



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Dissertação de Mestrado

“Influência dos tipos de agitações mecânica e ultrassônica na síntese de vidros bioativos com e sem íons fluoreto através de metodologia sol-gel simplificada”

Autora: Ingrid Elen Pinto e Souza

Orientadora: Prof^a Dr^a Marivalda de Magalhães Pereira

Coorientadora: Dr^a Talita Martins

Fevereiro/ 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Ingrid Elen Pinto e Souza

“Influência dos tipos de agitações mecânica e ultrassônica na síntese de vidros bioativos com e sem íons fluoreto através de metodologia sol-gel simplificada”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, de Materiais e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientadora: Prof^a Dr^a Marivalda de Magalhães Pereira

Coorientadora: Dr^a Talita Martins

BELO HORIZONTE – MG
ESCOLA DE ENGENHARIA DA UFMG
Fevereiro de 2019

S729i

Souza, Ingrid Elen Pinto e.

Influência dos tipos de agitações mecânica e ultrassônica na síntese de vidros bioativos com e sem íons fluoreto através da metodologia sol-gel simplificada [manuscrito] / Ingrid Elen Pinto e Souza. - 2019. xii, 70 f., enc.: il.

Orientadora: Marivalda de Magalhães Pereira.
Coorientadora: Talita Martins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 5-24.

1. Engenharia metalúrgica - Teses. 2. Ciência dos Materiais – Teses. 3. Flúor - Teses. 4. Compostos bioativos – Teses. I. Pereira, Marivalda de Magalhães. II. Martins, Talita. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 620(043)

São nossas escolhas que mostram o que realmente somos, mais do que nossas habilidades.

J.K. Rowling

AGRADECIMENTOS

Devo deixar meus sinceros agradecimentos a cada uma das pessoas que contribuíram para a conclusão deste trabalho:

Primeiramente, a Deus por mais uma oportunidade concedida a mim;

À Nossa Senhora Aparecida, por ser meu para-raios, consolo e fortaleza;

À minha mãe, Salete, que sempre me incentivou a estudar e foi quem, principalmente, proporcionou para que mais esta etapa fosse concluída, dando seu apoio incondicional. Este momento não teria chegado, se não fosse pela a crença dela em mim. Obrigada.

Ao Thiago, por ter me acompanhado em todos os dias destes dois anos, me dando forças e coragem para prosseguir sem desanimar nas dificuldades e entendendo cada ausência minha.

As minhas tias Arlete, Irlete, Elizabete e Eliete (*in memorian*) que, assim como minha mãe, são exemplos de professoras a serem seguidos.

Àquelas pessoas que desde o ensino fundamental me acompanham, Iracy, Ana e Marina, por me emprestarem os ouvidos e serem apoio durante todo este tempo;

A minha prima Gláucia, que se alegrou comigo em cada vitória;

Aos meus colegas do Laboratório de Biomateriais, que a cada dia me ensinam um pouco mais sobre a vida, amizade, amor e culinária. Obrigada Priscilla, Diogo, Andréia, Breno, Layla e Cheisy. Agradeço ainda a Agda Oliveira e a Sandhra Carvalho, que, por várias vezes, pacientemente me instruíram.

Ao Professor Eduardo pela amizade e por sempre estar disposto a ajudar.

Um agradecimento especial às minhas orientadoras Professora Marivalda e Professora Talita que me conduziram até aqui. Obrigada a vocês pela amizade, pela

paciência e pela oportunidade de estar junto desta equipe maravilhosa de pesquisadores.

A cada técnico administrativo, professores e técnicos de laboratório do Departamento de Engenharia Metalúrgica, Minas e Materiais, em especial à Maria Aparecida Pacheco (Cida), Ilda Batista e Patrícia Azevedo por toda assistência e amizade durante este tempo.

Ao Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais e ao PPGEM pela oportunidade e suporte durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE NOTAÇÕES	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral.....	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 O vidro bioativo.....	5
3.1.1 Síntese de vidros bioativos via rota sol-gel.....	7
3.1.2 A estrutura dos vidros bioativos.....	11
3.1.3 Bioatividade dos vidros.....	14
3.3 Incorporação de íons terapêuticos ao vidro bioativo	16
3.3.1 Vidro bioativo contendo íons fluoreto.....	18
3.4 Aplicações clínicas do vidro bioativo	21
3.5 Sonoquímica.....	24
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	27
4.1 Etapas de desenvolvimento do trabalho	27
4.2 Materiais	28
4.3 Síntese do vidro bioativo.....	28
4.3.1 Síntese do vidro bioativo através de agitação ultrassônica.....	28
4.3.2 Síntese do vidro bioativo através de agitação mecânica	29
4.4 Caracterização dos vidros bioativos.....	30
4.4.1 Composição química.....	30
4.4.2 Análises da morfologia e distribuição de tamanho	31
4.4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	31
4.4.2.2 Microscopia de força atômica (AFM)	31
4.4.2.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	31
4.4.3 Análise das características estruturais	32
4.4.3.1 Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)...	32
4.4.3.2 Difração de raio-X (DRX).....	32
4.4.3.3 Adsorção de nitrogênio por método BET	32

4.4.4 Análise do comportamento das partículas por exposição a fluido corporal simulado (SBF)	33
4.4.4.1 Preparação do SBF	33
4.4.4.2 Procedimento do teste de capacidade de formação de apatita.....	33
4.4.4.3 Caracterização das amostras	34
4.4.5 Caracterização biológica <i>in vitro</i> dos materiais	34
4.4.5.1 Análise de viabilidade celular por MTT	34
4.4.5.2 Ensaio de Calceína	35
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Caracterização química dos vidros bioativos	37
5.1.1 Análises da composição química por ICP-OES	37
5.2 Caracterização física dos vidros bioativos	38
5.2.1 Análises da morfologia por MEV e MFA e da distribuição de tamanho de partícula por DLS	38
5.2.2 Análises das características estruturais por FTIR, DRX, composição química e adsorção de Nitrogênio	44
5.3 Análise do comportamento dos vidros expostos à SBF	50
5.4 Caracterização biológica <i>in vitro</i> dos materiais	57
5.4.1 Análise de viabilidade celular por MTT	57
5.4.2 Ensaio de Calceína	59
6. CONCLUSÕES	62
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 3. 1: Fluxograma do processo de produção de vidros a partir da síntese sol-gel (Adaptado:(RAHMAN; PADAVETTAN, 2012))	8
Figura 3. 2: As reações gerais de TEOS que levam à formação de partículas de sílica no processo sol-gel (Adaptado: (RAHMAN; PADAVETTAN, 2012)).....	9
Figura 3.3: Esquema de reações no processo sol-gel para formação de sílica tetraédrica e nanopartículas a temperatura ambiente (Adaptado: (JONES, 2015))	12
Figura 3. 4: Visão geral das respostas biológicas aos produtos de dissolução iônica de vidros bioativos (Adaptado:(HOPPE; GÜLDAL; BOCCACCINI, 2011)).	18
Figura 3. 5: Diagrama estrutural do cristal de apatita com a célula unitária delineada em preto. Os tetraedros de PO ₄ estão representados em amarelo, o Ca ⁺ menor está representado em poliedros vermelhos, o Ca ²⁺ está representado em esferas azuis e os íons de flúor (que designam a fluorapatita) estão em esferas verdes (Adaptado: (DAR; KHAN; BIRCH, 2017))......	19
Figura 3. 6: Efeito hipotético da adição de íons fluoreto na rede de silicato dos vidros bioativos (Adaptado: (RABIEE et al., 2015)).....	20
Figura 4. 1: Fluxograma das atividades desenvolvidas neste trabalho	27
Figura 4. 2: Representação esquemática da síntese de VB por agitação ultrassônica	29
Figura 4. 3: Representação esquemática da síntese de VB por agitação mecânica...30	
Figura 5. 1: Fotografias dos vidros bioativos sintetizados neste estudo.....	38
Figura 5. 2: Imagens da superfície de vidros bioativos obtidas por MEV e espectros de EDS das respectivas regiões para as amostras (a) VBM, (b) VBU, (c) VBFM, e (d) VBFU.	40
Figura 5. 3: Imagens de MFA das partículas de (a) VBM, (b) VBU, (c) VBFM, e (d) VBFU.	41
Figura 5. 4: Distribuição de diâmetro de partículas por análise de DLS para as amostras de (a) VBM, (b) VBU, (c) VBFM, e (d) VBFU.	42
Figura 5. 5: Espectro FTIR dos vidros bioativos produzidos (2000- 450 cm ⁻¹): (a) VBM; (b) VBU; (c) VBFM; e (d) VBFU.....	45
Figura 5. 6: Espectros de DRX para as amostras de (a) VBM, (b) VBU, (c) VBFM e (d) VBFU e para o composto (i) CaF ₂ . Os * indicam a presença de picos nos espectros..	47
Figura 5.7: Isotermas de sorção de nitrogênio e distribuições de tamanho de poro (gráfico inserido) para (a) VBM, (b) VBU, (c) VBFM, e (d) VBFU.....	48

Figura 5. 8: Micrografias de MEV após 12 h, 24 h, 5 d, 14 d e 28 d de imersão das amostras de vidro em SBF a 37 °C.	52
Figura 5. 9: Relação dos espectros de EDS das respectivas regiões dos vidros mostrados na Figura 5.10 após 12 h, 24 h, 5 d, 14 d e 28 d de imersão em SBF a 37 °C.	53
Figura 5. 10 : Espectros de FTIR obtidos após imersão das amostras em SBF por 12 h, 24 h, 5 d, 14 d e 28 d. (a) VBM; (b) VBU; (c) VBFM; (d)VBFU.	55
Figura 5. 11: Padrões de DRX de (a) VBM; (b) VBU; (c) VBFM; (d)VBFU imersos em SBF por 12h, 24h, 5d, 14d e 28d.	56
Figura 5.12: Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT após 48 horas de exposição de culturas de células HEK293 T as amostras de VBM, VBU, VBFM e VBFU. A análise estatística não mostrou diferenças significantes entre os grupos controle e as amostras.	58
Figura 5.13: Imagens obtidas por Microscopia Óptica de Fluorescência do ensaio de calceína realizado utilizando células de rim humano (células HEK 293 T) expostas por 48h aos diferentes tipos de vidro bioativo produzidos e respectivo controle. (a) Controle (nenhum tratamento); (b) VBM; (c) VBU; (d) VBFM; (e) VBFU. (Escala = 100 um).	60

LISTA DE TABELAS

Tabela IV. 1 Vidros bioativos desenvolvidos neste estudo	28
Tabela V. 1: Composição química nominal e determinada pelo método de fusão de metaborato de lítio e ICP-OES (%mol) de vidros bioativos.....	38
Tabela V.2: Diâmetro médio de partícula por análise DLS e índice de polidispersividade.....	42
Tabela V. 3: Principais bandas vibracionais associadas aos vidros bioativos.	45
Tabela V. 4: Propriedades texturais obtidas pelos métodos BET e BJH para as amostras VBM, VBU, VBFM e VBFU.	49

LISTA DE NOTAÇÕES

- BET- Brunauer-Emmett-Teller
- BJH- Barrett, Joyner e Halenda
- CTAB- brometo de centrímonio
- DDA- dodecilamina
- DLS- Dynamic Light Scattering (Espalhamento Dinâmico de Luz)
- DRX- Difração de Raios X
- EDS- Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy (Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia)
- FA- Fluorapatita
- FDA- Food and Drug Administration
- FTIR- Fourier-transform infrared spectroscopy (Espectroscopia por Infravermelho por Transformada de Fourier)
- HA- Hidroxiapatita
- HAC- Hidroxiapatita Carbonatada
- HF- Ácido Fluorídrico
- ICP-OES- Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente
- MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura
- MTT- Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
- NC- Network Conectivit (Conectividade de Rede)
- PE- Polietileno
- PEG- Polietileno glicol
- pH- Potencial Hidrogeniônico
- RMN- Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Ressonância Magnética Nuclear)
- RPM- Rotações Por Minuto
- SBF- Simulated Body Fluid (Fluido Simulado Corporal)
- SFB- Soro Fetal Bovino
- TEOS- Tetraetil ortosilicato
- TEP- Trietil fosfato
- VB- Vidro Bioativo
- VBFM- Vidro Bioativo Contendo Íons Fluoreto Sintetizado Via Agitação Mecânica
- VBFU- Vidro Bioativo Contendo Íons Fluoreto Sintetizado Via Agitação Ultrassônica
- VBM- Vidro Bioativo Sintetizado Via Agitação Mecânica
- VBU- Vidro Bioativo Sintetizado Via Agitação Ultrassônica

XPS- X-ray Photoelectron Spectroscopy (Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X)

ONL- Oxigênio Não-Ligante

RESUMO

Os vidros bioativos (VB) são materiais de grande interesse na engenharia de tecidos por sua capacidade de formação de hidroxiapatita (HA) e integração óssea. Podem ser adicionados diferentes íons à estrutura dos VB, que aprimoram o desempenho do material quando em contato com o meio fisiológico. O flúor é um destes íons e sua incorporação ao VB leva à formação de fluorapatita, que é um composto quimicamente mais estável e resistente a ataques ácidos que a HA. Uma das maneiras de sintetizar VB contendo íons fluoreto (VBF) é através do processo sol-gel, onde há maiores possibilidades de controle dos parâmetros de síntese. Estes parâmetros, como o modo de agitação da suspensão, podem alterar significativamente as propriedades morfológicas, texturais e físico-químicas do vidro. Deste modo, este trabalho visou produzir VBF, empregando a rota sol-gel combinada ao estudo da influência dos modos de agitações mecânica e ultrassônica nas propriedades físicas, estruturais, morfológicas e biológicas *in vitro* de duas composições de VB. Foram produzidos VB de composição nominal molar, 80% SiO₂- 15% CaO- 5% P₂O₅ e 80% SiO₂- 5% CaO- 4% P₂O₅- 11% CaF₂. A morfologia esférica e o tamanho submicrométrico, visualizada através das técnicas de MEV e MFA, aumentam a possibilidade de adesão e proliferação celular ao biomaterial. A análise estrutural via FTIR mostrou bandas típicas de VB, não indicando diferenças significativas nas amostras sintetizadas por diferentes métodos de agitação ou pela adição de íons fluoreto. Já a análise estrutural por DRX mostrou além de halos amorfos típicos de VB, picos de cristalinidade referentes ao CaF₂, que podem estar relacionados à reprecipitação do sal CaF₂, indicando que parte dos íons fluoreto não foram incorporados ao VB, mas também é possível que existam nanoaglomerados CaF⁺ nos materiais. A análise de distribuição do tamanho de partículas, por DLS, e a análise das características texturais, por adsorção de N₂, mostraram que as propriedades físicas do vidro estão relacionadas à metodologia de agitação empregada no processo e à composição química do vidro. Observou-se também o comportamento dos vidros após imersão em SBF, sendo possível identificar a formação de apatitas na superfície dos vidros através de caracterização por MEV, EDS, FTIR e DRX após 28 dias. Além disto, os ensaios *in vitro* de citocompatibilidade por MTT e Calceína mostraram que não se tratam de materiais citotóxicos. Os resultados levam à conclusão de que a metodologia de agitação da síntese afeta nas propriedades físicas do material.

Palavras chave: vidro bioativo, flúor, agitação mecânica, agitação ultrassônica, sol-gel

ABSTRACT

Bioactive glasses (BG) are materials of great interest in tissue engineering for their ability to form hydroxyapatite (HA) and bone integration. Different ions can be incorporated into the structure of BG, which enhance the performance of the material when in contact with the physiological environment. Fluorine is one of these ions and its incorporation into BG leading to the formation of fluorapatite, which is a compound chemically more stable and resistant to acid attacks than HA. A possible route to synthesize FBG is through the sol-gel process. This process increases the possibility of control of the synthesis parameters such as the mode of agitation of the suspension. The modification of this parameter could affect significantly the morphological, textural and physicochemical properties of the bioactive glass. Thus, this work aimed to produce BG with incorporated fluorine ions using the sol-gel route to study the influence of mechanical stirring and ultrasonic energy on the physical, structural, morphological and biological properties of two BG compositions. BG's molar nominal compositions 80% SiO₂ - 15% CaO - 5% P₂O₅ and 80% SiO₂ - 5% CaO - 4% P₂O₅ - 11% CaF₂, were produced. The spherical morphology and submicron size, visualized by SEM and AFM techniques, increase the possibility of cell adhesion and proliferation. The FTIR structural analyses showed typical BG bands, which not exhibited differences between the mixing method applied and in fluoride ions incorporation. Instead of XRD data that showed typical BG halo-amorphous patterns and, for BG fluoride- containing, peaks which is related to the CaF₂ that could be associated to the salt precipitation or to the presence of CaF⁺ nano-clusters, which could indicate the presence of fluoride ions in the particles. The analysis of the particle size distribution by DLS and the analysis of the textural characteristics by N₂ adsorption showed that the physical properties of the glasses are related to the mixing method and to the BG composition employed in the process. It was also observed the behavior of the glasses after immersion in SBF, being possible to identify the formation of apatite on the surface of the glasses through characterization by SEM, EDS, FTIR and XRD after 28 days. In addition, the *in vitro* cytocompatibility assays by MTT and Calcein were ensure that they are not cytotoxic materials. The results lead to the conclusion that the methodology of agitation of the synthesis affects the physical properties of the material and the incorporation of ions to the BG network.

Key words: Bioactive glass, fluoride, mechanical stirring, ultrasonic energy, sol-gel

1. INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é uma tecnologia biomédica que auxilia e promove a reparação, substituição e a regeneração de tecidos lesionados. Ela emprega os princípios das áreas de ciência dos materiais, biologia celular, transplante e engenharia em um esforço para tratar ou substituir estes tecidos (NADERI; MATIN; BAHRAMI, 2011). Isto inclui a utilização de biomateriais, que podem ser materiais poliméricos como o Pluronic® (NIE et al., 2011), materiais metálicos como aços inoxidáveis austeníticos (PRASAD et al., 2017) e materiais cerâmicos como o vidro bioativo, ou mesmo uma associação de dois ou mais tipos de materiais, como a associação entre quitosana e vidro bioativo (MARTINS et al., 2017), os chamados materiais compósitos (ORÉFICE, RODRIGO LAMBERT; PEREIRA, MARIVALDA DE MAGALHÃES; MANSUR, 2006).

Um dos biomateriais empregados na engenharia de tecidos é o vidro bioativo. Desenvolvido por Larry Hench no final dos anos de 1970, o vidro bioativo (VB) teve alta visibilidade pela sua capacidade de integração óssea atribuída à formação de hidroxiapatita carbonatada na superfície do material quando implantado em tecido ósseo (JONES, 2015). Após a formação de camada de hidroxiapatita, acredita-se que o mecanismo biológico para crescimento e desenvolvimento de tecido ósseo envolva adsorção de fatores de crescimento, seguido por fixação, proliferação e diferenciação de células osteogênicas. Isso se deve ao estímulo dos genes nas células pelo vidro bioativo e, por isso, ocorre a produção de novas células em torno do material implantado, substituindo o biomaterial por um novo tecido (HOUREH et al., 2017; RAHAMAN et al., 2012; SIMON et al., 2017)

Alguns íons que podem ser incorporados à rede do vidro bioativo são: prata, que melhora a atividade antibacteriana; estrôncio, que eleva a atividade metabólica de osteoblastos e impede a absorção de tecido ósseo por osteoclastos; cálcio, que favorece a diferenciação de osteoblastos e a precipitação de apatitas; flúor, que atua como inibidor de corrosão por formar um composto mais estável quimicamente, a fluorapatita, ao invés de hidroxiapatita, entre outros. Dentre os íons citados, o vidro bioativo contendo flúor em sua rede tem sido extensamente estudado para o tratamento da hipersensibilidade dentinária, que acarreta ao paciente dor aguda nas terminações nervosas dos dentes, esta dor é causada pela exposição dos túbulos

presentes na dentina e atinge cerca de 35% da população mundial (JONES, 2015; LUSVARDI et al., 2009; RABIEE et al., 2015).

Tradicionalmente os vidros bioativos contendo íons fluoreto em sua composição são produzidos através de rotas de fusão, em que os óxidos precursores são fundidos juntamente com o precursor do flúor, geralmente, CaF_2 . Porém, durante o processo de fusão, há perda do elemento flúor através da sua reação com a água presente na atmosfera, formando ácido hidrófluorídrico. Ainda como desvantagens, as rotas de fusão geram partículas de tamanho e morfologia diversos, o que pode limitar suas aplicações (BRAUER; MNEIMNE; HILL, 2011). Uma alternativa para obtenção de vidro contendo flúor em rede é o uso da rota sol-gel.

O processo sol-gel envolve uma série de reações de hidrólises e condensações em solução aquosa à temperatura ambiente. Este processo tem como principal precursor de silicato o tetraetil ortosilicato (TEOS- $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$), que reage com a água hidrolisando-se e formando uma suspensão (sol) de partículas. Com o excesso de água na rede, após a hidrólise do TEOS, é necessário que o material seja secado, para estabilizar o gel, e calcinado, a fim de eliminar subprodutos dos precursores não alcóxidos. O produto final é um material que pode variar de tamanho de partícula entre 20 e 700 nm dependendo dos parâmetros de síntese, das concentrações dos precursores, da composição do vidro, do pH e da temperatura da reação, da taxa de adição de reagentes, do emprego de catalisadores ácido ou básico, da escolha do surfactante e da metodologia de agitação dos reagentes (JONES, 2015; LUKOWIAK et al., 2013).

Além do menor gasto energético durante a síntese, o processo sol-gel permite a obtenção de vidros bioativos com maior área superficial e maior porosidade, morfologia esférica, partículas com tamanhos reduzidos e com melhor capacidade de dispersão quando comparados aos vidros produzidos pela rota de fusão. Estas características aumentam a taxa de degradação do material em meio biológico e, conseqüentemente, estimulam a rápida formação de camada de hidroxiapatita na interface com o tecido no qual o material está inserido (CÔTÉ; CORMACK; TILOCCA, 2017; HU et al., 2014; LEPRY; NASERI; NAZHAT, 2017).

Estudos mostram que é possível a obtenção de vidro bioativo contendo flúor em sua estrutura através da rota sol-gel. Porém, trata-se de metodologia complexa, que demanda demasiado tempo para realização e com baixo rendimento final em relação à massa total de reagentes empregados, o que pode inviabilizar a escalonização industrial deste material (LINS et al., 2018). Além disso, de acordo Jafarzadeh et al (2009) as formas de mistura dos reagentes na síntese devem ser consideradas, pois alteram a sua reatividade, uma vez que torna os sítios ativos das moléculas mais disponíveis para que ocorram reações efetivas (JAFARZADEH; RAHMAN; SIPAUT, 2009).

