AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Síntese e caracterização de pós vitrocerâmicos no sistema CaO-MgO-SiO₂ utilizando sol-gel combinado a coprecipitação

DANIEL DE REZENDE LEME

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

**Orientadora:
Profa. Dra. Chieko Yamagata**

**São Paulo
2019**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Síntese e caracterização de pós vitrocerâmicos no sistema CaO-MgO-SiO₂ utilizando sol-gel combinado a coprecipitação

DANIEL DE REZENDE LEME

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora:
Profa. Dra. Chieko Yamagata

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2019

Auxílio CNPq: Processo nº 134599/2017-9.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
Para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Como citar:

LEME, Daniel R. **Síntese e caracterização de pós vitrocerâmicos no sistema CaO-MgO-SiO₂ utilizando sol-gel combinado a coprecipitação**. 2019. 100 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo. Disponível em <<http://www.teses.usp.br>>. (Acesso em: dd/mm/aaaa).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Daniel de Rezende Leme

Título: Síntese e caracterização de pós vitrocerâmicos no sistema CaO-MgO-SiO₂ utilizando sol-gel combinado a coprecipitação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof^a. Dr^a.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof^a. Dr^a.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A minha família e amigos pelo apoio,
paciência, palavras de incentivos e por
me ouvirem quando precisei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Dr^a. Chieko Yamagata pela orientação, paciência, dedicação, apoio, confiança e ensinamentos durante o trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, por ter viabilizado a realização deste trabalho, através do Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais – CCTM.

Aos técnicos dos laboratórios de caracterização do CCTM e demais centros do IPEN, pelo auxílio prestado na realização das caracterizações necessárias e explicações fornecidas.

Ao órgão de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (processo 134599/2017-9), pelo auxílio financeiro fornecido ao longo deste projeto.

À Dr^a. Andrea Cecília Dorion Rodas, professora da Universidade Federal do ABC, pela realização dos testes de citotoxicidade *in vitro*, pelas explicações fornecidas, sugestões e conversas que tivemos.

A todos os amigos que fiz dentro do IPEN, durante este projeto, pelas conversas e risadas trocadas, cafés bebidos, lanches da tarde realizados, troca de conhecimento, apoio e ajuda quando precisei.

A minha amada família por todo o apoio, conversas e força que me deram para realizar este projeto e sempre me darão ao longo de minha vida.

A Alexandra Elbakyan por toda a ajuda que me forneceu durante o mestrado.

E por fim eu também agradeço a todas as pessoas que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

LEME, Daniel R. **Síntese e caracterização de pós vitrocerâmicos no sistema CaO-MgO-SiO₂ utilizando sol-gel combinado a coprecipitação**. 2019. 100 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Materiais biocerâmicos são constituídos por elementos encontrados normalmente no organismo e por esse motivo são empregados na área médica, principalmente para a fabricação de implantes dentários e aplicação ortopédica. A partir do tipo de ligação realizada com o organismo, o biocerâmico é classificado em inerte, reabsorvível e bioativo, sendo esse último dividido em vidro bioativo, hidroxiapatita e vitrocerâmico. O material vitrocerâmico exibe propriedades únicas devido a sua microestrutura específica, variedade de composições e propriedades mecânicas adequadas. Entre as possíveis composições, o sistema CaO-MgO-SiO₂ exibe bioatividade devido a concentração de cálcio e silício que podem estimular os genes responsáveis pela proliferação de osteoblastos. A presença de magnésio eleva as propriedades mecânicas e a osteointegração devido a interações na superfície da cerâmica com os osteoblastos, possibilitando a formação de hidroxiapatita (HA) e consequentemente ligações diretas com o tecido vivo. Para este trabalho foram realizadas sínteses empregando sol-gel combinado com coprecipitação e sol-gel convencional, para comparação dos produtos obtidos. Os pós cerâmicos sintetizados foram caracterizados por DRX, MEV, BET e as cerâmicas foram testadas para determinação de bioatividade e citotoxicidade *in vitro*. A formação de HA na superfície das cerâmicas confirmou a bioatividade e observou-se que as amostras não são citotóxicas. Portanto, pôde-se concluir que a partir das metodologias aplicadas foi possível sintetizar pós cerâmicos que exibiram propriedades semelhantes, com potencial aplicação na área médica.

Palavra chave: CaO-MgO-SiO₂, síntese, sol-gel, coprecipitação, biocerâmica, pós vitrocerâmicos

ABSTRACT

LEME, Daniel R. **Synthesis and characterization of glass-ceramic powders in the system CaO-MgO-SiO₂ using sol-gel combined with coprecipitation.** 2019. 100 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Bioceramic materials are constituted by elements normally found in the body and are therefore used in the medical field, mainly for the manufacture of dental implants and orthopedic application. From the type of binding performed with the organism, the bioceramic is classified as inert, resorbable and bioactive, the latter being divided into bioactive glass, hydroxyapatite and glass-ceramic. The glass-ceramic material exhibits unique properties due to its specific microstructure, variety of compositions and suitable mechanical properties. Among the possible compositions, the CaO-MgO-SiO₂ system exhibits bioactivity due to the concentration of calcium and silicon that can stimulate the genes responsible for the proliferation of osteoblasts. The presence of magnesium increases the mechanical properties and the osseointegration due to interactions on the surface of the ceramic with the osteoblasts, allowing the formation of hydroxyapatite (HA) and consequently direct connections with the living tissue. In this work, syntheses were performed using sol-gel combined with coprecipitation and conventional sol-gel methods for comparison of the obtained products. The synthesized ceramic powders were characterized by XRD, SEM and BET, and the ceramics were submitted for tests of *in vitro* bioactivity and cytotoxicity. The formation of HA on the surface of the ceramics confirmed the bioactivity and no cytotoxicity was observed in the samples. Therefore, it was possible to conclude that using proposed methodologies it was possible to synthesize ceramic powders that exhibited similar properties, with potential application in the medical area.

Keywords: CaO-MgO-SiO₂, synthesis, sol-gel, coprecipitation, bioceramics, glass-ceramic powders

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Fórmulas químicas e sistemas cristalinos para cada fase do sistema CaO-MgO-SiO ₂	34
Tabela 2 – Valores de tenacidade à fratura, resistência à flexão e módulo de Young referentes a cada fase cristalina	35
Tabela 3 – Valores de referência para a composição em massa do pó cerâmico precursor	40
Tabela 4 – Reagentes para preparação de SBF por meio do protocolo de Kokubo e Takadama	48
Tabela 5 – Relação entre as amostras, fases majoritárias e fórmulas químicas verificadas no DRX dos pós cerâmicos precursores	58
Tabela 6 – FRX dos teores de CaO, MgO e SiO ₂ , dos pós cerâmicos precursores, após calcinação a 900 °C por 1 h	59
Tabela 7 – Área superficial específica dos pós cerâmicos precursores	66
Tabela 8 – Relação entre as amostras, fases majoritárias e fórmulas químicas verificadas no DRX dos corpos cerâmicos conformados	72
Tabela 9 – Valores referentes as bandas de absorção na superfície das cerâmicas após imersão em SBF por 21 dias	77

