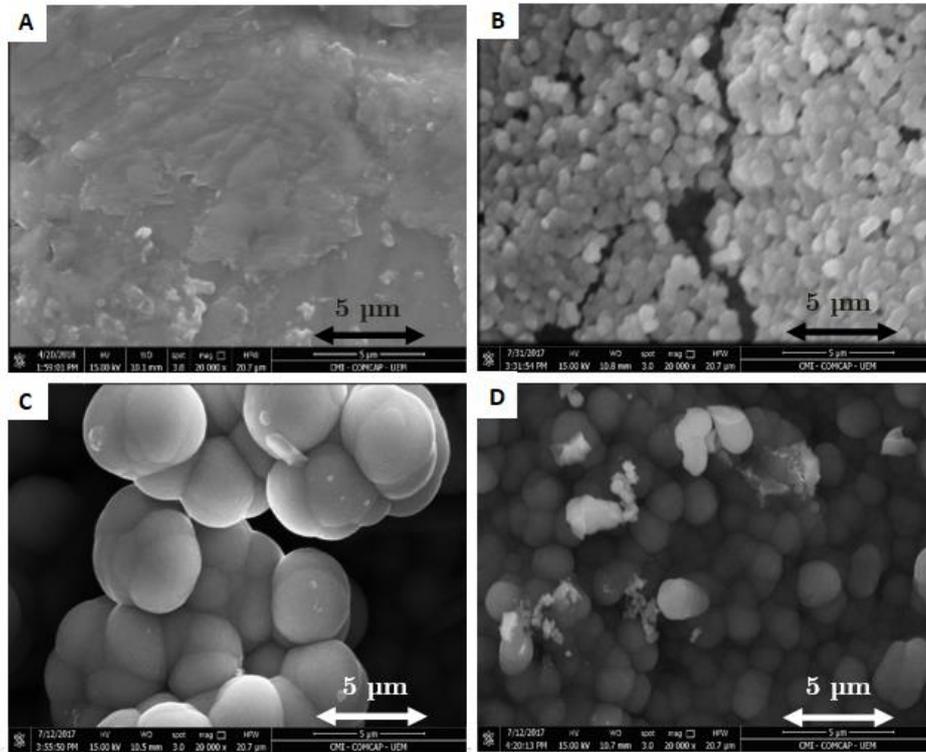


Figura 43: Imagens de MEV com magnificação de 20000x da superfície da amostra BV0 antes de imersão (A), e da camada acrescida nela depois de 96 horas (B), 7 (C) e 28 dias (D).

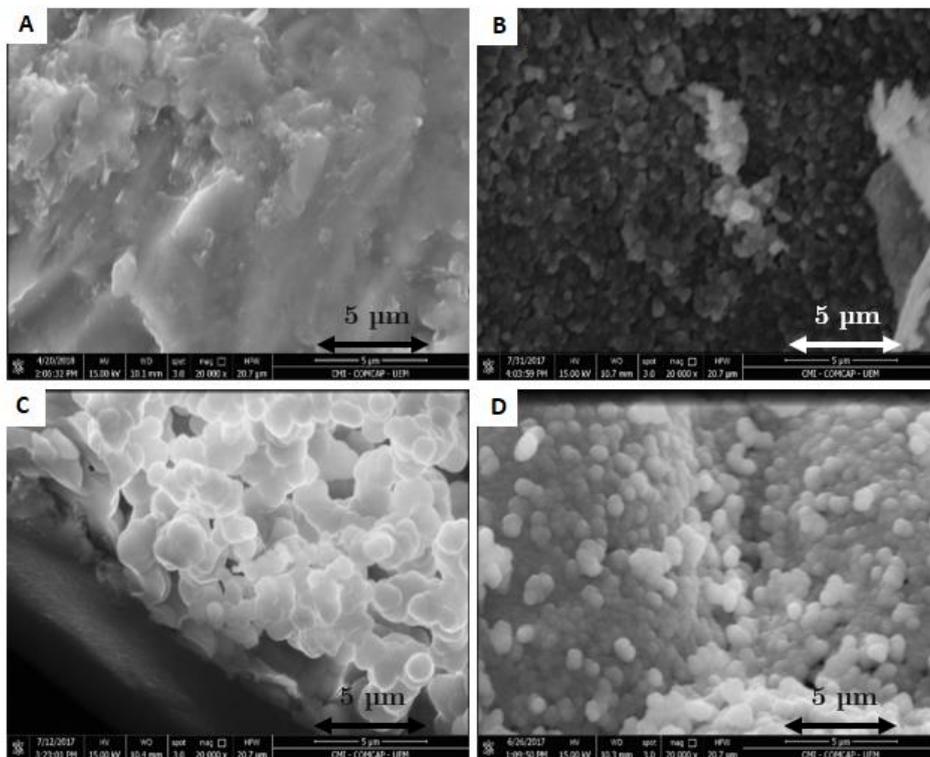


Figura 44: Imagens de MEV com magnificação de 20000x da superfície da amostra BV2 antes de imersão (A), e da camada acrescida nela depois de 96 horas (B), 7 (C) e 28 dias (D).

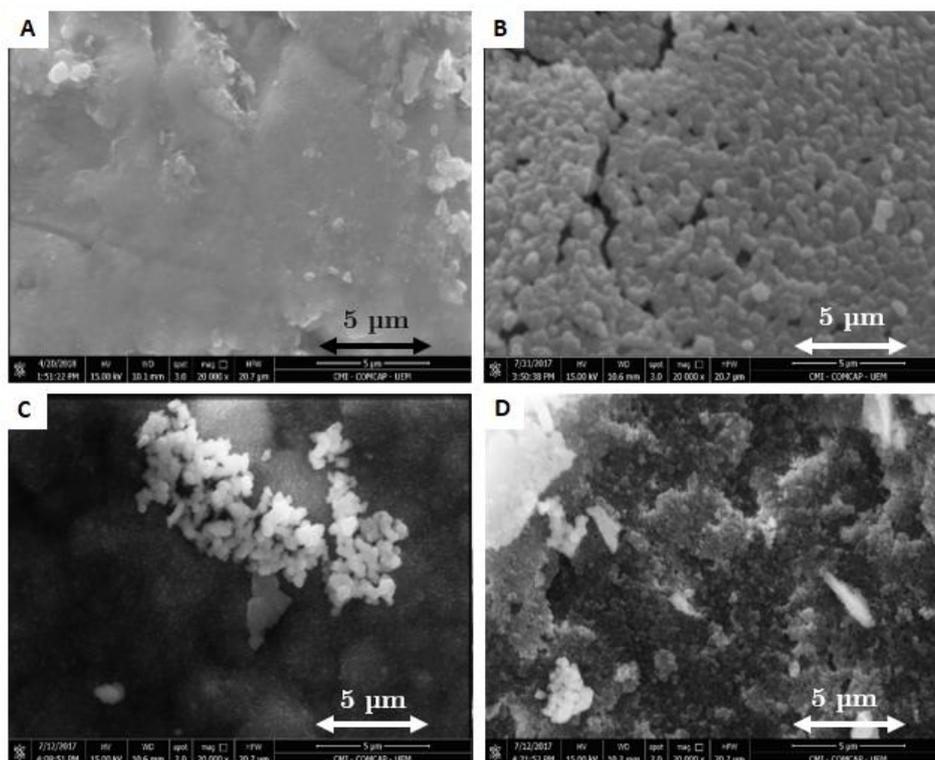


Figura 45: Imagens de MEV com magnificação de 20000x da superfície da amostra BV4 antes de imersão (A), e da camada acrescida nela depois de 96 horas (B), 7 (C) e 28 dias (D).

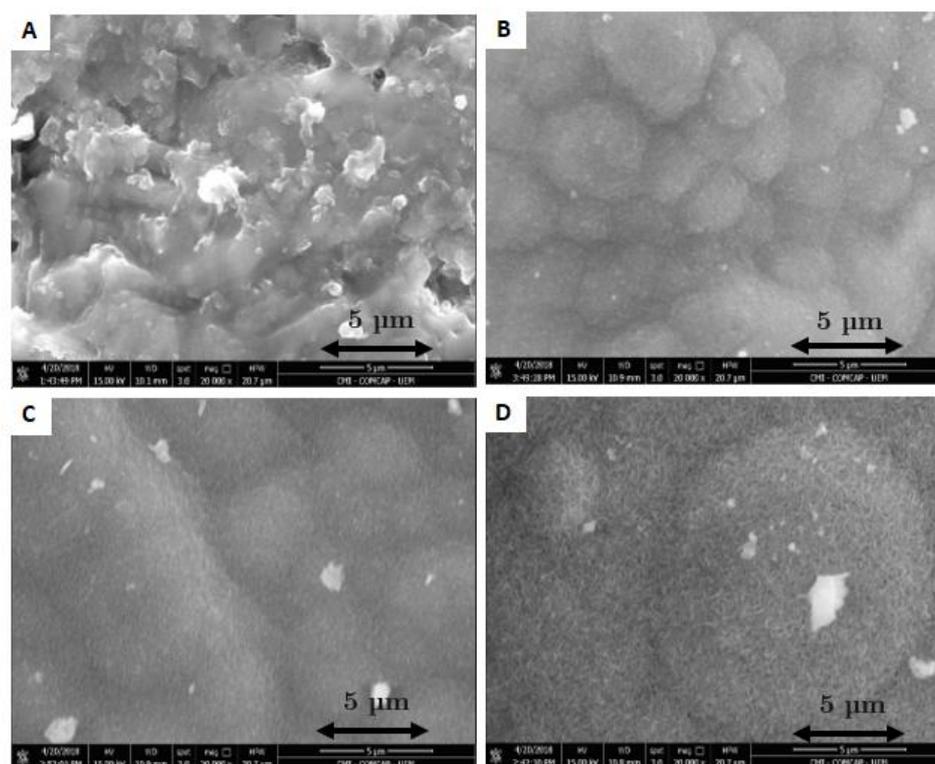


Figura 46: Imagens de MEV com magnificação de 20000x da superfície da amostra 45S5 antes de imersão (A), e da camada acrescida nela depois de 96 horas (B), 7 (C) e 28 dias (D).

Diferente da camada crescida vista sobre os vidros borato pós imersão em SBF, os cristais formados sobre o 45S5 apresentam morfologia mais planar, que se aglomera em estruturas esféricas maiores, porém mais porosas, e que vão crescendo conforme o tempo de exposição ao SBF aumenta. Essa morfologia é comumente encontrada para HCA nucleada no Bioglass® [6,109]. As distinções na forma da HCA que cresce nos vidros analisados podem decorrer de variações em fatores como composição da amostra [9] e pH [110] do SBF durante o procedimento de imersão. No estudo de vidros borosilicato com diferentes concentrações de boro e silício, feito por Yao e colaboradores [9], foi observada a mudança na forma da HCA nucleada sobre os vidros depois de imersos em SBF. Em suas imagens de MEV fica clara a transição de uma morfologia de cristais mais planares para uma mais compacta e com contornos arredondados, conforme vão sendo alteradas as quantidades  $\text{SiO}_2$  por  $\text{B}_2\text{O}_3$  nas composições dos vidros.

Os resultados das imagens realizadas com o MEV servem como uma análise complementar às demais técnicas. Elas corroboram para mostrar que com 96 horas de imersão já é possível perceber o surgimento de uma camada morfologicamente muito semelhante a HCA, mas não permite inferir nenhuma distinção entre as amostras borato, apenas ajuda atestar a potencial bioatividade dos vidros desenvolvidos neste trabalho.

# Conclusões

Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível avaliar os sistemas vítreos  $60\text{B}_2\text{O}_3\text{-}5\text{CaF}_2\text{-(}20\text{-}x\text{)Na}_2\text{O-(}15\text{-}x\text{)CaO}_2x\text{P}_2\text{O}_5$  ( $x = 0, 1, 2$ , em % de massa) tanto com relação a caracterização quanto à bioatividade em ensaio *in vitro*.

Pelas análises precedentes a imersão em SBF foi possível obter características térmicas, vibracionais e cristalográficas das três amostras de vidro borato. A técnica de DRX mostrou estrutura amorfa para os vidros borato, comprovando que nenhuma fase cristalina foi formada durante os processos de confecção dos mesmos.

Por meio da técnica de DSC observamos que a adição de  $\text{P}_2\text{O}_5$  à composição dos vidros, a qual ocorre à custa da subtração de  $\text{CaO}$  e  $\text{Na}_2\text{O}$ , torna maiores os valores de  $T_g$  e do coeficiente de Hruby da amostra, enrijecendo a rede vítrea e aumentando seu GFA. Porém, o  $\Delta T$  dos vidros não seguiu esta tendência, e apresentou o maior valor para a amostra BV2, a qual contém 2% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  (em massa) em sua composição, seguido por BV4 e BV0, respectivamente.

As espectroscopias vibracionais Raman e FTIR mostraram que os vidros borato possuem superestruturas coexistentes devido à anomalia do boro, e que a concentração destas depende da adição de  $\text{P}_2\text{O}_5$  à composição, e conseqüentemente da diminuição da concentração molar dos óxidos modificadores. Cabe destacar que, com a espectroscopia Raman, notamos que a formação de ligações B-O-P nas estruturas dos vidros borato aumentava com a adição de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , enquanto algumas superestruturas diminuía. Já com a técnica de FTIR, observamos que as unidades quadri-coordenadas aumentavam com a adição de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , e assim reduziam o número de unidades borato com NBO's.

Após o teste *in vitro*, com a imersão das amostras em SBF por diferentes períodos de tempo, as mesmas técnicas experimentais foram utilizadas para avaliação da bioatividade, exceto a análise térmica. Nesta etapa pós-imersão, os comportamentos dos vidros borato foram comparados ao vidro silicato 45S5 e a hidroxiapatita sintética. O pH do fluido foi medido após cada período de imersão, apresentando um aumento com o tempo para todos os vidros e sugerindo uma relação com a dissolução das amostras. BV2 e BV4 apresentaram variações de pH mais próximas às do 45S5, o que pode indicar que estas amostras gerariam menos riscos de serem nocivas em aplicações *in vivo*.

A análise dos resultados de Raman, FTIR e DRX em função do tempo de imersão dos vidros apresentaram algumas distinções entre si. Para BV0, tanto a espectroscopia Raman quanto FTIR mostraram a formação da camada de HCA após 96 horas de imersão em SBF. No entanto, nos espectros Raman foi observado a formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfo já em 1 hora de contato com o fluido. Os resultados de DRX apresentaram a presença da halite sobre o vidro, mas corroboram que a formação ainda muito amorfa da HCA também se inicia após 96 horas.

Os resultados das espectroscopias Raman e FTIR para BV2, demonstraram que esta amostra já tem a presença de uma camada de HCA mais cristalizada em sua superfície após 48 horas de imersão. Entretanto, tal como visto para BV0, os espectros Raman de 1 hora já denotam a formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfo. Os difratogramas de BV2 são os que permitem a melhor visualização dos picos da HCA entre os vidros borato, a partir de 96 horas de imersão.