Sendo assim, o presente trabalho, visa produzir e estudar partículas esféricas e submicrométricas de vidro bioativo com e sem incorporação de íons fluoreto, através do controle dos parâmetros de dois tipos de agitação na rota sol-gel: agitação mecânica e agitação ultrassônica, e em seguida comparar os materiais obtidos. A rota sol-gel adaptada de Hu et.al (2014) apresenta uma metodologia mais rápida, simplificada e escalonável em comparação às já existentes para sintetização via rota sol-gel de vidros com incorporação de íons e, portanto, foi escolhida para este trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O trabalho visa obter partículas submicrométricas de vidro bioativo com e sem incorporação de íons fluoreto através de uma rota rápida e simplificada, e ampliar o conhecimento sobre as interferências dos tipos de agitação na síntese de vidro bioativo.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar via rota sol-gel partículas submicrométricas de vidro bioativo com e sem incorporação de íons fluoreto utilizando agitações dos tipos mecânica e ultrassônica;
- Realizar estudo comparativo entre as duas técnicas de agitação a partir das análises dos resultados da caracterização dos materiais por tamanho de partícula e capacidade de incorporação de flúor;
- Caracterizar a composição química do material por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES), estruturalmente por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Difração de Raios X (DRX); morfologicamente por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia de Força Atômica (MFA); a área superficial por Adsorção- Dessorção de Nitrogênio pelo método de Brunauer, Emmett, Teller (BET) e a distribuição de tamanho de partícula por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS, do inglês Dynamic Light Scattering);
- Estudar o comportamento das partículas de vidro por exposição a SBF e caracterizá-lo posteriormente através das análises de MEV, FTIR e DRX.
- Avaliar a citotoxicidade através das técnicas *in vitro* a partir de análises de MTT ({brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}) e ensaio de calceína em células embrionárias de rins humano (células HEK 293 T);

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O vidro bioativo

As cerâmicas constituem uma classe de materiais que incluem os vidros e as vitrocerâmicas. Eles são compostos inorgânicos, não metálicos e de caráter misto iônico-covalente. Os materiais cerâmicos são utilizados na medicina em instrumentos de diagnósticos, vasilhames para análises clínicas, termômetros e *lasers*, dentre outros produtos. Neste viés, surgiram aplicações para estes materiais como biomateriais na engenharia de tecidos, isto é, os materiais cerâmicos são implantados no corpo como substituto do tecido danificado e/ou com a função de estimular a regeneração tecidual. (ORÉFICE, RODRIGO LAMBERT; PEREIRA, MARIVALDA DE MAGALHÃES; MANSUR, 2006).

Dentre os materiais cerâmicos os vidros bioativos (VB) têm sido extensamente estudados. Desenvolvido por Larry Hench no final dos anos de 1970, o VBe ganhou visibilidade por sua alta capacidade de ligação com o tecido ósseo (SIMON et al., 2017). Para aquela época, biomateriais eram definidos como materiais inertes. Quando implantados, os materiais inertes são encapsulados pelo organismo, isto é, não há estímulos para a regeneração tecidual, mas sim a formação de uma interface estável com o tecido de modo a isolá-lo do organismo (JONES, 2015). Neste contexto, Hench decidiu criar um material com a mesma composição do tecido ósseo, contendo 46,1% mol de SiO_2 , 24,4% mol de Na_2O , 26,9 %mol de CaO e 2.6% mol de P_2O_5 , o chamado vidro 45S5- o Bioglass® (GREENSPAN, 2016; LU et al., 2017).

Ao ser implantado no fêmur de ratos, o material desenvolvido por Hench criou uma ligação material/osso tão forte que era inviável a separação do biomaterial e do tecido sem o rompimento do tecido ósseo. Desta maneira, iniciou-se o campo dos biomateriais cerâmicos, que incluem vidros, vidro-cerâmicas e cerâmicas, como a hidroxiapatita sintética (HA) e outros fosfatos de cálcio (ABBASI et al., 2015; HENCH, 2006).

A ligação entre os vidros bioativos e o tecido ósseo acontece a partir da liberação de íons da superfície do material e a consequente formação de hidroxiapatita carbonatada (HAC), que possui composição química similar à do osso (PEREIRA;

CLARK; HENCH, 1994; UTECH; BOCCACCINI, 2016). Além disso, estudos apontam que o vidro bioativo estimula os genes das células para regeneração do tecido danificado (HOUREH et al., 2017).

Os VBs podem ser utilizados nas formas de pó, scaffolds, nanopartículas, na produção de compósitos e/ ou híbridos como agentes de carga para materiais poliméricos, em revestimento de biomateriais metálicos, ou mesmo em sistemas de liberação controlada de drogas ou como carreadores de íons (ZHENG; BOCCACCINI, 2017). Outra característica do VB que tem permitido inúmeras aplicações na medicina é sua alta taxa de dissolução no organismo, quando comparado a outros biomateriais, que é um importante fator para aumento da bioatividade do material. Essa taxa de dissolução pode ser alterada a partir da manipulação da composição química do vidro (CHRISTIE; DE LEEUW, 2017). Uma das formas de alterar a composição química do VB é a partir da adição de íons que desempenham funções químicas e/ou biológicas no meio ao qual estão inseridos, tal qual crescimento localizado e específico de tecidos, como íons de estrôncio, manganês, prata, zinco e flúor (CHRISTIE; DE LEEUW, 2017; RABIEE et al., 2015).

Os VBs podem ser sintetizados por diferentes metodologias, dependendo da aplicação para a qual o material for destinado. Dentre elas a rota de fusão é sem dúvida a mais tradicional, onde síntese ocorre com a fusão dos óxidos precursores do vidro, SiO_2 , CaO e P_2O_5 , a temperaturas acima de 1300°C . A fusão destes óxidos conta ainda com a presença do Na_2O para diminuir o ponto de fusão da mistura e, assim, aumentar a processabilidade da massa viscosa formada. Em seguida, a massa fundida passa por resfriamento brusco para que o vidro não se cristalice, logo, para que seja mantida a condição amorfa do vidro (JONES, 2015).

Uma das principais desvantagens do processo de fusão é o tamanho do particulado, pois os diâmetros encontrados são relativamente grandes para algumas aplicações (SHENG et al., 2016). Outras desvantagens incluem a dissolução de impurezas provenientes da síntese, como da platina presente no cadinho, e outros cátions indesejados, além de um maior gasto de energia para a fusão dos óxidos (ABBASI et al., 2015). Ademais, vidros bioativos produzidos por rota de fusão possuem partículas pouco homogêneas no que diz respeito à sua morfologia, sendo um método de obtenção de partículas pontiagudas, que podem causar microlesões no tecido

(ABBASI et al., 2015) . Desta forma, uma das principais alternativas ao processo de fusão são as sínteses realizadas a temperatura ambiente, sendo a rota sol-gel umas das mais bem-sucedidas.

3.1.1 Síntese de vidros bioativos via rota sol-gel

A rota de formação de VB via sol-gel tem inúmeras vantagens. Além de menor gasto energético, ela oferece vantagem para as aplicações biomédicas, uma vez que proporciona a formação de partículas homogêneas, com elevadas áreas superficiais e elevada porosidade que facilitam a adesão celular. Além disto, os vidros sintetizados por esta rota apresentam maiores concentrações de grupos Si-OH, o que aumenta a capacidade de funcionalização destes materiais, pois aumenta a quantidade de locais ativos, aumentando, também, a taxa de degradação e, conseqüentemente, a velocidade de formação de camadas de HCA quando o material estiver em contato com fluido corpóreo (PEREIRA; CLARK; HENCH, 1994; ZHENG; BOCCACCINI, 2017). Outras vantagens relacionadas a este método são a facilidade de associação de moléculas orgânicas poliméricas e biomoléculas, células e fármacos ao material sintetizado (OWENS et al., 2016).

O processo sol-gel envolve uma série de reações de hidrólise, condensação e gelificação de precursores dos óxidos formadores de rede de VB em solução aquosa e/ ou alcoólica. Em seguida, ocorre a secagem e estabilização do material (CÔTÉ; CORMACK; TILOCCA, 2017; LEPRY; NASERI; NAZHAT, 2017). A sistematização de uma típica síntese de VB é apresentada na Figura 3.1.

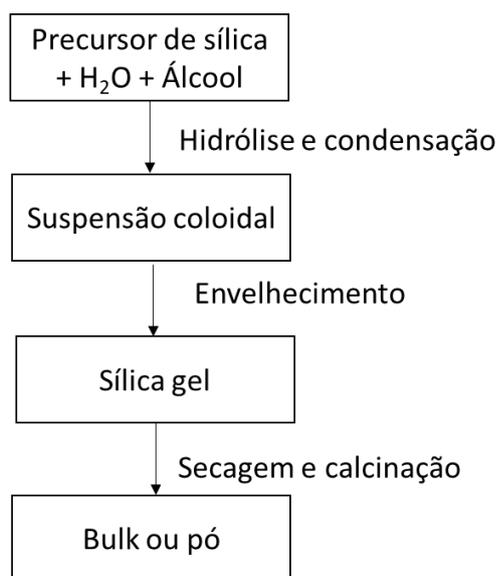


Figura 3. 1: Fluxograma do processo de produção de vidros a partir da síntese sol-gel (Adaptado:(RAHMAN; PADAVETTAN, 2012))

No processo sol-gel o tetraetil ortosilicato (TEOS- $\text{SiC}_8\text{H}_{20}\text{O}_4$) é o precursor de silicato mais empregado para obtenção de VB. O TEOS interage com a água hidrolisando-se (sol), tanto em meio ácido como em meio básico, formando uma suspensão contendo nanopartículas (1- 100 nm) de SiO_2 (sol) e condensando, de modo a formar uma rede tridimensional de SiO_2 (gel) (HENCH; WEST, 1990; OWENS et al., 2016). A hidrólise do TEOS forma grupos silanol (SiH_4O), enquanto a condensação destes grupos silanóis e de grupos etóxi (R-O) cria ligações de siloxano, gerando a estrutura da sílica (Si-O-Si) (GREEN et al., 2003; RAHMAN; PADAVETTAN, 2012). Precursores de íons metálicos, como nitrato de cálcio, podem ser adicionados à síntese durante a hidrólise e condensação do TEOS ou após a formação da rede de SiO_2 . As reações de hidrólise e condensação estão apresentadas na Figura 3.2.

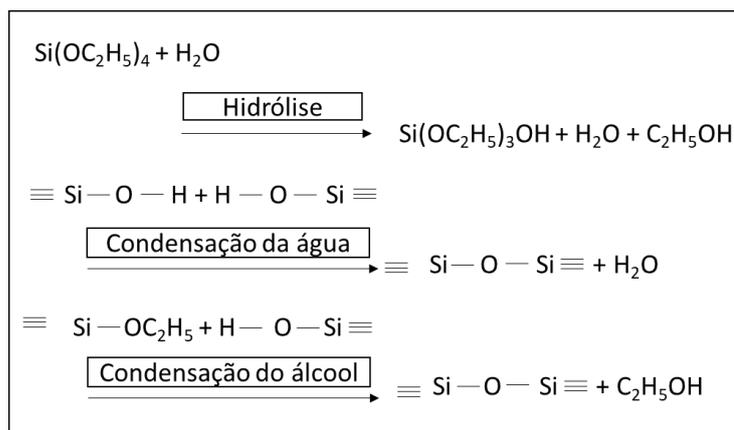


Figura 3. 2: As reações gerais de TEOS que levam à formação de partículas de sílica no processo sol-gel (Adaptado: (RAHMAN; PADAVETTAN, 2012))

As reações de condensação liberam água e etanol, o que gera um excesso de água na rede do vidro. Assim, faz-se necessária a secagem do material para estabilizar o gel e produzir um corpo nanoporoso de rede interconectada. Os poros são os interstícios das nanopartículas aglutinadas. O tamanho dos poros depende dos precursores utilizados, da composição do vidro e do pH da reação, podendo este tamanho variar entre 1 e 30 nm (JONES, 2015).

Após o processo de secagem é iniciado o processo de calcinação, ou tratamento térmico. O processo de calcinação é empregado para eliminar subprodutos de materiais não alcóxicos nas partículas, dar resistência mecânica, realizar o crescimento de grão e densificar o material. Usualmente, as temperaturas deste processo giram em torno de 700°C. Além disto, temperaturas acima de 400° C devem ser empregadas no processo de calcinação para que ocorra a incorporação de íons adicionais na rede do vidro. Os principais precursores para a inserção de cálcio e fósforo na composição do vidro bioativo são o nitrato de cálcio e o trietilfosfato (TEP), respectivamente (JONES, 2015; OWENS et al., 2016; UTECH; BOCCACCINI, 2016; YU et al., 2012).

A síntese através do método sol-gel pode ser modificada de diversas maneiras para que o produto final também seja alterado. Neste contexto, pode-se modifica-la através da mudança dos precursores da síntese, do tempo de gelificação, da temperatura da síntese, do catalisador (ácido ou base) empregado, das condições de gelificação, das

concentrações de reagentes e álcool do processo físico de formação do gel, por exemplo (ABBASI et al., 2015; OWENS et al., 2016).

A escolha do pH da síntese influencia nas características finais do material, como a distribuição de tamanho das partículas, morfologia, volume e tamanho de poros (RAHMAN; PADAVETTAN, 2012). O meio em que a síntese acontece pode ser básico (pH acima de 7) ou ácido (pH abaixo de 7). Uma vez acontecendo em condições básicas, o processo é chamado de processo Ströber. Originalmente desenvolvido por Werner Stöber em 1967, este método consiste na adição de hidróxido de amônia como catalisador à síntese e permite a produção de partículas esféricas e monodispersas (STÖBER; FINK; BOHN, 1968). A dispersão acontece, porque, as partículas em suspensão no meio sofrem repulsão devido às forças repulsivas geradas pela presença de íons OH⁻. Por vezes, é adicionada à síntese surfactantes orgânicos catiônicos para melhorar a dispersão das partículas e agindo adicionalmente como *templates*. A introdução destas moléculas facilita a formação de morfologias complexas e de materiais com estruturas mesoporosas (diâmetro de poros entre 2 e 50 nm). Exemplos de *templates* e surfactantes para catálises básicas são o brometo de centrônio (CTAB) e a dodecilamina (DDA) (OWENS et al., 2016; ZHENG; BOCCACCINI, 2017).

A síntese do VB produzido através de catálise ácida, inicia-se com a mistura dos precursores do vidro em pH abaixo de 2, onde a formação e a agregação de partículas primárias ocorre simultaneamente. As partículas carregam pouca carga, o que permite a colisão entre elas, dando origem a cadeias e, posteriormente, a um sólido tridimensional. Já em pH's entre 2 e 7, a polimerização ocorre entre espécies condensadas. Uma vez formados os dímeros, eles reagem preferencialmente com monômeros para formar trímeros e que tornam a se reagir para formar tetrâmeros. O crescimento e agregação ocorrem por contínua adição de moléculas pequenas às moléculas mais condensadas, formando cadeias e, por fim, uma rede tridimensional (HENCH; WEST, 1990). No entanto, catalisadores básicos também são necessários que se possa induzir a formação de nanopartículas, já que eles podem aumentar o valor do pH e este, por sua vez, impede que o VB desenvolva uma estrutura 3D gelificada, formando então partículas. Posteriormente, é adicionado um composto altamente básico, como o hidróxido de amônio. Ao contrário do que acontece na catálise básica, as partículas formadas na catálise ácida, ou ácido/básica, são

polidispersas ou mesmo aglomeradas. Nesta metodologia são empregados surfactantes não- iônicos, como o polietileno glicol (PEG) e o *Pluronic* P123, que agem como barreiras estéricas contra a aglomeração das partículas (OWENS et al., 2016; ZHENG; BOCCACCINI, 2017).

Otimizando os parâmetros de reação da síntese de vidros bioativos no processo sol-gel, pode-se obter materiais com tamanho de partículas menores ou maiores. Ademais, pode-se também controlar a morfologia, a composição química e as propriedades texturais destes materiais, isto é, os materiais obtidos tendem a ter maior homogeneidade em suas propriedades. Esta otimização acontece, principalmente, quando há um controle (retardamento) da taxa das reações de condensação de reagentes durante o processo (RAHMAN; PADAVETTAN, 2012; ZHENG; BOCCACCINI, 2017).

Estudos reportam que o tempo de adição de reagentes como o de nitrato de cálcio (sal precursor de cálcio), alteram a morfologia, a composição e a dispersão das partículas, porque afetam a formação das nanopartículas primárias de sílica (ZHENG et al., 2016). Já o tipo de solvente utilizado afeta o volume de poros, o tamanho de poros e o tamanho das partículas (UTECH; BOCCACCINI, 2016). Ao alterar a concentração do surfactante empregado na síntese, por exemplo o CTAB, a morfologia das partículas pode ser esférica ou em formato de pinhão. A morfologia esférica nestes materiais viabiliza maior número de grupos silanóis o que, conseqüentemente, aumenta a taxa de dissolução dos vidros bioativos em meio aquoso (LUKOWIAK et al., 2013). Além desta característica, os vidros bioativos com morfologia esférica ainda podem melhorar a adesão celular, aumentar a proliferação de osteoblastos, promover a diferenciação e aumentar a biomineralização em meio fisiológico (AJITA; SARAVANAN; SELVAMURUGAN, 2015). Além dos fatores relacionados aos reagentes, é reportada em vários estudos a importância da escolha do tipo de agitação ao qual o método será conduzido, podendo este alterar a morfologia, tamanho das partículas e porosidade dos materiais produzidos.

3.1.2 A estrutura dos vidros bioativos

Os vidros bioativos possuem característica amorfa e são estruturalmente formados por íons formadores de rede, modificadores de rede e óxidos intermediários. Os óxidos

formadores de rede são aqueles que não precisam de componentes adicionais para que o vidro seja criado, exemplo destes são a sílica (SiO_2), o pentóxido de fósforo (P_2O_5) e o trióxido de boro (B_2O_3). Já os modificadores de rede são aqueles que afetam a estrutura do vidro, porque ligam-se a átomos de oxigênio não- ligantes ($\text{Si}-\text{O}-\text{M}^+$, onde M é um cátion modificador de rede). Enquanto que os óxidos intermediários podem tanto agir como formadores quanto como modificadores de rede (ZHENG; BOCCACCINI, 2017).

A microestrutura da sílica derivada de sol-gel está intimamente relacionada com as suas propriedades químicas. Por exemplo, muitos materiais de sílica derivados de processo sol-gel catalisados por ácido têm estruturas fractais. Esta estrutura fractal é formada por aglomeração de partículas com um diâmetro de 4- 6 nm (partícula secundária), que também são compostas de pequenas partículas com um diâmetro de 1- 2 nm (partícula primária) (JONES, 2015).

A unidade básica de construção dos vidros de silicato é o tetraedro de SiO_4 , que pode se ligar ao vizinho através átomos de oxigênio ligantes, formando ligações de Si- O- Si, como mostrado na Figura 3.4. Esses tetraedros são comumente chamados de unidades Q_n , onde n descreve o número de átomos de oxigênio ligados ao tetraedro. Por exemplo, na sílica vítrea, cada tetraedro está ligado a outro tetraedro em cada um dos seus quatro vértices, o que corresponde a quatro átomos de oxigênio de ligação por tetraedro (unidades Q_4) (BRAUER, 2015).

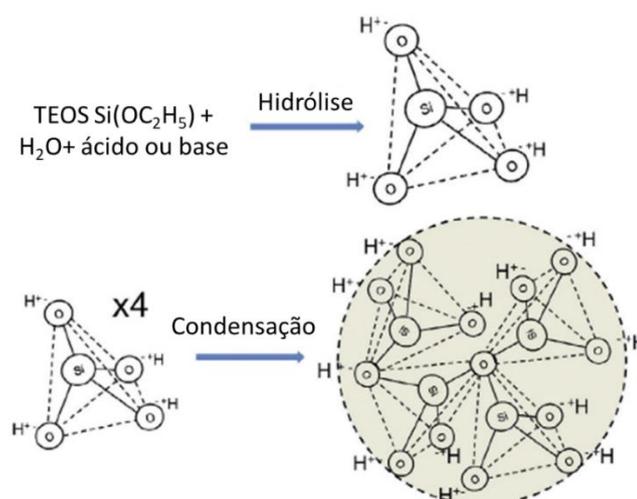


Figura 3.3: Esquema de reações no processo sol-gel para formação de sílica tetraédrica e nanopartículas a temperatura ambiente (Adaptado: (JONES, 2015))

A espectroscopia de RMN (Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear) de Si tem sido usada para caracterizar a estrutura dos silicatos de vidros bioativos, já que diferentes espécies Q possuem diferentes desvios químicos. Desta forma, Elgayar e colaboradores (2005) investigaram que estrutura dos vidros bioativos é composta principalmente por grupos Q_2 e que sua estrutura é altamente descontínua, em comparação aos vidros convencionais (ELGAYAR et al., 2005). Os estudos mostram que quantidades crescentes de modificadores de rede resultam na presença de mais átomos de oxigênio não-ligantes em vidros bioativos (BRAUER, 2015; JONES, 2015).

A estrutura do vidro pode ser estimada com base na composição do vidro a partir do modelo de conectividade de rede (CN). Este modelo descreve o número médio de átomos de oxigênio ligantes por elemento de formação de rede. A CN dá uma ideia da policondensação média da rede e também é uma ferramenta útil para prever as propriedades do vidro, como a bioatividade, a tendência de cristalização e a temperatura de transição vítrea. A CN de vidros bioativos simples, como o SiO_2 - P_2O_5 - M_2O - $M'O$, onde M_2O e $M'O$ são modificadores de rede, é calculada de acordo com a Equação (3.1), que assume no máximo quatro átomos de oxigênio ligados por átomo de silício, de onde os átomos de oxigênio não-ligantes são subtraídos. Muitos vidros bioativos possuem um segundo formador de rede, o P_2O_5 , além do SiO_2 . O P_2O_5 aumenta o número de oxigênios ligantes, pois precisa de cátions para equilibrar a carga do $P_2O_4^{3-}$. SiO_2 , P_2O_5 , M_2O e $M'O$, na Equação (3.1), referem-se às percentagens molares de cada componente (BRAUER, 2015; JONES, 2015).

$$CN_{Si} = \frac{4 \times SiO_2 + 6 \times P_2O_5 - 2 \times (M_2O + M'O)}{SiO_2} \quad \text{Eq. (3.1)}$$

Os vidros bioativos geralmente têm conectividade de rede entre 2 e 3, como exemplo tem-se o Bioglass® 45S5 com uma conectividade de rede de 2.11, que corresponde a uma estrutura composta por cadeias de silicato (89% Q_2), na qual 11% de todas as unidades Q são unidades ramificadas (Q_3) que interconectam as cadeias por ligações de átomos de oxigênio (BRAUER, 2015).

Os modificadores de rede alteram a estrutura do vidro transformando oxigênios ligantes (com ligações químicas predominantemente de caráter covalentes) em

átomos de oxigênio não-ligante (ligações Si-O- M^+ , predominantemente de caráter iônico, onde M^+ é um cátion modificador). Exemplos de modificadores de rede são os óxidos de metais alcalinos e metais alcalino-terrosos. Ao contrário dos formadores de rede, que apresentam número de coordenação 3 (três) ou 4 (quatro), os cátions modificadores apresentam maiores números de coordenação que vão de 5.6 a 7.1 (BRAUER, 2015).