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Biocerâmicos podem ser utilizados na reparação e/ou substituição de tecidos duros danificados no organismo. (A) haste de quadril e implante dentário revestidos com HA; (B) cabeça de fêmur em alumina; (C) coroa dentária de ZrO_2 ; (D) suporte cerâmico de HA/TCP reabsorvível; (E) implante cerâmico para joelho; (F) grânulos de HA para preenchimento ósseo; (G) cume alveolar cerâmico.....	23
Figura 2 – Etapas dependentes da temperatura: nucleação e crescimento de cristais. (a) Dependência da temperatura para as taxas de nucleação e crescimento com sobreposição desprezível; (b) tratamento térmico por meio de duas etapas.....	27
Figura 3 – Esquema de biocompatibilidade do material: interação entre o sistema biológico, a função e as propriedades da cerâmica	28
Figura 4 – Interação entre material e solução de SBF, produzindo em sua superfície uma camada de hidroxiapatita cristalizada.....	31
Figura 5 – Representação esquemática em 2D da rede tridimensional do sistema $CaO-MgO-SiO_2$	33
Figura 6 – Gráfico esquemático exibindo as três etapas envolvidas na síntese por reação em estado sólido	36
Figura 7 – Equações (1) e (2) exibem o mecanismo de reação da hidrólise e policondensação, respectivamente	38
Figura 8 – Fluxograma do processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando Na_2SiO_3 e pH ácido	42
Figura 9 – Fluxograma do processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando Na_2SiO_3 e pH básico	43
Figura 10 – Fluxograma do processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando TEOS e pH ácido.....	44
Figura 11 – Fluxograma do método sol-gel utilizando TEOS e pH ácido. Aquecimento em chapa seguido de calcinação (SAT-2B) e adição de NaOH para coprecipitação de hidróxidos (SAT-2A).....	45
Figura 12 – Corpo cerâmico cilíndrico de 0,25 g obtido em uma matriz de 15 mm de diâmetro	46
Figura 13 – ATD dos pós cerâmicos precursores: SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B	51

Figura 14 – Espectro de DRX do pó precursor SA-SiNa, tratado termicamente a 900 ° C por 1 h.....	53
Figura 15 – Espectro de DRX do pó precursor SB-SiNa, tratado termicamente a 900 ° C por 1 h.....	54
Figura 16 – Espectro de DRX do pó precursor SAT-1, tratado termicamente a 900 ° C por 1 h.....	55
Figura 17 – Espectro de DRX do pó precursor SAT-2A, tratado termicamente a 900 ° C por 1 h.....	56
Figura 18 – Espectro de DRX do pó precursor SAT-2B, tratado termicamente a 900 ° C por 1 h.....	57
Figura 19 – Micrografias obtidas por MEV dos pós cerâmicos precursores SA-SiNa (a) e SB-SiNa (b).....	62
Figura 20 – Micrografias obtidas por MEV dos pós cerâmicos precursores SAT-1 (a) e SAT-2A (b).....	63
Figura 21 – Micrografia obtidas por MEV do pó cerâmico precursor SAT-2B (a) .	64
Figura 22 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos aglomerados dos pós cerâmicos precursores de SA-SiNa (a), SB-SiNa (b), SAT-1 (c), SAT-2A (d) e SAT-2B (e).....	65
Figura 23 – Espectro de DRX do corpo cerâmico SA-SiNa, sinterizado a 1200 ° C por 2 h e do pó cerâmico precursor calcinado a 900 °C por 1 h	67
Figura 24 – Espectro de DRX do corpo cerâmico SB-SiNa, sinterizado a 1200 ° C por 2 h e do pó cerâmico precursor calcinado a 900 °C por 1 h	68
Figura 25 – Espectro de DRX do corpo cerâmico SAT-1, sinterizado a 1200 ° C por 2 h e do pó cerâmico precursor calcinado a 900 °C por 1 h	69
Figura 26 – Espectro de DRX do corpo cerâmico SAT-2A, sinterizado a 1200 ° C por 2 h e do pó cerâmico precursor calcinado a 900 °C por 1 h	70
Figura 27 – Espectro de DRX do corpo cerâmico SAT-2B, sinterizado a 1200 ° C por 2 h e do pó cerâmico precursor calcinado a 900 °C por 1 h	71
Figura 28 – Espectro de FT-IR do corpo cerâmico SA-SiNa (a) e SB-SiNa (b), após imersão em SBF por 3, 7, 14 e 21 dias	75
Figura 29 – Espectro de FT-IR do corpo cerâmico SAT-1 (a) e SAT-2A (b), após imersão em SBF por 3, 7, 14 e 21 dias.....	76
Figura 30 – Espectro de FT-IR do corpo cerâmico SAT-2B (a), após imersão em SBF por 3, 7, 14 e 21 dias.....	77

Figura 31 – Micrografias do corpo cerâmico conformado de SAT-2A antes (a) e depois de ser imersa em SBF por 3 (b), 7 (c), 14 (d) e 21 (e) dias. Em (f) visualiza-se SAT-2A após imersão em 21 dias com ampliação de 400 vezes.....	82
Figura 32 – Micrografias das amostras SA-SiNa (a), SB-SiNa (b), SAT-1 (c) e SAT-2B (d) imersas em SBF durante 21 dias indica formação da camada globular típica de HA.....	83
Figura 33 – Gráfico exibindo o resultado do teste de citotoxicidade indireta do ensaio de viabilidade celular	84

LISTA DE ABREVIATURAS

Nomenclatura	Sigla
<i>International Organization for Standardization</i>	ISO
Hidroxiapatita	HA
<i>Simulated Body Fluid</i>	SBF
Dispositivo Médico Implantável	DMI
Platina–Ródio	Pt–Rh
Ortosilicato de Tetraetila	TEOS
Ácido Clorídrico	HCl
Ácido Nítrico	HNO ₃
Hidróxido de Sódio	NaOH
Dióxido de Silício	SiO ₂
Óxido de Cálcio	CaO
Óxido de Magnésio	MgO
Síntese Ácida – Silicato de Sódio	SA-SiNa
Síntese Básica – Silicato de Sódio	SB-SiNa
Síntese Ácida TEOS – 1	SAT–1
Síntese Ácida TEOS – 2A	SAT–2A
Síntese Ácida TEOS – 2B	SAT–2B
Difração de raios X	DRX
Fluorescência de raios X	FRX
Análise Térmica Diferencial	ATD
Microscopia Eletrônica de Varredura com canhão de emissão de campo	MEV-FEG
Brunauer–Emmett–Teller	BET
Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier	FT–IR
<i>International Center for Diffraction Data</i>	ICDD
<i>Powder Diffraction File</i>	PDF

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 Biomateriais	21
3.2 Biocerâmica: Características e propriedades	22
3.2.1 Vidros e Vitrocerâmicos	25
3.3 Biocompatibilidade da cerâmica	28
3.4 Bioatividade da cerâmica	30
3.5 Sistema CaO-MgO-SiO₂	32
3.6 Processos de síntese de biocerâmicos à base de silicatos	35
3.6.1 Método por reação em estado sólido	36
3.6.2 Método hidrotérmico	37
3.6.3 Método sol-gel	37
3.6.4 Método por coprecipitação	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Materiais	40
4.2 Métodos	40
4.2.1 Preparação dos materiais iniciais	40
4.2.2 Síntese dos pós cerâmicos precursores do sistema CaO-MgO-SiO ₂	41
4.2.2.1 Síntese 1: Processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando Na ₂ SiO ₃ , como precursor de Si, e pH ácido	41
4.2.2.2 Síntese 2: Processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando Na ₂ SiO ₃ , como precursor de Si, e pH básico	42
4.2.2.3 Síntese 3: Processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando TEOS, como precursor de Si, e pH ácido	43
4.2.2.4 Síntese 4: Processo de síntese por método sol-gel utilizando TEOS, como precursor de Si, e pH ácido	44
4.3 Sinterização do pó cerâmico precursor	45
4.4 Técnicas de caracterização empregadas	46
4.4.1 Difração de raios X	46
4.4.2 Fluorescência de raios X	46

4.4.3 Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo	46
4.4.4 Análise térmica diferencial.....	47
4.4.5 Área superficial específica.....	47
4.4.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	47
4.5 Teste de bioatividade <i>in vitro</i>.....	48
4.6 Teste de citotoxicidade <i>in vitro</i>	49
4.6.1 Manutenção das células	49
4.6.2 Preparação do extrato	49
4.6.3 Teste de citotoxicidade	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Análise térmica diferencial dos pós cerâmicos precursores	51
5.2 Difração de raios X dos pós cerâmicos precursores	52
5.3 Fluorescência de raios X dos pós cerâmicos precursores.....	59
5.4 Microscopia eletrônica de varredura dos pós cerâmicos precursores	61
5.5 Área superficial específica por método BET	66
5.6 Difração de raios X do corpo cerâmico conformado.....	66
5.7 Testes de bioatividade <i>in vitro</i>	73
5.7.1 Verificação de hidroxiapatita por FT-IR	73
5.7.2 Observação de hidroxiapatita por MEV	78
5.8 Testes de citotoxicidade <i>in vitro</i>	83
6. CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Hildebrand¹, biomateriais são utilizados desde as civilizações antigas, na forma de prótese para substituição de membros perdidos, exibindo um aumento na taxa de sucesso devido ao desenvolvimento de boas práticas médicas. Registros históricos mostram que as cirurgias mais comuns eram de reparação óssea e substituição dentária. Inicialmente os materiais empregados foram madeira, madrepérola e marfim, porém através do avanço na medicina houve o desenvolvimento de novos biomateriais.