Os espectros Raman da amostra BV4 apresentaram os mesmos comportamentos dos demais vidros borato, entretanto sua cristalização só ocorre após 7 dias de contato com o fluido. Em contraponto, os resultados de FTIR não mostraram a cristalização da HCA em nenhum período. Os difratogramas das amostras BV4 concordam com a espectroscopia Raman, e apresentaram picos referentes a HCA após 7 dias de imersão em SBF.

Os métodos utilizados para averiguar a cristalinidade da HCA formada sobre os vidros borato mostraram certa ambiguidade entre si, pois não apresentam o mesmo padrão nas análises feitas por espectroscopia Raman e FTIR. Tais cálculos sofrem influências da metodologia matemática empregada, todavia forneceram informações acerca do processo de crescimento de cristais e incorporação de carbonatos, que possivelmente ocorrem concomitantemente, causando as variações de cristalinidade.

Comparados ao Bioglass<sup>®</sup>, o vidro que apresentou os melhores resultados foi BV2. Embora seja difícil obter uma informação precisa sobre a cristalinidade da HCA formada nas condições do teste *in vitro*, BV2 apresentou os espectros Raman, FTIR e os difratogramas mais similares aos demonstrados pelo 45S5. Além disso, ele é o vidro que propicia a formação mais rápida de uma HCA cristalina, sendo esse um fator diretamente ligado ao índice de bioatividade de um material.

Embora não apresentem os mesmos resultados de BV2, BV0 e BV4 demonstram sua potencial bioatividade e rápida reação na formação de uma camada de fosfato de cálcio

amorfo, com taxas superiores às do 45S5. Além disso, as três composições borato desenvolvidas neste trabalho possuem propriedades térmicas mais vantajosas que o Bioglass® quando se trata da produção de fibras e *scaffolds*. Isso nos mostra que, de acordo com a aplicação a qual se deseja investir, BV0, BV2 e BV4 podem ser utilizados como vidros bioativos tão promissores quanto o 45S5.

# Perspectivas para estudos futuros

A experiência adquirida durante todos os estudos com vidros bioativos talvez seja o maior legado deste trabalho. Ela nos permite, hoje, avaliar com cautela os melhores passos a serem tomados para compor um procedimento mais completo de caracterização e avaliação da bioatividade destes materiais.

Tratando especificamente dos vidros abordados neste trabalho, é necessário elucidar alguns aspectos ainda pouco esclarecidos sobre as amostras, além de realizar experimentos que podem expandir o conhecimento sobre a melhor forma de aplicação destas composições.

Talvez o primeiro teste a ser feito seja submeter o SBF utilizado no procedimento *in vitro* à técnica de Absorção Atômica, juntamente da realização de medidas de perda de massa das amostras. Em conjunto com as medidas de pH do fluido, os resultados destes procedimentos permitirão uma avaliação mais completa dos processos desencadeados durante a dissolução das amostras.

Outro passo a ser tomado trata de repetir os mesmos procedimentos realizados neste trabalho para as amostras trituradas em diferentes tamanhos de grãos. Tendo em vista que inúmeras aplicações de vidros bioativos são feitas nesta condição, é importante avaliar como o tamanho de partícula interfere na bioatividade do material.

Baseando-se na ideia de simular uma condição mais próxima àquela encontrada em aplicações *in vivo*, outro teste interessante para ser desenvolvido é avaliar como a agitação do sistema (vidro + SBF) e a troca do fluido durante o procedimento de imersão interferem na capacidade de nucleação de HCA de cada amostra. De forma mais elaborada, isto poderia ser feito por meio de um sistema de circulação e bombeamento do SBF.

O último e talvez mais complexo passo possível, é a utilização dos vidros borato desenvolvidos neste trabalho para a confecção de *scaffolds*. Tendo em vista o interesse crescente da engenharia de tecidos em se estudar este tipo de aplicação, e as vantajosas propriedades térmicas apresentadas pelos vidros borato, seria interessante produzir e avaliar a bioatividade destes vidros quando convencionados nestas estruturas tridimensionais e porosas.

Por fim, vale relatar que testes em cultura de células, bem como a aplicação *in vivo* dos vidros borato para preenchimento de fratura óssea na calvária de ratos, já vêm sendo desenvolvidos em conjunto com outros colaboradores.

# Apêndice A

## Técnicas Experimentais

### A.1 Calorimetria Exploratória Diferencial

Segundo a definição dada por Mackenzie [111], análise térmica é “um grupo de técnicas pelas quais se acompanham as variações de uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação, enquanto a mesma é submetida a uma programação de temperatura”. Dentre estas técnicas devemos destacar duas das mais conhecidas e que foram utilizadas neste trabalho. A Análise Térmica Diferencial ou DTA (do inglês “Differential Thermal Analysis”), e a Calorimetria Exploratória Diferencial ou DSC (do inglês: “Differential Scanning Calorimetry”) [112].

Usadas em áreas como química, farmácia, física, biologia e engenharias, essas duas técnicas podem ser empregadas nos estudos de inúmeras substâncias, como amostras biológicas, tecidos, polímeros, metais, óleos, cerâmicas, vidros e fármacos, ou seja, materiais de praticamente todas as formas e estados físicos. Além de serem aplicadas por meio de equipamentos comerciais relativamente baratos, elas permitem que a substância seja estudada sob um grande intervalo de temperatura e consumindo pequenas quantidades de amostra. As informações típicas derivadas da utilização destas técnicas são temperaturas específicas (transição vítrea, fusão, cristalização), grau de cura<sup>19</sup> em resinas, estabilidade oxidativa, pureza eutética<sup>20</sup>, calor específico entre outras [113].

O DTA é a técnica mais simples e amplamente utilizada para fazer análises térmicas [114]. Ela se baseia em registrar a diferença de temperatura,  $\Delta T$ , entre a amostra e uma referência inerte enquanto ambas são submetidas a mesma programação de aquecimento. Em instrumentos clássicos, como o representado na figura 47-A, o  $\Delta T$  entre a referência e a amostra é obtido diretamente como uma função da temperatura enquanto todo o sistema é aquecido sob uma taxa controlada e linear. Se não acontecer nenhuma diferença térmica

---

<sup>19</sup> A mudança nas propriedades químicas e físicas de uma determinada formulação resina/endurecedor.

<sup>20</sup> Referente a misturas eutéticas, nas quais dois ou mais elementos juntos se comportam como um só, propiciando diminuição do ponto de fusão do conjunto.

entre a amostra e a referência, o sinal de saída do sensor de temperatura (que pode ser um termopar ou uma termorresistência) será zero. Por outro lado, quando um evento térmico acontece, como calor liberado durante o processo de cristalização, por exemplo, o  $\Delta T$  será diferente de zero, indicando a mudança ocorrida na amostra detectada pelo sinal gerado no sensor. Uma vez findado o fenômeno físico ou químico sob o qual a amostra foi submetida, sua diferença de temperatura com a referência volta a ser nula [36,114].

O DSC é uma técnica mais recente e se apresenta como uma evolução do DTA [36]. Embora revelem basicamente os mesmos resultados, o DTA é adequado para a determinação de temperaturas características, enquanto o DSC também permite a obtenção de valores como calor de fusão ou calor de cristalização [113]. Este tipo de análise pode ser feito por meio de duas configurações distintas: o DSC com compensação de potência (figura 47-C) e o DSC com fluxo de calor (Figura 47-b).

Para os exemplares com compensação de potência, tanto amostra quanto referência são mantidas à mesma temperatura por meio de aquecedores elétricos individuais, e a diferença na potência de entrada de cada aquecedor é o parâmetro registrado. No caso de DSC's com fluxo de calor, amostra e referência, ambas contidas em seus respectivos suportes, são colocadas sobre um disco de metal. Para a condição de fluxo de calor de estado estacionário, as trocas de calor entre o forno e a amostra ocorrem preferencialmente pelo disco, e o sinal detectado durante uma medição é relativo à diferença de temperatura entre a amostra e a referência, em  $\mu V$ , similar ao que acontece no DTA. Entretanto, para o DSC esta diferença de temperatura pode ser convertida em um fluxo de calor, em mW, por meio de uma calibração apropriada [115].

Em todos os aspectos as curvas de DSC e DTA são muito semelhantes, com exceção da unidade do eixo da ordenada [115]. Os processos decorridos durante a análise térmica expressos no gráfico são representados por desvios ou picos divergentes da linha de base. As temperaturas características correspondentes a cada evento sofrido pela amostra são usualmente tomadas pela extrapolação da linha de base e do início ou final do evento, bem como por seu ponto de maior intensidade. Especificamente nos resultados apresentados nesse trabalho, as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), início de cristalização ( $T_x$ ), pico de cristalização ( $T_c$ ), início de fusão ( $T_L$ ) e pico de fusão ( $T_m$ ) são determinadas de acordo com o exemplo apresentado na figura 48.

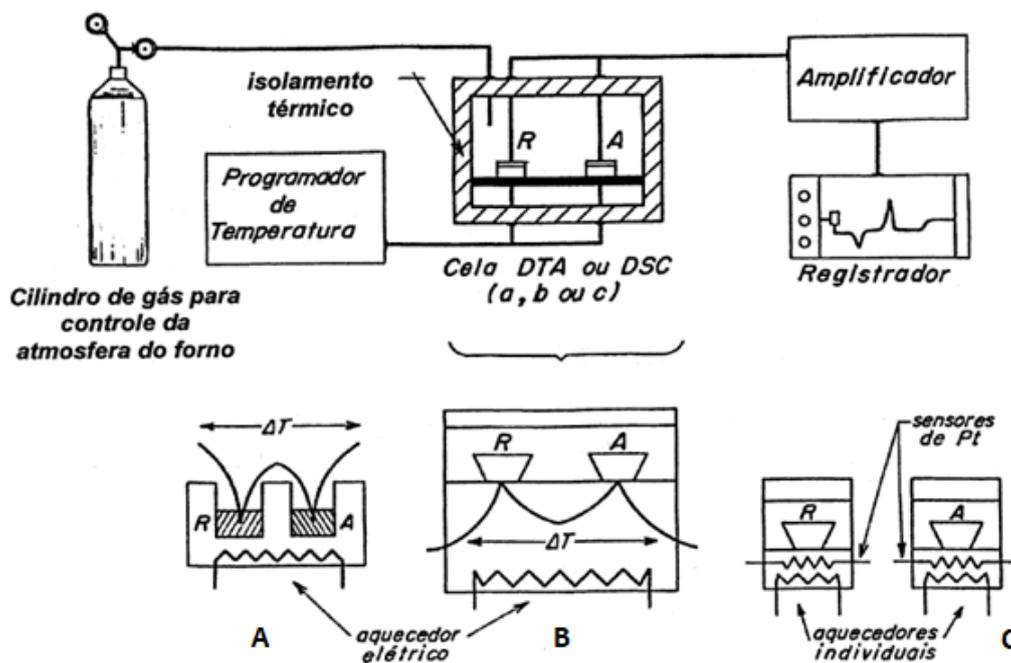


Figura 47: Representação de um equipamento genérico para análise térmica via DTA e DSC. A) DTA; B) DSC com fluxo de calor; C) DSC com compensação de potência. Adaptado da referência [112].

A diferença entre as temperaturas de início da cristalização e de transição vítrea,  $\Delta T = T_x - T_g$ , tem sido comumente utilizada como uma medida da estabilidade térmica (GS) do vidro contra desvitrificação [36]. O GS costuma ser utilizado como um indicador de resistência à cristalização durante o aquecimento do vidro, e é um parâmetro importante quando se trata da produção de fibras e *scaffolds* mediante sinterização [31].

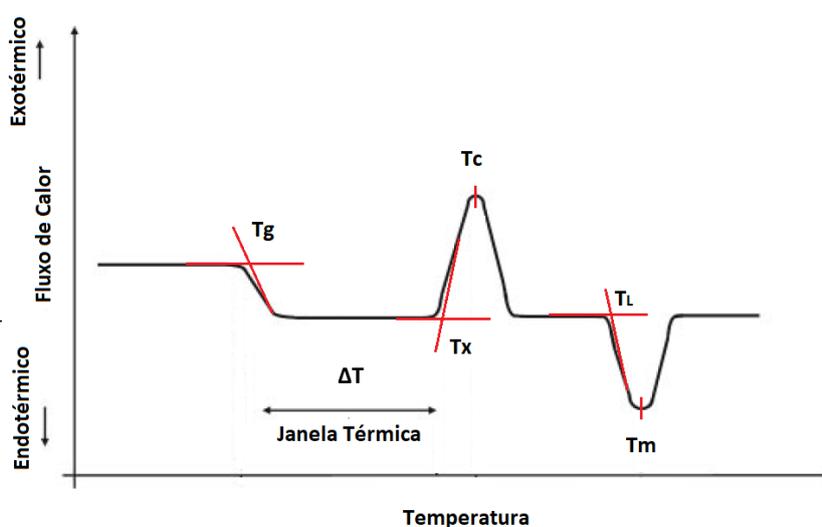


Figura 48: Representação de um equipamento genérico para análise térmica via DTA e DSC. A) DTA; B) DSC com fluxo de calor; C) DSC com compensação de potência. Adaptado da referência [8].

Estudos mostraram que um acréscimo nos parâmetros que medem a estabilidade térmica também podem indicar um aumento na sua habilidade de formação vítrea (GFA) [116], que se refere a facilidade com que as massas fundidas podem ser arrefecidas para se tornar vidros, evitando a formação de cristais [117]. Um parâmetro muito útil para avaliar o GFA de um vidro é o coeficiente de Hrubý [118]:

$$K_{gl} = T_x - T_g / T_L - T_x \quad (12)$$

Quanto maior o valor de  $K_{gl}$  mais fáceis são as condições de se preparar a amostra vítrea [118]. A figura 49 traz o resultado típico do DSC para três amostras de biovidros bem conhecidos: o 45S5, S53P4 e 13-93. Como podemos notar, a janela térmica dos dois primeiros é curta, o que facilita sua cristalização durante processos de sinterização. O 13-93, por outro lado, apresenta um  $\Delta T$  bem mais amplo, tanto que é utilizado na fabricação de fibras contínuas e *scaffolds* por vários grupos de pesquisa [31].

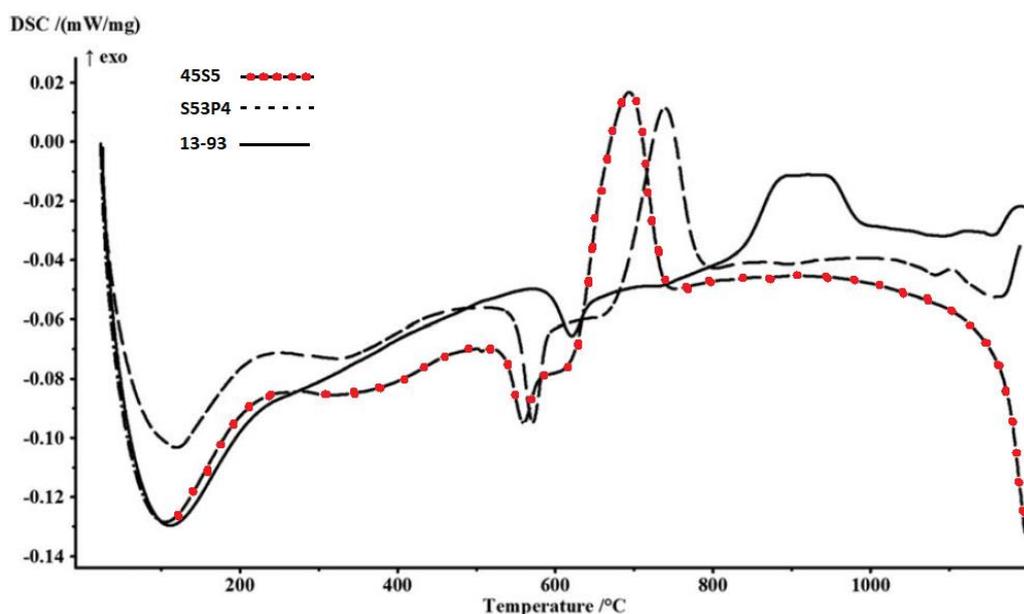


Figura 49: DSC típico mostrando os efeitos térmicos sofridos pelos biovidros 45S5, S53P4 e 13-93. Adaptado da referência [31].