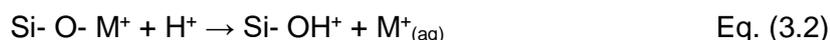
A terceira categoria de componentes é a de íons intermediários. Os íons intermediários têm forças de campo cristalino situadas numa faixa entre os formadores de rede e os modificadores de rede. Como resultado, a incorporação de óxidos intermediários em vidros bioativos pode ajudar a melhorar certas propriedades do vidro, como a redução da tendência de cristalização. No entanto, eles tendem a dificultar o entendimento da estrutura do vidro ao qual estão inseridos, pois eles podem mudar seu papel no vidro, hora atuando como íon intermediário, hora atuando como íon modificador de rede (BRAUER, 2015).

A substituição de diferentes cátions modificadores também afeta a estrutura do vidro, apesar do fato de a conectividade da rede permanecer constante. O motivo para a alteração na estrutura são as diferenças nos raios iônicos e os campos de forças eletromagnéticas dos dois íons. Ao substituir cátions modificadores de mesma valência, mas com raios iônicos diferentes, a rede de silicato pode expandir-se ou se tornar mais compacta, o que altera as características texturais, como o tamanho, o volume, a distribuição e o formato de poros. Este efeito pode ser descrito por alterações na densidade de empacotamento do vidro e pode afetar as propriedades do vidro, como a solubilidade, a bioatividade e o tamanho final das partículas (BRAUER, 2015).

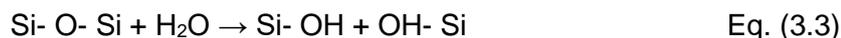
3.1.3 Bioatividade dos vidros

Ao serem inseridos no organismo ou sob situação de simulação de fluido corporal, os vidros bioativos passam por uma sequência de reações químicas para que haja a ligação material/ osso. A cinética de reações na superfície dos vidros inclui cinco estágios. Assim, estes cinco estágios de reações iniciais que ocorrem no vidro para formação de hidroxiapatita são descritos sequencialmente a seguir (HENCH, 2006; JONES; SEPULVEDA; HENCH, 2001; RAHAMAN et al., 2012):

1. O primeiro estágio refere-se às reações de troca iônica entre os modificadores de rede do vidro modificado (M^+) com os H^+ (ou H_3O^+) presentes da solução. Então, os grupos de sílica sofrem hidrólise e há a formação de grupos silanol ($Si-OH$) na superfície do vidro. Como há consumo de íons H^+ , o meio torna-se mais alcalino. Essa etapa pode ser interpretada de acordo com a Equação (3.2).



2. Em seguida, o aumento do pH (consequência do aumento da concentração de OH^- no meio) acarreta na dissolução da sílica em rede (SiO_2), por conseguinte, na dissolução da sílica em ácido silícico ($SiOH_4$) e na formação constante de grupos $Si-OH$ na superfície do vidro de acordo com a Equação (3.3).



3. Posteriormente, há a condensação e a polimerização de uma camada amorfa e concentrada de SiO_2 na superfície do vidro, porém empobrecida de M^+ ;
4. Sucede, então, a migração dos íons Ca_2^+ e $(PO_4)_3^-$ através da camada rica em SiO_2 , levando a formação e a deposição de uma camada de fosfato de cálcio amorfo (ACP) na superfície rica em SiO_2 ;
5. Por último, a camada de ACP incorpora, a partir da solução, OH^- e $(CO_3)^{2-}$ e cristaliza como hidroxiapatita carbonatada (HAC). Esta e todas as reações anteriores acontecem simultaneamente.

Em meio biológico, outros sete estágios ocorrem. Desta forma, após a formação de camada de HAC, acredita-se que o mecanismo biológico para crescimento e desenvolvimento de tecido ósseo abranja adsorção de fatores de crescimento (estágio 6), que sinalizam o local para que macrófagos preparem o implante para o reparo tecidual (estágio 7). Depois ocorre a fixação (estágio 8), seguida da proliferação e diferenciação de células osteogênicas (estágio 9). Então, nos estágios dez e onze, as células de formação do osso, os osteoblastos, criam uma matriz extracelular de colágeno que será mineralizada para formar um mineral nanocristalino na superfície de contato com o vidro. Por último há o crescimento do osso (estágio 12). Todas as

etapas descritas ocorrem continuamente (HENCH, 2006, 2015; RAHAMAN et al., 2012).

A composição do vidro é a variável que mais influencia na taxa de formação da camada de HAC e, conseqüentemente, na ligação material/ tecido ósseo. Essencialmente, um menor teor de sílica significa uma rede de sílica menos conectada, que é mais propensa à dissolução e, portanto, os estágios listados acontecem mais rapidamente. Assim, a bioatividade está diretamente relacionada à energia de ativação da dissolução de sílica no vidro. No entanto, a conectividade da rede é fundamental e depende da quantidade de sílica e de outros componentes que modificam o vidro (JONES, 2015).

Uma composição que possui maior quantidade de sílica em rede é a do vidro 80S. Os vidros bioativos no sistema 80% SiO₂-15% CaO-5% P₂O₅ são distintos dos vidros bioativos não-mesoporosos convencionais desenvolvidos, pois possuem estruturas mesoporosas altamente ordenadas e área superficial específica significativamente maior. Esses vidros também oferecem características interessantes como maior volume de poros e tamanhos de poros que variam de 2 a 10 nm, o que os torna adequados para uma variedade de aplicações de liberação de drogas e íons terapêuticos (POURSHAHRESTANI et al., 2016; YAN et al., 2004). Através de suas propriedades físicas, o vidro 80S demonstrou uma melhoria na mineralização apatita quando estudado sob efeito de fluidos corporais simulados e apresentou excelente citocompatibilidade *in vitro* em células humanas osteoblásticas (Saos-2), fibroblastos murinho (L929) e linfócitos T (SR.D10), tal qual estudado por Alcaide e colaboradores (ALCAIDE et al., 2010; WU; CHANG; XIAO, 2011).

3.3 Incorporação de íons terapêuticos ao vidro bioativo

À estrutura dos vidros bioativos podem ser inseridos alguns elementos, como moléculas biológicas, fármacos e íons metálicos que exercem funções terapêuticas. Os íons metálicos adicionais desempenham funções específicas, como ação antibiótica ou osteogênica, dentre outras. Exemplos destes íons e das funções que desempenham são a prata e o gálio, com efeito bactericida; estrôncio com inibição da atividade osteoclástica e aumento da atividade metabólica de osteoblastos, podendo ser empregado no tratamento da osteoporose; o cálcio que pode favorecer a

diferenciação osteoblástica, bem como a precipitação de apatitas; e o flúor que inibe a desmineralização e aumenta a remineralização da dentina a partir da formação de fluorapatita na superfície do material (ABBASI et al., 2015; BARRIONI et al., 2017).

Na rota sol-gel existem duas formas de inserção de íons à rede do vidro: 1) a partir da adição de sais metálicos durante a síntese e 2) imergindo o material sintetizado em um banho de sais metálicos. A primeira via de inserção de íons à rede do vidro acontece por adição de sais e óxidos durante a formação de rede da sílica, sendo que a incorporação ocorrerá principalmente durante o tratamento térmico. A segunda via de inserção de íons à rede do vidro acontece por difusão, onde o vidro já sintetizado é mantido em uma solução de íons que serão adsorvidos na sua superfície e, em seguida, o vidro é calcinado a altas temperaturas para que os íons sejam difundidos para o interior da rede no material (ZHENG; BOCCACCINI, 2017).

Os estudos de bioatividade dos vidros bioativos apontam que o silício é responsável tanto pela mineralização da matriz extracelular, quanto pela calcificação e pela atividade osteoblástica (HOUREH et al., 2017). O silício ainda ampliaria a produção do colágeno tipo I, o que aumenta a vascularização e diminui a atividade osteoclástica. Ao ser adicionado à composição do vidro, o fósforo pode estimular a manifestação de proteínas específicas na matriz, que desempenham um papel significativo na estruturação do tecido ósseo. Já o cálcio ativaria os receptores celulares que desencadeiam as reações de crescimento ósseo (MAÇON et al., 2017).

A figura 3.4 apresenta um esquema das respostas biológicas dos produtos de dissolução iônica de vidros bioativos contendo diferentes íons terapêuticos. Estes íons além de estimular os genes de células osteoblásticas e a angiogênese, também possuem ação antibacteriana e anti-inflamatória. De acordo com a literatura, vários estudos ao redor do mundo tem se intensificado a fim de incorporar íons terapêuticos aos vidros bioativos e aumentar a bioatividade destes materiais (HOPPE; GÜLDAL; BOCCACCINI, 2011).

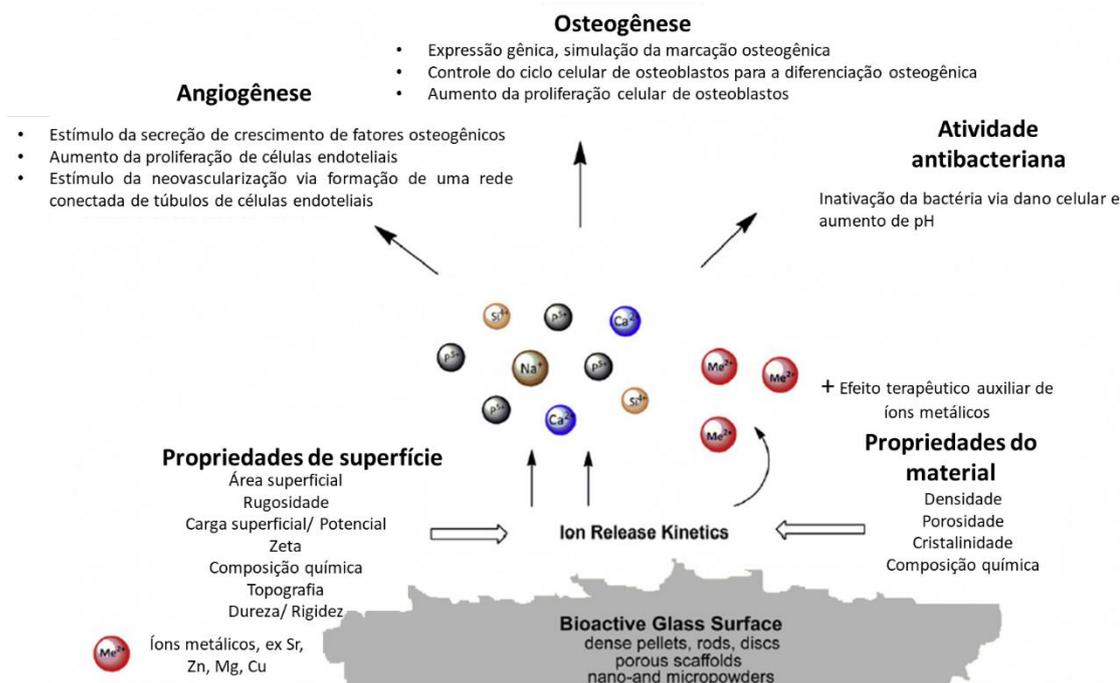


Figura 3. 4: Visão geral das respostas biológicas aos produtos de dissolução iônica de vidros bioativos (Adaptado:(HOPPE; GÜLDAL; BOCCACCINI, 2011)).

3.3.1 Vidro bioativo contendo íons fluoreto

Desde que o flúor ficou conhecido por oferecer resistência a cavidade oral contra agentes químicos ácidos, sua incorporação aos vidros bioativos tornou-se uma fonte promissora de bioatividade (ABBASI et al., 2015). Assim, o vidro bioativo contendo íons de flúor tornou-se de grande interesse para aplicações dentárias. O flúor também ficou conhecido por influenciar no estímulo de células osteoblásticas (BAINO; HAMZEHLU; KARGOZAR, 2018; SHAH et al., 2015) quando aplicado em concentrações entre 25 e 500 ng. mL⁻¹, entretanto, em concentrações maiores que 500 ng. mL⁻¹ podem suprimir a atividade osteoblástica. Em doses elevadas, o flúor pode ser tóxico, promovendo dano oxidativo celular (BRAUER, 2015; RABIEE et al., 2015).

Estudos mostram que a combinação vidro bioativo e flúor implica em deposição de fluorapatita (FA) em meio fisiológico. A fluorapatita é um composto mais estável quimicamente que a hidroxiapatita (HA), pois tem menor dissolução em meio ácido, o que é uma condição importante para aplicações em meio bucal, onde o pH é em torno

de 4,5 (RABIEE et al., 2015). O íon fluoreto é menor do que o íon hidroxila da HA e, portanto, ele pode se encaixar no centro do triângulo de Ca^{2+} na rede cristalina de apatita (Figura 3.5), formando a FA (SHAH, 2016; SRIRANGANATHAN et al., 2017).

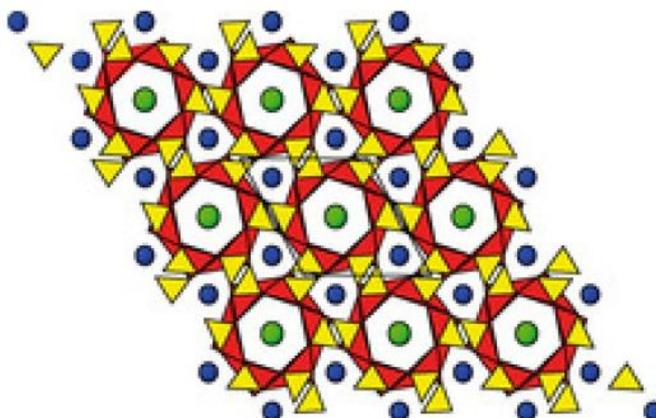


Figura 3. 5: Diagrama estrutural do cristal de apatita com a célula unitária delineada em preto. Os tetraedros de PO_4 estão representados em amarelo, o Ca^+ menor está representado em poliedros vermelhos, o Ca^{2+} está representado em esferas azuis e os íons de flúor (que designam a fluorapatita) estão em esferas verdes (Adaptado: (DAR; KHAN; BIRCH, 2017)).

A formação de FA é observada em vidros contendo flúor e fosfatos. Estuda-se que a dependência de formação de FA está intimamente relacionada a quantidade de fosfatos presente no vidro, isto é, quão maior a quantidade de fosfatos, mais rápida a formação de FA (JONES, 2015; RABIEE et al., 2015).

Como dito anteriormente, as propriedades estruturais do vidro podem ser descritas através da sua conectividade de rede (NC). Neste contexto, estudos preliminares acerca de vidros contendo íons fluoreto chegaram à conclusão de que o silício e o flúor não realizam ligações entre si (Si-F), o que não influenciaria a NC da sílica e nem a concentração de oxigênios não-ligantes. Porém, sugere-se que os íons fluoreto estariam, então, coordenados com os cátions de Cálcio na forma de CaF^+ (Figura 3.6) (BRAUER, 2015; RABIEE et al., 2015).

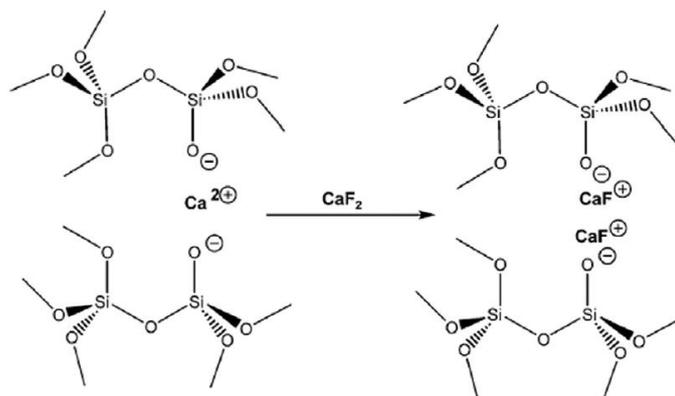


Figura 3. 6: Efeito hipotético da adição de íons fluoreto na rede de silicato dos vidros bioativos (Adaptado: (RABIEE et al., 2015))

Uma das principais fontes de íons fluoreto na síntese de vidros bioativos é o fluoreto de cálcio, CaF_2 (RABIEE et al., 2015). O CaF_2 é adicionado à síntese do vidro em substituição a óxidos modificadores, como o CaO . Quando o CaF_2 é adicionado, ele tende a romper a estrutura do vidro, aumentando a tendência à cristalinidade do material (OWENS et al., 2016). Desta forma, apesar da condição amorfa do vidro, é possível observar, através das técnicas de caracterização, pontos de cristalização no material semelhantes à estrutura da fluorita (CaF_2) (BRAUER, 2015).

Iniciou-se, então, um processo de desenvolvimento de composições de vidro bioativo para aplicações odontológicas a fim de que fosse depositada fluorapatita (FA) no meio bucal de modo a se ter uma prevenção contínua contra cáries e para o tratamento de hipersensibilidade dentinária (DE CALUWÉ et al., 2016; M; S; A, 2016). Sabe-se também que o flúor aumenta a densidade óssea e, apesar de uma janela terapêutica estreita e alguma divergência sobre a sua eficácia na prevenção de fraturas, os implantes que libertam flúor podem ser de interesse para os pacientes que sofrem de osteoporose (BRAUER et al., 2010).

A via tradicional de produção de vidros bioativos contendo íons fluoreto é a rota de fusão. Porém, durante a rota de fusão para VB contendo flúor há perda de parte dos íons que deveriam ser incorporados. Isto ocorre pois, durante o processo de aquecimento a altas temperaturas, há reação da fonte de flúor com o ar atmosférico, gerando ácido hidrófluorídrico (HF) que é eliminado por evaporação (BRAUER; MNEIMNE; HILL, 2011). Uma alternativa para a sintetização de vidros contendo íons fluoreto é via rota sol-gel. Assim, a primeira síntese de vidros bioativos contendo flúor

por essa rota foi realizada por Li e colaboradores (2013). Este estudo mostrou que é possível a substituição de parte do CaO por CaF₂ na composição do vidro, sem perda de bioatividade do material (LI et al., 2013).

Lins e colaboradores (2018) desenvolveram uma composição de vidro bioativo contendo flúor a partir do vidro de composição (em mol) 60% SiO₂, 36% CaO e 4% P₂O₅, obtendo, então, após substituição de parte do CaO por CaF₂, o vidro SiO₂ 60%, CaO 26.72%, P₂O₅ 4%, CaF₂ 9.28% (LINS et al., 2018). O intuito deste estudo era sintetizar nanopartículas esféricas e dispersas de vidro bioativo contendo íons fluoreto em composição a partir da utilização de agitador ultrassônico. Assim, foram obtidas partículas esféricas de diâmetro hidrodinâmico (antes do tratamento térmico), de 5.3 ± 0.3 nm (medida por DLS-*Dinamic Ligth Scattering*). Porém os resultados de MFA (Microscopia de Força Atômica) mostraram que houve a aglomeração das partículas, ou seja, por esta metodologia não foi possível a obtenção de partículas monodispersas. Os resultados de MFA mostraram ainda que as partículas estariam com tamanho aproximado de 50 nm após o tratamento térmico. Já os resultados de DRX (Difratometria de Raios- X) e XPS (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*) mostraram que houve cristalização de fluorapatita na matriz do vidro, o que é desejável para a aplicação em tratamento de hipersensibilidade dentinária (LINS et al., 2018).

3.4 Aplicações clínicas do vidro bioativo

Diferentes formas do vidro bioativo podem ser empregadas em aplicações clínicas. Estas formas variam entre scaffolds porosos e partículas nanométricas para aplicações em tecido duro e tecido macio. Estudos clínicos mostraram que os vidros bioativos e biocerâmicas são materiais superiores a outros biomateriais por serem capazes de realizar uma ligação estável com o tecido em que estiver inserido com maior rapidez que outros biomateriais (HENCH, 2015).

Após a criação da primeira composição comercial do vidro bioativo conhecido como Bioglass®, a primeira prática clínica de vidro bioativo foi para o tratamento de doenças nos ossículos do ouvido, em 1977, surgindo, assim, o Ceravital®. No ano seguinte, a compatibilidade do VB com o tecido da córnea ocular foi confirmada através de um implante ocular. Após oito anos, em 1985 o Bioglass® foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) e foi implantado para a reparação ossicular da orelha média (MEP®). Nos anos seguintes, o Bioglass® foi empregado no tratamento de câncer no

fígado, em implante de manutenção do cume endósseo (ERMI®) e para reparação do nervo periodontal. A FDA ainda aprovou um material compósito de polietileno (PE) e vidro para implantes orbitais, o Medpor®-Plus™. Nos anos que se seguiram, até os dias atuais, o Bioglass® foi empregado em tratamentos de feridas, utilizado como cerâmicas dentais, engenharia de tecidos em pulmões, em transporte de fármacos, reparo do músculo esquelético, reparo de ligamentos, tratamento de úlceras gastrointestinais, engenharia de tecidos voltada para o sistema cardiovascular, embolização de miomas uterinos, reparação da medula espinhal e vidros bioativos radioativos, comercialmente chamados TheraSphere® para o tratamento de câncer. Outras aplicações clínicas do vidro bioativo incluem aplicações odontológicas seja para reposição óssea, seja para tratamento de hipersensibilidade dentinária, assim, deu-se início à utilização do PerioGlas®, em 1993 (ABBASI et al., 2015; BAINO; HAMZEHLU; KARGOZAR, 2018; GREENSPAN, 2016; HENCH, 2006).

Como exemplo uma aplicação muito usual, nanopartículas de vidro bioativo têm sido incorporadas a pastas de dente para tratamento da hipersensibilidade dentinária, desde 2004. Os resultados da combinação pasta de dente e VB são satisfatórios pela sua eficácia e pela rapidez do processo (CROVACE et al., 2016). Estudos mostram que a utilização de 5% em peso de Bioglass® em pasta de dentes além de reduzir os sintomas da hipersensibilidade dentinária, também reduz o sangramento gengival, a placa bacteriana e a desmineralização do dente (CROVACE et al., 2016; YU et al., 2016). Com os vidros bioativos sendo utilizados em tratamentos de hipersensibilidade dentinária, variações nas composições químicas destes vidros são empregadas, principalmente no que diz respeito à obtenção de fluorapatita no dente (JONES, 2015). Neste contexto, a síntese de vidro bioativo contendo íons fluoreto torna-se extremamente interessante, justamente por ser mais adequada para esta aplicação. Aplicações comercializadas de vidros bioativos contendo íons fluoreto (VBF) não foram encontradas até a conclusão deste trabalho, porém muitos estudos indicam futuras aplicações para vidros contendo esses íons.

Os vidros bioativos, particularmente o Bioglass® 45S5, têm sido usados para regenerar clinicamente o osso humano desde a metade dos anos 80. No entanto, eles mostram uma forte tendência a sofrer cristalização no tratamento térmico a altas temperaturas, o que poderia limitar seu leque de aplicações. Neste contexto, VBF foram investigados para melhorar o processamento dos VB como o estudo de Groh e

colaboradores (2014), onde a processabilidade de vidros 45S5 contendo 1, 3 e 8% de CaF_2 foi investigada. O estudo mostrou que a presença de íons fluoreto melhora a processabilidade do material, o que o torna de mais fácil obtenção, uma vez que a temperatura de fusão do material se torna mais baixa (GROH; DÖHLER; BRAUER, 2014).