Em 1986, durante a conferência da Sociedade Européia de Biomateriais² definiu-se pela primeira vez o termo biomaterial: “material utilizado em um dispositivo médico, destinado a interagir com um sistema biológico”. Segundo Bergmann³, o *American National Institute of Health* apresenta a definição mais aceita para biomaterial: “qualquer substância ou combinação de substâncias de origem natural ou sintética (exceto drogas), que pode ser utilizada por qualquer período de tempo e capaz de melhorar ou substituir, de maneira parcial ou total, tecido, órgão ou função do corpo para manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo”.

Atualmente, biomaterial é utilizado na forma de implante ou dispositivo médico, para substituir ou melhorar tecido e/ou órgão danificado. É importante ressaltar que o prefixo “bio” de biomaterial⁴ refere-se à palavra biocompatibilidade em vez de biológico ou biomédico. Portanto para o material ser implantado com sucesso no sistema biológico, é necessário elevado grau de biocompatibilidade².

Define-se biocompatibilidade⁵ como: “capacidade de um material para induzir uma resposta biológica adequada em uma determinada aplicação”. Logo, os implantes devem apresentar segurança biológica bioestabilidade para não produzir morte celular, inflamação crônica, reações tóxicas, sintomas alérgicos ou outro tipo de comprometimento das funções celulares ou tecidos^{2,6}. Além dessas propriedades, a superfície dos biomateriais² apresenta uma função importante devido ao seu contato com o sistema biológico. Portanto, é necessário preparar a superfície desses materiais⁶ considerando-se as propriedades física, química,

biológica e morfológica para poderem interagir com o organismo. Assim, a combinação das características apresentadas diferencia os biomateriais, permitindo seu emprego de maneira eficiente em sistemas biológicos.

De um modo geral, os biomateriais^{7,8} podem ser classificados de acordo com o tipo de interação que ocorre entre o dispositivo médico aplicado *in vivo* e o ambiente fisiológico. Desse modo, materiais bioinertes⁷ não provocam respostas adversas do tecido ao seu redor, mantendo suas propriedades físicas e mecânicas inalteradas. Os materiais bioativos⁷ estimulam a interação com o tecido ao seu redor, produzindo respostas do material que imita o tecido natural. Os materiais absorvíveis⁷ conforme são degradados por ação química ou biológica são substituídos por células.

Devido às possíveis interações existentes entre o material e organismo empregam-se materiais diversos⁹ na sua composição, por exemplo, metais, polímeros, cerâmicos e compósitos contendo dois ou mais componentes. Dentre esses materiais, a cerâmica^{10,11} destaca-se por apresentar resistência à corrosão, boa propriedade mecânica, estabilidade química e melhor biocompatibilidade que metais e diversos polímeros. As cerâmicas são geralmente utilizadas para substituição ou regeneração óssea e odontológica, uma vez que apresentam propriedades mecânicas adequadas para aplicação na região óssea. O primeiro registro a respeito de um implante biocerâmico, realizado com sucesso, data do século XIX¹¹.

Também pode-se classificar a biocerâmica^{12,13} de acordo com o tipo de interação no ambiente fisiológico, portanto são divididas em bioinertes (alumina e zircônia), bioativas (vidro bioativo, vitrocerâmica e hidroxiapatita) e absorvíveis (fosfatos de cálcio).

Utiliza-se a cerâmica bioativa para enxerto ósseo¹⁴ e revestimento de implantes metálicos¹⁵ por exibir similaridade com a fase inorgânica do tecido ósseo, uma vez que apresenta valores de tenacidade à fratura e módulo de Young similares ao osso cortical¹⁶. A categoria de cerâmica bioativa iniciou-se com o vidro bioativo, nomeado Bioglass[®] ($\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$) e sintetizado por Hench et al.¹⁷ no ano de 1969. Após o desenvolvimento do Bioglass[®] outras biocerâmicas foram sintetizadas, por exemplo, a hidroxiapatita sintética e o vitrocerâmico.

A hidroxiapatita sintética¹⁸ ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é considerada a mais importante das cerâmicas bioativas, porque apresenta semelhança química com o componente mineral dos ossos e biocompatibilidade com os tecidos ósseo, cutâneo e muscular. A interação entre a superfície da hidroxiapatita sintética e o tecido vivo, forma uma camada interfacial de hidroxiapatita natural, existente no componente mineral dos ossos, que aumenta a integração e incorporação deste biomaterial no tecido ósseo.

O vitrocerâmico^{7,19} é um material policristalino obtido por meio da cristalização realizada na matriz vítrea, através de nucleação e crescimento de cristais. Apresenta como vantagem a possibilidade de controlar a formação de fases cristalinas¹⁹ produzindo-se materiais com boas propriedades mecânicas, usinabilidade e bioatividade. Assim, diversos sistemas⁷ podem ser conseguidos, por exemplo, Cerabone[®], Bioverit[®] e Ceravital[®] apresentando as possíveis fases cristalinas²⁰ diopsídio, akermanita, monticelita e merwinita.

Dentre os diversos sistemas de vitrocerâmicos, o sistema CaO-MgO-SiO_2 ²¹ têm sido estudado por apresentar boa propriedade mecânica, química, bioatividade e compatibilidade celular. Nesse sistema a concentração de cálcio e silício podem estimular genes responsáveis pela produção de osteoblastos (células diferenciadas participantes da calcificação da matriz óssea), enquanto a incorporação de magnésio ao sistema CaO-MgO-SiO_2 melhora a propriedade mecânica²⁰ e a osteointegração devido a interação da superfície do material com os osteoblastos. Essa interação²² ocorre através de receptores de adesão na membrana celular, sendo o magnésio responsável por aumentar a adesão desses receptores e melhorar a incorporação dos biocerâmicos no tecido ósseo.

Tradicionalmente os processos para obtenção²³ de vitrocerâmicos são a reação em estado sólido que utiliza alta temperatura para realizar a síntese, e o método sol-gel cuja síntese pode ser realizar em temperatura ambiente. O método sol-gel é empregado na produção de cerâmicas para fins biomédicos, porque produz um pó fino, homogêneo²⁴ e de elevada pureza²⁵.

No presente trabalho, a partir de pesquisa bibliográfica realizada percebeu-se que o método sol-gel é muito utilizado na síntese de diversas cerâmicas para fins biomédicos, porém exhibe como desvantagem uma baixa reprodutibilidade. Por esse motivo procurou-se desenvolver um novo método de síntese para obter pós vitrocerâmicos no sistema CaO-MgO-SiO_2 , ao combinar os

métodos sol-gel e coprecipitação. A combinação desses métodos possui como intuito juntar as características existentes do método sol-gel com a ótima reprodutibilidade e baixo custo de operação da coprecipitação. Desse modo será possível a obtenção de pós vitrocerâmicos com característica nanométrica e homogênea que seja similar ao pó obtido pelo método sol-gel convencional. Para isso definiu-se alguns parâmetros como a utilização dos precursores de sílica ortosilicato de tetraetila ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ – TEOS) e silicato de sódio (Na_2SiO_3) e a influência do processo de síntese em condições de catalise ácida e básica para obtenção dos géis de sílica. No contexto acadêmico, a maior produção de estudos e conteúdos sobre novos métodos de síntese para biomateriais pode ser o início de um processo de transformação que começa na academia e estende seus reflexos para a área biomédica. Assim, pesquisas e trabalhos relacionados a novos métodos de síntese são cada vez mais importantes para expandir as possibilidades dessa área da ciência.