## A.2 Espectroscopia no Infravermelho

O espectro eletromagnético compreende radiações que se estendem desde os raios gama até ondas de rádio, com comprimentos de onda que podem variar de  $10^{-15}$  até  $10^3$  m. Quando estas radiações interagem com a matéria, inúmeros fenômenos podem ser

produzidos. Os estudos e avaliações das respostas geradas por meio desta interação compreendem a espectroscopia [119,120].

Dentre todo o espectro eletromagnético, vamos focar na região que engloba as ondas com comprimentos em torno de 0,7 e 1000  $\mu\text{m}$ . Esta parte é denominada de infravermelho e ainda pode ser subdividida em outras três regiões: o infravermelho longínquo, infravermelho médio e infravermelho próximo [120]. Destes três, aquele que trataremos com maior atenção é o infravermelho médio. Ele contém as ondas com comprimentos entre 2,5 e 25  $\mu\text{m}$  e foi utilizado como fonte de radiação para medidas realizadas neste trabalho.

A espectroscopia no infravermelho é uma técnica baseada na vibração e rotação dos átomos de uma molécula. Uma resposta da atuação da radiação infravermelha em um material é comumente obtida pela sua incidência através de uma amostra e a consequente determinação de qual fração da energia inicial é absorvida para um determinado comprimento de onda. Como resultado se pode montar um gráfico com bandas que representam as frequências de vibração correspondente a uma parte das moléculas de amostra, ou seja, um espectro de absorção de infravermelho [119].

O espectro infravermelho de um material é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características e, por conta disto, a espectroscopia na região do infravermelho tem extensa aplicação na identificação dos compostos e caracterização de materiais, sendo uma das técnicas analíticas mais importantes disponíveis aos cientistas de hoje. Uma de suas grandes vantagens é que praticamente qualquer amostra em praticamente qualquer estado pode ser estudada. Líquidos, soluções, pastas, pós, filmes, fibras, gases e superfícies podem ser examinados com a escolha correta da instrumentação aplicada [119].

De acordo com o que se pretende investigar, as diferentes regiões do infravermelho podem ser utilizadas para excitação do material. O infravermelho médio talvez seja a região mais chamativa pelo fato da maioria das moléculas possuírem forte absorção destes comprimentos de onda. Além disso, moléculas que contêm ligações C-H, N-H e O-H possuem absorções proeminentes neste intervalo, atraindo a atenção de estudos em diversas áreas. Ademais, os espectros de absorção de infravermelho médio são menos congestionados, permitindo detecção seletiva de um grande número de moléculas [120].

As outras regiões do infravermelho também são capazes de excitar algumas moléculas em nível vibracional e rotacional. Aquelas que absorvem na região do infravermelho longínquo são normalmente representadas por compostos inorgânicos com átomos mais

pesados. Enquanto no outro oposto, moléculas excitadas pelo infravermelho próximo possuem menos características espectrais, com bandas mais amplas e difíceis de interpretar [120].

Embora a apresentação de um espectro eletromagnético possa ser dado em termos do comprimento de onda ou frequência, quando tratamos de infravermelho eles são comumente representados pelo seu número de onda. Esta grandeza mede o número de ciclos que uma onda desenvolve por unidade de comprimento, é expressa como inverso do comprimento de onda e tem sua unidade básica dada pelo  $\text{cm}^{-1}$ . A vantagem em apresentar um espectro de absorção de infravermelho em função do número de onda se dá pela sua relação linear com a energia, ou seja, quanto maior o número de onda, maior é a energia da radiação [119,120].

Para que uma molécula apresente absorção de infravermelho é necessário que haja variação de seu momento de dipolo elétrico como consequência de um movimento vibracional. Podemos dizer que o espectro de absorção no infravermelho se origina quando a radiação eletromagnética incidente tem um componente com frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais. Apenas nessa circunstância há interação entre a radiação incidente e a molécula [119].

De forma básica, uma molécula pode ser vista como um sistema massa-mola. Seus átomos também podem ter um movimento relativo entre si, isto é, os comprimentos das ligações e seus ângulos podem variar. Decorrentes dos alongamentos e contrações das ligações temos os estiramentos, enquanto as variações angulares representam os dobramentos. Juntos, esses movimentos representam as vibrações possíveis para uma molécula, e suas variações estão expostas separadamente na figura 50 [119].

O número de movimentos vibracionais possíveis para uma molécula também pode ser calculado. Moléculas com  $N$  átomos possuem  $3N$  graus de liberdade translacional devido seu movimento conjunto em um dos três eixos cartesianos. Se a molécula não for linear, ela também possuirá 3 graus de liberdade rotacional, referentes à rotação em torno dos eixos  $x$ ,  $y$  e  $z$ , caso contrário, ela perde um grau de liberdade rotacional. Os movimentos restantes correspondem aos possíveis graus de liberdade vibracional da molécula, ou seja:  $3N-6$  para os tipos não lineares e  $3N-5$  para os lineares [119]. Agregados moleculares como cristais se comportam como “supermoléculas” nas quais as vibrações de componentes individuais são acopladas [121].

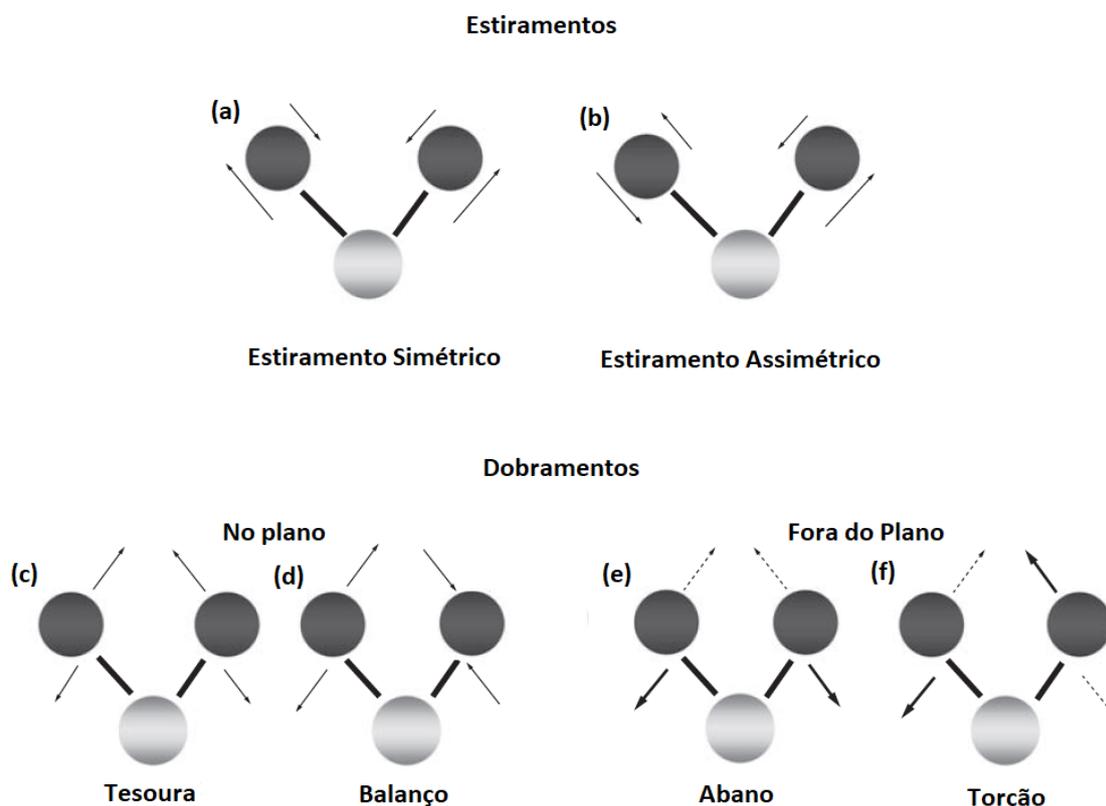


Figura 50: Diferentes tipos de modos vibracionais. Na parte de cima estão os estiramentos (a) simétrico e (b) assimétrico. Na parte de baixo, à esquerda estão os dobramentos realizados no mesmo plano que une os três átomos, dados pelo tipo (c) tesoura e (d) balanço. À direita estão os dobramentos realizados fora do plano, dados pelo tipo (e) abano e (f) torção. Setas tracejadas representam movimentos com direção perpendicular ao plano da página. Adaptado da referência [122].

Na prática, nem sempre o número de modos normais de vibração corresponde ao número de bandas observadas no espectro. Isso pode ocorrer para moléculas que possuem certos elementos de simetria. Neste caso, vibrações diferentes apresentam a mesma frequência e, conseqüentemente, a mesma posição no espectro. Esses modos vibracionais são ditos degenerados. Além disso, outros fatores podem complicar a interpretação do espectro de infravermelho, como bandas *overtones* e combinações de bandas. Os *overtones* são bandas que representam múltiplos de frequências fundamentais de absorção. Assumindo níveis de energia uniformemente espaçados, o primeiro *overtone* aparecerá no espectro localizado com número de onda igual ao dobro do correspondente a banda fundamental. As combinações de bandas surgem quando duas bandas fundamentais absorvem energia simultaneamente, resultando na criação de uma terceira banda posicionada com número de onda correspondente à soma das duas primeiras ( $\bar{\nu}_1 + \bar{\nu}_2$ ) [119].

Os instrumentos comumente utilizados para observar o espectro de absorção de infravermelho de um material são denominados espectrômetros. Tradicionalmente, os primeiros deste tipo estão disponíveis comercialmente desde os anos de 1940, e utilizam o método dispersivo para dividir os diferentes comprimentos de onda da fonte de radiação infravermelha, monitorando uma a uma as intensidades dos feixes após estes atravessarem a amostra. Além de demandarem longos períodos para realização de um espectro, seu resultado nem sempre é obtido com alta qualidade devido ao processo de medida não ser suficientemente estável durante todo tempo [119,121].

Os espectrômetros mais modernos operam sob um princípio diferente. Conhecidos como FTIR's (*Fourrier Transform Infrared*), esses equipamentos têm em seu componente principal um interferômetro de Michelson. Um esquema representando seus componentes pode ser visto na figura 48. Ele consiste em uma fonte de radiação infravermelha que emite um feixe em direção ao interferômetro. Nele, a radiação colimada atravessa um divisor de feixes (ou *beamsplitter*) que idealmente o separa em duas partes iguais. Uma parte refletida 90° em direção a um espelho plano fixo e a outra transmitida para um espelho plano móvel. Após serem refletidos, os dois feixes se recombinaem no divisor, produzindo um padrão de interferência de ondas construtivas e destrutivas devido a variação no caminho óptico causado pelo movimento de um dos espelhos [123].

Depois de sair do interferômetro a radiação atravessa a amostra que se deseja analisar. Ao absorver determinados comprimentos de onda, flutuações na intensidade da energia que atinge o detector são digitalizadas em tempo real, produzindo um interferograma. O interferograma é geralmente um gráfico de intensidade em função da diferença de trajetória entre o espelho estacionário e o móvel, e contém toda a informação necessária para construir o espectro de infravermelho da amostra, mas esta informação está no domínio temporal. Para obter dados interpretáveis, aplica-se então uma transformada de Fourier de forma a converter o interferograma para o domínio da frequência. O resultado é o espectro de infravermelho com as intensidades do feixe transmitido em função do número de onda da radiação [123].

Se for obtido da maneira anteriormente explicitada, o espectro da amostra será dado em função de sua transmitância. A transmitância relaciona as intensidades da radiação antes ( $I_0$ ) e depois ( $I$ ) de atravessarem a amostra da seguinte forma [119,120]:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (13)$$

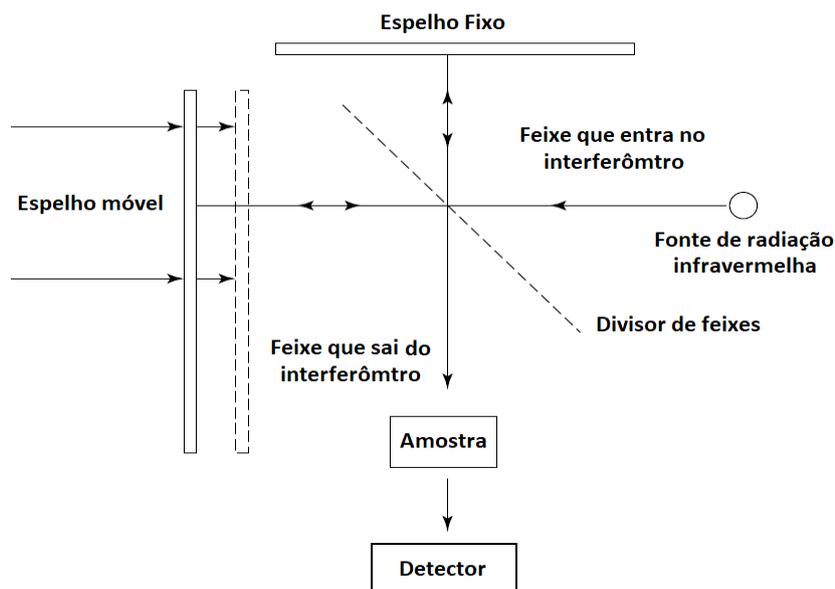


Figura 51: Esquema dos componentes de um equipamento utilizado para aplicação da técnica de FTIR. Adaptado da referência [119].

Ela se relaciona com a absorvência por meio da simples expressão matemática [119,120]:

$$A = -\log T \quad (14)$$

A absorvência ( $A$ ), por outro lado, pode ser expressa em termos da concentração da substância absorvente no meio ( $c$ ), seu coeficiente de absorção molar ( $\alpha$ ) e a distância que a radiação atravessa pelo material ( $l$ ) por meio da *Lei de Beer* [119,120]:

$$A = \alpha lc \quad (15)$$

Os espectros expressos em transmitância e absorvência apresentam as bandas de absorção de uma amostra de maneira diferente. Enquanto no primeiro caso elas estarão voltadas para baixo, em sentido à origem do eixo  $y$ , no segundo as bandas se posicionam com seu máximo apontando para cima. Análises qualitativas podem ser realizadas independentemente do espectro ser apresentado em função da transmitância ou absorvência da amostra. Entretanto, pelo fato da absorvência ser diretamente proporcional a concentração da substância absorvente, o espectro montado nessa condição se faz necessário quando se deseja realizar análises quantitativas [119,120].