A presença de íons fluoreto em vidros bioativos é também investigada para aumento da taxa de formação de apatitas, quando em meio corporal simulado, a partir da eliminação de uma etapa do mecanismo de formação da HA, a etapa de formação de octa-cálcio-fosfato (OCP), que é uma fase precursora a HA. O que estudo realizado por Sriranganathan e colaboradores (2017) demonstrou que ao acrescentar íons fluoreto ao VB a via de formação de apatita é afetada, pois a fluorapatita é formada diretamente, ao invés da via de formação de OCP em HA (SRIRANGANATHAN et al., 2017). Portanto, os VBF possuem potenciais aplicações clínicas como um aditivo para aumentar a formação de apatita.

As principais vias de estudo para aplicações de VBF estão relacionadas a tratamentos odontológicos. Assim, os estudos nesta área alternam o uso de VBF em compósitos poliméricos, uso do VBF como *scaffolds* ou mesmo na forma de pó com aplicação direta na lesão. Exemplo de utilização direta é o estudo realizado por Lins e colaboradores (2016), onde a potencial utilização de nanopartículas de VBF no tratamento de hipersensibilidade dentinária foi avaliada por teste *in vitro*. Neste teste, os túbulos da dentina de dentes humanos foram expostos e, então, foram escovados com um gel contendo nanopartículas de VBF. Os resultados mostraram-se promissores para a aplicação, uma vez que houve a oclusão dos túbulos dentinais após remineralização do tecido por formação de hidroxiapatita e/ou fluorapatita (LINS et al., 2016).

Davis e colaboradores (2014) estudaram a liberação de íons fluoreto e cálcio através da produção de compósito de resina polimérica e VBF 80S derivado de rota sol-gel no tratamento de lesões cariais. Os pesquisadores afirmaram que o compósito obtido teve sucesso em liberação dos íons F^- e Ca^+ por 18 dias, atingindo o objetivo proposto de reservatório de íons (DAVIS et al., 2014).

3.5 Sonoquímica

De um modo geral, a química é o estudo da interação entre energia e matéria. Para que ocorram reações químicas é necessário o uso contínuo de energia, seja proveniente do calor, da luz ou de radiação ionizante. A irradiação ultrassônica difere das fontes tradicionais de energia em tempo de duração, pressão e energia dispensada por molécula, sendo, portanto, um meio único de interação entre energia e matéria (SUSLICK, 1990).

As vantagens do emprego da irradiação ultrassônica que a fazem superior a outros métodos são 1) sintetização de materiais amorfos e em escala nanométrica; 2) inserção de nanomoléculas em materiais porosos; 3) deposição de materiais nanoparticulados (metais, óxidos, semicondutores, polímeros), de forma homogênea, em várias superfícies; e 4) sintetização de micro e nanoesferas, além da possibilidade de encapsulação destas esferas por proteínas ou fármacos (GEDANKEN, 2004).

O ultrassom tem uma ampla variedade de aplicações, desde a degradação de poluentes, aumento das reações de polimerização, fabricação de nanopartículas até a ciência de alimentos e aplicações biomédicas. A maioria desses processos surge da cavitação ultrassônica, isto é, da formação, crescimento e colapso violento de bolhas microscópicas à medida que compressões e rarefações alternadas das ondas sonoras se propagam pelo líquido. O colapso da bolha induzido pela cavitação produz aquecimento intenso e altas pressões no interior do reator ultrassônico, gerando uma atmosfera única no meio (MEROUANI et al., 2015; SUSLICK, 1990). A área de pesquisa na qual as moléculas sofrem reação química devido à aplicação de irradiação ultrassônica na faixa de 20 kHz- 10 MHz é chamada de sonoquímica.

Na irradiação ultrassônica, a cavitação proporciona jatos de líquido de alta velocidade na superfície, o que produz superfícies altamente aquecidas, onde as ondas de choque criadas aceleraram as partículas sólidas a altas velocidades, diminuindo assim o tempo de reação. As colisões entre partículas resultantes são capazes de induzir mudanças significativas na morfologia, na composição e na reatividade da superfície do material (SUSLICK, 1990). Já os efeitos químicos da sonoquímica são diversos, uma vez que há aumento do número de reações efetivas (SUSLICK, 1990). A grande utilidade da sonoquímica reside no fato de que a escolha de reagentes químicos com

base em sua pressão de vapor pode ajudar a personalizar o processo de uma maneira geral (POKHREL; VABBINA; PALA, 2016).

Ainda no processamento da sonoquímica, os ciclos de compressão fazem com que a pressão e a temperatura dentro da bolha aumentem para mais de 1000 atm e 5000 K durante a cavitação, fazendo com que a região central, conhecida como *hotspot*, apresente colisões de partículas de alta energia que geram energia de até 13 eV (GEDANKEN, 2004; POKHREL; VABBINA; PALA, 2016). Além da energia do *hotspot* e dos efeitos químicos associados, as bolhas acústicas dão origem a fenômenos físicos úteis durante o colapso. Assim, bolhas que atingem o limite, explodem para produzir microjatos e as bolhas que implodem produzem ondas de choque que aceleram as partículas de soluto e de impurezas a velocidades de várias centenas de metros por segundo. A colisão nessa velocidade resulta em drástica transformação estrutural do material que pode ser usada para diferentes propósitos (GEDANKEN, 2004; POKHREL; VABBINA; PALA, 2016).

Na sonoquímica, materiais frágeis, como cerâmicas, se quebram em pequenos fragmentos para produzir partículas finas, o que se mostrou mais eficaz do que o moinho de bolas e processos similares. As ondas de choque também podem impactar as partículas diretamente e induzir a fragmentação sem a necessidade de colisão. Porém, a distribuição da matéria e o efeito das ondas de choque e dos microjatos que se seguem à explosão da bolha só se estendem à proximidade, portanto o efeito da sonoquímica no ambiente é localizado. A combinação de tais efeitos torna viável a síntese de materiais morfológicamente delicados e incomuns, como nanoesferas (POKHREL; VABBINA; PALA, 2016).

Cai e colaboradores (2007) mostraram que, ao empregar a agitação ultrassônica associada ao CTAB como surfactante na síntese de fosfato de cálcio, é possível obter um material esférico em escala nanométrica. Os pesquisadores afirmam, ainda, que a utilização do ultrassom é um dos gatilhos externos mais promissores para sintetizar materiais com capacidade de liberação de fármacos, por exemplo (CAI et al., 2007)

Estudo realizado por Rahman e colaboradores (2007) comparou a interferência entre os métodos de agitação magnética e agitação ultrassônica na síntese de partículas de sílica. Os pesquisadores constataram que as partículas ficam altamente agregadas ao

utilizar-se agitação magnética, ao invés de agitação ultrassônica. Além disto, os pesquisadores também constataram que o tamanho de partícula para a sílica produzida em agitação ultrassônica é menor do que a sílica produzida através de agitação magnética (RAHMAN et al., 2007).

O ultrassom também pode ser utilizado como catalisador do processo sol-gel para produzir agregados finos, justamente por criar um ambiente único para que as reações ocorram, o que acarreta em características particulares aos sonogéis resultantes (OLIVEIRA et al., 2014). O trabalho de Oliveira e colaboradores (2014), mostrou que processo sol-gel em simultaneidade à agitação ultrassônica e utilização de polietilenoglicol (PEG 6000) como dispersante permite a formação de partículas de tamanho submicrométrico e com características mesoporosas (OLIVEIRA et al., 2014).

Sendo assim, fixando-se as concentrações de reagentes na síntese de vidros, o tamanho e a distribuição de partículas é altamente dependente do modo de mistura da reação. Rahman e colaboradores (2012) mostraram que nestas condições o tamanho de partícula de sílica sob influência ultrassônica é em escala nanométrica, mostrando-se uma técnica simples e reproduzível, que proporciona alto rendimento de partículas nanométricas em faixa de tamanho primário (RAHMAN; PADAVETTAN, 2012)

Desta forma, a capacidade de controle e modificação das características dos materiais também passa pelo processamento ao qual ele é submetido. Assim, os vidros bioativos sintetizados por metodologia sol-gel possuem propriedades altamente dependentes dos modos de mistura dos reagentes, pois eles influenciam diretamente na interação/reação das moléculas com o meio. Por exemplo, o TEOS é uma molécula altamente apolar, logo, imiscível em água, porém altamente miscível em álcool, assim quanto melhor for a disponibilidade de sítios ativos através da agitação, mais rapidamente TEOS será hidrolisado e menor será o tempo de síntese (JAFARZADEH; RAHMAN; SIPAUT, 2009).

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Etapas de desenvolvimento do trabalho

As etapas desenvolvidas neste trabalho estão esquematizadas no fluxograma abaixo, Figura 4.1.

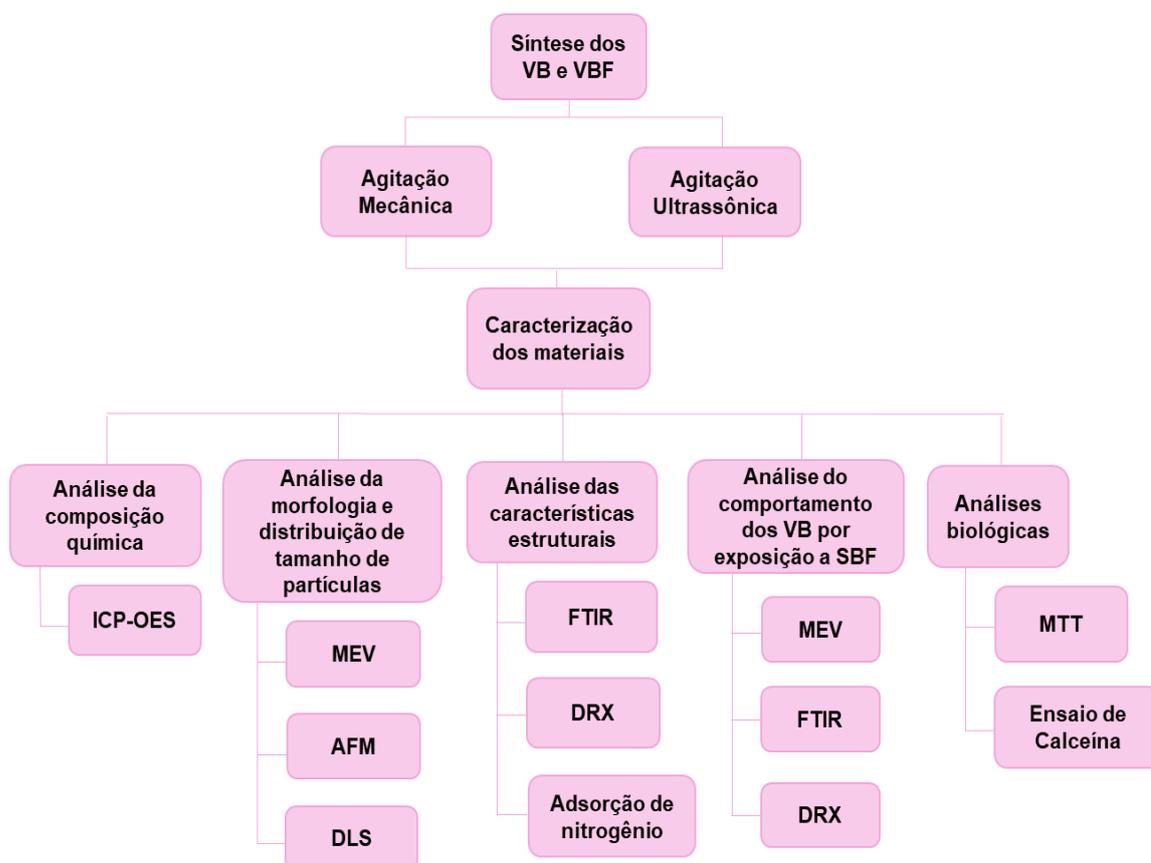


Figura 4. 1: Fluxograma das atividades desenvolvidas neste trabalho

4.2 Materiais

As partículas de vidro bioativo foram sintetizadas utilizando os seguintes reagentes: Água Milli-Q com resistividade mínima de (18,0 MΩ.cm) a 25 °C; Brometo de cetrimônio (CTAB: CH₃(CH₂)₁₅N(Br)(CH₃)₃, de peso molar 364,46 g.mol⁻¹ – 99% de pureza, Vetec), Álcool etílico (C₂H₆O- 95% de pureza, Synth), Hidróxido de amônia (NH₄OH- teor de 27%, Synth), Tetraetil ortosilicato (TEOS: C₈H₂₀O₄Si - 98% de pureza, Sigma - Aldrich, Saint Louis, EUA), Trietil fosfato (TEP: C₆H₁₅O₄P – Sigma - Aldrich, Saint Louis, EUA), nitrato de cálcio tetra hidratado (Ca(NO₃)₂ .4H₂O: 99% de pureza- Synth) e Fluoreto de cálcio (CaF₂- 96% de pureza, Vetec).

4.3 Síntese do vidro bioativo

Foram sintetizadas via rota sol-gel duas composições nominais de vidro bioativo com e sem adição de fluoreto de cálcio, que foi empregado para incorporação de íons fluoreto à estrutura do vidro. As amostras de vidro bioativo (VB) produzidas são descritas na Tabela IV.1 de acordo com seu processamento e composição química nominal em %mol.

Tabela IV. 1 Vidros bioativos desenvolvidos neste estudo

Amostra	Processamento	Composição (%mol)
VBM	Agitação mecânica (M)	80% SiO ₂ - 15% CaO- 5% P ₂ O ₅
VBFM	Agitação mecânica (M)	80% SiO ₂ - 5% CaO- 4% P ₂ O ₅ - 11% CaF ₂
VBU	Agitação Ultrassônica (U)	80% SiO ₂ - 15% CaO- 5% P ₂ O ₅
VBFU	Agitação Ultrassônica (U)	80% SiO ₂ - 5% CaO- 4% P ₂ O ₅ - 11% CaF ₂

4.3.1 Síntese do vidro bioativo através de agitação ultrassônica

O VB foi sintetizado a partir da adaptação da rota sol-gel desenvolvida por Hu e colaboradores (2014). A solução de partida (sol) foi produzida através de reagentes precursores com adição dos mesmos em intervalos de 30 min entre cada adição, como esquematizado e enumerado por etapas na Figura 4.2. Inicialmente adicionou-se 0,814 g de CTAB em 330 mL de água deionizada e 156 mL de álcool etílico sob agitação mecânica à velocidade de 280 rpm (1). Em seguida, a solução formada foi

transferida para o agitador ultrassônico Hielscher- Ultrasound Technology, modelo UP200S (220V, 24kHz), com programação de amplitude de agitação de 40% e ciclo de 0,4 e adicionou-se 5,58 mL de solução de amônia (2). Posteriormente foram adicionados de 6 mL de TEOS (3). Após 30 min, a amplitude e o ciclo de agitação foram ajustados para 60% e 0,6, respectivamente, e 0,46 mL de TEP foram adicionados à solução precursora (4). Na sequência, adicionou-se 1,28 g de nitrato de cálcio (5). A solução resultante permaneceu sob agitação por 3 h à temperatura ambiente, formando um precipitado branco. Filtrou-se a suspensão em filtro Millipore 0,22 μm (6) para coleta do precipitado branco (7) que foi por sua vez lavado com 25 mL de água deionizada e 25 mL de etanol. O material retido foi seco à temperatura ambiente durante 24 h (8). As partículas de vidro bioativo foram obtidas (10) após tratamento térmico ao ar a 650 °C por 3 h com taxa de aquecimento de 2 °C/min (9) e desaglomeração do pó. Para a síntese do VBFU contendo flúor adicionou-se, juntamente com o nitrato de cálcio (5), 0,296 g de fluoreto de cálcio (HU et al., 2014).

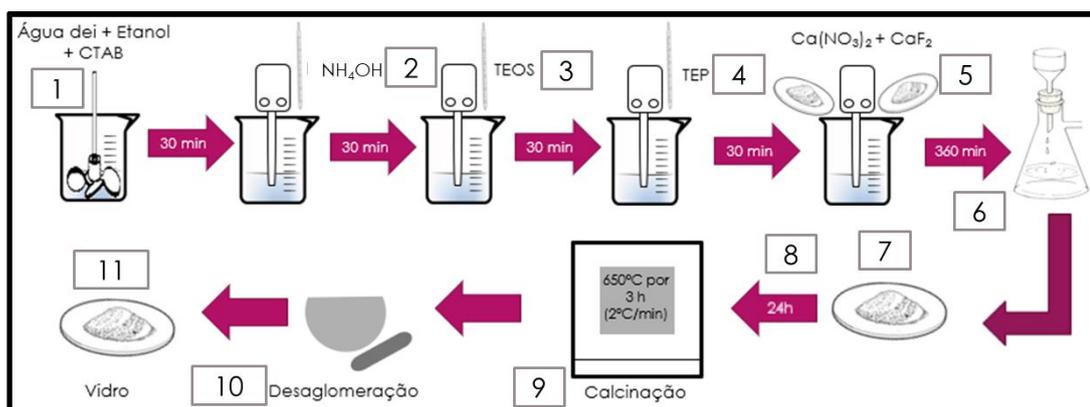


Figura 4. 2: Representação esquemática da síntese de VB por agitação ultrassônica

4.3.2 Síntese do vidro bioativo através de agitação mecânica

O VB sintetizado através da agitação mecânica também foi preparado a partir da adaptação da rota sol-gel desenvolvida por Hu e colaboradores (2014). A solução de partida (sol) foi produzida através de reagentes precursores com adição dos mesmos em intervalos de 30 min entre cada adição, como esquematizado e enumerado por etapas na Figura 4.3. Foram adicionados 0,407 g de CTAB à uma solução de 165 mL de água deionizada e 78 mL de álcool etílico absoluto sob agitação mecânica à velocidade de 280 rpm, durante 30 min (1). Posteriormente, 2,79 mL de solução de

amônia (2), 3 mL de TEOS (3), 0,23 mL de TEP (4), 0,64 g de nitrato de cálcio (5) foram adicionados à solução. A solução resultante permaneceu sob agitação por 3 h à temperatura ambiente, formando um precipitado branco. Filtrou-se a suspensão em filtro Millipore 0,22 μm (6) para coleta do precipitado branco (7), que foi, por sua vez, lavado com 25 mL de água deionizada e 25 mL de etanol. O material retido foi seco à temperatura ambiente durante 24 h (8). As partículas de vidro bioativo foram obtidas (11) após tratamento térmico ao ar a 650 °C por 3 h com taxa de aquecimento de 2° C/min (9) e desaglomeração do pó (10). Para a síntese do VBMF contendo flúor adicionou-se, juntamente com o nitrato de cálcio (5), 0,148 g de fluoreto de cálcio (HU et al., 2014).

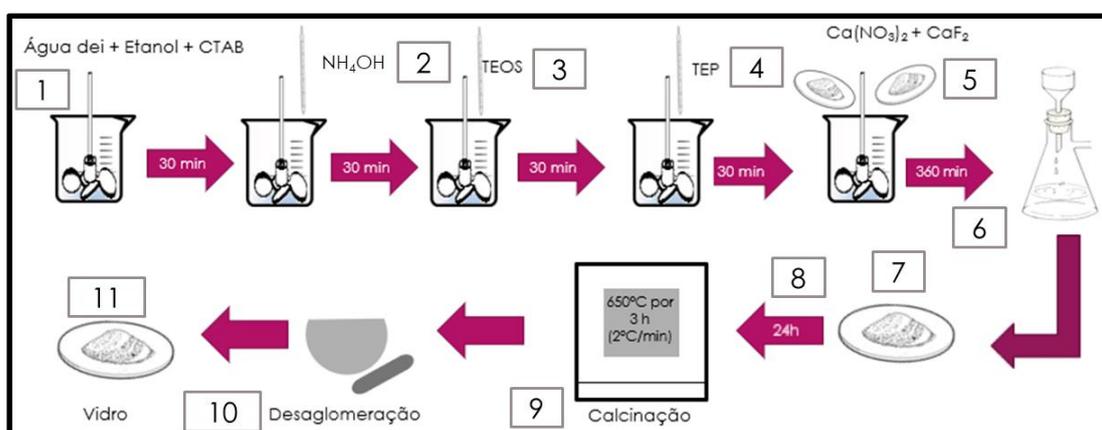


Figura 4. 3: Representação esquemática da síntese de VB por agitação mecânica

4.4 Caracterização dos vidros bioativos

Para todas as amostras de vidro bioativo com e sem adição de íons fluoreto e sob os dois processos de agitação, por ultrassom e por agitação mecânica, foram aplicadas todas as técnicas de caracterização de materiais a seguir.

4.4.1 Composição química

A composição das partículas foi analisada por meio de Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) no equipamento Optima 7300 DV (PerkinElmer, EUA). Para essa análise, 0,1 g das amostras foram transferidas para um cadinho de grafite, contendo 0,7 g de metaborato de lítio. Outra porção de 0,7 g de metaborato de lítio foi adicionada e a mistura levada à mufla (950 \pm 25 °C) por 10

minutos. O cadinho foi retirado da mufla, a mistura homogeneizada e, em seguida, colocada de volta no equipamento por 10 minutos adicionais (950 ± 25 °C). Depois disso, a mistura foi transferida para um béquer contendo 100 mL de solução de ácido nítrico (10% (v/v)) e submetida a agitação até completa dissolução. A solução resultante foi transferida para tubos falcon para armazenamento e posterior análise. As concentrações de Si, Ca e P foram então analisadas pelo equipamento e as proporções de SiO_2 , CaO e P_2O_5 foram calculadas.

4.4.2 Análises da morfologia e distribuição de tamanho

4.4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia superficial dos materiais foi observada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) FEI-INSPECT S50, operando a tensão de 15kV. O MEV é equipado com Espectrômetro por Dispersão de Energia (EDS) da EDAX Genesis, utilizado para avaliar qualitativamente a composição química elementar da superfície das amostras. As amostras foram previamente preparadas para a análise a partir da direta pulverização de grafite em fita adesiva e condutiva de carbono (HU et al., 2014; LINS et al., 2018).

4.4.2.2 Microscopia de força atômica (AFM)

As imagens topográficas das amostras foram obtidas a partir da técnica de Microscopia de Força Atômica (MFA). Utilizou-se o equipamento AFM-Park Systems - modelo XE-70, ponta de Si tipo PPP-NCHR, no modo não-contato, com constante força de 42 N/m e frequência 330 kHz. A preparação das amostras foi realizada por dispersão do pó em álcool etílico absoluto, na concentração 1 mg/ml, sob agitação magnética por 5 horas. Uma gota da mistura preparada foi adicionada à lamínula de mica e seca ao ar para a análise, seguindo o protocolo elaborado por LINS, 2018.

4.4.2.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi realizada para mensurar o diâmetro hidrodinâmico das partículas após o tratamento térmico. O equipamento utilizado foi o Zetasizer 3000 HS 1256. Este sistema é equipado com um laser de

4 mW de hélio/neon, com comprimento de onda de 633 nm e mede o tamanho de partícula com a tecnologia de retroespalhamento não invasiva com um ângulo de detecção de 173°. As medições de dispersão de luz foram realizadas a 25±1 °C. As medições hidrodinâmicas foram realizadas com ângulo de 90°. Os dados foram analisados de acordo com o método cumulativo para diâmetro médio aparente e índice de polidispersibilidade (PDI), o valor final foi uma média aritmética de 10 medições. Para avaliar o tamanho das partículas, as amostras foram preparadas a partir da dispersão do vidro em metanol na concentração de 0,01 g/mL (OLIVEIRA et al., 2014).