2 OBJETIVOS

O escopo do presente trabalho é propor e estudar um novo método de síntese do pó vitrocerâmico no sistema CaO-MgO-SiO_2 . Caracterizar o pó obtido, compará-lo com o método sol-gel convencional e realizar testes *in vitro* para verificar a bioatividade e citotoxicidade.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biomateriais

Os biomateriais⁷ compreendem um conjunto de produtos utilizados para aplicação médica. São materiais utilizados em contato próximo ou direto com o sistema biológico, por exemplo, dispositivos biomédicos (biossensores), dispositivos para liberação de medicamentos (implantes subdérmicos), materiais implantáveis (suturas, lentes ou dentes) e órgãos artificiais (pele e rim).

Definiu-se o termo biomaterial pela primeira vez em 1986 durante a conferência da Sociedade Europeia de Biomateriais² e ao longo dos anos houveram aprimoramentos no conceito apresentado. Entretanto manteve-se a noção geral de “um material que interage com o sistema biológico”²⁶.

De um modo geral, os biomateriais^{2,7} são constituídos de compostos de origem sintética, natural, ou materiais naturais quimicamente modificados, podendo ser aplicados na substituição ou reparação de partes danificadas do sistema biológico.

A seleção de um biomaterial^{2,4,6} depende do tipo de aplicação que será realizada, desse modo garantindo as propriedades desejadas do material, sem ocorrência de inflamação crônica, reações tóxicas, sintomas alérgicos ou outro tipo de comprometimento das funções celulares ou teciduais.

A superfície dos biomateriais²⁷ apresenta uma função importante, uma vez que ocorre a adsorção de proteínas nessa superfície, sendo uma das primeiras etapas neste tipo de interação. A adsorção de proteínas na superfície auxilia a adesão de células e demais processos celulares, por exemplo, proliferação e diferenciação celular. Portanto, biomateriais^{2,6,27} são produzidos considerando as propriedades físicas, químicas, biológicas, morfológicas e fatores como pH e força iônica para obter uma melhor interação do material com o organismo e evitar efeitos negativos possivelmente causados pelo biomaterial.

Define-se a escolha do material^{2,28} utilizado, pela aplicação designada e pelas características encontradas na superfície e *bulk* do biomaterial. Através

desses requisitos, os materiais se enquadram em três categorias: metais, cerâmicos e polímeros. Os metais² são materiais resistentes com relativa maleabilidade para a produção de formas complexas, sendo aplicados na substituição total de articulações ou fixação de fraturas. Os cerâmicos² são materiais cristalinos de elevada dureza e maior resistência a degradação que metais e diversos polímeros, sendo utilizados como materiais odontológicos ou implantes ortopédicos. Os polímeros² são materiais orgânicos de longas cadeias, sendo aplicados na substituição de tecido mole ou utilizados como materiais cirúrgicos cardiovasculares. Normalmente os materiais²⁹ poliméricos podem ser absorvíveis, cerâmicos podem ser absorvíveis, ativos ou biotoleráveis e metais são tipicamente biotoleráveis.

As possíveis interações^{7,8,30} do material com o organismo são bioinertes, bioativas e absorvíveis. Em termos gerais, os bioinertes provocam respostas mínimas do tecido, desse modo, mantendo suas propriedades físicas e mecânicas inalteradas. Os bioativos interagem com o tecido, produzindo uma camada interfacial entre a sua superfície e o tecido natural. Os absorvíveis são degradados por ação química ou biológica sendo substituídos por células.

3.2 Biocerâmica: Características e propriedades

Tradicionalmente as cerâmicas¹⁰ são materiais inorgânicos não metálicos, tipicamente duros e suscetíveis a fraturas. Exibem como característica, elevado ponto de fusão, estabilidade química e são bons isolantes térmicos e elétricos. A cerâmica apresenta duas formas de classificação³¹, a tradicional (argila empregada como matéria prima) e a avançada (matéria prima sintética de alta pureza). A cerâmica avançada possui como característica a combinação de propriedades cerâmicas com mecânica, elétrica, óptica, magnética e biológica. Na área biomédica pode-se utilizar a cerâmica avançada (considerada biocerâmica) no sistema biológico, devido as propriedades que o material apresenta.

Os biocerâmicos³²⁻³⁴ podem ser utilizados na reparação e/ou substituição de tecidos duros danificados no organismo, como ilustrado na Fig. 1, por apresentarem propriedades adequadas para serem empregados na região óssea.

Os biocerâmicos³⁵ podem ser obtidos na forma de dispositivo médico implantável (DMI), revestimento para outros biomateriais, pós cerâmicos e compósitos. Sabe-se que muitas composições cerâmicas³⁶ foram testadas para obter materiais com fins biológicos, porém apenas algumas composições são efetivamente aplicadas no tratamento clínico, por exemplo, alumina, zircônia, fosfato de cálcio, vidro bioativo, vitrocerâmico e hidroxiapatita (HA).

Figura 1 – Biocerâmicos podem ser utilizados na reparação e/ou substituição de tecidos duros danificados no organismo. (A) haste de quadril e implante dentário revestidos com HA; (B) cabeça de fêmur em alumina; (C) coroa dentária de ZrO_2 ; (D) suporte cerâmico de HA/TCP reabsorvível; (E) implante cerâmico para joelho; (F) grânulos de HA para preenchimento ósseo; (G) cume alveolar cerâmico

Fonte: Referência 32.

A escolha adequada de biocerâmicos^{32,37} aplicados no organismo é dependente do mecanismo de fixação, que está relacionado com o modo de ligação realizado entre o implante e o tecido. Portanto, nenhum material pode ser considerado inteiramente inerte, uma vez que sempre acontece um tipo de ligação na interface do implante-tecido. Desse modo, classificam-se as possíveis interações em bioinerte, absorvível ou bioativo. A cerâmica bioinerte³⁸ (ou biologicamente inativa) mantém suas propriedades físicas e mecânicas inalteradas após implante no organismo, visto que ocorre uma resposta biológica mínima. Assim, essa cerâmica é envolvida por um tecido de característica fibrosa

e espessura variada, enquanto os processos biológicos conduzem células do tecido ósseo ao redor do implante por osteocondução³⁹.

A cerâmica absorvível³⁸ dissolve-se no organismo em íons inorgânicos absorvidos por meio de reações bioquímicas. Esses íons promovem os processos de osteocondução e osteoindução³⁹ responsáveis pela osteogênese produzindo principalmente osteoblastos, que realizam de modo gradual a substituição dessa cerâmica por osso, conforme ocorre a degradação.

A cerâmica bioativa³⁸ (ou biologicamente ativa) interage no organismo com o tecido circundante através de reações químicas produzindo uma ligação interfacial (formação de hidroxiapatita), por meio de osteocondução, osteoindução e osteointegração³⁹. Os processos de osteocondução, osteointegração e osteoindução são responsáveis por realizar a união do tecido ósseo com a superfície da cerâmica por meio de poros localizados na superfície da cerâmica bioativa, através do mecanismo de fixação biológica.