A aplicação da técnica de FTIR é muito importante no estudo desenvolvido neste trabalho. Além de requerer pequenas quantidades de amostra, ela nos permite atestar com facilidade as mudanças ocorridas no vidro devido ao crescimento da camada de HCA em sua superfície. As bandas de absorção de infravermelho do novo material se distinguem do vidro original, possibilitando a avaliação da bioatividade da amostra. Sobretudo por ser uma das técnicas mais utilizadas na caracterização de vidros bioativos, a comparação de resultados com a literatura torna-se menos trabalhosa.

Além da identificação das bandas correspondentes à HCA nucleada sobre o vidro, o espectro de FTIR nos permite adquirir algumas informações adicionais, como o grau de cristalinidade do novo material. Nesta análise qualitativa, aplicaremos o método descrito por Shemesh [124], o qual foi utilizado por ele para medir a cristalinidade de apatitas sedimentares. O método consiste na subtração de uma linha de base entre 450 e 750  $\text{cm}^{-1}$ , sucedida pelo cálculo do índice de cristalinidade (IC), dado pela seguinte expressão:

$$IC = \frac{A_{605} + A_{565}}{A_{595}} \quad (16)$$

Nela,  $A_{605}$ ,  $A_{565}$  e  $A_{595}$  correspondem aos valores de absorbância medidos para os números de onda de 605, 565 e 595  $\text{cm}^{-1}$ . Devido ao fato da HCA recém-formada sobre os vidros ter um caráter amorfo, adaptamos os pontos usados no cálculo da expressão 16, substituindo-os pelos correspondentes aos centros das bandas de fosfato  $\nu_4$  e o mínimo valor do vale entre eles. Quanto maior o valor de IC, maiores e/ou mais ordenados serão os cristais [107]. Por meio deste cálculo podemos acompanhar melhor algumas mudanças sofridas pela camada de HCA durante os vários períodos em que os vidros permaneceram imersos no SBF. A figura 52 exemplifica o procedimento realizado para o cálculo do IC.

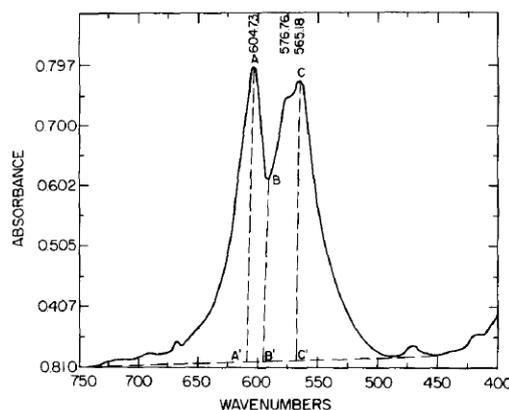


Figura 52: Parte do espectro de infravermelho de uma apatita sedimentar exemplificando como é o cálculo do IC feito por Shemesh. Adaptada da referência [124].

## A.3 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman se baseia no espalhamento inelástico de um fóton ao interagir com a matéria. Este fenômeno foi observado experimentalmente pela primeira vez em líquidos, em 1928, por Chandrasekhara Venkata Raman e Kariamanickam Srinivasa Krishnanpor. A título de curiosidade, este trabalho rendeu um Nobel de física a Raman, em 1930 [125].

A técnica de espectroscopia Raman tem se mostrado muito importante na caracterização de materiais, e pode ser aplicada a materiais sólidos, líquidos e gases numa ampla variedade de casos. Ela é não destrutiva e exige pequenas quantidades de amostra, permitindo a coleta de informações detalhadas sobre propriedades físicas e químicas, tanto de materiais puros ou compostos, assim como de substâncias orgânicas e inorgânicas. Mesmo sendo popularizada como uma técnica de espectroscopia vibracional, se realizada em condições de ressonância ela permite a caracterização de estados eletrônicos de um determinado sistema. Além disso, ela também pode ser aplicada no estudo de propriedades elásticas e de transições de fase [126,127].

No processo que envolve o espalhamento da luz por uma amostra, o campo elétrico oscilante da radiação incidente que interage com uma molécula do material, faz com que a nuvem eletrônica de uma ligação covalente oscile e se distorça em relação a sua posição de equilíbrio. Isso resulta na promoção de um elétron a um estado excitado virtual, que não corresponde a um estado de energia estacionário da molécula, e que depende da energia da radiação incidente. Em seguida, num processo que ao todo envolve tempos da ordem de femtossegundos ( $10^{-15}$  s), este dipolo induzido, por sua vez, emite uma radiação [121,125].

Na imensa maioria das vezes a radiação espalhada possui a mesma energia da incidente, e nestes casos o espalhamento é dito elástico ou Rayleigh. Porém, em algumas circunstâncias pode haver trocas de energia entre os fótons incidentes e as moléculas do material, fazendo com que o número de onda da radiação espalhada diverja da incidente, nesta condição temos o chamado efeito Raman [121,125].

O efeito Raman ainda pode ser especificado em outros dois. Quando a energia é transferida de um fóton incidente para uma molécula da amostra, o fóton espalhado terá um número de onda menor que o incidente, e a isto damos o nome Raman Stokes. No caso oposto, em que a energia é transferida da molécula para o fóton espalhado, este terá um

número de onda maior que o incidente, e então chamamos de Raman anti-Stokes. A figura 53 exemplifica os três tipos de espalhamento, nos quais as energias correspondentes à radiação incidente ( $\bar{\nu}_0$ ), espalhada ( $\bar{\nu}$ ) e transições de estados vibracionais das moléculas ( $\bar{\nu}_M$ ) são representadas pelos seus respectivos números de onda, podendo ser relacionados pela seguinte expressão [121,125]:

$$\bar{\nu} = \bar{\nu}_0 \pm \bar{\nu}_M \quad (17)$$

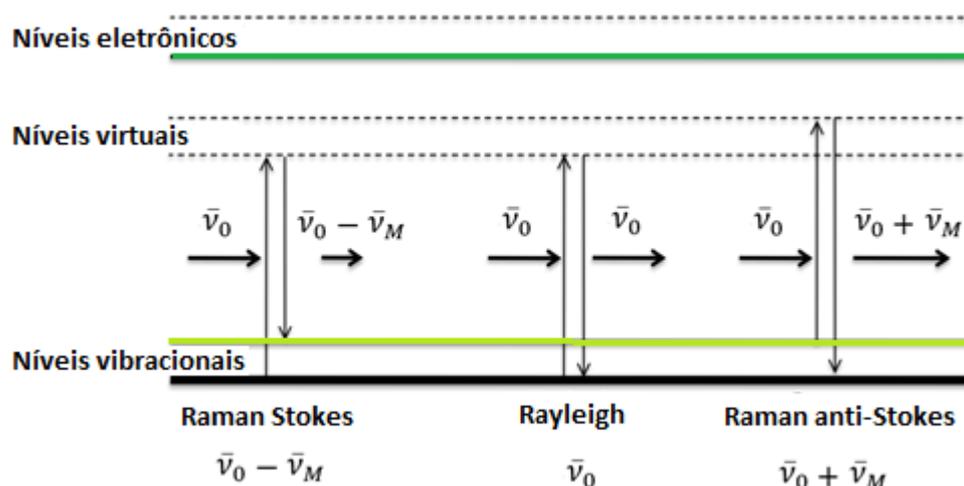


Figura 53: Diagrama dos níveis de energia para exemplificar o efeito Raman decorrente do espalhamento de radiação por um material.

A radiação espalhada proveniente da interação da luz com a matéria, como um todo, representa em torno de  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  da intensidade da radiação incidente. Sabendo que o espalhamento Raman é de 3 a 5 ordens de grandeza menor que o Rayleigh, podemos então ter noção do quão fraco é este fenômeno. Por meio do espectro da cumarina<sup>21</sup>, apresentado na figura 54, vemos o espalhamento Raman posicionado como pares de bandas simetricamente espaçadas em relação ao espalhamento Rayleigh [125]. Na figura também são visíveis as diferenças de intensidade entre os espalhamentos Stokes e anti-Stokes. Isto se deve ao fato da intensidade do espalhamento anti-Stokes depender da população de moléculas no primeiro estado vibracional excitado, que por sua vez depende da temperatura. À temperatura ambiente o espalhamento Raman Stokes predomina, porque a maioria das moléculas está no estado vibracional fundamental [121,125].

<sup>21</sup> É um componente químico que ocorre naturalmente em alguns óleos essenciais, como canela, lavanda, cumaru, capim limão, rosas.

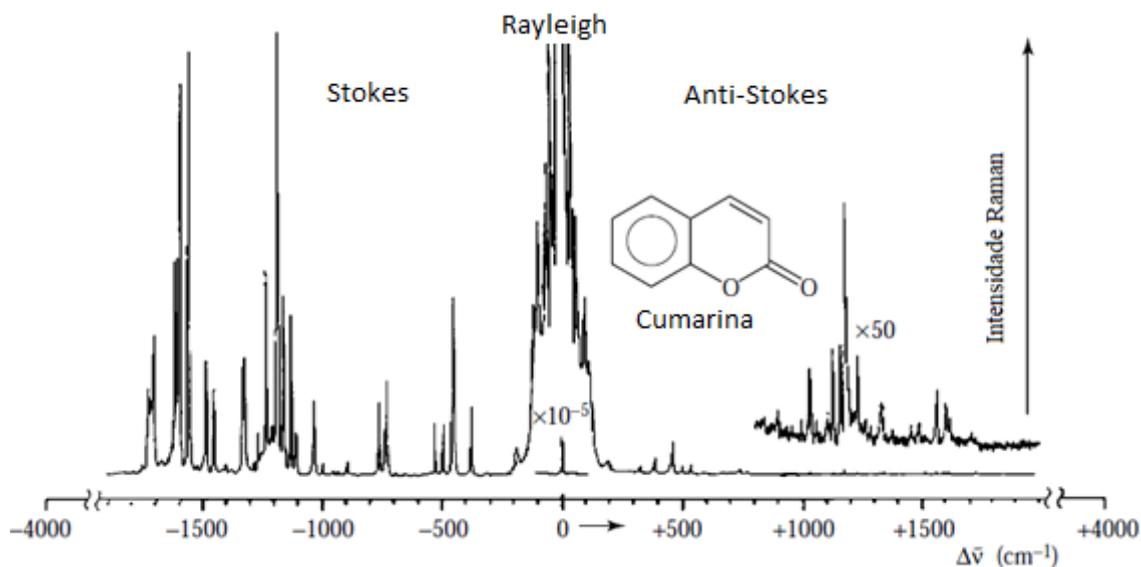


Figura 54: Espectro Raman típico da cumarina mostrando os espalhamentos Rayleigh, Raman Stokes e Anti-Stokes. Adaptado da referência [125].

Junto da espectroscopia no infravermelho, a espectroscopia Raman compõe as maiores técnicas utilizadas na investigação das transições de estados vibracionais das moléculas. Embora ambas possam ser utilizadas para a mesma finalidade, os resultados obtidos por meio de um espectro Raman podem ser muito diferentes daqueles do espectro de infravermelho. Isto se deve as distinções nas regras de seleção de cada fenômeno [121].

Como visto no tópico anterior, para que uma molécula apresente uma banda de absorção no espectro de infravermelho, é necessário que a radiação que interage com ela provoque uma variação em seu dipolo elétrico. No caso do Raman, para que uma banda esteja presente em seu espectro, o requisito é que a radiação que incide na molécula cause uma mudança na polarizabilidade de uma de suas ligações. Podemos considerar a polarizabilidade como uma medida da facilidade da distorção da nuvem de elétrons de uma ligação química na presença de um campo elétrico externo. Isto significa que vibrações de ligações apolares produzem maiores intensidades no espectro Raman que ligações polares, graças as suas nuvens eletrônicas não serem localizadas, assim como no caso de moléculas que contêm átomos pesados [121]. Em decorrência disso, a espectroscopia no infravermelho é superior em alguns casos e em outros a espectroscopia Raman oferece resultados mais úteis. De modo geral, pode-se dizer que as espectroscopias Raman e infravermelho são técnicas complementares [119].

Tipicamente, o espectro Raman expõe a intensidade da radiação espalhada em função da sua diferença relativa, em números de onda, com a da radiação utilizada como fonte,

por isso, ele é comumente chamado de desvio ou deslocamento Raman, e é independente do comprimento de onda de excitação [125].

Um espectrômetro Raman convencional pode funcionar via métodos dispersivos ou por interferometria com transformada de Fourier, similares àqueles utilizados em espectroscopia de infravermelho. Nas análises realizadas neste trabalho o equipamento utilizado foi um micro-Raman ou Raman confocal. Ele difere do arranjo de um espectrômetro Raman convencional devido a integração de um microscópio óptico aos componentes. Isto permite que se obtenha espectros de regiões micrométricas, além de requerer quantidades ainda menores de amostra [126]. Na figura 55 temos um esquema que representa a configuração do equipamento.

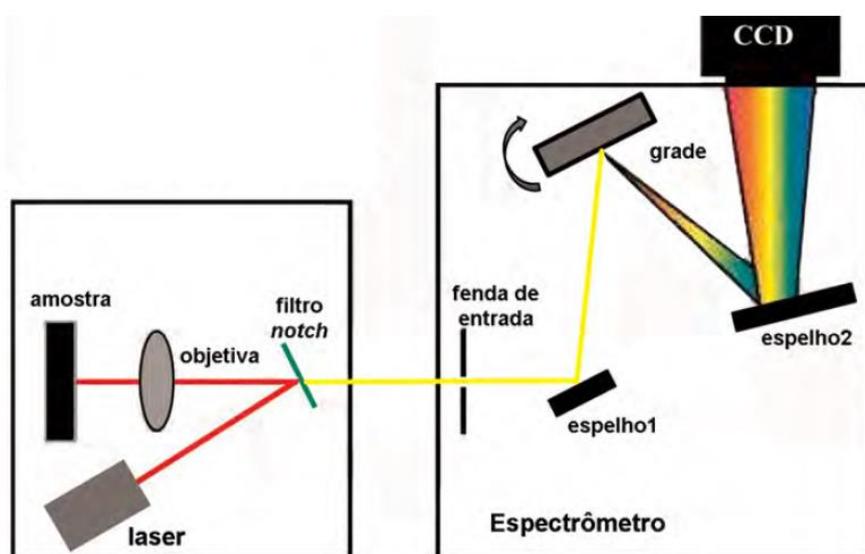


Figura 55: Esquema representando os componentes e a configuração convencional de um equipamento micro-Raman. Adaptado da referência [128]

Equipamentos modernos utilizam lasers como fonte de excitação devido a sua estabilidade, disponibilidade de potências e capacidade de prover feixes com diâmetros pequenos, importantes na geração do efeito Raman. Através de um conjunto de lentes e espelhos (que pode variar de acordo com a montagem), a radiação é direcionada para um filtro holográfico *notch*. Esse componente é essencial, pois é ele que impede a passagem da radiação de comprimento de onda do laser, refletindo-a para a objetiva do microscópio onde ela é focada na região da amostra. Para o caso de uma configuração de retroespalhamento, apenas os fótons espalhados em aproximadamente  $180^\circ$  são utilizados na geração do espectro. Esses fótons então retornam para o filtro *notch*, e só aqueles com comprimentos de onda diferentes do laser de excitação são transmitidos. Em seguida, o uso de um sistema

confocal, por meio da escolha de uma fenda ou pinhole, permite que seja selecionada apenas a radiação espalhada pela região em que o feixe incidente é focado. As etapas finais consistem na separação dos comprimentos de onda por meio de uma grade de difração e a sua captura com a utilização de uma CCD (*Charge Coupled Devices*). Por último, o sinal é digitalizado no computador e processado na forma dos espectros [126].