4.4.3 Análise das características estruturais

4.4.3.1 Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização química qualitativa, a partir dos grupos funcionais presentes nas amostras, foi realizada por Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Foi empregada a técnica de reflectância, com comprimentos de onda entre 400 e 4000 cm⁻¹, em equipamento Thermo Scientific Nicolet 6700 – OMNI Smart Accessory, no decurso de 64 varreduras com resolução de 4 cm⁻¹ e com intervalos de 2 cm⁻¹. As amostras foram preparadas a partir da dispersão do material em KBr em uma proporção de 1:100, respectivamente (BARRIONI et al., 2017; LINS et al., 2018).

4.4.3.2 Difração de raio-X (DRX)

A análise de Difração de Raios-X (DRX) foi empregada a fim de verificar as características de fases e organização estrutural das amostras de VB produzidas. Os espectros foram coletados no equipamento Philips PW1700 utilizando radiação Cu-Ka ($\lambda=1,5418$ Å) a 40kV/40mA. Os dados coletados estão em 2 θ entre 4,05 e 89,95° com passo de 0,06° e tempo de permanência de 1,5s (LINS et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2014)

4.4.3.3 Adsorção de nitrogênio por método BET

A técnica de adsorção-dessorção de N₂ pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET) foi realizada a fim de se obter valores de área superficial específica e porosidade total das partículas de VB. Para tal, foi utilizado equipamento Quantachrome9 com medidas de

isotermas de adsorção-dessorção de N₂ a 77 K. A área de superfície específica foi determinada com método de BET, que utiliza os pontos dos dados de adsorção na pressão relativa (P/P_0) na faixa de 0,01-0,30. A distribuição do diâmetro dos poros foi calculada pelo método BJH (Barrett, Joyner e Halenda) aplicada às curvas de dessorção. A dessorção é preferível à adsorção para estes cálculos, porque geralmente ocorre com menor pressão relativa, sendo, portanto, considerada uma melhor aproximação do equilíbrio termodinâmico. Os tipos de isotermas foram avaliados de acordo com a sua forma e tipo de histerese entre os modos de adsorção-dessorção (BARRIONI et al., 2017; HU et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014).

4.4.4 Análise do comportamento das partículas por exposição a fluido corporal simulado (SBF)

Aqui o ensaio de SBF foi empregado para prever a bioatividade óssea *in vivo*, isto é, a capacidade de formação de hidroxiapatita e/ ou fluorapatita em tecidos vivos através dos materiais sintetizados.

4.4.4.1 Preparação do SBF

À 700mL de água deionizada foram adicionados, em ordem e após dissolução completa de cada reagente: 8,035 g de NaCl, 0,355 g de NaHCO₃, 0,225 g de KCl, 0,231 g de K₂HPO₄.3H₂O, 0,311 g de MgCl₂.6H₂O, 39 mL 1,0M. HCl, 0,292 g de CaCl₂ e 0,072 g de Na₂SO₄, sob agitação magnética e a 37 °C. Após estabelecimento do pH da solução em $2,0 \pm 1,0$, foi adicionado Trishidroximetilaminometano e HCl até ajuste e tamponamento em pH 7,4 na temperatura de 37 °C. A solução obtida foi transferida para um balão volumétrico e resfriada até 20 °C (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

4.4.4.2 Procedimento do teste de capacidade de formação de apatita

Em béqueres plásticos, as partículas de VBM, VBU, VBFM e VBFU foram adicionadas à solução de SBF sob agitação em uma concentração de 1,5 g/L a 37 °C. Com o objetivo de favorecer as condições de supersaturação das amostras e induzir a formação de apatitas, as amostras permaneceram sob agitação de 60 rpm por 12 h, 24 h, 5 d, 14 d e 28 d. Uma alíquota de SBF sem vidro foi utilizada como controle. As misturas resultantes, após cada tempo determinado, foram filtradas em papel filtro com

porosidade 5µm. O papel filtro foi seco em estufa por 1 h a 37 °C e levado para caracterização (BRAUER et al., 2010; KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

4.4.4.3 Caracterização das amostras

Após imersão em SBF, as amostras de VB foram caracterizadas para análise da sua morfologia por microscopia eletrônica de varredura. A estrutura e composição química foram avaliadas por espectroscopia na região do infravermelho e espectroscopia por dispersão de energia de raios X. Além disso, foram verificados os padrões de cristalinidade das amostras através de ensaio de difração de raios X, com posterior comparação aos padrões de referência do Centro Internacional de Dados de Difração incluindo hidroxiapatita (JCPDS 09-432); hidroxiapatita carbonatada (JCPDS 19-272); fluorapatita (JCPDS 15-876); fluorapatita carbonatada (JCPDS 31-267); fluorita (JCPDS 35-816), e calcita (JCPDS 5-586) (SHAH et al., 2014a).

4.4.5 Caracterização biológica *in vitro* dos materiais

4.4.5.1 Análise de viabilidade celular por MTT

Cultura celular

Células de linhagem de rim de embrião humano (HEK293 T) foram cedidas pela Profa. M.F Leite do Departamento de Fisiologia e Biofísica, UFMG. Todas as células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*) com (10 %, v/v) de soro fetal bovino (SFB), sulfato de estreptomicina (10 mg.mL⁻¹), penicillina G sódica (10 units.mL⁻¹), e anfotericina-b (0.025 mg.mL⁻¹), todos fornecidos pela Gibco BRL (NY, USA), em estufa com 5 % de CO₂ e 37 °C. As células HEK293 T foram utilizadas para os experimentos na passagem 35.

MTT

Os ensaios biológicos foram realizados seguindo as normas 10993-5:2009 ('Biological evaluation of medical devices: Tests for in vitro cytotoxicity').

Células HEK293 T foram plaqueadas (1 × 10⁴ células / poço) em placas de 96 poços. As populações celulares foram sincronizadas em meio sem soro durante 24 h. Depois

disso, o volume de meio foi aspirado, substituído por meio DMEM com 10% de SFB e foram adicionadas 1 mg.m⁻¹ (p/v) das amostras VBM, VBU, VBFM e VBFU. Controles de células e DMEM com 10% de SFB foram utilizados como referência, como controle positivo Triton X-100 (1% v/v em tampão fosfato salino, PBS) da Gibco BRL, Nova Iorque, EUA) e como controle negativo lascas estéreis de tubos de Eppendorf de polipropileno (1 mg.mL⁻¹, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Após 48 h, o meio foi aspirado e substituído por 60 µl de meio de cultura com soro em cada poço. Foram adicionados a cada poço 50 µL de reagente MTT (5 mg.mL⁻¹, p / v em PBS) da (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e incubou-se durante 4 h em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após esse período, 40 µl de solução de Isopropanol / 4% de HCl foram colocadas em cada poço. Em seguida, 100 µl foram removidos de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços para quantificar a absorbância (Abs) em espectrofotômetro (I-Mark, Bio-Rad) com filtro de 595 nm. Os valores obtidos foram expressos como percentagem de células viáveis de acordo com a Equação 4.1.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{absorbância das células em contato com as amostras} \times 100}{\text{absorbância do controle}} \quad \text{Eq. 4.1}$$

Consideraram-se os valores dos controles (poços com células e sem amostras) como 100% de viabilidade celular.

Análise estatística

Os experimentos foram realizados com n= 6 (p < 0,05 análise estatística: one way / ANOVA / Bonferroni / GraphPadPrism).

4.4.5.2 Ensaio de Calceína

Células HEK293 T foram plaqueadas (1 × 10⁴ células / poço) em placas de 96 poços. As populações celulares foram sincronizadas em meio sem soro durante 24 h. Os controles de referência foram células cultivadas em meio DMEM com 10% de FBS. Após 48 h, todos os meios foram aspirados e as células foram lavadas duas vezes com 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco BRL, NY, EUA). As células foram tratadas com calceína (Life Technologies of Brazil Ltd., São Paulo, Brasil) por 30 min, de acordo com as especificações do fabricante. Imagens de

emissões fluorescentes foram adquiridas (calceína a 530 ± 12 nm) com microscópio óptico invertido (Leica DMIL LED, Alemanha).

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química dos vidros bioativos

5.1.1 Análises da composição química por ICP-OES

A composição química (em % mol) dos vidros foi analisada através do método de fusão de metaborato de lítio e análise de ICP-OES. Os resultados são apresentados na Tabela V.4 e não apresentam, para as composições contendo íons fluoreto, a %mol do composto CaF_2 , uma vez que a técnica não é sensível à capitação do elemento flúor.

Observa-se diferenças entre a composição nominal e a composição determinada por ICP-OES do vidro, principalmente no que diz respeito à presença do pentóxido de fósforo (P_2O_5). O precursor de fósforo, o TEP, foi adicionado em quantidades muito menores em comparação aos outros reagentes e é um composto que reage mais lentamente que o TEOS (precursor de Si) podendo ter afetado sua inserção na rede, o que contabilizaria as menores frações de P_2O_5 nos vidros sintetizados (BARRIONI et al., 2017). A quantidade de cálcio incorporada nos géis resultantes depende da composição inicial. Durante a policondensação e a secagem, os íons de cálcio são liberados do gel. Parte dos íons de cálcio podem ter sido levados durante a lavagem do gel com água e etanol, por isso a menor proporção nos VBM e VBU (OLIVEIRA et al., 2014). Para os vidros contendo íons fluoreto, a porcentagem de cálcio final é maior, pois o cálcio deve ser incorporado via nitrato de cálcio e, para a incorporação de íons fluoreto, também via fluoreto de cálcio (CaF^+). Porém, é possível que a maior proporção de cálcio encontrada nas amostras de VBFM e VBFU, além do cálcio proveniente do nitrato de cálcio, refere-se à presença do sal de CaF_2 nas partículas.

Tabela V. 1: Composição química nominal e determinada pelo método de fusão de metaborato de lítio e ICP-OES (%mol) de vidros bioativos.

Amostra	Composição nominal (%mol)				Composição ICP-OES (%mol)			
	SiO ₂	CaO	P ₂ O ₅	CaF ₂	SiO ₂	CaO	P ₂ O ₅	CaF ₂
VBM	80,0	15,0	5,0	-	88,8	11,1	0,1	-
VBU	80,0	15,0	5,0	-	85,0	15,0	0,0	-
VBFM	80,0	5,0	4,0	11,0	82,6	17,2	0,2	-
VBFU	80,0	5,0	4,0	11,0	80,0	20,0	0,0	-

5.2 Caracterização física dos vidros bioativos

5.2.1 Análises da morfologia por MEV e MFA e da distribuição de tamanho de partícula por DLS

A figura 5.1 apresenta fotografias das amostras VBM, VBU, VBFM e VBFU. Os pós sintetizados apresentam coloração esbranquiçada, característica de vidros bioativos produzidos via rota sol-gel.

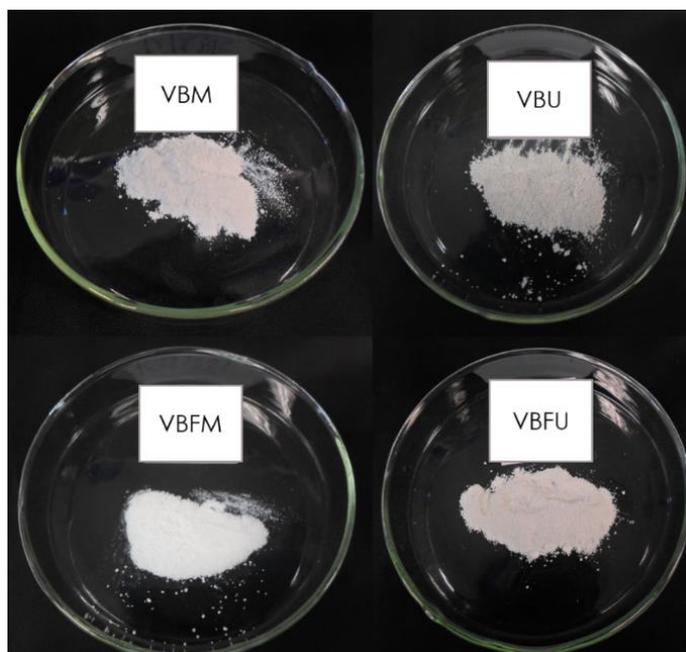


Figura 5. 1: Fotografias dos vidros bioativos sintetizados neste estudo

A microscopia eletrônica de varredura foi empregada para avaliar a morfologia e a estrutura superficial das amostras. A Figura 5.2 apresenta as imagens dos vidros produzidos e seus respectivos espectros de EDS. Nas imagens é possível identificar que todas as amostras apresentam morfologia esférica. O tamanho de partículas avaliado para as amostras está entre 299-392 nm para a amostra de VBM, 233-417 nm para a amostra de VBU, 328-460 nm para a amostra de VBFM e 350-488 nm para a amostra de VBFU. A presença dos elementos Si e Ca nos vidros foi observada através da análise de EDS, porém, não foi detectado o elemento flúor nas amostras de VBFM e VBFU, isso se deve provavelmente ao limite de detecção da técnica de EDS.

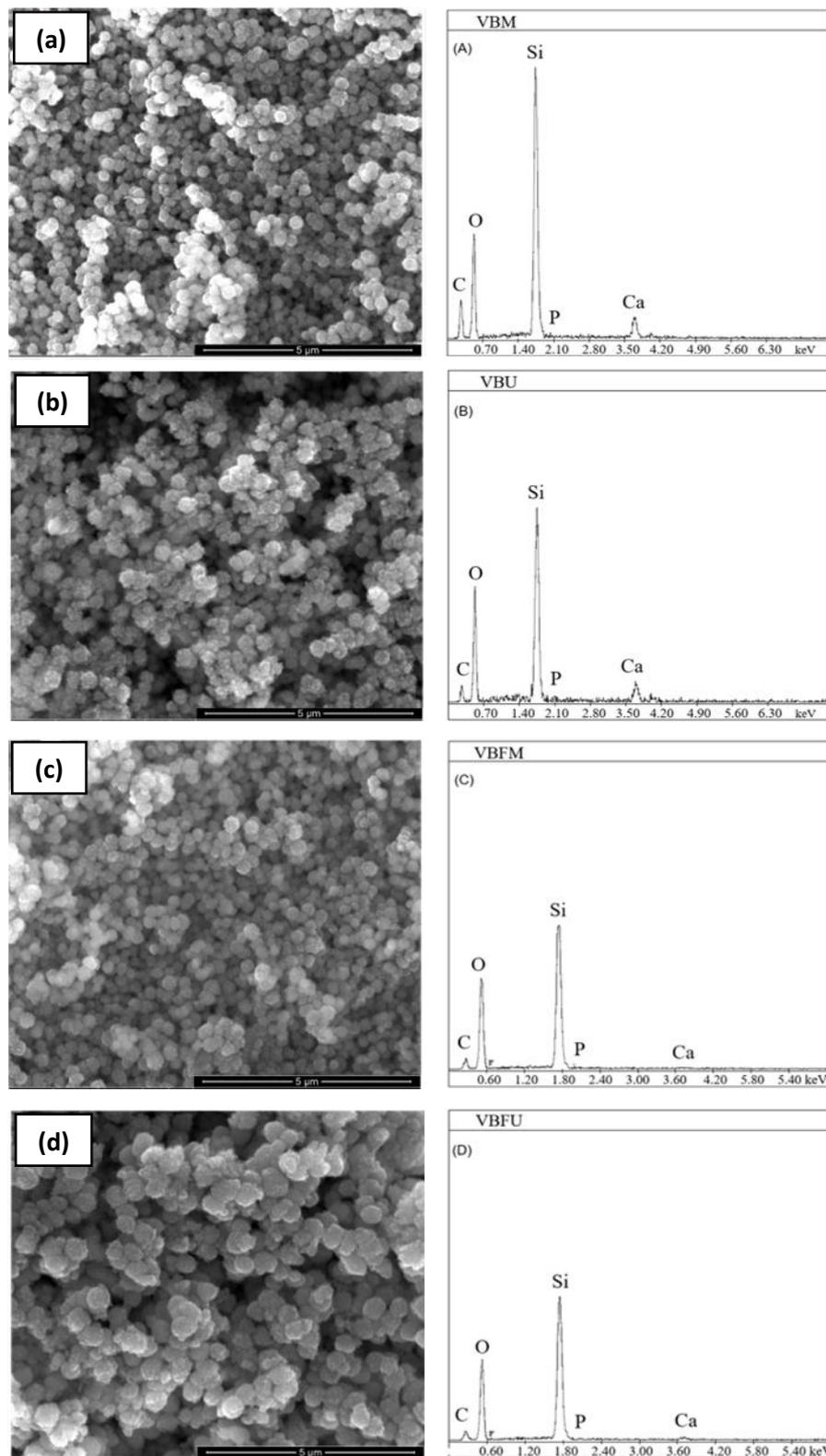


Figura 5. 2: Imagens da superfície de vidros bioativos obtidas por MEV e espectros de EDS das respectivas regiões para as amostras (a) VBM, (b) VBU, (c) VBFM, e (d) VBFU.

A topografia e morfologia das amostras também foram analisadas via Microscopia de Força Atômica (MFA). A forma esférica foi confirmada e a faixa de diâmetro de partícula obtida por esta técnica para a amostra de VBM foi de 582-1000 nm, para a amostra de VBU foi de 406-567 nm, para a amostra de VBFM foi de 296-566 nm e para a amostra de VBFU foi de 213-434 nm, como é apresentado na figura 5.3.

O fato de as partículas de vidro bioativo sintetizadas serem esféricas propicia propriedades físico-químicas e biológicas aprimoradas em comparação àquelas sintetizadas com morfologia irregular (HU et al., 2014). Além do mais, um material com morfologia irregular pode causar microcortes e microlesões no local do implante, aumentando o tempo de cicatrização, o que pode ser evitado quando usados materiais com morfologia esférica (ABBASI et al., 2015; LINS et al., 2018). Sabe-se ainda que a adesão e proliferação celular em materiais com morfologia esférica é maior quando comparados aos materiais com morfologia irregular, uma vez que as células poderão se aderir e espalhar com maior facilidade devido a menor barreira física que impeça seu movimento (LEVY et al., 2007).

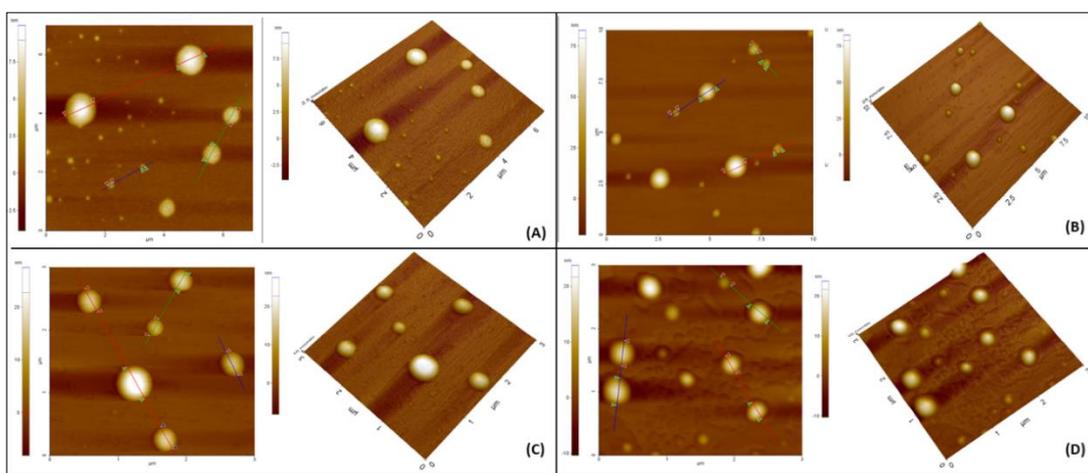


Figura 5. 3: Imagens de MFA das partículas de (a) VBM, (b) VBU, (c) VBFM, e (d) VBFU.

A distribuição de tamanho de partículas das amostras em suspensão foi obtida por análise de DLS (Fig. 5.4). A análise cumulativa, sintetizada na Tabela V.2, mostra um diâmetro médio de partículas maior do que 100 nm, o que indica tamanho de partícula

submicrométrico, como descrito na literatura (JONES, 2015). O índice de polidispersividade (PDI) obtido na análise é de aproximadamente 0,30, apontando que há uma distribuição homogênea de tamanho de partículas em suspensão (MOREIRA et al., 2018).

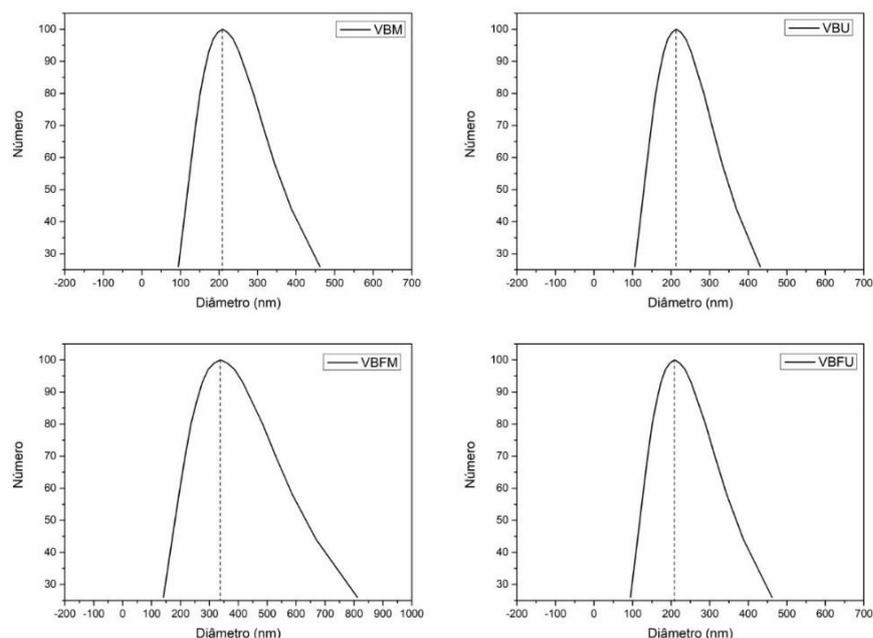


Figura 5. 4: Distribuição de diâmetro de partículas por análise de DLS para as amostras de (a) VBM, (b) VBU, (c) VBFM, e (d) VBFU.

Tabela V.2: Diâmetro médio de partícula por análise DLS e índice de polidispersividade

Amostra	Diâmetro médio de partícula (nm)	Índice de polidispersividade
VBM	197 ±23	0,30
VBU	234 ±20	0,22
VBFM	390 ±41	0,35
VBFU	235 ±23	0,28

As técnicas de MEV e MFA foram escolhidas para fins de análise qualitativa da faixa de tamanho das partículas sintetizadas, pois para essas análises não foram empregadas repetições estatisticamente significativas nas medições, o que pode

indicar valores que não representem o tamanho médio real das partículas nas amostras. Contudo, a técnica de DLS é uma técnica precisa para análise do tamanho de partícula de materiais. Ademais, os resultados obtidos por DLS foram estimados após 10 (dez) medições, o que garante maior confiabilidade dos resultados. Desta forma, neste trabalho utilizou-se os resultados obtidos através da análise de DLS para comparação do tamanho de partícula das amostras sintetizadas via agitações mecânica e ultrassônica, com e sem adição de íons fluoreto.