Observa-se que nas três formas de mecanismo de desenvolvimento de tecidos que foram descritas, a espessura da camada interfacial que recobre o biocerâmico³⁷ dependerá do tipo de interação existente entre o material cerâmico e o tecido vivo. Assim, sabe-se que os inertes exibem uma mínima interação com o organismo formando apenas uma fina camada de tecido fibroso em sua superfície. Os absorvíveis e bioativos exibem elevada interação com o organismo e no caso dos absorvíveis forma-se uma fina camada de hidroxiapatita, enquanto para os bioativos forma-se uma espessa camada de hidroxiapatita.

Os cerâmicos exibem elevada estabilidade²⁸ em relação aos materiais metálicos e poliméricos, no que concerne a degradação em ambiente fisiológico. Entende-se que a estabilidade dos materiais cerâmicos ocorrerá devido a uma elevada resistência existente a ambientes cujo meio seja muito agressivo. Contudo, é válido informar que cerâmicas absorvíveis são projetadas para se degradarem em partículas ou substâncias químicas inorgânicas na presença de fluidos corporais.

As cerâmicas³⁸ apresentam características apropriadas para aplicação no sistema biológico uma vez que suas propriedades mecânicas apresentam valores próximos ao do tecido duro. Dessa forma, evitam-se complicações médicas como osteopenia (redução na concentração de minerais, em especial cálcio e fósforo, presente nos ossos) e osteoporose induzida por *stress shielding*

(redução na densidade óssea após o dispositivo ser implantado). Outra característica importante é a porosidade³⁸ da cerâmica, uma vez que permite a migração, proliferação e diferenciação celular ao fornecer ambiente adequado para a troca de nutrientes, oxigênio e resíduos metabólicos celulares.

Alguns biocerâmicos⁴⁰ apresentam como vantagem, em relação aos demais biomateriais, serem constituídos por elementos encontrados normalmente no organismo, por exemplo, cálcio, magnésio, fosfato e sódio. Por fim, sabe-se que vidros bioativos e vitrocerâmicos são considerados uma subclasse da cerâmica³⁶.

3.2.1 Vidros e Vitrocerâmicos

A substituição de partes danificadas no organismo, para recuperar funções fisiológicas, permitiu a descoberta de novos biomateriais⁴¹, como o vidro bioativo e o vitrocerâmico, capazes de realizar essa tarefa de maneira eficiente.

Em 1969, Larry Hench⁴² desenvolveu o vidro bioativo, nomeado Bioglass[®] (45S5), capaz de realizar uma forte ligação com o tecido vivo de modo natural. Essa descoberta, pela primeira vez, expôs uma alternativa interessante às cerâmicas inertes utilizadas até o momento.

Os vidros bioativos⁴³ exibem as propriedades de osteoindução e osteocondução necessárias na reparação de tecidos danificados. A superfície⁴¹ desse material induz a formação de tecido ósseo através da diferenciação e estimulação de células mesenquimais (osteoindução), para assim o osso poder se formar ao longo da superfície desses vidros (osteocondução).

Os vidros bioativos baseados em silicatos⁴³ usualmente exibem os óxidos SiO_2 , Na_2O , CaO e P_2O_5 , podendo ser aplicados como enxerto ósseo. Essas composições auxiliam na osteogênese^{41,43}, visto que os osteoblastos, presentes na superfície do vidro interagem com os íons dissolvidos do material, permitindo uma melhor integração com o tecido por formação de uma camada interfacial durante o processo de mineralização óssea. Entretanto as propriedades mecânicas reduzidas⁴³ do vidro bioativo são a principal desvantagem desse material, limitando sua aplicação. Os vitrocerâmicos, contendo fases cristalinas específicas, são uma alternativa interessante devido ao maior número de possíveis aplicações médicas.

Os vitrocerâmicos⁴⁴ apresentam propriedades usualmente superiores aos metais e polímeros nas características térmica, química, biológica, dielétrica e também exibem uma notável vantagem sobre os materiais vítreos e cerâmicos. São conhecidos por possuir alta variedade de composições e microestruturas refinadas que proporcionam características favoráveis ao material.

Classifica-se vitrocerâmicos⁴⁴⁻⁴⁶ como materiais existentes entre o vidro e a cerâmica, uma vez que esse material pode exibir elevada cristalinidade (50–95 %) com o restante da proporção sendo vidro residual localizado no contorno de grãos. Teoricamente, a produção desse material ocorre por cristalização da matriz vítrea, que serve de suporte para o crescimento de cristais e simultaneamente exibe alterações em sua composição.

Portanto, a composição química e a proporção dos componentes existentes na matriz vítrea determinam as fases cristalinas produzidas, visto que os componentes existentes no vidro são reestruturados para formar cristais contendo composição diferente da matriz^{45,47}.

Os sistemas mais utilizados na formação de matrizes vítreas são baseados em composições contendo silicatos⁴⁴. Essas composições são classificadas em: nesosilicato, sorosilicato, ciclosilicato, inosilicato, filosilicato e tectosilicato de acordo com o grau de polimerização das ligações Si–O.

Entende-se que a composição e microestrutura⁴⁴ são propriedades importantes na elaboração de vitrocerâmicos. A composição química da matriz controla a capacidade de formação do vidro e o tipo de nucleação (interna ou superficial), enquanto a microestrutura é responsável pelas propriedades físicas do material. As propriedades da microestrutura são dependentes da composição da matriz e cristalinidade do vitrocerâmico, sendo possível modificar essas propriedades por meio de tratamento térmico.

O mecanismo para a produção de vitrocerâmicos^{46,48} é o processo de cristalização controlada da matriz vítrea, ocorrendo acima da temperatura de transição vítrea (T_G). A cristalização pode ocorrer durante o resfriamento do material fundido ou no tratamento térmico do vidro já resfriado, por meio de duas etapas dependentes da temperatura: nucleação e crescimento de cristais, conforme a Fig. 2 ilustra. A primeira etapa é a nucleação^{46,49,50} que consiste no desenvolvimento de “embriões” que posteriormente formarão núcleos para o crescimento de cristais, podendo ser classificada em homogênea ou heterogênea.

Na nucleação homogênea os “embriões” formam-se a partir da matriz vítrea, enquanto na heterogênea os “embriões” são formados sobre superfícies como contorno de grãos, bolhas ou impurezas, nomeados agentes nucleantes. Considera-se a nucleação heterogênea o mecanismo típico dessa etapa, uma vez que não é possível excluir os agentes nucleantes existentes no vidro.

A etapa de crescimento de grãos^{50,51} é a continuação do processo de nucleação, iniciando-se quando o “embrião” atinge o tamanho crítico. Nesse momento átomos são difundidos para a interface vidro-núcleo até a formação de cristais propriamente ditos, e o transporte de átomos continua para desenvolver esse cristal. A cinética de crescimento do cristal é dependente da temperatura, assim pode-se determinar uma temperatura máxima para a taxa de crescimento de cristais segundo modelos matemáticos.

Figura 2 – Etapas dependentes da temperatura: nucleação e crescimento de cristais. (a) Dependência da temperatura para as taxas de nucleação e crescimento com sobreposição desprezível; (b) tratamento térmico por meio de duas etapas

Fonte: Adaptado da referência 45.

Após a cristalização, os vitrocerâmicos⁵² são materiais policristalinos contendo boas propriedades mecânicas em relação à matriz vítrea. A relação existente entre as fases cristalinas, vítreas e os poros formados determinam sua microestrutura, responsável pelas propriedades físicas, químicas, mecânicas e biológicas.

Pode-se utilizar vitrocerâmicos⁴⁸ nas áreas elétrica, eletrônica, energética, médica e odontológica. Na área da saúde utiliza-se principalmente para a fabricação de implantes dentários e aplicação ortopédica, particularmente preenchimento ósseo ou revestimento de implante metálico. Os vitrocerâmicos mais utilizados são Cerabone[®] ($\text{MgO-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaF}_2$), Ceravital[®] ($\text{Na}_2\text{O-K}_2\text{O-MgO-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$), Bioverit[®] ($\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$) e Biosilicato[®] ($\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$).