Nas análises de bioatividade desenvolvidas neste trabalho, o uso da espectroscopia micro-Raman é fundamental. Além de complementar os resultados obtidos pelo FTIR, ela permita que a sondagem das mudanças ocorridas na superfície dos vidros seja feita diretamente na amostra, após ela ser retirada do contato com o SBF. O fato de ser não destrutiva, ter uma resolução de imagem micrométrica e não exigir nenhum tipo de preparo na amostra, auxilia a detecção da HCA e reduz o tempo necessário em cada medida, preservando material para utilização em outras técnicas.

A análise convencional proporcionada pela espectroscopia Raman é feita por meio da observação da evolução dos espectros da superfície das amostras submetidas ao teste *in vitro* [83]. Conforme os períodos de imersão das amostras aumentam, a tendência é que bandas que correspondam a HCA comecem a surgir e mudar progressivamente os espectros. Com o tempo também espera-se que o material recém-formado adquira cristalinidade. Como já foi citado no tópico anterior, a cristalinidade reflete a perfeição estequiométrica da apatita e o tamanho do seu cristal, assim como pode ser relacionada a quantidade de substituição de outros íons em sua estrutura. Quanto maiores e/ou mais perfeitos forem os cristais, e quanto menos substituições acontecerem na rede, maior será a cristalinidade. Este parâmetro é normalmente correlacionado ao estreitamento da banda de fosfato  $\nu_1$  do novo composto.

Assim, a cristalinidade da camada de HCA que nucleia na superfície dos vidros pode ser estimada pelo valor da largura à meia altura da banda referente ao fosfato  $\nu_1$ , normalmente posicionada entre 960 e 965  $\text{cm}^{-1}$ . Para avaliá-la, seguiremos o método adotado por Awonusi e colaboradores [90]. Ele tem início na subtração de uma linha de base entre 900 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Em seguida, devido ao fato da banda correspondente ao fosfato  $\nu_1$  ser levemente assimétrica, com uma parte mais elevada para o lado de números de onda menores, a deconvolução é feita utilizando duas funções *voigt* [33]. Essa elevação muito fraca, entre 945 e 950  $\text{cm}^{-1}$ , pode ser atribuída a uma banda adicional correspondente a uma

amorfização ou desordem cristalográfica encontrada em hidroxiapatitas sintetizadas a altas temperaturas [90].

## A.4 Difração de raios-X

A difratometria de raios-X é uma das técnicas mais importantes, e talvez a mais utilizada, para a caracterização e identificação microestrutural de materiais cristalinos, sendo aplicada em diversos campos de conhecimento como ciência de materiais, química, física, geociências e engenharias em geral [129].

Diferentes dos vidros, tão citados até aqui, materiais cristalinos são constituídos por arranjos de átomos organizados periodicamente ao longo de grandes distâncias (em torno de  $10^7$  unidades<sup>22</sup> repetidas em cada dimensão). Para sondar estas estruturas, é necessário a utilização de uma radiação que possua comprimento de onda da ordem dos espaçamentos interplanares da rede cristalina, por isso o emprego dos raios-X se faz tão importante [130,131].

Os raios-X possuem comprimentos de onda que variam entre 0,1 e 10 Å. Fontes de raios-X mais comuns são constituídas por um filamento de tungstênio mantido em um tubo a vácuo. A partir do aquecimento do filamento, elétrons são emitidos e acelerados por uma diferença de potencial elétrico, de modo a se chocarem com um alvo metálico (cobre, cromo, ferro entre outros) que normalmente é arrefecido à água. A desaceleração provocada pela interação dos elétrons incidentes e os átomos do material do alvo, gera a emissão de ondas eletromagnéticas com comprimentos de onda proporcionais a mudança de energia cinética do elétron incidente. Essa radiação é denominada raios-X *Bremsstrahlung* (ou freamento), e sua energia depende da energia cinética da partícula incidente, variando num espectro contínuo, de zero a um valor máximo. Por outro lado, se os elétrons gerados no filamento impactam o alvo ejetando elétrons de camadas internas dos átomos do material, o rearranjo da estrutura eletrônica é sucedido pela emissão de uma radiação com energia referente à diferença de níveis eletrônicos do átomo. Esses são chamados raios-X característicos, e é a partir deles que se estabelece a difração de raios-X [129,130,131].

A técnica de DRX se baseia em explorar o fenômeno de difração gerado quando um feixe de raios-X característico interage com um material cristalino. Para entendermos

---

<sup>22</sup> Essas unidades podem ser átomos individuais, átomos agrupados, moléculas entre outros.

melhor como funciona este processo podemos observar a figura 56. Nela, por simplificação, substituímos os planos cristalográficos de átomos dispersores por planos cristalográficos que funcionam como espelhos ao refletir o feixe incidente de raios-X [129,130,131].

A figura mostra a incidência de um feixe de raios-X monocromático de comprimento de onda  $\lambda$  sobre uma rede cristalina com distância interplanar  $d$ . Quando o feixe incidente se choca com o conjunto de planos em um certo ângulo, de modo que as ondas difratadas fiquem fora de fase, sua posterior interação não produzirá qualquer feixe reforçado. Ocorre, então, uma interferência destrutiva. Por outro lado, se as ondas refratadas pelos vários planos se encontrarem em fase, então ocorre um reforço do feixe ou uma interferência construtiva [129,130].

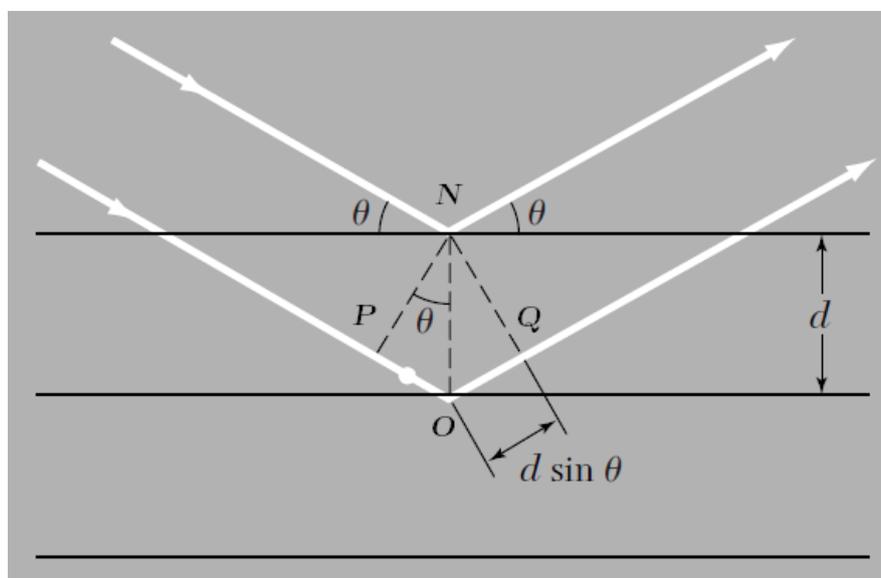


Figura 56: Representação da interação entre raios-X e os planos cristalográficos de um sólido cristalino. Adaptado da referência [130].

Para que os raios-X difratados produzam uma interferência construtiva, a condição necessária é que a diferença de caminho óptico percorrido entre eles seja um múltiplo inteiro do comprimento de onda da radiação incidente. Ou seja, para que haja uma interferência construtiva no caso expresso na figura 53, é necessário que a diferença de caminho óptico percorrido  $POQ$  seja um múltiplo inteiro de  $\lambda$ . A equação que satisfaz esta exigência é resumida na expressão 18, e é conhecida como Lei de Bragg. Os ângulos para os quais a difração ocorre são chamados ângulos de Bragg [129,130].

$$PO + OQ = n\lambda = 2d\sin\theta; n = 1, 2, 3 \dots \quad (18)$$

Por meio da interação entre os raios-X e a matéria, e da utilização da Lei de Bragg, podemos descobrir diversos parâmetros de um sólido cristalino. Os equipamentos

designados para essa função, os difratômetros de raios-X, são comumente encontrados no mercado e possuem arranjo geométrico constituído de um goniômetro horizontal ( $\theta$ - $2\theta$ ) ou vertical ( $\theta$ - $2\theta$  ou  $\theta$ - $\theta$ ), acoplado aos acessórios de fonte e recepção dos feixes difratados. A figura 57 apresenta a geometria  $\theta$ - $2\theta$ , similar a utilizada nas análises deste trabalho. Nela, o goniômetro move-se com velocidade angular ( $2\theta$ /passo) sobre o eixo P, perpendicular ao plano da página, e rotaciona sobre a amostra (C) com metade desta velocidade ( $\theta$ /passo). O raio do círculo percorrido é fixo ( $LP = DP$ ), mantendo os raios incidente e difratado no plano do círculo focal [132].

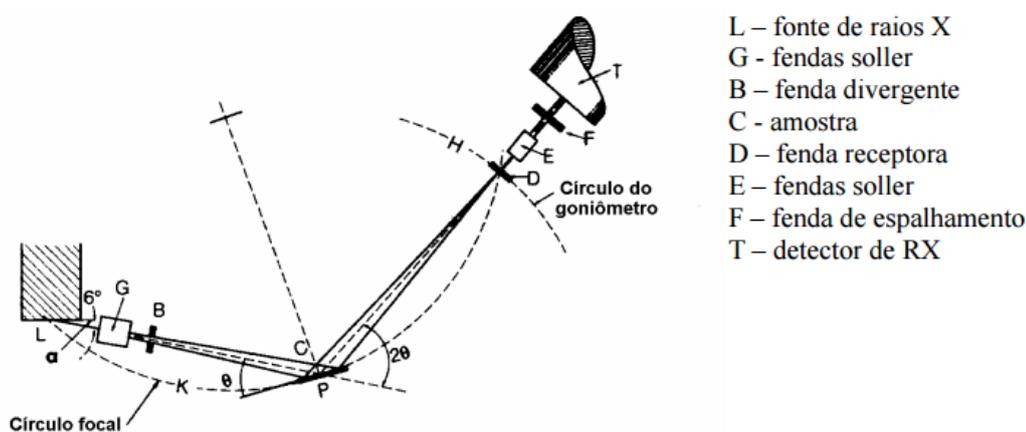


Figura 57: Esquema representando os componentes e a configuração convencional de um difratômetro de raios-X com geometria  $\theta$ - $2\theta$ . Adaptado da referência [132].

A partir da fonte (L), os raios-X atravessam a fenda Soller (G), que serve para eliminar parte da radiação que não é paralela ao plano do círculo do difratômetro, e cruzam a fenda de divergência que restringe o tamanho do feixe (B) antes de atingir a amostra (C). Os raios difratados convergem para a fenda de recepção (D), a qual elimina parte do feixe, permitindo apenas a passagem em determinado ângulo. Depois da fenda de recepção pode ser colocado um segundo conjunto de fenda Soller (E), bem como uma fenda de espalhamento (F), esta última para filtrar comprimentos de onda indesejáveis antes do feixe chegar ao detector (T) [132].

Os difratogramas resultantes da aplicação da técnica, são gráficos que expressam a intensidade do feixe difratado em função do ângulo de difração. Eles funcionam como impressões digitais, já que os planos de difração e suas respectivas distâncias interplanares, bem como as densidades de átomos ao longo de cada plano cristalino, são características específicas e únicas de cada substância. A identificação da amostra pode ser feita com a ajuda de bancos de dados contendo informações cristalográficas de vários materiais, como

o ICDD (*International Center for Diffraction Data*), ICSD (*Inorganic Crystal Structure Database*) ou, no caso utilizado neste trabalho, o JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) [129,130].

Com o recurso da técnica de DRX, fica fácil comprovar que uma substância com estrutura cristalina começa a se formar sobre os vidros após seu processo de imersão em SBF. Isso graças ao surgimento de picos antes não vistos devido à estrutura amorfa dos vidros. Entretanto, como relatado em alguns estudos, devido a HCA nucleada sobre as amostras ter um caráter ainda bastante amorfo, é muito difícil se obter dados que vão além da localização e distinção de alguns de seus planos cristalográficos.

## A.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os microscópios têm como função tornar visível aquilo que é pequeno demais para ser acessível ao olho humano. Os primeiros microscópios desenvolvidos foram os microscópios ópticos, que utilizam luz visível para iluminar a amostra e produzir a imagem. O limite máximo de resolução desses aparelhos é estabelecido pelos efeitos de difração, atingindo ampliações de até 2000 vezes para os mais convencionais, mas que pode variar de acordo com as lentes ópticas utilizadas em cada instrumento [133,134,135]. Para se atingir escalas ainda menores e com melhor resolução, entram em cena equipamentos mais sensíveis e com tecnologias muito mais sofisticadas. Para análises microestruturais de objetos sólidos, o microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um dos instrumentos mais versáteis disponíveis [133,134,135].

A microscopia eletrônica tem sido empregada no estudo de diversas áreas do conhecimento, bem como na indústria e até em análises forenses [136]. Ela é uma ótima ferramenta para caracterização de materiais, tanto de sua morfologia quanto composição, assim como na determinação da estrutura atômica de metais, cerâmicas, polímeros e até espécimes biológicas. Especificamente, quando aplicada na engenharia de tecidos, ela permite a visualização de interconexões de poros em *scaffolds*, o crescimento de HCA na superfície de materiais bioativos, a proliferação endotelial<sup>23</sup> e a citocompatibilidade<sup>24</sup> de amostras

---

<sup>23</sup> É referente a um tipo de célula achatada de espessura variável que recobre o interior dos vasos sanguíneos, especialmente os capilares sanguíneos, formando assim parte da sua parede.

<sup>24</sup> Compatibilidade proporcionada por um meio ou substância ao desenvolvimento celular.

submetidas a testes *in vivo*, bem como a presença e quantidade de microfissuras em biomateriais [34] [133] [134].

Um MEV típico trabalha em vácuo com poder de resolução nanométrica, geralmente causando efeitos destrutivos para a amostra. Seu princípio de funcionamento consiste na emissão termiônica de elétrons de um determinado material (normalmente de tungstênio), acelerados por tensões de 0,5 a 30 kV através de uma coluna mantida em alto vácuo em direção a um ânodo aterrado. Este sistema de eletrodos é chamado de canhão de elétrons. Posteriormente, os elétrons que atravessam o orifício do ânodo sofrem a ação de um conjunto de condensadoras (lentes eletromagnéticas), responsáveis por concentrar os elétrons em um feixe extremamente colimado (cerca de 50 Å de diâmetro) e direcioná-lo à abertura da última delas, também chamada de objetiva. A objetiva ajusta o foco do feixe de elétrons antes dele atingir a amostra analisada. Acima da abertura final, numa depressão dentro da objetiva, encontram-se um par de bobinas eletromagnéticas. São elas que defletem o feixe nas direções x e y e permitem a varredura da amostra [133,134,135,136]. A figura 58 apresenta um esquema do interior de um MEV.