É possível identificar que há diferença significativa entre as faixas de tamanho de partícula das amostras produzidas sob agitação mecânica e das amostras produzidas sob agitação ultrassônica. As amostras produzidas sob agitação mecânica apresentaram variação de tamanho com a adição do flúor na sua composição, uma vez que variaram entre 197 nm (VBM) e 390 nm (VBFM), enquanto o tamanho de partícula das amostras produzidas sob agitação ultrassônica apresentou maior consistência de valores, com variação entre 234 nm (VBU) e 235 nm (VBFU). Possivelmente, esta diferença está relacionada as condições de síntese que os reatores proporcionaram as suspensões, como a variação de temperatura no início e no final da síntese.

Neste trabalho as temperaturas de início e término de síntese foram aferidas e constatou-se que sob agitação mecânica a temperatura da suspensão permaneceu constante a 25 °C. Já na agitação ultrassônica, observou-se que houve aumento de temperatura, uma vez que a temperatura inicial foi de 25 °C e a temperatura final foi de 52 °C. A síntese através de agitação ultrassônica proporcionou condições reacionais diferentes das condições de síntese através de agitação mecânica, pois o princípio de sonocavitação aumenta a temperatura do meio, criando bolhas de gás, que agem como nanoreatores, onde a síntese acontece mais rapidamente (OLIVEIRA et al., 2014). Estudo de metodologia de mistura na síntese de partículas de sílica realizado por Rahman e colaboradores (2007) mostrou que sob agitação mecânica com temperatura de síntese a 25 °C e sob agitação ultrassônica onde a temperatura de síntese subiu para 50 °C, houve diminuição do tamanho de partícula do material, que foi justificada por um aumento da taxa de nucleação da sílica, levando a diminuição no tamanho de partícula (RAHMAN et al., 2007). Contudo, no presente trabalho não foi possível observar diferenças consistentes nos tamanhos de partículas encontrados, uma vez que os tamanhos de partícula para amostras sintetizadas via agitação

ultrassônica (VBU e VBFU) foram similares e os resultados obtidos em relação aos vidros de mesma composição. Ainda, o vidro produzido por agitação mecânica (VBM) e o vidro produzido por agitação ultrassônica (VBU), mostraram que houve alteração do tamanho de partícula com a alteração da metodologia de agitação.

A síntese empregada neste estudo foi adaptada de Hu e colaboradores (2014). Os dados obtidos pelos pesquisadores mostraram que o diâmetro médio das esferas submicrométricas de vidro bioativo obtido foi de 264 nm (HU et al., 2014). Portanto, as amostras VBM, VBU, VBFM e VBFU estão em valores médios de diâmetros congruentes ao esperado de acordo com a literatura.

5.2.2 Análises das características estruturais por FTIR, DRX, composição química e adsorção de Nitrogênio

Os espectros de FTIR dos vidros produzidos podem ser observados na Figura 5.5 e as principais bandas de absorção estão listadas na Tabela V.3. As quatro composições de vidro bioativo produzidos apresentaram espectros com as bandas típicas de VB. A banda na região de 1500-1600 cm^{-1} é comumente associada a grupos -OH presentes na água, assim como a banda na região 1630-1450 cm^{-1} é associada ao carbonato, e ambos estariam adsorvidos nas superfícies dos materiais. A banda centrada em 1090 cm^{-1} corresponderia ao estiramento assimétrico de Si-O-Si e a banda centrada em 965 cm^{-1} ao Si-O- (Si-O-ONL) com um oxigênio não ligante (ONL) por tetraedro de SiO_4 . A banda de 800 cm^{-1} pode ser associada ao estiramento simétrico vibracional de Si-O-Si. A banda centrada em 467 cm^{-1} pode estar relacionada a vibração de Si-O-Si e também ao Si-O de vidro amorfo. Observa-se uma pequena banda em 1160 cm^{-1} , sendo associada à presença do estiramento assimétrico de P-O. As ligações P-O relacionadas a vibração assimétrica do grupo PO_4^{3-} estariam na banda em 560 cm^{-1} (BARRIONI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2013).

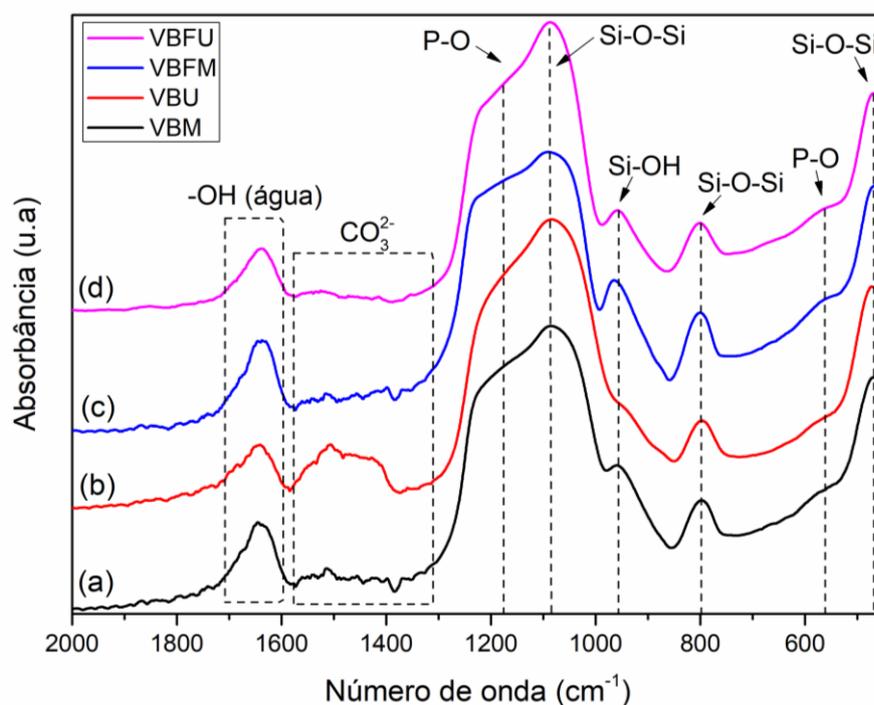


Figura 5. 5: Espectro FTIR dos vidros bioativos produzidos (2000- 450 cm^{-1}): (a) VBM; (b) VBU; (c) VBFM; e (d) VBFU.

Tabela V. 3: Principais bandas vibracionais associadas aos vidros bioativos.

Material	Número de onda (cm^{-1})	Atribuição	Referências
VBM VBU VBFM VBFU	1500-1600	Deformação -OH de água adsorvidas	(a)(b)
	1630-1450	Estiramento CO_3^{2-} carbonatos adsorvidos	(a)(b)
	1090	Estiramento assimétrico de Si-O-Si	(a)(b)
	965	Estiramento Si-O	(a)(b)
	800	Estiramento simétrico vibracional de Si-O-Si	(a)(b)
	467	Vibração de Si-O-Si	(a)(b)
	1160	Estiramento assimétrico de P-O	(a)(b)
	560	Ligações P-O	(a)(b)

(a) (BARRIONI et al., 2017); (b) (OLIVEIRA et al., 2013)

Poucas diferenças são significativas entre os espectros de VBM, VBU, VBFM e VBFU. É possível, porém, identificar que a banda de Si-OH, centrada em 965cm^{-1} , dos vidros contendo íons fluoreto em sua composição, possuem maior intensidade que a mesma banda nos vidros sintetizados sem íons fluoreto em sua composição. Possivelmente, a intensidade dessa banda sofreu alteração devido a presença de íons fluoreto nas partículas de VBFM e VBFU (LUSVARDI et al., 2009). Quando o CaF_2 é adicionado, ele tende a romper a estrutura do vidro (OWENS et al., 2016), o que aumentaria a quantidade de grupamentos Si-OH na estrutura do vidro e, conseqüentemente, a intensidade desta banda seria mais proeminente em espectros de FTIR.

Os padrões de difração de raio X obtidos para as amostras VBM, VBU, VBFM e VBFU são mostrados na Figura 5.6. Através dos padrões encontrados é possível confirmar a natureza amorfa do vidro, pois há um halo disperso em 2θ entre 20° e 40° . A condição amorfa é importante para que haja uma liberação com taxa controlada dos íons incorporados na rede do vidro, de modo que a bioatividade do mesmo seja garantida e modulada (LINS et al., 2016). Para as amostras de vidro contendo íons fluoreto em sua composição é possível visualizar picos de cristalinidade em 2θ próximos a 28° , 47° , 55° , 68° , 76° e 87° . Estes picos são característicos do fluoreto de cálcio (CaF_2), Figura 5.6(i). A principal razão para o aparecimento destes picos seria a precipitação do sal de CaF_2 na superfície das partículas após a síntese. Desse modo, a presença de picos de CaF_2 nos padrões de DRX poderia indicar que parte do flúor não foi incorporado na estrutura das amostras de VBFM e VBFU. Outra justificativa seria que esses picos indicam a presença de CaF^+ nas partículas. Uma vez que a fonte de íons fluoreto na síntese dos vidros foi o já citado composto iônico CaF_2 e que o flúor não realiza ligação direta com o silício, os íons fluoreto podem ser incorporados através da coordenação de íons de flúor (F^-) com íons de cálcio (Ca^{2+}). O composto iônico Ca^{2+}F^- (ou CaF^+) formaria, então, nanoaglomerados nas partículas que aparecem como cristalinidade nos padrões de DRX (RABIEE et al., 2015). Porém a distinção de qual espécie ou espécies estão presentes só poderia ser confirmada através de análises de técnicas mais específicas tal qual a Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), em que são obtidos a composição elementar, o estado químico e eletrônico dos elementos presentes na superfície das amostras.

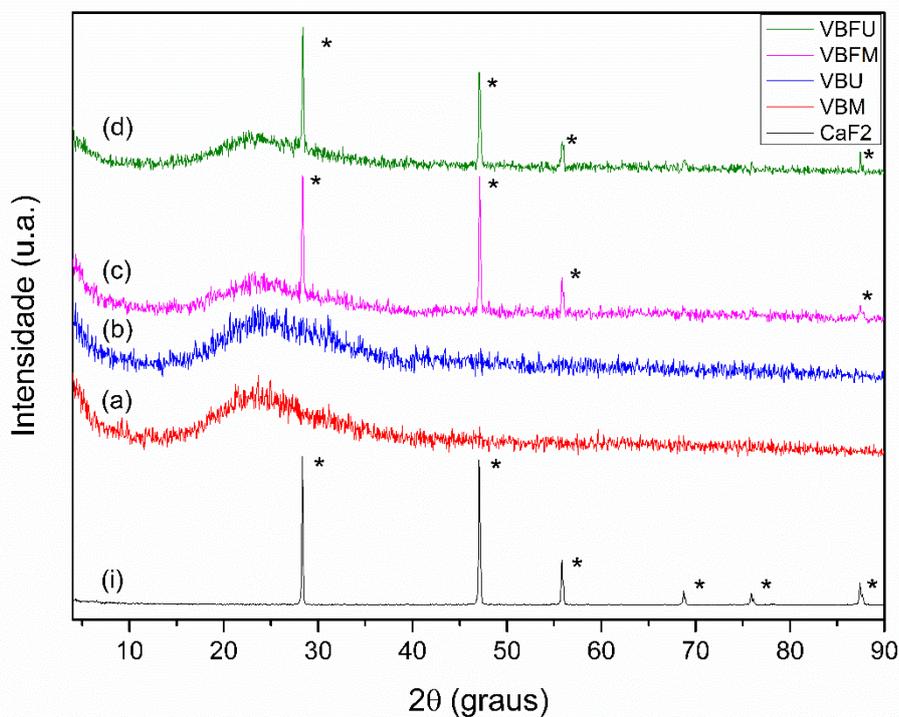


Figura 5. 6: Espectros de DRX para as amostras de (a) VBM, (b) VBU, (c) VBFM e (d) VBFU e para o composto (i) CaF₂. Os * indicam a presença de picos nos espectros.

A análise de FTIR mostrou que apesar de uma maior descontinuidade na rede dos vidros contendo íons fluoreto (maior intensidade da banda de Si-OH), o que indicaria a presença de flúor na estrutura do material, a análise de DRX elucida que a presença de íons fluoreto na superfície das partículas está intimamente relacionada à precipitação do sal de CaF₂ nos VBFM e VBFU. Portanto, a partir das análises de FTIR e DRX não é possível afirmar que houve incorporação de íons fluoreto em alta quantidade na estrutura do material.

As características de área superficial, volume e tamanho de poros foram analisadas através da técnica de adsorção de N₂ pelos métodos BET e BJH, respectivamente. A Figura 5.7 traz as isotermas de adsorção-dessorção e o perfil de distribuição de tamanho de poros (gráfico inserido) obtidos através das análises. As isotermas de adsorção-dessorção de todas as amostras foram identificadas como do tipo IV, que são próprias de materiais com característica mesoporosa, típicos de materiais sintetizados na presença de CTAB, nos quais os poros encontram-se na faixa de 2-

50 nm (ZHENG; BOCCACCINI, 2017). A importância dada a materiais nesta faixa de porosidade se dá por apresentarem indução, nucleação e cristalização mais rápida e em maior quantidade de camada de hidroxiapatita carbonatada em meio fisiológico, uma vez que possuem alta área superficial (LEE et al., 2016; MELCHERS et al., 2016; PEREIRA; HENCH, 1996). Os loops de histerese das isotermas são do tipo H1, o que indica que os poros estão em formato de canais cilíndricos (ALOTHMAN, 2012; MELCHERS et al., 2016).

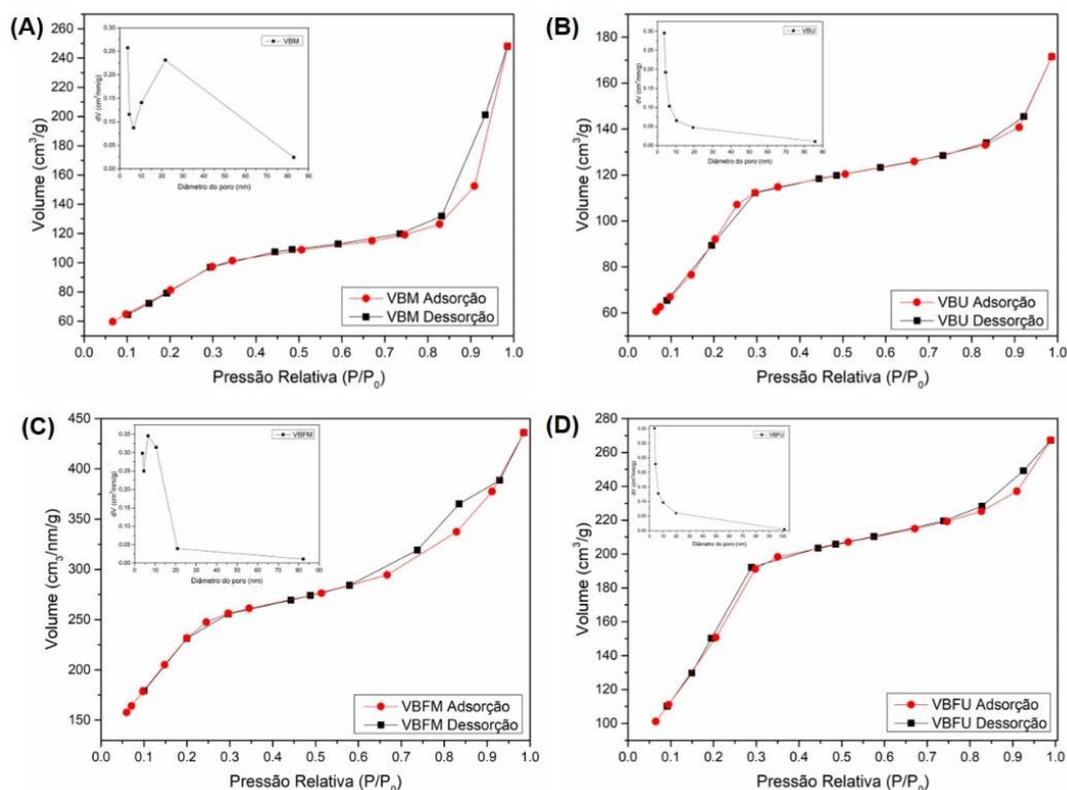


Figura 5.7: Isotermas de sorção de nitrogênio e distribuições de tamanho de poro (gráfico inserido) para (a) VBM, (b) VBU, (c) VBFM, e (d) VBFU.

A área superficial específica obtida pelo método BET, o volume de poros e o diâmetro médio de poros estão presentes na Tabela V.4. A partir da Tabela V.4, infere-se que a área superficial de vidros produzidos via mesma rota de agitação (VBM e VBFM; VBU e VBFU) apresentaram aumento da área superficial com a adição de íons fluoreto à síntese. Ainda se observa que, independentemente da adição de íons fluoreto, as áreas superficiais dos vidros sintetizados por agitação ultrassônica (VBU e VBFU) são maiores que as dos vidros sintetizados por agitação mecânica (VBM e VBFM). A

proporção de aumento das áreas superficiais do VBM para o VBU corresponde a 12%, enquanto a proporção de aumento com a adição de íons fluoreto (VBFM e VBFU) para estes vidros corresponde a 12%, respectivamente. Já a relação entre vidros sintetizados via mesma rota de agitação, com ou sem adição de íons fluoreto, corresponde a 25% entre o VBM e o VBFM, e a 24% entre o VBU e o VBFU. Então, é possível afirmar que os vidros sintetizados contendo íons fluoreto em sua composição possuem área superficial, aproximadamente, 1,25 vez maior que os vidros sintetizados sem a adição de íons fluoreto.

Tabela V. 4: Propriedades texturais obtidas pelos métodos BET e BJH para as amostras VBM, VBU, VBFM e VBFU.

Amostra	Área Superficial (m ² /g)	Volume Total de Poros (cm ³ /g)	Diâmetro Médio de Poro (nm)
VBM	487	0,62	5,0
VBU	551	0,38	2,8
VBFM	613	0,49	3,2
VBFU	684	0,46	2,7

O volume total de poros obtido pelo método BJH mostrou que o VBM possui o maior volume de poros dentre todos os vidros sintetizados, com valor de 0,62 cm³/g. Neste trabalho, o volume total de poros é sempre menor, para uma mesma composição de vidro bioativo, quando é empregada agitação ultrassônica ao invés de agitação mecânica. Porém a variação de volume total de poros para os vidros com adição de íons fluoreto é menor, havendo uma redução de 6,3% no volume de poros do VBFM em relação ao VBFU, quando comparada aos vidros sem adição de íons fluoreto em sua composição, em que houve redução de 60,8% no volume de poros do VBM para o volume de poros do VBU, o que indica uma diminuição de 10 vezes na variação desta propriedade com a incorporação de íons em síntese.

O diâmetro de poros obtido pelo método BJH mostrou que o VBM possui maior diâmetro de poros dentre todos os vidros sintetizados, com valor de 5,0 nm. Com relação aos vidros sintetizados através de agitação ultrassônica, houve uma congruência de valores indicando maior padronização de parâmetros, enquanto que para os vidros sintetizados através de agitação mecânica, a variação de diâmetro de

poros foi alta, houve uma redução de 63,5% com a adição de íons fluoreto. O diâmetro de poros para os vidros sintetizados por agitação ultrassônica sofre baixíssima variação com a adição de flúor à sua composição. Como o flúor é um elemento de pequeno raio iônico, é possível que sua incorporação não tenha afetado o tamanho de poros destas partículas. Observou-se também que as diferentes agitações proporcionaram diferentes valores de diâmetro de poros, pois houve diminuição de 84% no diâmetro dos poros dos vidros sintetizados através de agitação mecânica para os vidros sintetizados através de agitação ultrassônica. Isto provavelmente ocorreu devido a junção de poros menores formando, assim, poros maiores (BARRIONI et al., 2017).

Todos os materiais produzidos são mesoporosos, o que pode levar ao aumento da taxa de formação de hidroxiapatita em suas superfícies em meio fisiológico, porém a variação do tamanho de poros pode afetar esta taxa de formação, sendo assim, materiais com características texturais com menores variações em número são mais propícios para aplicações biológicas - tais quais os vidros sintetizados via agitação ultrassônica (BARRIONI et al., 2017).

A concentração de 4,6 mM de CTAB empregada neste trabalho foi a mesma utilizada em estudo realizado por Hu e colaboradores (2014). Assim, o tipo de isoterma obtido foi o mesmo em ambos estudos (tipo IV), enquanto o valor de área superficial foi maior para as amostras de VBM, VBU, VBFM e VBFU, quando comparado ao valor de 444 m²/g obtido nas partículas sintetizadas pelos pesquisadores. Já o diâmetro médio de poro obtido pelos autores foi de 5,696 nm, enquanto diâmetros menores foram obtidos para VBM, VBU, VBFM e VBFU (HU et al., 2014). A variação entre os valores da literatura e os valores das amostras aqui obtidos pode estar relacionada com os parâmetros de síntese e o tipo de agitação empregado, uma vez que no estudo de Hu e colaboradores (2014) a forma de mistura é identificada apenas como “sob agitação”, o que não deixa claro se se trata de agitação mecânica, magnética ou ultrassônica.

5.3 Análise do comportamento dos vidros expostos à SBF

A capacidade de ligação com o osso de um material é frequentemente avaliada examinando a capacidade de formação de apatitas na superfície deste material quando em contato com o fluido corporal simulado (SBF). O SBF é uma solução com

concentrações de íons quase iguais às do plasma sanguíneo humano (KOKUBO; TAKADAMA, 2006). Assim, as amostras de vidro bioativo foram imersas em SBF a 37 °C por diferentes períodos de tempo para avaliar o perfil de dissolução e formação de hidroxiapatita e/ ou fluorapatita. Para tal, os vidros após imersos durante os períodos de 12 h, 24 h, 5 d, 14 d e 28 d foram caracterizados via MEV, FTIR e DRX.

A modificação da superfície das amostras em função do tempo foi observada nas micrografias de MEV. A morfologia da camada de apatita nos vidros após imersão em SBF nos intervalos de 12 h, 24 h, 5 d, 14 d e 28 d é demonstrada na Figura 5.8. É possível observar que as superfícies das amostras a princípio (12 h e 24 h) encontram-se mais lisas e homogêneas, passando, em seguida, para uma superfície aplainada (5 d) que, de acordo com Caluwé et al. (2016), está relacionada à formação de fosfato na superfície do material (DE CALUWÉ et al., 2016). Por fim, em 14 d e 28 d, é possível a identificação de superfícies extremamente rugosas, que são referenciadas na literatura como indicio da formação de apatitas na superfície dos vidros bioativos (PAPPAS et al., 2008).