3.3 Biocompatibilidade da cerâmica

Considera-se a biocompatibilidade⁵ de um implante, uma resposta biológica adequada para uma determinada aplicação dentro do sistema biológico, sem a ocorrência de rejeição ou a produção de processos que possam comprometer as funções celulares do organismo. Logo, a biocompatibilidade^{53,54} é uma propriedade necessária ao material implantado que ocorre devido a interação entre o sistema biológico, a função e as propriedades da cerâmica, conforme ilustra o esquema na Fig. 3.

Figura 3 – Esquema de biocompatibilidade do material: interação entre o sistema biológico, a função e as propriedades da cerâmica

Fonte: Adaptado da referência 54.

Para a cerâmica ser considerada ou não biocompatível⁵, é necessário avaliar a função física desempenhada e a resposta biológica produzida. Desse modo define-se primeiramente qual será a função física exigida do material, para

na sequência determinar o tipo de interação no organismo e a possível resposta biológica produzida. A biocompatibilidade produz diferentes respostas biológicas, sendo considerado um processo dinâmico⁵⁴, uma vez que a interação entre organismo, função e propriedades da cerâmica podem variar. O organismo pode alterar-se devido a presença de doenças ou idade avançada. Por outro lado, o implante cerâmico pode alterar-se ao sofrer corrosão no ambiente que está imerso, fadiga ou se a carga aplicada nele aumentar, caso o dispositivo implantado ganhe sobrepeso⁵⁴. Em virtude da existência desse processo dinâmico, ocorre a necessidade por uma produção de respostas biológicas melhores⁵ visto que, atualmente as cerâmicas desempenham sofisticadas funções físicas no organismo, por longos períodos de tempo. Logo é essencial um conhecimento multidisciplinar nas áreas da ciência dos materiais, bioengenharia, biologia molecular e bioquímica. A interdisciplinaridade requerida por esse campo do conhecimento permitiu a produção de biocerâmicas aprimoradas⁵, quanto à função física desempenhada e resposta biológica produzida. Uma elevada quantidade dessas biocerâmicas encontra-se em fase de testes clínicos para determinação de sua resposta biológica, uma vez que a caracterização exigida é complexa e a metodologia utilizada desenvolve-se conforme o campo progride.

Atualmente as metodologias⁵⁵ empregadas para definir a biocompatibilidade são os testes *in vitro* (fora do organismo) e *in vivo* (dentro do organismo). De um modo geral, nos testes *in vitro* analisa-se o potencial citotóxico presente no material, enquanto os testes *in vivo* realizam-se com base na aplicação pretendida para a cerâmica.

A realização de testes *in vitro* e *in vivo* é um requisito importante para a aprovação e aplicação de biocerâmicas como dispositivo médico. Esses testes seguem normas estabelecidas por diversas agências regulamentadoras⁵⁵ sendo a *International Organization for Standardization* (ISO) a mais aplicada. O conjunto de regras da norma ISO 10993-1:2009⁵⁵ é responsável por definir os parâmetros necessários no escopo referente a proteção de seres humanos contra potenciais riscos a saúde, por meio da aplicação de biomateriais no organismo.

3.4 Bioatividade da cerâmica

A bioatividade⁵⁶ da cerâmica (atividade biológica) é o resultado de reações que ocorrem na superfície do material, sendo quantificada por meio da liberação de íons em solução ou por formação de apatita semelhante a matriz inorgânica dos ossos.

A apatita⁵⁷ é um grupo de compostos minerais contendo fosfato e dentro desse grupo, a hidroxiapatita sintética ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) exibe fórmula química semelhante as apatitas biológicas. Por isso, a hidroxiapatita sintética é obtida na síntese de biomateriais utilizados para substituição ou reparo do tecido ósseo. A hidroxiapatita pode ser obtida por vários métodos⁵⁷, por exemplo, hidrotermal, sol-gel e cristalização no fluido corpóreo humano (SBF – *simulated body fluid*).

A concentração iônica de SBF^{58–60}, foi inicialmente proposta por Kokubo et al. em 1990⁶¹, e posteriormente corrigida pelo mesmo autor em 1991⁶². Em 2004, a solução de SBF foi novamente revisada e simplificada, para ser proposta ao *International Organization for Standardization*, como solução padrão utilizada nos testes *in vitro*, que necessitam monitorar a formação de apatita na superfície do implante.

Prepara-se a solução de SBF misturando-se a solução tampão Tris(hidroximetil)aminometano ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) com soluções iônicas de proporção similar ao plasma sanguíneo, de acordo com o protocolo de Kokubo⁵⁹. A solução resultante é supersaturada para ocorrer a formação de hidroxiapatita.

O teste *in vitro* de SBF^{7,63,64} para a formação de hidroxiapatita pode ser descrito em cinco etapas, iniciando com 1) troca rápida de íons alcalino terrosos da superfície do material, com íons H^+ presentes na solução de SBF; 2) a sílica é liberada na forma de $(\text{SiO}_4)^{4-}$ como resultado da quebra de ligações siloxano (Si-O-Si) e formação de ligações silanol (Si-OH) na sua superfície; 3) policondensação dos silanois em uma camada porosa de sílica gel na superfície do material deficiente em íons alcalino terrosos; 4) íons Ca^{2+} e $(\text{PO}_4)^{3-}$, presentes no SBF, são adsorvidos na camada de sílica gel, formando camada amorfa rica em $\text{CaO-P}_2\text{O}_6$; 5) cristalização da camada amorfa por incorporação de íons OH^- ou $(\text{CO}_3)^{2-}$, presentes no SBF, produzindo a camada de hidroxiapatita carbonatada. A Fig. 4 ilustra a interação entre o material e a solução de SBF,

produzindo em sua superfície uma camada de hidroxiapatita cristalizada, nas etapas 1 a 5 descritas acima. Essas etapas constituem o teste *in vitro* finalizando-se na formação de HA na superfície do implante. Porém em implantes *in vivo*⁶³ acontece mais seis etapas de reação celular, iniciando com 6) camada cristalizada oferece pontos de adsorção para fatores de crescimento; 7) ação de macrófagos; 8) e 9) fixação e diferenciação de células tronco; 10) e 11) desenvolvimento e cristalização de matriz óssea.

A camada de hidroxiapatita carbonatada⁶⁵ é química e estruturalmente equivalente a fase mineral do osso, visto que possui grupos $(\text{CO}_3)^{2-}$ com proporção em massa de 3–8 %, substituindo OH^- ou $(\text{PO}_4)^{3-}$ na hidroxiapatita.

Figura 4 – Interação entre material e solução de SBF, produzindo em sua superfície uma camada de hidroxiapatita cristalizada

Fonte: Autor da dissertação.

Referente ao sistema CaO-MgO-SiO_2 , sabe-se que a formação da camada de hidroxiapatita carbonatada depende da concentração de sílica, uma vez que a sílica é responsável por produzir camada porosa de gel de sílica para ocorrer a deposição de hidroxiapatita. Assim, teores^{7,43} entre 40–52 % em massa de sílica exibem ligação rápida, entre 52–60 % apresentam ligação lenta e acima de 60 % não formam ligações por apresentar caráter inerte, devido a elevada estabilidade química do material. Muitos materiais⁵⁹ incluindo o Bioglass®, hidroxiapatita sintética, fosfatos de cálcio e vitrocerâmicos ligam-se diretamente

ao tecido vivo, por esse motivo são utilizados clinicamente, uma vez que formam camada de hidroxiapatita em sua superfície.