A possibilidade de captar e medir as diversas radiações provenientes das interações elétron-amostra, tornam a microscopia eletrônica de varredura extremamente versátil. Após atingir a superfície do material em análise, o feixe de elétrons interage com os átomos presentes, produzindo diferentes sinais, tais como elétrons secundários, elétrons retroespalhados, elétrons Auger, raio-X característico, radiação eletromagnética no infravermelho, visível e ultravioleta entre outros [133,134,135,136]. Alguns destes efeitos estão exemplificados na figura 59.

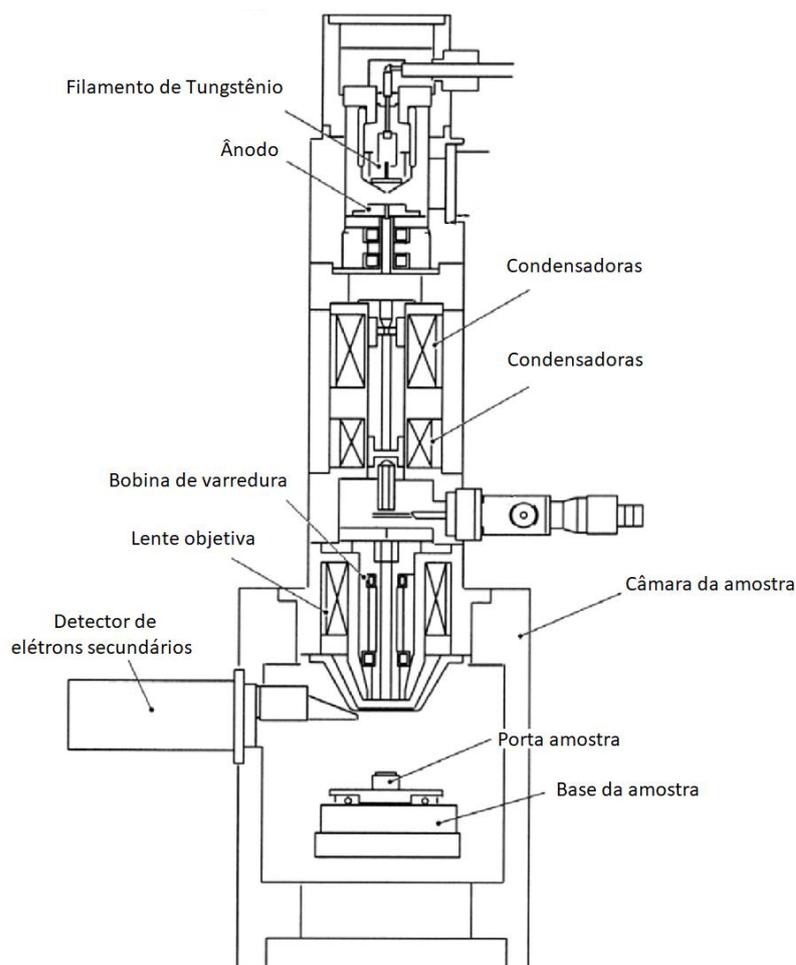


Figura 58: Esquema dos componentes internos de um MEV convencional. Adaptado da referência [134].

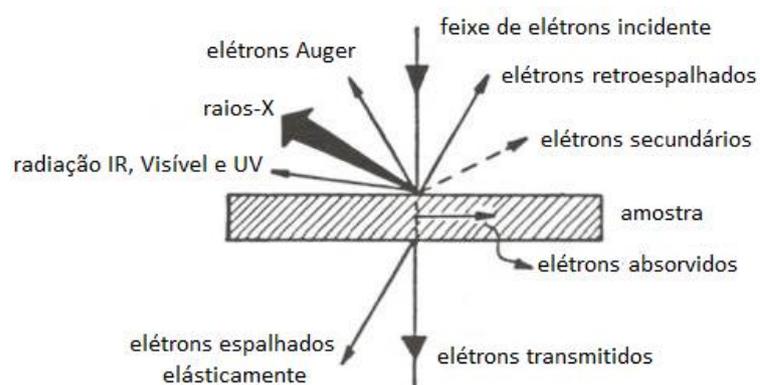


Figura 59: Ilustração dos efeitos gerados pela interação do feixe de elétrons incidente em uma amostra durante uma análise de MEV. Adaptado da referência [136].

A presença do potencial atômico e nuclear da amostra faz com que os elétrons que incidem sobre ela tenham modificações em sua velocidade inicial. As interações nas quais

ocorre mudança na trajetória do elétron sem que ocorra variação na sua energia cinética são ditas interações elásticas. Aquelas em que há transferência de energia do elétron incidente para os átomos da amostra são chamadas de interações inelásticas. Dessas interações, a geração de elétrons secundários e elétrons retroespalhados são responsáveis pelos sinais utilizados na formação das imagens vistas no MEV [133,134,135,136].

Provenientes das interações inelásticas do feixe de elétrons incidente com a amostra, os elétrons resultantes com energia inferior a 50 eV são chamados, por definição, de elétrons secundários. Por serem de baixa energia, eles só conseguem escapar se forem gerados a alguns nanômetros da superfície. Portanto, os elétrons secundários marcam com precisão a posição do feixe e dão informações topográficas com boa resolução. O detector de elétrons secundários mais usado é do tipo Everhart-Thornley. Ele é isolado eletricamente do resto do microscópio e possui na sua frente uma grade com potencial de +300 eV, utilizada para atrair os elétrons secundários e transformar a corrente elétrica produzida por eles em imagem. O resultado é apresentado com boa profundidade de foco para ampliações entre 10 e 100.000 vezes [133,134,135,136].

Outro método valioso na produção de informação topográfica e composicional da amostra é baseado na captação dos elétrons retroespalhados. Esses elétrons são resultado de colisões elásticas e inelásticas entre o feixe incidente e a superfície do material em análise, e possuem energias que vão desde 50 eV até a valores iguais aos dos elétrons incidentes. Os elétrons resultantes de colisões elásticas simples provém de camadas superficiais da amostra e são mais energéticos. Portanto, imagens formadas pela captação destes elétrons contêm pouca informação de profundidade. O sinal originário de elétrons retroespalhados com menores energias, vindos de interações que ocorrem em camadas mais internas da amostra, são oriundos da região do volume de interação com maior diâmetro do que o diâmetro do feixe primário. Isso faz com que a resolução da imagem gerada por eles seja inferior àquela produzida por elétrons secundários [133,134,135,136].

Um fator determinante na resolução da imagem formada por elétrons retroespalhados é o número atômico do elemento que compõe a amostra. Elementos com números atômicos maiores possuem mais cargas positivas em seu núcleo e, conseqüentemente, produzirão mais elétrons retroespalhados, concedendo imagens com contraste em função de Z. Ao contrário do detector de elétrons secundários, o de elétrons retroespalhados frequentemente possui uma grade com tensões negativas, com intuito de repelir os elétrons com baixas

energias e permitir que apenas aqueles mais energéticos realmente atinjam o detector. Na figura 60 são apresentadas duas imagens de nanohastes de Ni/Au. Nela, vemos que o contraste da imagem formada por elétrons secundários dificulta a identificação da imagem, enquanto aquela proveniente de elétrons retroespalhados é muito mais nítida [133,134,135,136].

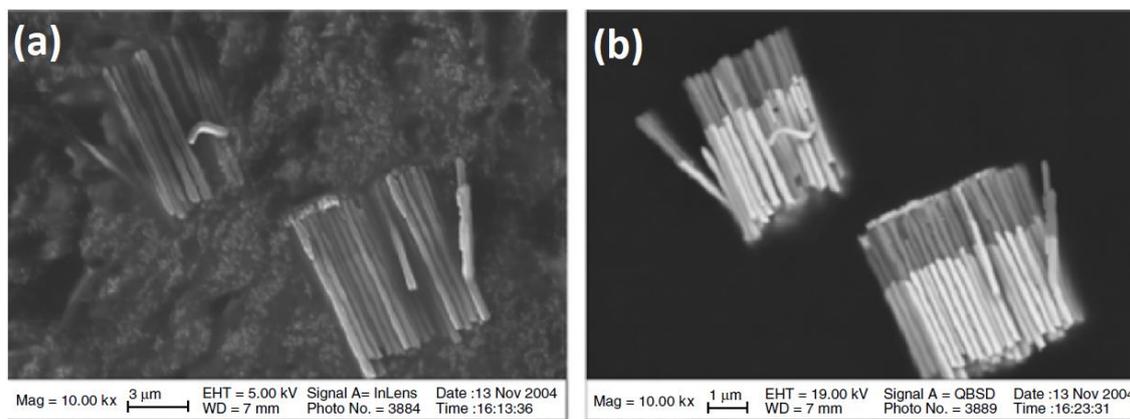


Figura 60: Imagens de Nanohastes de Ni/Au formadas pelo sinal de (a) elétrons secundários e (b) elétrons retroespalhados. Adaptado da referência [134].

Uma análise composicional da amostra pode ser utilizada de forma complementar, caso o microscópio eletrônico de varredura possua um detector de energia dispersiva de raios-X (EDS ou EDX). Quando um elétron do feixe incidente interage com elétrons de camadas mais internas de um átomo da amostra, ele pode causar a ejeção destes, deixando uma vacância nesta camada. O átomo fica então num estado excitado e, por meio de uma série de transições permitidas dos elétrons de camadas externas, tende a preencher o vazio da camada incompleta. Quando o produto desta readequação é uma transição radioativa, a diferença de energia é expressa como um fóton com energia altamente específica, o raios-X característico. A partir do sinal gerado neste processo o acessório de EDS permite que se faça uma análise semiquantitativa da composição do material em foco, possibilitando a identificação dos elementos químicos presentes nela, desde que, estes possuam número atômico superior a 11 (provavelmente pela baixa energia desses raios-X, acabam sendo reabsorvidos e não conseguem escapar da amostra) [134,137].

## A.6 Teste *in vitro* com solução SBF

O objetivo principal dos testes *in vitro* em vidros que se propõe serem bioativos, é avaliar a capacidade destes materiais desenvolverem uma camada de HCA em sua

superfície. Uma das primeiras tentativas de simular as condições *in vivo*, foi feita por Hench [138]. Ele demonstrou que o Bioglass<sup>®</sup> era capaz de formar esta camada biologicamente ativa quando imerso em solução de Tris hidroximetil amino metano (TRIS) e ácido clorídrico (HCl), ajustado com pH igual a 7,4.

Anos depois, intrigado com o fato da vitrocerâmica A-W que havia criado apresentar bioatividade *in vivo*, mas não fazer o mesmo após imersão em solução TRIS tampão, Kokubo decidiu inventar um fluido com propriedades mais próximas as do sangue. Ao imitar a concentração iônica e pH do fluido corpóreo, surgiu, então, o SBF. Por meio desta nova solução, Kokubo conseguiu atestar a formação da HCA na vitrocerâmica A-W também *in vitro* [35].

Com o êxito obtido, Kokubo e Hench realizaram testes independentes imergindo o Bioglass<sup>®</sup> no SBF, e ambos confirmaram a nucleação da HCA na superfície do vidro. Desde então, inúmeros testes com o fluido foram realizados nos mais diferentes tipos de amostra, sempre comparando o que se observava *in vitro* com o obtido quando o material era implantado em um organismo vivo. A grande maioria dos resultados demonstrou a concomitante formação ou não da HCA, tanto quando a amostra era imersa em SBF ou aplicada *in vivo* [139,140,141].

Baseado nestes resultados, em 1991 foi proposto que o requisito essencial para que um material se ligasse com o tecido ósseo vivo fosse a formação de uma apatita similar à do osso em sua superfície, quando este era implantado *in vivo*, e que essa formação poderia ser reproduzida em SBF. Isso significa que a bioatividade de um material pode ser prevista pelo exame da formação de HCA em sua superfície quando imerso em SBF [35].

A partir de então, diversos grupos de pesquisa tentaram desenvolver fluidos que pudessem aprimorar o SBF original, mas as complicações em se evitar a supersaturação da solução acabam dificultando inovações promissoras. Na tabela 6 é exposto um comparativo entre a concentração iônica do SBF criado por Kokubo e a do sangue [35].

Há trabalhos que colocam em cheque a eficácia da previsão de bioatividade feita com a utilização do SBF, alegando que testes *in vitro* com esse sistema geram falsos positivos e falsos negativos. Entretanto, apesar de afirmarem que o método necessita de aprimoramentos, também concordam que vários cientistas fazem uso do SBF e que este protocolo de teste de bioatividade continua sendo muito atrativo [142].

Na confecção do SBF muitos cuidados devem ser tomados, principalmente quanto a higienização do ambiente e das ferramentas usadas no preparo. Os reagentes devem ser pesados com precisão e adicionados na ordem correta ao recipiente que contem água deionizada, mantendo-se as condições de temperatura e pH devidamente ajustadas [35]. A tabela 7 relaciona os reagentes utilizados e suas respectivas massas/volumes para a fabricação de 1 litro do fluido.

Tabela 6: Concentração iônica nominal e pH do SBF comparados com o plasma sanguíneo. Adaptada da referência [35].

Íon	Concentração iônica (mM)	
	Plasma sanguíneo	SBF
Na <sup>+</sup>	142,0	142,0
K <sup>+</sup>	5,0	5,0
Mg <sup>+</sup>	1,5	1,5
Ca <sup>+</sup>	2,5	2,5
Cl <sup>-</sup>	103,0	147,8
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27,0	4,2
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0	1,0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,5	0,5
pH	7,2 – 7,4	7,40

Para o controle da temperatura e movimento do fluido durante o preparo, utiliza-se um reservatório térmico com agitador magnético acoplado a um controlador de temperatura, como pode ser visto na figura 61. O procedimento é dividido em três etapas. Na primeira, os reagentes do 1° ao 8° são dissolvidos, um a um, dentro da solução contida no recipiente de plástico. Na segunda, utiliza-se o TRIS e o HCl para ajustar o pH da solução em 7,4. Na terceira, por fim, o SBF é filtrado em uma membrana de poros de 0,2 µm com auxílio de uma seringa. Depois de preparado, o SBF deve ser conservado em um refrigerador entre 5 e 10°C por até 28 dias [35].

Tabela 7: Ordem, reagente, quantidade e pureza dos reagentes para preparar 1 l de SBF. Adaptado da referência [35].