A presença de fluorapatita e de hidroxiapatita pode ser diferenciada em micrografias através de suas respectivas morfologias. A hidroxiapatita exibe uma estrutura esferoidal em cachos, comumente chama de estrutura “couve-flor”, enquanto a fluorapatita apresenta estrutura acicular, isto é, em formato de agulhas (SHAH, 2016). Neste trabalho não foi possível a visualização de estrutura acicular e, conseqüentemente, a identificação de fluorapatita através de micrografias de MEV. Na literatura, porém, estudo realizado por Shah e colaboradores (2014) mostrou que a partir de 7 dias de imersão em meio de cultura celular, o vidro bioativo 45S contendo íons fluoreto estimulou a precipitação de cristais de fluorapatita nestes meios, cristais estes que foram visualizados em micrografias de MEV (SHAH et al., 2014b).

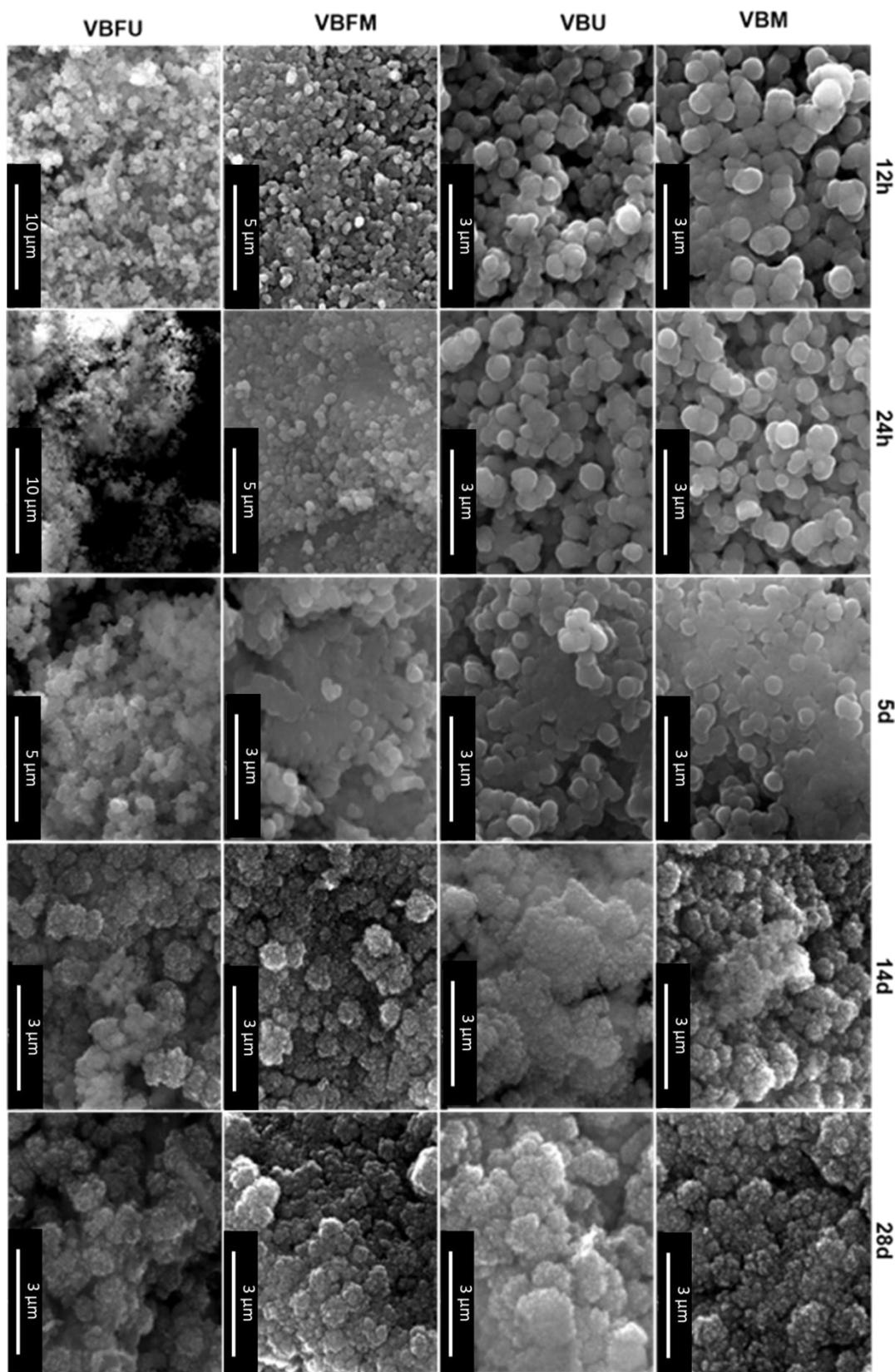


Figura 5. 8: Micrografias de MEV após 12 h, 24 h, 5 d, 14 d e 28 d de imersão das amostras de vidro em SBF a 37 °C.

A Figura 5.9 traz os espectros de EDS das respectivas regiões das micrografias de MEV apresentadas na Figura 5.8. Na Figura 5.9 é possível identificar que houve diminuição do pico de silício (Si) entre os tempos de imersão de 12 h e 28 d, bem como aumento dos picos de fósforo (P) e cálcio (Ca), o que indica que pode ter havido precipitação de fosfato de cálcio e, por conseguinte, formação de apatitas na superfície dos materiais (SHAH et al., 2015). Estas alterações mostram o mecanismo de nucleação de apatitas, onde há troca iônica entre a solução e a superfície do vidro levando à liberação de íons Ca_2^+ e PO_4^{2-} dos vidros para o meio, seguida pela liberação de sílica solúvel do vidro, a policondensação de grupos silanóis e formação de uma camada porosa rica em sílica, o aumento da concentração de Ca_2^+ e PO_4^{3-} na solução, a formação de um filme rico em fosfato de cálcio amorfo (ACP) e a formação de uma camada de hidroxiapatita pela incorporação de ânions OH^- e CO_3^{2-} da solução (GROH; DÖHLER; BRAUER, 2014). O elemento flúor (F) não foi identificado, provavelmente devido às limitações da técnica, portanto não podendo-se afirmar através do EDS se houve ou não formação de fluorapatita nos vidros contendo íons fluoreto em composição (VBFM e VBFU) após imersão em SBF.

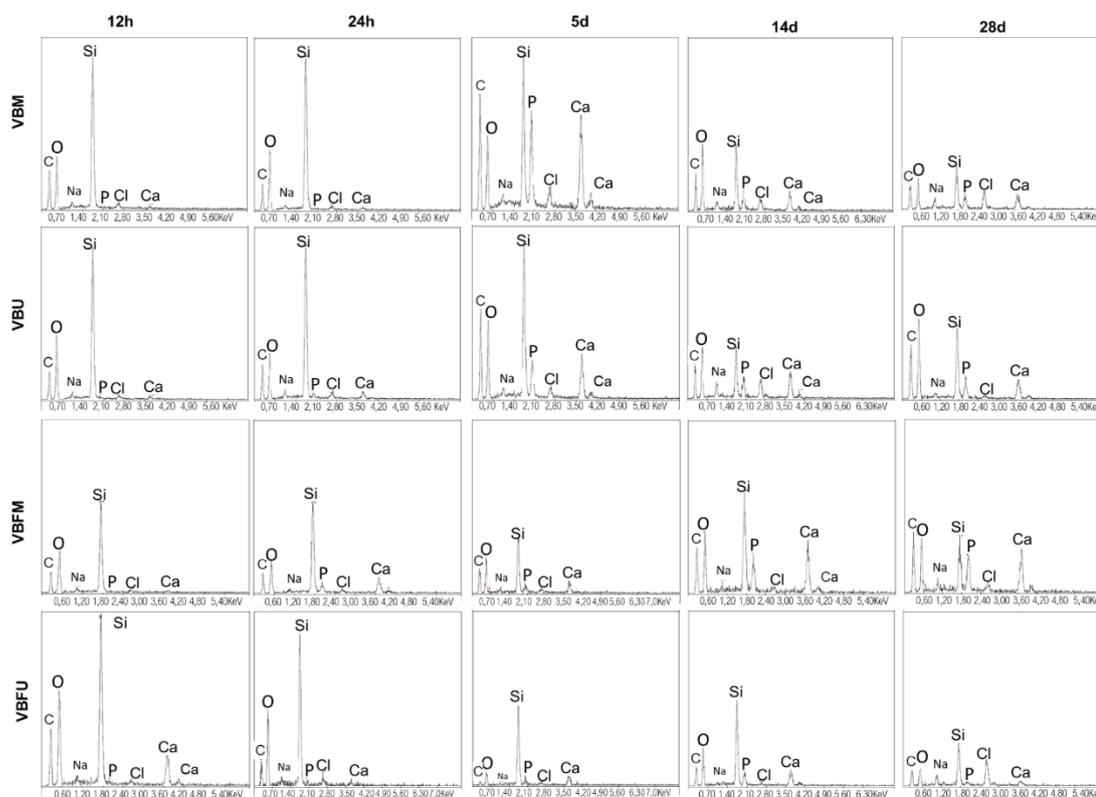


Figura 5. 9: Relação dos espectros de EDS das respectivas regiões dos vidros mostrados na Figura 5.10 após 12 h, 24 h, 5 d, 14 d e 28 d de imersão em SBF a 37 °C.

A estrutura dos vidros bioativos após imersão em SBF foi analisada por FTIR e está apresentada na Figura 5.10. De uma maneira geral, não foram identificadas diferenças significativas entre os espectros dos vidros após imersão, porém, para os vidros contendo íons fluoreto em sua composição, é possível observar que há uma significativa redução da intensidade das bandas centradas em 1100 cm^{-1} e 475 cm^{-1} . Dito isto, a banda de 1100 cm^{-1} é referenciada como a banda de estiramento de Si-O e também é associada ao estiramento assimétrico de P-O (1050 cm^{-1}), pois as bandas estariam se sobrepondo. Estas bandas também são utilizadas para diferenciar a hidroxiapatita carbonatada formada através do contato do material com a solução de SBF, daquelas bandas relacionadas ao próprio vidro (BARRIONI et al., 2017). A banda centrada em 960 cm^{-1} está relacionada ao estiramento simétrico de PO_4^{3-} , enquanto a banda de estiramento assimétrico de PO_4^{3-} está localizada em 475 cm^{-1} (BARRIONI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2013). A banda centrada em 800 cm^{-1} é relacionada a vibrações de Si-O-Si em vidros antes do contato com SBF (0h), porém após imersão em SBF esta mesma banda é associada a grupos Si-OH formados após troca iônica dos íons presentes na solução e dos íons modificadores do vidro, o que indicam a formação de uma camada de sílica gel na superfície dos vidros (GROH; DÖHLER; BRAUER, 2014; MOZAFARI et al., 2010).

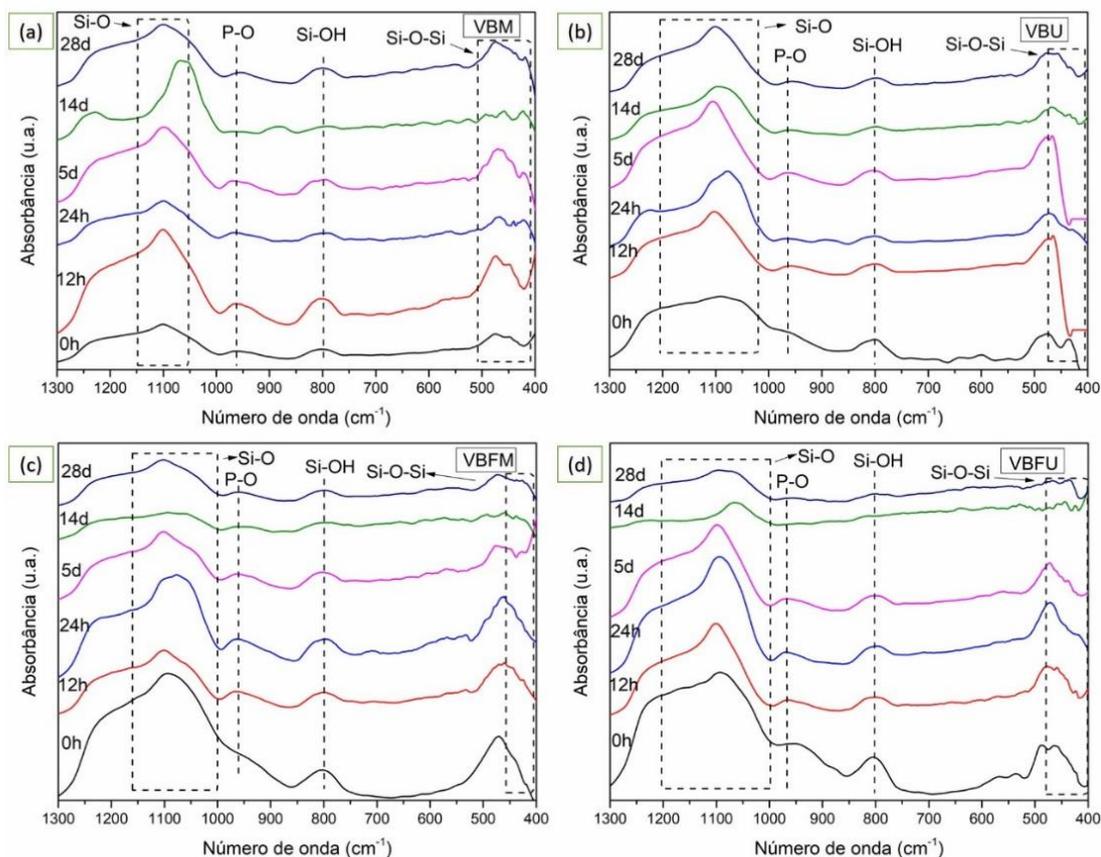


Figura 5. 10 : Espectros de FTIR obtidos após imersão das amostras em SBF por 12 h, 24 h, 5 d, 14 d e 28 d. (a) VBM; (b) VBU; (c) VBFM; (d)VBFU.

A Figura 5.11 mostra os padrões de DRX das amostras de vidro após imersão em SBF. As amostras de VBM e de VBU apresentaram condição amorfa até 5 dias de imersão. A partir do 14^o dia é possível identificar um pico de cristalinidade na amostra de VBM referente a cloreto de sódio, possivelmente houve precipitação deste sal a partir da solução de SBF. O padrão de DRX para ambas amostras, VBM e VBU, apresenta picos em 2θ em 31°, que está relacionado à formação de hidroxiapatita carbonatada (JCPDS 19-272), o que confirma a formação de HAC na superfície das amostras após imersão em SBF, assim como visualizado através das ligações químicas propostas de FTIR (SRIRANGANATHAN et al., 2017). Após os tempos de imersão de 12h, 24h, 5d e 14d as amostras de VBFM e VBFU apresentaram condição amorfa em 2θ entre 15° e 35° e picos de cristalinidade referentes a fluoreto de cálcio (JCPDS 35-816), possivelmente por causa da precipitação desse sal após a síntese dos vidros (BRAUER; MNEIMNE; HILL, 2011) . No tempo de imersão de 28 d ambas

amostras, VBFM e VBFU, apresentaram picos referentes à hidroxiapatita carbonatada e/ ou fluorapatita (JCPDS 31-267), entretanto a distinção das duas fases é dificultada pelo caráter isomórfico dos dois minerais, assim seus picos estariam sobrepondo-se (COCCHI et al., 2012; LINS et al., 2018). Ainda para a amostra de VBFU foi possível a identificação de fluorita (JCPDS 35-816), forma mineral do fluoreto de cálcio, que ocorre em vidros com alto teor de flúor e baixo teor de fosfato (SHAH, 2016).

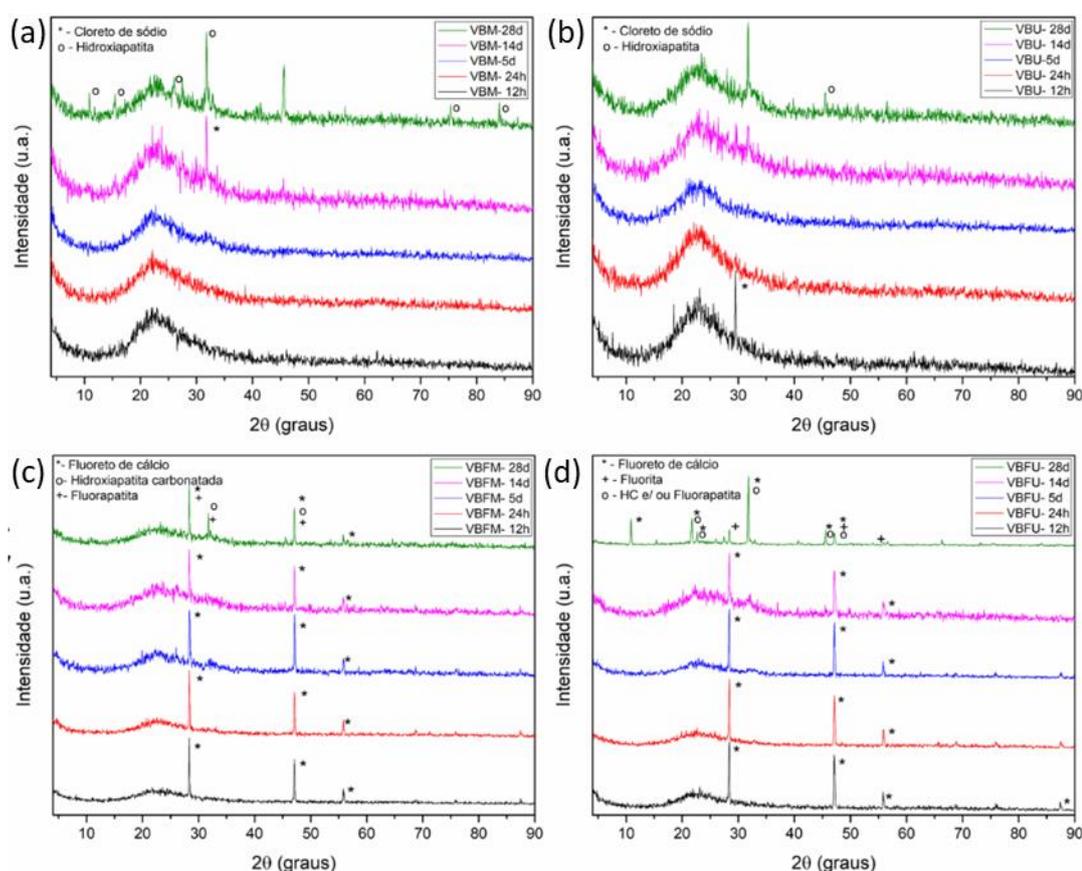


Figura 5. 11: Padrões de DRX de (a) VBM; (b) VBU; (c) VBFM; (d)VBFU imersos em SBF por 12h, 24h, 5d, 14d e 28d.

Para vidros com baixo teor de fosfato e concentrações mais altas de flúor na sua composição há uma tendência no aumento da formação de fluorita ao invés de fluorapatita, porque há uma relação desfavorável na proporção de Ca/P, uma vez que a baixa concentração de fosfato é um fator limitante para essa formação (MNEIMNE et al., 2011; SHAH, 2016). Assim, a presença de picos referentes a fluorita nos

padrões de DRX podem estar indicando que parte do fluoreto de cálcio não foi incorporado à estrutura dos vidros bioativos (VBFM e VBFU).

Estudo realizado por Lusvardi e colaboradores (2009) mostrou que vidros bioativos contendo íons fluoreto e sintetizados por rota de fusão iniciaram a formação de hidroxiapatita após 15 dias de imersão em SBF, informação que vai de acordo com os padrões de DRX obtidos. Porém, picos pronunciados de apatita só foram identificados após 30 dias de imersão na solução (LUSVARDI et al., 2009). Já o estudo de Brauer e colaboradores (2010), sobre imersão em SBF de vidros bioativos contendo íons fluoreto, mostrou através de análises de DRX que houve início de formação de apatitas após a primeira semana de imersão dos vidros em SBF, mas foi apenas após 14 dias que estes picos se tornaram mais intensos. No entanto, os padrões de DRX neste estudo mostraram picos com aspecto de bandas, o que indicaria que os cristais formados seriam pequenos e de caráter altamente desordenado. Este mesmo estudo mostrou ainda que para vidros com altas concentrações de íons fluoreto há precipitação de fluoreto de cálcio na superfície das partículas, mesmo após imersão em SBF. Isto aconteceria, também, pelo fluoreto de cálcio ser um composto de baixa solubilidade em água (BRAUER et al., 2010). Outros estudos de imersão de vidros bioativos contendo íons fluoreto, como os de Saha e colaboradores (2014) e Saha e colaboradores (2015), também mostraram através dos padrões de DRX a possível precipitação de CaF_2 nas partículas de vidro bioativo (SHAH et al., 2014b, 2015). Estes estudos sugerem que a liberação de flúor de vidros bioativos pode de fato resultar na formação de CaF_2 ao invés de fluorapatita ou hidroxiapatita na superfície dos materiais após imersão em SBF. Assim, os resultados obtidos neste trabalho estão em conformidade aos resultados encontrados na literatura, pois o início de formação de apatitas nos vidros contendo íons fluoreto é identificada através de análises de DRX na literatura a partir de 14 dias de imersão do material em meio fisiológico simulado. Porém, a consolidação da formação de apatitas na literatura é registrada por padrões de DRX após 28 dias de imersão, tal como visto neste trabalho.

5.4 Caracterização biológica *in vitro* dos materiais

5.4.1 Análise de viabilidade celular por MTT

O ensaio de MTT avalia a viabilidade celular 'in vitro' através da análise da atividade mitocondrial. Este ensaio consiste na capacidade de enzimas desidrogenases, localizadas nas mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazólio, de coloração amarela e solúvel em água, em formazan, um sal azul e insolúvel em água. Assim, a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis no meio (ORÉFICE, RODRIGO LAMBERT; PEREIRA, MARIVALDA DE MAGALHÃES; MANSUR, 2006) .

Observa-se na Figura 5.12 que os valores apresentados nos controles referência foram similares ao controle negativo e que o controle positivo sempre esteve abaixo de 70%. Além disso, o gráfico demonstra que todos os vidros bioativos sintetizados, tanto via agitação mecânica quanto via agitação ultrassônica, possuem viabilidade celular variando entre $83 \pm 14\%$ (VBFM) e $102 \pm 12\%$ (VBU). Todos os vidros estão em patamares acima de 70% caracterizando-os como materiais não-citotóxicos (BARRIONI et al., 2017), porém não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as amostras comparadas. Desta maneira, nem a metodologia de agitação, nem a adição de íons fluoreto ao vidro interferiu na atividade metabólica mitocondrial das células.