3.5 Sistema CaO-MgO-SiO₂

Alguns vitrocerâmicos⁶⁶ de potencial aplicação médica são baseados no sistema CaO-MgO-SiO₂ e possuem fases cristalinas, obtidas após o processo de cristalização, que exibem bioatividade e não apresentam toxicidade conhecida (citocompatibilidade) no sistema biológico. O sistema CaO-MgO-SiO₂⁶⁷ cristaliza-se em temperaturas maiores que 700 °C e na etapa de nucleação caracteriza-se pela separação de fases ricas em óxidos metálicos bivalentes, formando cristais simples essencialmente do tipo diopsídio. A estrutura desse sistema apresenta características que explicam o comportamento bioativo do material. Assim, CaO-MgO-SiO₂⁶⁸ é composto por uma rede tridimensional onde a sílica é considerada o formador de rede, uma vez que na sua forma tetraédrica (SiO₄)⁴⁻ liga-se covalentemente a átomos de oxigênio localizados nos vértices do tetraedro, compartilhados para produzir essa rede. Classificam-se os oxigênios localizados no vértice como “oxigênio de ligação” e sabe-se que a ligação entre Si²⁺ e O⁻ fornece estabilidade para todo o sistema.

Consideram-se os óxidos de cálcio e magnésio modificadores de rede⁶⁸ uma vez que os cátions Ca²⁺ e Mg²⁺ alteram as ligações covalentes existentes, por provocar interações iônicas com os átomos de oxigênio localizados nos vértices. Assim, os oxigênios formando ligações iônicas com os cátions são classificados como “oxigênio sem ligação” e as interações entre Ca²⁺/Mg²⁺ e O⁻ reduzem parcialmente a estabilidade do sistema, viabilizando a reatividade superficial no material. Uma representação esquemática em 2D da rede tridimensional do sistema CaO-MgO-SiO₂ é ilustrada na Fig. 5.

Após a formação da rede tridimensional modificada, o CaO^{16,63} do sistema CaO-MgO-SiO₂ fornece cátions Ca²⁺ capazes de interagir com os osteoblastos por meio de receptores de cálcio na membrana celular, regulando a osteogênese. Devido a troca iônica entre Ca²⁺ e H₃O⁺ no fluido fisiológico, o pH torna-se alcalino, e ocorre um aumento na concentração de Ca²⁺ permitindo elevada reatividade do sistema. Os cátions Mg²⁺ provenientes de MgO^{63,64,69} do sistema são responsáveis por estimular a proliferação de osteoblastos,

possibilitando melhor adesão dessa célula na superfície do material durante a osteogênese. A presença de Mg^{2+} nesse sistema diminui a bioatividade, na etapa de cristalização da hidroxiapatita, por desacelerar a formação de camada amorfa rica em $CaO-P_2O_6$. Entretanto, o magnésio melhora as propriedades mecânicas⁶⁴, desse sistema, produzindo valores de tenacidade à fratura, resistência à flexão e módulo de Young próximos ao do tecido ósseo.

Figura 5 – Representação esquemática em 2D da rede tridimensional do sistema $CaO-MgO-SiO_2$

Fonte: Autor da dissertação.

O SiO_2 ^{63,70} do sistema está associado com a bioatividade, uma vez que o silício envolve-se diretamente no processo de mineralização durante o crescimento ósseo. Sendo um elemento traço⁷⁰ importante para o organismo, uma vez que exibe concentração de 100 ppm de Si^{2+} no osso e/ou 200–500 ppm de Si^{2+} ligados a compostos da matriz extracelular.

Os vitrocerâmicos do sistema $CaO-MgO-SiO_2$ apresentam as possíveis fases cristalinas⁶⁷: diopsídio, akermanita, merwinita, bredigite, monticelita e wollastonita. Estudos revelam que essas fases²⁰ exibem a formação de uma camada de hidroxiapatita na interface vitrocerâmico–tecido, promovendo ligações diretas com o sistema biológico, quando implantado. As fórmulas químicas e sistemas cristalinos para cada fase do sistema $CaO-MgO-SiO_2$ são apresentadas na Tabela 1.

Na literatura^{20,63} a incorporação de magnésio, como elemento traço, ao sistema CaO-SiO₂ permite a obtenção de materiais com composição química variada (conforme observado na Tabela 1) e sistemas cristalinos que exibem características específicas. A bredigite^{20,63} apresenta valores de tenacidade à fratura, resistência à flexão e módulo de Young próximos do osso cortical, e seus produtos de dissolução iônica promovem um aumento na concentração de osteoblastos no valor de 6,25–50 mg.mL⁻¹.

Tabela 1 – Fórmulas químicas e sistemas cristalinos para cada fase do sistema CaO-MgO-SiO₂

Fase	Sistema Cristalino	Formula Química
Bredigite	Ortorrômbico	Ca ₇ MgSi ₄ O ₁₆
Diopsídio	Monoclínico	CaMgSi ₂ O ₆
Merwinita	Monoclínico	Ca ₃ MgSi ₂ O ₈
Akermanita	Tetragonal	Ca ₂ MgSi ₂ O ₇
Monticelita	Triclínico	CaMgSiO ₄
Wolastonita	Monoclínico	CaSiO ₃

Fonte: Autor da dissertação.

O diopsídio^{20,63} apresenta uma pequena taxa de degradação (perda de massa) e pode formar ligações diretamente com o tecido ósseo. Devido a sua composição química, apresenta valores de propriedades mecânicas maiores que do osso cortical, desse modo exibindo baixa probabilidade de fratura e maior durabilidade em comparação a hidroxiapatita sintética.

A akermanita^{20,63} apresenta valores de modulo de Young e resistência à flexão próximos do osso cortical, porém o valor de tenacidade à fratura é menor que o do osso cortical. Sugere-se que o vitrocerâmico contendo essa fase não é totalmente denso, o que influencia suas propriedades mecânicas e através de processos de sinterização é possível melhorar tais valores. A akermanita pode estimular a proliferação celular em concentrações entre 1,25–125 mg.mL⁻¹. O aumento na concentração de MgO torna o sistema mais estável, já que átomos de Mg habitam o lugar de Ca nessa estrutura.

A merwinita^{20,63} apresenta valores de tenacidade à fratura, resistência à flexão e módulo de Young próximos do osso cortical, e seus produtos de dissolução iônica promovem um aumento significativo na proliferação de

osteoblastos. Nesta fase cristalina, o aumento no teor de Mg pode diminuir a formação de hidroxiapatita e proliferação celular.

A monticelita^{20,63} apresenta valores de resistência à flexão e tenacidade à fratura próximos do osso cortical, enquanto o valor de módulo de Young é maior que o do osso cortical. Essa fase exibe baixa probabilidade de fratura. De acordo com estudos, a monticelita apresenta propriedades mecânicas comparáveis com as fases akermanita e bredigite, já que o tamanho médio de cristal e densidade relativa não variam consideravelmente. Nessa fase, o aumento na concentração de MgO diminui a formação de hidroxiapatita.

A wollastonita^{71,72} apresenta um valor de resistência a flexão dentro do intervalo referente ao valor do osso cortical. Os vitrocerâmicos dessa fase contém elevada concentração de cálcio na sua composição. Estudos mostram que a wollastonita é mais bioativa que o diopsídio, em relação à taxa de formação da hidroxiapatita.

Os valores de tenacidade à fratura, resistência à flexão e módulo de Young referentes a cada fase cristalina^{20,70} são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de tenacidade à fratura, resistência à flexão e módulo de Young referentes a cada fase cristalina

Nome	Resistência à Flexão (MPa)	Tenacidade à fratura (MPa.m ^{1/2})	Módulo de Young (GPa)
Osso cortical	50–150	2–12	7–30
Bredigite	156,0	1,57	43,0
Diopsídio	300,0	3,50	170,0
Merwinita	151,0	1,72	31,0
Akermanita	176,2	1,83	42,0
Monticelita	159,0	1,65	51,0
Wolastonita	95,0	–	–

Fonte: Adaptado das referências 21 e 71.