Ordem	Reagente	Massa/Volume	Pureza (%)
1	NaCl	8,035 g	99,5
2	NaHCO <sub>3</sub>	0,355 g	99,5
3	KCl	0,225 g	99,5
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0,231 g	99,0
5	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,311 g	98,0
6	1,0M – HCl	39 ml	-
7	CaCl <sub>2</sub>	0,292 g	95,0
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,072 g	99,0
9	((HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub> ) (Tris)	6,118 g	99,0
10	1,0M – HCl	0 - 5 ml	-

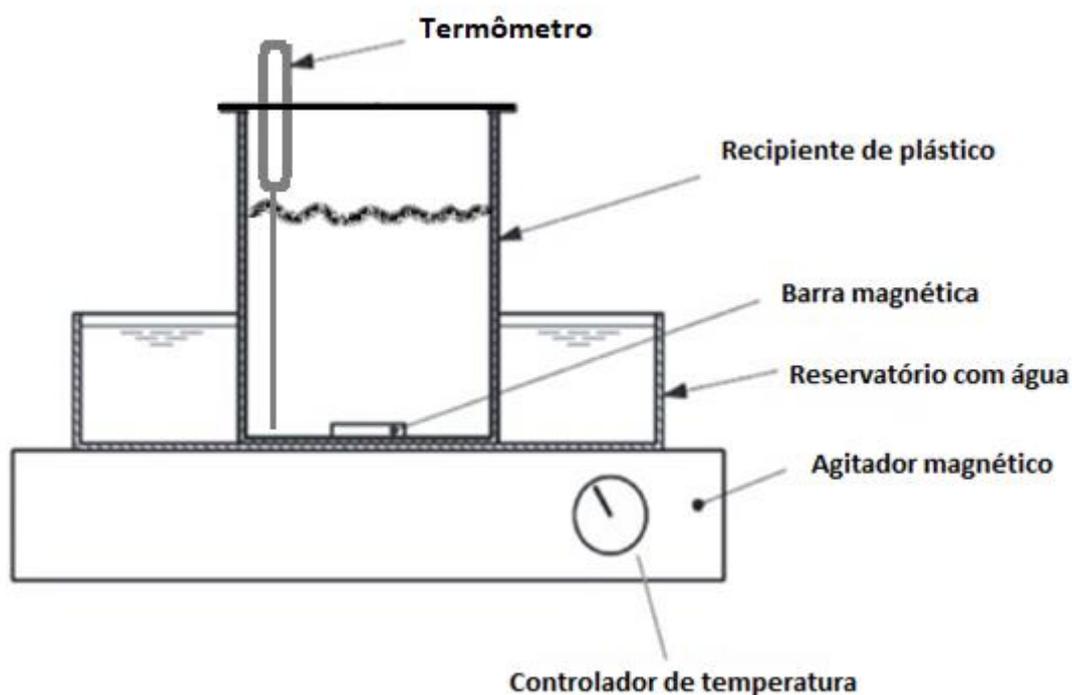


Figura 61: Ilustração que representa o processo de fabricação de SBF. Adaptado da referência [60].

O processo de imersão das amostras para o teste de sua bioatividade *in vitro* também deve seguir alguns protocolos. Para materiais densos, o conjunto SBF/amostra deve ter as dimensões ajustadas para que se obedeça à seguinte relação [35,60]:

$$V_s = \frac{S_a}{10} \quad (19)$$

onde  $V_s$  é volume de SBF a ser utilizado (ml) e  $S_a$  é a área aparente da superfície da amostra ( $\text{mm}^2$ ). No caso de materiais porosos, o volume de SBF deve ser maior que o  $V_s$  calculado na expressão 19. Assim se deve analisar o grau da porosidade da amostra e aumentar o volume de SBF para sua imersão [35].

Por fim, o volume de SBF calculado é inserido em um tubo falcon ou outro recipiente de plástico. Após o fluido ser aquecido entre 36,5-37 °C, a amostra pode ser posta em imersão, sempre garantindo que ela permaneça totalmente imersa. É recomendado que as amostras sejam colocadas no SBF como mostra a figura 62-A. A posição expressa na figura 62-B pode favorecer a formação da apatita apenas em uma região da amostra, devido processos de decantação [35].

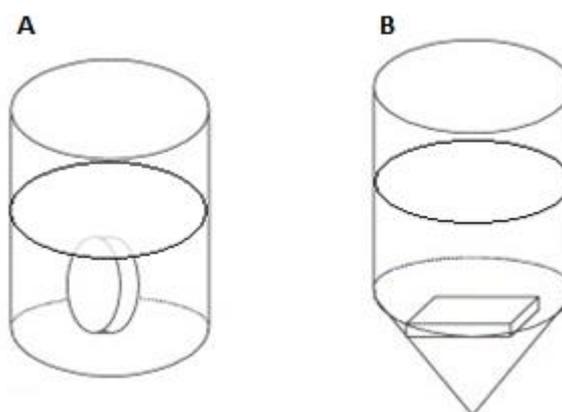


Figura 62: Exemplos de posicionamento de amostras em imersão em SBF.(A) Como é sugerido o posicionamento e (B) como deve ser evitado. Adaptada da referência [35].

# Referências

1. ESTATÍSTICAS nacionais de acidentes de trânsito. **Por Vias Seguras**, 2017. Disponível em:<[http://www.viasseguras.com/os\\_acidentes/estatisticas/estatisticas\\_nacionais](http://www.viasseguras.com/os_acidentes/estatisticas/estatisticas_nacionais)>. Acesso em: 15 Janeiro 2018.
2. SOARES, G. D. A. **Biomateriais**. Fórum de Biotecnologia Biomateriais. Rio de Janeiro: [s.n.]. 2005. p. 78.
3. PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, C. K.; MORAES, M. BIOMATERIAIS: Tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, 2015. p. 957-971.
4. BASU, B.; KATTI, D.; KUMAR, (Eds.). **Advanced Biomaterials: Fundamentals, processing, and applications**. 1. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., v. 1, 2009.
5. GROSS, U.; REVELL, P. A. **History of the European Society for Biomaterials**. 1. ed. [S.l.]: The European Society for Biomaterials, 2001.
6. HENCH, L. L. (Ed.). **An Introduction to Bioceramics**. 2. ed. [S.l.]: Imperial College Press, v. 1, 2013.
7. WEB of science. **web of knowledge**, 2018. Disponível em: <<https://webofknowledge.com>>. Acesso em: 28 Fevereiro 2018.
8. JONES, J. R.; CLARE, A. G. (Eds.). **Bio-Glasses: an Introduction**. 1. ed. [S.l.]: John Wiley and Sons, Ltd, v. 1, 2012.
9. YAO, et al. In vitro bioactive characteristics of borate-based glasses with controllable degradation behavior. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 90, n. 1, 2007. p. 303-306.
10. KASUGA, T. et al. Bioactive ceramics prepared by sintering and crystallization of calcium phosphate invert glasses. **Biomaterials**, v. 20, n. 15, 1999. p. 1415-1420.
11. RING, M. E. **História Ilustrada da Odontologia**. 1. ed. São Paulo: Editora Manole, 1998.
12. RATNER, B. D. et al. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, v. 1, 2004. 864 p.
13. TEOH, S. H. Introduction to biomaterials engineering and processing—an overview. In: \_\_\_\_\_ **Engineering materials for biomedical applications**. [S.l.]: [s.n.], 2004. p. 1-1.

14. VALLET-REGÍ, M.; ARCOS,. **Biomimetic Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications**. 1. ed. [S.l.]: RSC Nanoscience & Nanotechnology, v. 1, 2008.
15. GUTIERRES , M. et al. Substitutos Ósseos: conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de Medicina**, v. 19, n. 4, 2005. p. 153-162.
16. NAVARRO, M. et al. Review-Biomaterials in orthopaedics. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 5, n. 27, 2008. p. 1137-1158.
17. MAIA, M. et al. Facial structure reconstruction by biomaterials: literature review. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 25, n. 3, 2010. p. 566-572.
18. BIOMATERIAIS na medicina. **Biomateriais o desenvolvimento de um novo mundo**, 2018. Disponível em: <<http://biomatufjrjmacae.blogspot.com.br/2011/11/biomateriais-na-medicina.html>>. Acesso em: 15 Março 2018.
19. NEW biomaterials for orthopedic implants. **Dovepress: open access to scientific and medical research**, 2018. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/new-biomaterials-for-orthopedic-implants-peer-reviewed-fulltext-article-ORR>>. Acesso em: 15 Março 2018.
20. KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, 2000. p. 518-522.
21. COSTA, A. C. F. M. et al. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 4, n. 3, 2009. p. 29-38.
22. DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 9, 2009. p. 2343-2387.
23. BYSTROV, V. S. et al. Computational study of hydroxyapatite structures, properties and defects. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 48, n. 19, 2015. p. 195302.
24. KAUR, et al. A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication, and apatite formation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 1, 2014. p. 254-274.
25. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e atlas**. 12. ed. [S.l.]: Guanabara Koogan Ltda, v. 1, 2013.
26. OSAKA, et al. Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid. **Journal of materials science: materials in medicine**, v. 2, n. 1, 1991. p. 51-55.

27. PRAMANIK, et al. Development of high strength hydroxyapatite by solid-state-sintering process. **Ceramics International**, v. 33, n. 3, 2007. p. 419–426.
28. WEINAND, W. R.; LIMA, W. M. **Processo de obtenção de hidroxiapatita via calcinação de ossos de peixe**. 0506242-0, 07 Março 2017.
29. APARECIDA, et al. Estudo da influência dos íons  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  E  $CO_3^{2-}$  na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP). **Química Nova**, v. 30, n. 4, 2007. p. 892-896.
30. JOHANSSON, S.-A.; NANCOLLAS, G. H. The Role of Brushite and Octacalcium Phosphate in Apatite Formation. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 3, n. 1, 1992. p. 61-82.
31. BOCCACCINI, A.; BRAUER, D.; HUPA, L. (Eds.). **Bioactive Glasses: Fundamentals, Technology and Applications**. 1. ed. [S.l.]: Royal Society of Chemistry, v. 1, 2016. 530 p.
32. VALLET-REGÍ, et al. XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of in vitro growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 44, n. 4, 1999. p. 416-421.
33. PUCÉAT, E.; REYNARD, B.; LÉCUYER, C. Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatites? **Chemical Geology**, v. 205, n. 1-2, 2004. p. 83-97.
34. SAMUDRALA, R. et al. Cytocompatibility studies of titania-doped calcium borosilicate bioactive glasses *in-vitro*. **Materials Science and Engineering: C**, v. 77, 2017. p. 772-779.
35. KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, 2006. p. 2907-2915.
36. SHELBY, E. **Introduction to Glass Science and Technology**. 2. ed. [S.l.]: The Royal Society of Chemistry, v. 1, 2005.
37. ZACHARIASEN, H. The atomic arrangement in glass. **Journal of the American Chemical Society**, v. 54, n. 10, 1932. p. 3841-3851.
38. ALVES, O.; GIMENEZ, I.; MAZALI, I. Vidros. In: \_\_\_\_\_ **Cadernos Temáticos - Química Nova na Escola**. [S.l.]: [s.n.], 2001. p. 9-20.

39. BRAUER, D. S. Bioactive Glasses-Structure and Properties. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, 2015. p. 2-24.
40. ZARZYCKI, J. **Glasses and the vitreous state**. 1. ed. [S.l.]: Cambridge University Press, v. 1, 1991. 501 p.
41. HENCH, L. L. The story of Bioglass<sup>®</sup>. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 11, 2006. p. 967-978.
42. KONIJNENDIJK, W. L.; STEVELS, J. M. The structure of borate glasses studied by Raman scattering. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 18, n. 3, 1975. p. 307-331.
43. MEERA, B. N.; RAMAKRISHNA, J. Raman spectral studies of borate glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 159, n. 1-2, 1993. p. 1-21.
44. WRIGHT, A. C. Borate structures: crystalline and vitreous. **Physics and Chemistry of Glasses-European Journal of Glass Science and Technology Part B**, v. 51, n. 1. p. 1-39.
45. HENCH, L. L.; SPLINTER, R. J.; ALLEN, W. C. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. **Biomedical Materials Research Part A**, v. 5, n. 2, 1971. p. 117-141.
46. CERRUTI, M. G. **Characterization of bioactive glasses. Effect of the immersion in solutions that simulate body fluids**. University of Turin. Turin, p. 224. 2004.
47. JONES, J. R. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. **Acta biomaterialia**, v. 23, 2015. p. 53-82.
48. OONISHI, H. et al. Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass<sup>®</sup>, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. **Journal of biomedical materials research**, v. 51, n. 1, 2000. p. 37-46.
49. HENCH, L. L. Chronology of bioactive glass development and clinical applications. **New Journal of Glass and Ceramics**, v. 3, n. 2, 2013. p. 67-73.
50. BRINK, M. The influence of alkali and alkaline earths on the working range for bioactive glasses. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 36, n. 1, 1997. p. 109-117.
51. HUANG, et al. Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 7, 2006. p. 583-596.

52. JUNG, S.; DAY, D. E. Conversion kinetics of silicate, borosilicate, and borate bioactive glasses to hydroxyapatite. **Physics and Chemistry of Glasses-European Journal of Glass Science and Technology Part B**, v. 50, n. 2, 2009. p. 85-88.
53. YLÄNEN, H. (Ed.). **Bioactive Glasses: Materials, Properties and Applications**. 2. ed. [S.l.]: Elsevier Ltd, v. 1, 2018.
54. DAGUANO, K. M. D. F. J. **Biovidros e vitrocerâmicos bioativos do sistema  $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{SiO}_2 \cdot \text{MgO}$  para aplicações biomédicas: processamento e caracterizações estruturais, mecânicas e biológicas**. Universidade de São Paulo. Lorena, p. 202. 2011.
55. HOUSER, C. A. et al. Sodium-Hydrogen Interdiffusion in Sodium Silicate Glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 41, n. 1, 1980. p. 89-98.
56. GOETSCHIUS, K. L. et al. Dissolution behavior of ternary alkali-alkaline earth-borate glasses in water. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 487, n. 1, 2018. p. 12-18.
57. VELÉZ, M. H.; TULLER, H. L.; UHLMANN, D. R. Chemical durability of lithium borate glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 49, n. 1-3, 1982. p. 351-362.
58. GEORGE, J. L.; BROW, R. K. In-situ characterization of borate glass dissolution kinetics by  $\mu$ -Raman spectroscopy. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 426, 2015. p. 116-124.
59. GENESTE, G.; BOUYER, F.; GIN, S. Hydrogen-sodium interdiffusion in borosilicate glasses investigated from first principles. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 352, n. 28-29, 2006. p. 3147-3152.
60. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO FDIS 23317: Impants for surgery – In vitro evaluation for apatite – forming ability of implant**. [S.l.]. 2014.
61. BAJAJ, et al. Effects of doping trivalent ions in bismuth borate glasses. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 92, n. 5, 2009. p. 1036-1041.
62. SHAABAN, K. et al. Structural Analyses of Halide Alkali Lead Borate Glasses. **Silicon**, 2016. p. 1-7.
63. UPENDER, G.; BABUA, J. C.; MOUL, V.. Structure, glass transition temperature and spectroscopic properties of  $10\text{Li}_2\text{O} \cdot x\text{P}_2\text{O}_5 \cdot (89 - x)\text{TeO}_2 \cdot 1\text{CuO}$  ( $5 \leq x \leq 25$  mol%) glass system. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 89, 2012. p. 39-45.