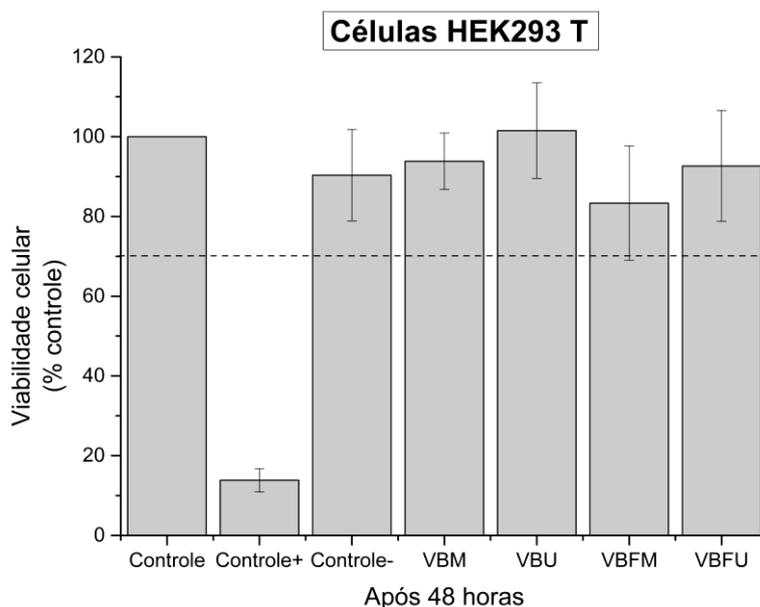


Figura 5.12: Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT após 48 horas de exposição de culturas de células HEK293 T as amostras de VBM, VBU, VBFM e VBFU. A análise estatística não mostrou diferenças significantes entre os grupos controle e as amostras.

5.4.2 Ensaio de Calceína

O ensaio de calceína foi empregado para análise da função citoplasmática e da integridade da membrana celular. Através do ensaio de calceína é possível observar a viabilidade celular por ocorrência de células vivas, coloridas de verde. No ensaio, a calceína é transportada através da membrana citoplasmática por difusão facilitada. Intracelularmente, ela é hidrolisada por esterases endógenas, produzindo um composto fluorescente. A viabilidade de células por este ensaio ocorre uma vez que este composto, após transportado através da membrana celular, liga-se ao cálcio presente nas células vivas e emite comprimento de onda de cor verde na fluorescência (GLAVINAS et al., 2011; MARTIN-PIEDRA et al., 2014).

Neste trabalho foi utilizado o ensaio calceína para validar qualitativamente os resultados do ensaio de MTT. Esse ensaio é baseado na determinação de células vivas através da fluorescência verde (λ_{ex} 495 nm, λ_{em} 515 nm). Na Figura 5.13 observa-se que as células HEK293 T em contato com as amostras VBM, VBU, VBFM e VBFU por 48 horas apresentaram fluorescências similares ao grupo controle, ou seja, alta fluorescência verde (células viáveis). Conclui-se a partir dos ensaios empregados que os materiais sintetizados são potencialmente utilizáveis como biomateriais, uma vez que não apresentaram citotoxicidade às células de rim embrionário humano (HEK 293 T).

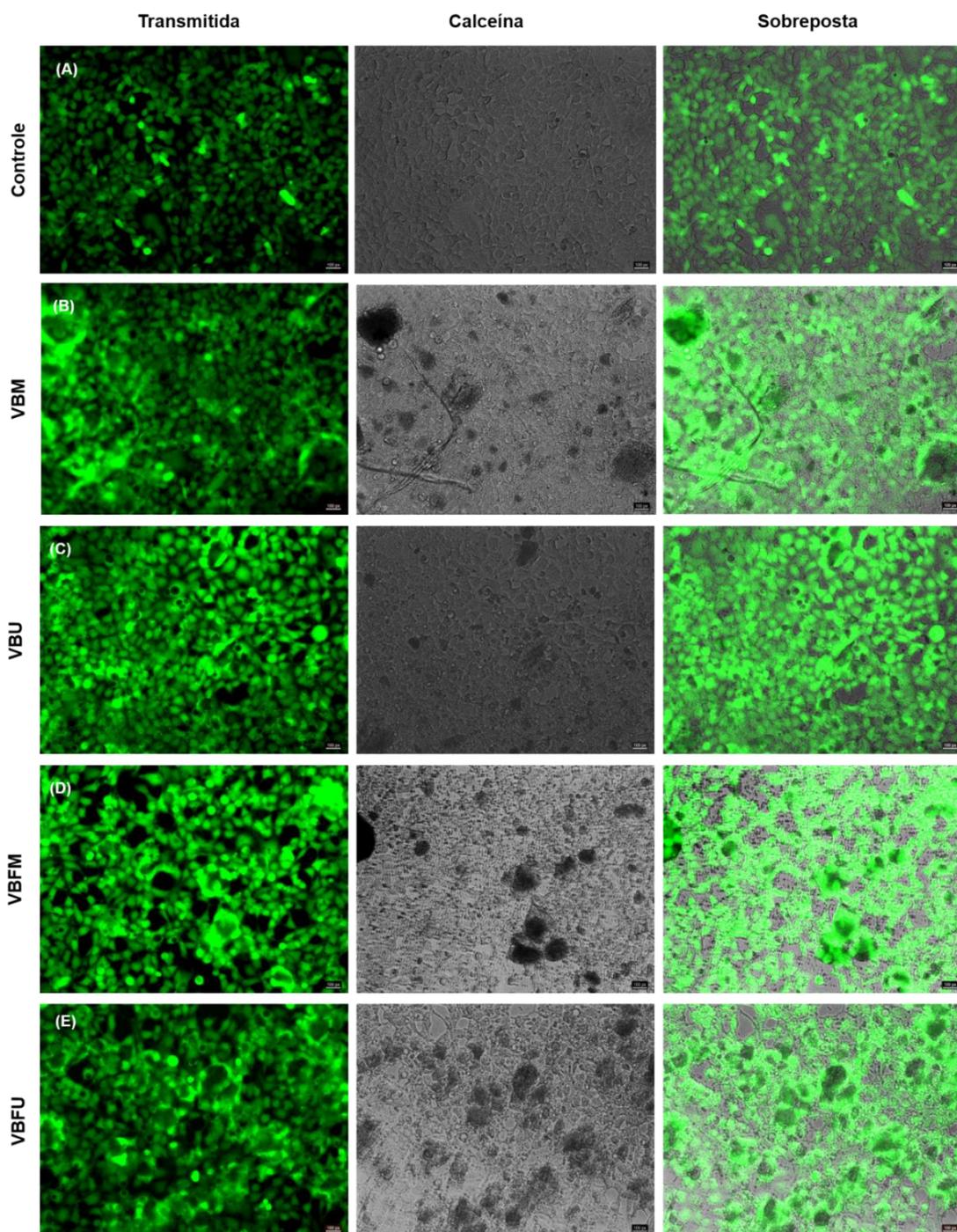


Figura 5.13: Imagens obtidas por Microscopia Óptica de Fluorescência do ensaio de calceína realizado utilizando células de rim humano (células HEK 293 T) expostas por 48h aos diferentes tipos de vidro bioativo produzidos e respectivo controle. (a) Controle (nenhum tratamento); (b) VBM; (c) VBU; (d) VBFM; (e) VBFU. (Escala = 100 µm).

Considerando todos os resultados apresentados, este estudo mostrou que quando alteradas as metodologias de síntese no processamento sol-gel, altera-se também o tamanho de partícula e as características texturais dos materiais. Os resultados mostraram que há influência das metodologias de agitação na síntese de partículas e, possivelmente, na incorporação de íons fluoreto ao vidro bioativo, mas não é possível afirmar qual o efeito do método de agitação na incorporação de íons, pois são dois eventos que ocorrem concomitantemente. Assim, são necessários mais estudos para esclarecer como os íons de flúor são organizados na estrutura dos vidros bioativos sintetizados. Contudo, os resultados de viabilidade celular indicam que não se tratam de materiais citotóxicos, portanto havendo possibilidade de utilização dos mesmos como biomateriais. Já os testes dos comportamentos dos vidros após imersão em fluido corporal simulado apontaram que, independentemente da metodologia de agitação empregada e da presença de íons fluoreto, os VB sintetizados possuem baixa bioatividade, uma vez que o tempo para visualização de apatitas foi considerado grande.

6. CONCLUSÕES

As análises de MEV e AFM mostraram que os quatro vidros (VBM, VBU, VBFM e VBFU) podem ser sintetizados com morfologia esférica.

A caracterização do tamanho e distribuição de partículas por DLS indica que as partículas são submicrométricas, da ordem de tamanho de 260 nm, e monodispersas.

A análise de FTIR confirma que se tratam de materiais com bandas características de vidros bioativos. A análise de DRX confirma a natureza amorfa dos vidros.

A análise de DRX mostrou que há CaF_2 precipitado na superfície dos vidros, indicando que parte dos íons fluoreto pode não ter sido incorporada aos vidros bioativos.

Nenhuma das composições químicas sintetizadas ou forma de agitação causou citotoxicidade nas células embrionárias de rins humanos (HEK 293 T), o que as possibilitariam a serem usadas como biomateriais.

Os ensaios de imersão em SBF mostraram que para todas as amostras há início de formação de hidroxiapatita e/ ou fluorapatita na superfície dos vidros bioativos a partir de 14 dias de imersão e concretização no tempo de 28 dias, o que os caracteriza como vidros de baixa bioatividade.

Não foram observadas diferenças significativas nos resultados das técnicas de caracterização dos materiais sintetizados pelas duas diferentes formas de agitação utilizadas.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudo da influência da variação dos parâmetros das agitações, como rotações por minuto, ciclo e amplitude nas propriedades físico-químicas dos vidros bioativos.

Caracterizar estruturalmente os vidros bioativos por XPS e RMN (Ressonância Magnética Nuclear) para melhor compreensão do papel do flúor na rede do material.

Realizar ensaio para análise de liberação de flúor em meio fisiológico simulado.

Realizar síntese de vidros contendo íons fluoreto substituindo todo o nitrato de cálcio por fluoreto de cálcio.

Estudo da incorporação do fluoreto de cálcio em diferentes temperaturas de tratamento térmico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, Z. et al. Bioactive Glasses in Dentistry: A Review. **Journal of Glasses in Dentistry: A Review**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2015.
- AJITA, J.; SARAVANAN, S.; SELVAMURUGAN, N. Effect of size of bioactive glass nanoparticles on mesenchymal stem cell proliferation for dental and orthopedic applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 53, p. 142–149, 2015.
- ALCAIDE, M. et al. Interaction of an ordered mesoporous bioactive glass with osteoblasts, fibroblasts and lymphocytes, demonstrating its biocompatibility as a potential bone graft material. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 892–899, 2010.
- ALOTHMAN, Z. A. A review: Fundamental aspects of silicate mesoporous materials. **Materials**, v. 5, n. 12, p. 2874–2902, 2012.
- BAINO, F.; HAMZEHLU, S.; KARGOZAR, S. Bioactive glasses: Where are we and where are we going? **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, 2018.
- BARRIONI, B. R. et al. Sol–gel-derived manganese-releasing bioactive glass as a therapeutic approach for bone tissue engineering. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 15, p. 8904–8927, 2017.
- BRAUER, D. 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, p. 3275–3282, 2010.
- BRAUER, D. S. Bioactive glasses - Structure and properties. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 14, p. 4160–4181, 2015.
- BRAUER, D. S.; MNEIMNE, M.; HILL, R. G. Fluoride-containing bioactive glasses: Fluoride loss during melting and ion release in tris buffer solution. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 357, n. 18, p. 3328–3333, 2011.
- CAI, Y. et al. Ultrasonic controlled morphology transformation of hollow calcium phosphate nanospheres: A smart and biocompatible drug release system. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 13, p. 3081–3083, 2007.
- CHRISTIE, J. K.; DE LEEUW, N. H. Effect of strontium inclusion on the bioactivity of phosphate-based glasses. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 15, p. 9014–9022, 2017.
- COCCHI, M. et al. Evaluation of the behaviour of fluorine-containing bioactive glasses:

Reactivity in a simulated body fluid solution assisted by multivariate data analysis. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, n. 3, p. 639–648, 2012.

CÔTÉ, A. S.; CORMACK, A. N.; TILOCCA, A. Reactive molecular dynamics: an effective tool for modelling the sol–gel synthesis of bioglasses. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 15, p. 9006–9013, 2017.

CROVACE, M. C. et al. Biosilicate® - A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. in vitro, in vivo and clinical trials. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 432, p. 90–110, 2016.

DAR, S. A.; KHAN, K. F.; BIRCH, W. D. **Sedimentary: Phosphates**☆. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

DAVIS, H. B. et al. Ion release from, and fluoride recharge of a composite with a fluoride-containing bioactive glass. **Dental Materials**, v. 30, n. 10, p. 1187–1194, 2014.

DE CALUWÉ, T. et al. Bioactivity and biocompatibility of two fluoride containing bioactive glasses for dental applications. **Dental Materials**, v. 32, n. 11, p. 1414–1428, 2016.

ELGAYAR, I. et al. Structural analysis of bioactive glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 351, n. 2, p. 173–183, 2005.

GEDANKEN, A. Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 2, p. 47–55, 2004.

GLAVINAS, H. et al. Calcein assay: A high-throughput method to assess P-gp inhibition. **Xenobiotica**, v. 41, n. 8, p. 712–719, 2011.

GREEN, D. L. et al. Size, volume fraction, and nucleation of Stober silica nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2003.

GREENSPAN, D. C. Glass and Medicine: The Larry Hench Story. **International Journal of Applied Glass Science**, v. 7, n. 2, p. 134–138, 2016.

GROH, D.; DÖHLER, F.; BRAUER, D. S. Bioactive glasses with improved processing. Part 1. Thermal properties, ion release and apatite formation. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 10, p. 4465–4473, 2014.

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

HENCH, L. L. Opening paper 2015- some comments on bioglass: Four eras of

discovery and development. **Biomedical Glasses**, v. 1, n. 1, p. 1–11, 2015.

HENCH, L. L.; WEST, J. K. The sol-gel process. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 1, p. 33–72, 1990.

HOPPE, A.; GÜLDAL, N. S.; BOCCACCINI, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2757–2774, 2011.

HOUREH, A. B. et al. Influence of calcium and phosphorus release from bioactive glasses on viability and differentiation of dental pulp stem cells. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 15, p. 8928–8941, 2017.

HU, Q. et al. Facile synthesis of hollow mesoporous bioactive glass sub-micron spheres with a tunable cavity size. **Materials Letters**, v. 134, p. 130–133, 2014.

JAFARZADEH, M.; RAHMAN, I. A.; SIPAUT, C. S. Synthesis of silica nanoparticles by modified sol-gel process: The effect of mixing modes of the reactants and drying techniques. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 328–336, 2009.

JONES, J. R. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. **Acta Biomaterialia**, v. 23, n. S, p. S53–S82, 2015.

JONES, J. R.; SEPULVEDA, P.; HENCH, L. L. Dose-dependent behavior of bioactive glass dissolution. **Journal of Biomedical Materials Research**, 2001.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907–2915, 2006.

LEE, J. H. et al. Effect of aminated mesoporous bioactive glass nanoparticles on the differentiation of dental pulp stem cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–23, 2016.

LEPRY, W. C.; NASERI, S.; NAZHAT, S. N. Effect of processing parameters on textural and bioactive properties of sol-gel-derived borate glasses. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 15, p. 8973–8985, 2017.

LEVY, S. et al. Cell/surface interactions and adhesion on bioactive glass 45S5. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 1, p. 89–102, 2007.

LI, H. C. et al. Crystallization, mechanical properties and in vitro bioactivity of sol-gel derived Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅ glass-ceramics by partial substitution of CaF₂ for CaO. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 67, n. 1, p. 56–65, 2013.

- LINS, C. E. C. et al. Application of Fluorine Containing Bioactive Glass Nanoparticles in Dentin Hypersensitivity Treatment. **Key Engineering Materials**, v. 696, n. 1, p. 103–107, 2016.
- LINS, C. E. C. et al. Structural analysis of fluorine-containing bioactive glass nanoparticles synthesized by sol–gel route assisted by ultrasound energy. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 106, n. 1, p. 360–366, 2018.
- LU, X. et al. Effects of boron oxide substitution on the structure and bioactivity of SrO-containing bioactive glasses. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 15, p. 8793–8811, 2017.
- LUKOWIAK, A. et al. Bioactive glass nanoparticles obtained through sol-gel chemistry. **Chemical Communications**, v. 49, n. 59, p. 6620–6622, 2013.
- LUSVARDI, G. et al. Fluoride-containing bioactive glasses: Surface reactivity in simulated body fluids solutions. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 9, p. 3548–3562, 2009.
- M, K.; S, A.; A, D. Influence of Incorporating Fluoroapatite Nanobioceramic on the Compressive Strength and Bioactivity of Glass Ionomer Cement. **Journal of dental biomaterials**, v. 3, n. 3, p. 276–283, 2016.
- MAÇON, A. L. B. et al. Synthesis and dissolution behaviour of CaO/SrO-containing sol–gel-derived 58S glasses. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 15, p. 8858–8870, 2017.
- MARTIN-PIEDRA, M. A. et al. Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. **Cytotherapy**, v. 16, n. 2, p. 266–277, 2014.
- MARTINS, T. et al. Novel 3D composites with highly flexible behavior based on chitosan and bioactive glass for biomedical applications. **Materials Chemistry and Physics**, v. 189, p. 1–11, 2017.
- MELCHERS, S. et al. Effect of Aluminum Ion Incorporation on the Bioactivity and Structure in Mesoporous Bioactive Glasses. **Chemistry of Materials**, v. 28, n. 10, p. 3254–3264, 2016.
- MEROUANI, S. et al. A method for predicting the number of active bubbles in sonochemical reactors. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 51–58, 2015.
- MNEIMNE, M. et al. High phosphate content significantly increases apatite formation of fluoride-containing bioactive glasses. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1827–1834,

2011.

MOREIRA, C. D. F. et al. Nanostructured chitosan/gelatin/bioactive glass in situ forming hydrogel composites as a potential injectable matrix for bone tissue engineering. **Materials Chemistry and Physics**, v. 218, n. July, p. 304–316, 2018.

MOZAFARI, M. et al. Development of macroporous nanocomposite scaffolds of gelatin/bioactive glass prepared through layer solvent casting combined with lamination technique for bone tissue engineering. **Ceramics International**, v. 36, n. 8, p. 2431–2439, 2010.

NADERI, H.; MATIN, M. M.; BAHRAMI, A. R. Review paper: Critical issues in tissue engineering: Biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 26, n. 4, p. 383–417, 2011.

NIE, S. et al. Thermoreversible pluronic® F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: In vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, n. 1, p. 151–166, 2011.

OLIVEIRA, A. A. R. DE et al. Synthesis, characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard tissue engineering applications. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 8, n. 2, 2013.

OLIVEIRA, A. A. R. DE et al. Synthesis and characterization of bioactive glass particles using an ultrasound-assisted sol-gel process: Engineering the morphology and size of sonogels via a poly(ethylene glycol) dispersing agent. **Materials Letters**, v. 133, p. 44–48, 2014.

ORÉFICE, RODRIGO LAMBERT; PEREIRA, MARIVALDA DE MAGALHÃES; MANSUR, H. S. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

OWENS, G. et al. Sol-gel Based Materials for Biomedical Applications. **Progress in Materials Science**, v. 77, p. 1–79, 2016.

PAPPAS, G. S. et al. Synthesis and characterization of new SiO₂-CaO hollow nanospheres by sol-gel method: Bioactivity of the new system. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 354, n. 2–9, p. 755–760, 2008.

PEREIRA, M. M.; CLARK, A. E.; HENCH, L. L. Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 28, n. 6, p. 693–698, 1994.

PEREIRA, M. M.; HENCH, L. L. Mechanisms of hydroxyapatite formation on porous gel-silica substrates. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 7, n. 1–2, p. 59–68, 1996.

POKHREL, N.; VABBINA, P. K.; PALA, N. Sonochemistry: Science and Engineering. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 104–128, 2016.

POURSHAHRESTANI, S. et al. Gallium-containing mesoporous bioactive glass with potent hemostatic activity and antibacterial efficacy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 1, p. 71–86, 2016.

PRASAD, K. et al. Metallic biomaterials: Current challenges and opportunities. **Materials**, v. 10, n. 8, 2017.

RABIEE, S. M. et al. Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review. **Ceramics International**, v. 41, n. 6, p. 7241–7251, 2015.

RAHAMAN, M. N. et al. Bioactive glass in bone tissue engineering. **Ceramic Transactions**, v. 237, n. 6, p. 73–82, 2012.

RAHMAN, I. A. et al. An optimized sol-gel synthesis of stable primary equivalent silica particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 294, n. 1–3, p. 102–110, 2007.

RAHMAN, I. A.; PADAVETTAN, V. Synthesis of Silica nanoparticles by Sol-Gel: Size-dependent properties, surface modification, and applications in silica-polymer nanocomposites- A review. **Journal of Nanomaterials**, 2012.

SHAH, F. A. et al. Fluoride-containing bioactive glasses and Bioglass®45S5 form apatite in low pH cell culture medium. **Materials Letters**, v. 119, p. 96–99, 2014a.

SHAH, F. A. et al. Influence of cell culture medium composition on in vitro dissolution behavior of a fluoride-containing bioactive glass. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 102, n. 3, p. 647–654, 2014b.

SHAH, F. A. et al. Apatite formation of bioactive glasses is enhanced by low additions of fluoride but delayed in the presence of serum proteins. **Materials Letters**, v. 153, p. 143–147, 2015.

SHAH, F. A. Fluoride-containing bioactive glasses: Glass design, structure, bioactivity, cellular interactions, and recent developments. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 1279–1289, 2016.

SHENG, X. Y. et al. Mineral formation on dentin induced by nano-bioactive glass. **Chinese Chemical Letters**, v. 27, n. 9, p. 1509–1514, 2016.

SIMON, S. et al. MAS-NMR support for Hench model in the case of bioactive glass microspheres. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 15, p. 8998–9005, 2017.

SRIRANGANATHAN, D. et al. The effect of the incorporation of fluoride into strontium containing bioactive glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 457, p. 25–30, 2017.

STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. **Journal of Colloid And Interface Science**, 1968.

SUSLICK, K. S. Sonochemistry. n. March, 1990.

UTECH, S.; BOCCACCINI, A. R. **A review of hydrogel-based composites for biomedical applications: enhancement of hydrogel properties by addition of rigid inorganic fillers**. [s.l.] Springer US, 2016. v. 51

WU, C.; CHANG, J.; XIAO, Y. Mesoporous bioactive glasses as drug delivery and bone tissue regeneration platforms. **Therapeutic Delivery**, v. 2, n. 9, p. 1189–1198, 2011.

YAN, X. et al. Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 43, n. 44, p. 5980–5984, 2004.

YU, B. et al. Effect of calcium source on structure and properties of sol-gel derived bioactive glasses. **Langmuir**, v. 28, n. 50, p. 17465–17476, 2012.

YU, J. et al. A novel application of nanohydroxyapatite/mesoporous silica biocomposite on treating dentin hypersensitivity: An in vitro study. **Journal of Dentistry**, v. 50, p. 21–29, 2016.

ZHENG, K. et al. Timing of calcium nitrate addition affects morphology, dispersity and composition of bioactive glass nanoparticles. **RSC Advances**, v. 6, n. 97, p. 95101–95111, 2016.

ZHENG, K.; BOCCACCINI, A. R. Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 363–373, 2017.