64. SARAVANAN, ; RAJESH, ; PALANI,. Thermal and structural properties of mixed alkali and transition metal ions in sodium borate glass. **International Journal of Recent Research and Review**, 8, n. 3, 2015. 1-9.
65. GRESSLER, A.; SHELBY, J. E. Properties and structure of PbO-PbF<sub>2</sub>-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> glasses. **Journal of Applied Physics**, v. 66, n. 3, 1989. p. 1127-1131.
66. SOLIMAN, A.. XRD, DTA and density studies lithium borate glasses containing copper. **Armenian Journal of Physics**, v. 1, n. 3, 2008. p. 188-197.
67. O'DONNELL, M. et al. Materials characterisation and cytotoxic assessment of strontium-substituted bioactive glasses for bone regeneration. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 40, 2010. p. 8934-8941.
68. ABDELGHANY, A. M.; ELSAYED, H.; ALTURKI, A. M. Hydroxyapatite formation and bone bonding ability of ternary borate glasses ceramics containing ZnO. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, 2014. p. 470-480.
69. ABDELGHANY, A. M.; KAMAL, H. Spectroscopic investigation of synergetic bioactivity behavior of some ternary borate glasses containing fluoride anions. **Ceramics international**, v. 40, n. 6, 2014. p. 8003-8011.
70. BINGEL, et al. Influence of dissolution medium pH on ion release and apatite formation of Bioglass® 45S5. **Materials Letters**, v. 143, 2015. p. 279-282.
71. JONES, J. R.; SEPULVEDA, P.; HENCH, L. L. Dose-dependent behavior of bioactive glass dissolution. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 58, n. 6, 2001. p. 720-726.
72. DELIORMANLI, A. M. Size-dependent degradation and bioactivity of borate bioactive glass. **Ceramics International**, v. 39, n. 7, 2013. p. 8087-8095.
73. THIND, et al. Soluble borate glasses: in vitro analysis. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 90, n. 2, 2007. p. 467-471.
74. JEDLICKA, A. B.; CLARE, A. G. Chemical durability of commercial silicate glasses. I. Material characterization. **Journal of non-crystalline solids**, v. 281, n. 1-3, 2001. p. 6-24.
75. BRAUER, S. et al. Fluoride-containing bioactive glasses: effect of glass design and structure on degradation, pH and apatite formation in simulated body fluid. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 8, 2010. p. 3275-3282.

76. MANUPRIYA et al. Compositional dependence of in-vitro bioactivity in sodium calcium borate glasses. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 70, n. 8, 2009. p. 1137-1141.
77. ZHANG, et al. Teicoplanin-loaded borate bioactive glass implants for treating chronic bone infection in a rabbit tibia osteomyelitis model. **Biomaterials**, v. 31, n. 22, 2010. p. 5865-5874.
78. NING, et al. Synthesis and in vitro bioactivity of a borate-based bioglass. **Materials letters**, v. 61, n. 30, 2007. p. 5223–5226.
79. PASCUTA, ; LUNGU, ; ARDELEAN,. FTIR and Raman spectroscopic investigation of some strontium–borate glasses doped with iron ions. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 21, n. 6, 2010. p. 548-553.
80. KAMITSOS, E. I.; CHRYSOSIKOS, G. D. Borate glass structure by Raman and infrared spectroscopies. **Journal of molecular structure**, v. 247, 1990. p. 1-16.
81. KROGH-MOE, J. The structure of vitreous and liquid boron oxide. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 1, n. 4, 1969. p. 269-284.
82. LARINK , D. et al. Mixed Network Former Effect in Ion-Conducting Alkali Borophosphate Glasses: Structure/Property Correlations in the System  $[M_2O]_{1/3}[(B_2O_3)_x(P_2O_5)_{1-x}]_{2/3}$  (M = Li, K, Cs). **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 50, 2012. p. 26162-26176.
83. SARANTI, ; KOUTSELAS, ; KARAKASSIDES, M.. Bioactive glasses in the system CaO–B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>–P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: preparation, structural study and in vitro evaluation. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 352, n. 5, 2006. p. 390-398.
84. ANASTASOPOULOU , M. et al. Structural and Theoretical Study of Strontium Borophosphate Glasses Using Raman Spectroscopy and ab Initio Molecular Orbital Method. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 17, 2017. p. 4610-4619.
85. KOUTSOPOULOS,. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 62, n. 4, 2002. p. 600-612.
86. NOTINGHER, et al. Application of Raman microspectroscopy to the characterisation of bioactive materials. **Materials Characterization**, v. 49, n. 3, 2002. p. 255-260.

87. CERRUTI, et al. Surface modifications of bioglass immersed in TRIS-buffered solution. A multitechnical spectroscopic study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 30, 2005. p. 14496-14505.
88. RANJKESH, B. et al. Apatite precipitation on a novel fast-setting calcium silicate cement containing fluoride. **Acta biomaterialia odontologica Scandinavica**, v. 2, n. 1, 2016. p. 68-78.
89. BELLUCCI, D. et al. In situ Raman spectroscopy investigation of bioactive glass reactivity: Simulated body fluid solution vs TRIS-buffered solution. **Materials characterization**, v. 62, n. 10, 2011. p. 1021-1028.
90. AWONUSI, A.; MORRIS, M. D.; TECKLENBURG, M. J. Carbonate Assignment and Calibration in the Raman Spectrum of Apatite. **Calcified tissue international**, 81, n. 1, 2007. p. 46-52.
91. REHMAN, et al. Analysis of surface layers on bioactive glasses. **Biomaterials**, v. 15, n. 10, 1994. p. 865-870.
92. NELSON, D. G.; WILLIAMSON, B. E. Low-temperature laser Raman spectroscopy of synthetic carbonated apatites and dental enamel. **Australian Journal of Chemistry**, v. 35, n. 4, 1982. p. 715-727.
93. KAVITHA, R. J. et al. Synthesis and Invitro characterisation of lithium doped bioactive glass through quick alkali Sol-Gel method. **International Journal of Innovative Research in Science & Engineering**, v. 1, n. 2, 2014. p. 2347-3207.
94. KHAN, A. F. et al. Raman spectroscopy of natural bone and synthetic apatites. **Applied Spectroscopy Reviews**, 48, n. 4, 2013. 329-355.
95. NOTINGHER, et al. Application of FTIR and Raman spectroscopy to characterisation of bioactive materials and living cells. **Journal of Spectroscopy**, v. 17, n. 2-3, 2003. p. 275-288.
96. HAN, ; DAY, D. E. Reaction of sodium calcium borate glasses to form hydroxyapatite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 9, 2007. p. 1837-1847.
97. MARGHA, H.; ABDELGHANY, A.. Bone bonding ability of some borate bio-glasses and their corresponding glass-ceramic derivatives. **Processing and Application of Ceramics**, v. 6, n. 4, 2012. p. 183-192.

98. YIANNOPOULOS , Y. D.; CHRYSSEIKOS, G. D.; KAMITSOS, E. I. Structure and properties of alkaline earth borate glasses. **Physics and chemistry of glasses**, v. 42, n. 3, 2001. p. 164-172.
99. THEODOROU, et al. Comparative bioactivity study of 45S5 and 58S bioglasses in organic and inorganic environment. **Bioceramics Development and Applications**, v. 1, 2011.
100. FILHO, ; LATORRE, G. ; HENCH, L.. Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45%. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 30, n. 4, 1996. p. 509-514.
101. SARAVANAPAVAN, et al. Bioactivity of gel–glass powders in the CaO-SiO<sub>2</sub> system: A comparison with ternary (CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>) and quaternary glasses (SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O). **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 66, n. 1, 2002. p. 110-119.
102. REHMAN, ; KNOWLES, ; BONFIELD,. Analysis of in vitro reaction layers formed on Bioglass<sup>®</sup> using thin-film X-ray diffraction and ATR-FTIR microspectroscopy. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 41, n. 1, 1998. p. 162-166.
103. SROKA-BARTNICKA, A. et al. Structural transformation of synthetic hydroxyapatite under simulated in vivo conditions studied with ATR-FTIR spectroscopic imaging. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 171, 2017. p. 155-161.
104. OUIS, ; ABDELGHANY, ; ELBATAL, H.. Corrosion mechanism and bioactivity of borate glasses analogue to Hench's bioglass. **Processing and Application of Ceramics**, v. 6, n. 3, 2012. p. 141–149.
105. BOCCACCINI, A. R. et al. Sintering, crystallisation and biodegradation behaviour of Bioglass<sup>®</sup>-derived glass–ceramics. **Faraday discussions**, v. 136, 2007. p. 27-44.
106. HOPPE, A. et al. In vitro reactivity of Cu doped 45S5 Bioglass<sup>®</sup> derived scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 41, 2013. p. 5659-5674.
107. WEINER' , ; BAR-YOSEFA,. Ofer. States of preservation of bones from prehistoric sites in the Near East: a survey. **Journal of Archaeological Science**, v. 17, n. 2, 1990. p. 187-196.

108. SA, Y. et al. Are different crystallinity-index-calculating methods of hydroxyapatite efficient and consistent? **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 13, 2017. p. 5723-5731.
109. BHAKTA, et al. Prediction of osteoconductive activity of modified potassium fluorrichterite glass-ceramics by immersion in simulated body fluid. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 11, 2010. p. 2979-2988.
110. ARCE, H. et al. Effect of pH and temperature on the formation of hydroxyapatite at low temperatures by decomposition of a Ca-EDTA complex. **Polyhedron**, v. 23, n. 11, 2004. p. 1897-1901.
111. MACKENZIE, R. C. Nomenclature in thermal analysis, part IV. **Thermochimica acta**, v. 28, n. 1, 1979. p. 1-6.
112. BERNAL, C. et al. Influência de alguns parâmetros experimentais no resultado de análises calorimétricas diferenciais - DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, 2002. p. 849-855.
113. NETZSCH. **Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC) / Análise Térmica Diferencial (DTA)**, 2018. Disponível em: <<https://www.netzsch-thermal-analysis.com/pt/landing-pages/calorimetro-diferencial-de-varredura-dsc-analise-termica-diferencial-dta/>>. Acesso em: 10 Abril 2018.
114. BROWN, M. E. (Ed.). **Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications**. 2. ed. [S.l.]: Kluwer Academic Publishers, v. 1, 2001. 264 p.
115. IONASHIRO, M.; CAIRES, F. J.; GOMES, D. J. C. **Giolito: fundamentos da termogravimetria e análise térmica diferencial/calorimetria exploratória diferencial**. 1. ed. [S.l.]: São Paulo: Giz, v. 1, 2005. 80 p.
116. MA, et al. Thermal stability of Na<sub>2</sub>O-FeO-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 409, 2015. p. 131-138.
117. LIN, C.-C.; HUANG, L.-C.; SHEN, N. Na<sub>2</sub>CaSi<sub>2</sub>O<sub>6</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> based bioactive glasses. Part 1: Elasticity and structure. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 351, n. 40-42, 2005. p. 3195-3203.
118. HRUBÝ, A. Evaluation of glass-forming tendency by means of DTA. **Czechoslovak Journal of Physics B**, v. 22, n. 11, 1972. p. 1187-1193.
119. STUART, B. **Infrared spectroscopy: Fundamental and applications**. 1. ed. [S.l.]: Google Scholar, v. 1, 2004. 203 p.

120. SMITH, B. C. **Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy**. 2. ed. [S.l.]: CRC press, v. 1, 2011. 182 p.
121. SCHRADER, (Ed.). **Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications**. 1. ed. [S.l.]: VCH Verlagsgesellschaft, v. 1, 1995. 780 p.
122. UR REHMAN, ; MOVASAGHI, ; REHMAN,. **Vibrational spectroscopy for tissue analysis**. 1. ed. [S.l.]: CRC Press, v. 1, 2012. 303 p.
123. ISMAIL , A. A.; VAN DE VOORT , F. R.; SEDMAN, J. Fourier transform infrared spectroscopy: principles and applications. In: \_\_\_\_\_ **Techniques and instrumentation in analytical chemistry**. [S.l.]: [s.n.], 1997. p. 93-139.
124. SHEMESH, A. Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 54, n. 9, 1990. p. 2433-2438.
125. CHALMERS , J. M.; GRIFFITHS, P. R. (Eds.). **Handbook of Vibrational Spectroscopy: Theory and Instrumentation**. [S.l.]: [s.n.], v. 1, 2002. 785 p.
126. JIMENEZ-SANDOVAL, S. Micro-Raman spectroscopy: a powerful technique for materials research. **Microelectronics Journal**, v. 31, n. 6, 2000.
127. SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**. 2. ed. [S.l.]: Unesp, v. 1, 1996.
128. HINRICHS, R.; VASCONCELLOS, M. A. Z. Espectroscopia micro-Raman. In: \_\_\_\_\_ **Técnicas instrumentais não destrutivas aplicadas a gemas do Rio Grande do Sul**. [S.l.]: IGeo/UFRGS, 2014. Cap. 10, p. 145-157.
129. CULLITY, B. D. **Elements of X-ray Diffraction**. 2. ed. [S.l.]: Addison-Wesley Publishing Company, Inc, v. 1, 1978. 555 p.
130. KITTEL,. **Introduction to Solid State Physics**. 8. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc, v. 1, 2004. 680 p.
131. CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: uma introdução**. 7. ed. [S.l.]: Grupo Gen-LTC, v. 1, 2008. 705 p.
132. JENKINS, R.; SNYDER, R. L. **Introduction to X-ray Powder Diffractometry**. 5. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, INC., v. 1, 1996. 403 p.
133. DEDAVID, A.; GOMES, C. ; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. 1. ed. [S.l.]: EdIPUCRS, v. 1, 2007. 60 p.

134. ZHOU, et al. Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). In: \_\_\_\_\_ **Scanning microscopy for nanotechnology**. [S.l.]: Springer New York, 2006. p. 1-40.
135. MALISKA, A. Microscopia eletrônica de varredura. **Universidade Federal de Santa Catarina**. Florianópolis, p. 97. 2005.
136. PADILHA, F.; FILHO, F. A. **Técnicas de análise microestrutural**. 1. ed. [S.l.]: Hemus, v. 1, 2004. 193 p.
137. OLIVEIRA, S. D. A. F. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e biológicas**, 9, n. 1, 2010. 37-44.
138. OGINO, ; OHUCHI, ; HENCH. , L. Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 14, n. 1, 1980. p. 55-64.
139. HÖLAND, W. et al. Interface reactions between machinable bioactive glass-ceramics and bone. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 19, n. 3, 1985. p. 303-312.
140. OHTSUKI , C. et al. Apatite formation on the surface of ceravital-type glass-ceramic in the body. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 25, n. 11, 1991. p. 1363-1370.
141. KOKUBO, T. et al. Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 24, n. 3, 1990. p. 331-343.
142. BOHNER, M.; LEMAITRE, J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? **Biomaterials**, v. 30, n. 12, 2009. p. 2175-2179.
143. HARRIS, E. D. A requirement for copper in angiogenesis. **Nutrition Reviews**, v. 62, n. 2, 2004. p. 60-64.
144. JUNG, S. B.; DAY, D. E.; BROWN, R. F. Comparison of self-bonded three dimensional bioactive glass fiber scaffolds after in-vivo implantation in rats. In: NARAYAN, ; MCKITTRICK , **Advances in Bioceramics and Biotechnologies**. [S.l.]: [s.n.], 2010. p. 115-132.