3.6 Processos de síntese de biocerâmicos à base de silicatos

A obtenção de biocerâmicos⁷³ à base de silicatos contendo elevada área superficial ou partículas de tamanho reduzido é desejada, uma vez que essas características influenciam a bioatividade do material. Partículas⁷³ com

tamanho entre 20–500 nm são desejadas devido a elevada área superficial específica, maior energia superficial em relação a partículas micrométricas e versatilidade para modelagem dos biocerâmicos.

Para ocorrer a preparação de biocerâmicas à base de silicatos⁷⁴, as metodologias mais utilizadas costumam ser reação em estado sólido, hidrotermal, sol-gel e coprecipitação.

3.6.1 Método por reação em estado sólido

A reação em estado sólido^{75,76} é um método tradicional empregado na síntese de biocerâmicos, consistindo no aquecimento da mistura de reagentes até sua fusão (1350–1400 °C) em cadinho de platina-ródio (Pt–Rh)⁷⁶. O rápido resfriamento, desse líquido homogêneo, provoca tensões internas que prejudicam sua estabilidade mecânica, assim para aliviar as tensões internas, realiza-se o processo de recozimento (450–550 °C). Após a etapa de recozimento, a mistura é resfriada até temperatura ambiente obtendo-se o biocerâmico. Para produzir o biocerâmico⁷⁷ na forma granulada ou pó, após a fusão da mistura, deve-se resfriá-lo rapidamente em água, antes de realizar a moagem e o peneiramento afim de obter partículas com o tamanho desejado. A Fig. 6 ilustra o gráfico esquemático exibindo as três etapas envolvidas na síntese por reação em estado sólido.

Figura 6 – Gráfico esquemático exibindo as três etapas envolvidas na síntese por reação em estado sólido

Fonte: Adaptado da referência 77.

3.6.2 Método hidrotérmico

O método hidrotérmico⁷⁸⁻⁸⁰ é uma rota de síntese para nanomateriais que produz uma variedade de morfologias, consistindo em uma reação química em meio reacional aquoso, que ocorre dentro de uma autoclave, tipicamente de teflon, pressurizada em temperatura elevada. Usualmente, esse método⁷⁸ é empregado na síntese de materiais inorgânicos, uma vez que possui boa reprodutibilidade. Utiliza-se o termo solvotérmico⁷⁹, para esse método, quando solventes orgânicos são empregados como meio reacional no lugar de água.

O processo hidrotérmico^{78,81} apresenta algumas vantagens, em relação aos demais métodos convencionais, como simplicidade, melhor controle de nucleação, maior cinética de reação e produção de cerâmicas em temperaturas relativamente baixas (300 °C). Nesse processo⁸¹, o tempo de reação é maior que os demais, porém obtém-se partículas altamente cristalinas com melhor controle sobre seu tamanho e forma.

3.6.3 Método sol-gel

O método sol-gel^{76,82} é um processo químico de via úmida, envolvendo a mistura de reagentes na forma de soluções, para obter uma suspensão coloidal (sol) que produz uma estrutura molecular rígida (gel), contendo fase líquida imobilizada em seus interstícios. O gel é constituído por partículas coloidais ou cadeias poliméricas. Esse processo caracteriza-se por produzir misturas com elevado grau de homogeneidade^{83,84} e grande quantidade de poros^{76,80}.

A gelificação da suspensão coloidal⁸⁵ é uma etapa importante, uma vez que nesta etapa, que pode ocorrer de modo lento ou rápido, formam-se as microestruturas que são responsáveis por definir as propriedades do gel. Assim, os géis obtidos a partir de reagentes iniciais idênticos, podem ser diferentes dependendo do processo de gelificação.

As etapas necessárias para a síntese de materiais, utilizando o método sol-gel⁸⁴, ocorrem na seguinte ordem: hidrólise, policondensação, gelificação, *ageing* e secagem de produtos⁸⁵ que podem ser gel seco, vidro, vitrocerâmico ou cerâmica. Nesse método utiliza-se, usualmente, alcóxidos metálicos ($M(OR)_4$) como fonte de óxidos⁸⁵, para as reações de hidrólise e policondensação

sintetizarem a suspensão coloidal. Na fórmula $(M(OR)_4)$ o M representa um formador de rede (Si, Ti, Zr, Al, B, etc.) enquanto R retrata um grupo alquil⁸⁶.

Na reação de hidrólise^{76,85} mistura-se no meio reacional, alcóxido, água e catalisador ácido ou básico, obtendo-se o grupo silanol (Si–OH). Na reação de policondensação⁸⁵ os silanois, reagem entre si, produzindo ligações siloxano (Si–O–Si) e eliminação de água. Na Fig. 7 as equações (1) e (2) exibem o mecanismo de reação da hidrólise e policondensação, respectivamente.

Figura 7 – Equações (1) e (2) exibem o mecanismo de reação da hidrólise e policondensação, respectivamente

Fonte: Autor da dissertação.

Conforme as reações de policondensação ocorrem formam-se, nesta ordem, oligômeros, polímeros e por fim partículas que aumentam a viscosidade da suspensão coloidal⁸⁵. Na etapa de gelificação⁸⁷, gradualmente, ocorre a formação de ligações cruzadas entre as partículas de sílica produzindo por fim o gel. Entende-se que o sol se torna um gel quando apresenta resistência elástica. Simultaneamente a gelificação, a etapa de *ageing*^{76,87} ocorre permitindo que mais ligações cruzadas se formem, obtendo-se uma estrutura molecular rígida. Por fim na secagem⁸⁷, a fase líquida imobilizada nos poros do gel é completamente removida por evaporação em temperatura acima de 100 °C, a pressão atmosférica.

Sabe-se que o pH influencia na etapa de gelificação⁸⁸. Assim, o pH ácido induz uma gelificação lenta que formam longas cadeias ramificadas que produzem o gel monolítico, enquanto o pH básico provoca uma gelificação rápida que formam pequenos aglomerados ramificados.

3.6.4 Método por coprecipitação

O termo coprecipitação^{89,90} é utilizado para definir a precipitação simultânea de dois ou mais cátions presentes em uma solução. Caracteriza-se por ser um método prático, de aparelhagem simples, baixo custo, de fácil controle dos parâmetros de processo, boa reprodutibilidade, homogeneidade dos produtos e resultados satisfatórios. Nesse método as propriedades físico-químicas⁹⁰, dos precipitados (cristalinos ou amorfos), estão diretamente ligadas aos parâmetros utilizados na síntese. Sendo os mesmos: o pH da solução, a concentração de cátions, a ordem e velocidade de adição dos reagentes, temperatura de precipitação e velocidade de agitação da solução.

O processo de coprecipitação^{90,91} envolve duas etapas: nucleação e crescimento da partícula. De um modo geral, durante a nucleação ocorre a formação de pequenos núcleos, induzidos pela saturação das espécies constituintes na solução, e o posterior crescimento de maneira lenta e uniforme, por agregação irreversível desses núcleos. Assim, o controle da quantidade de partículas⁹¹ produzidas ocorrerá durante a etapa de nucleação, visto que durante o processo de crescimento das partículas a quantidade que foi obtida, durante a nucleação, não será alterada.

Desse modo, a coprecipitação⁹⁰ apresenta as seguintes características: os precipitados são espécies geralmente pouco solúveis formados em condição de supersaturação, durante a nucleação forma-se um número elevado de partículas pequenas, os processos de amadurecimento de Ostwald (crescimento de partículas maiores através da dissolução de partículas menores) e coalescência (agregação das partículas) afetam o tamanho, morfologia e propriedades dos precipitados e a interação entre os parâmetros que influenciam a síntese induzem as condições necessárias para ocorrer a precipitação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os precursores de Si utilizados foram o ortosilicato de tetraetila (TEOS) (98% de pureza, Sigma-Aldrich) e solução de silicato de sódio (Dinâmica Química).

Utilizou-se duas formas para obtenção de Ca e Mg. Na primeira forma preparou-se soluções clorídricas de cálcio e magnésio através da dissolução dos respectivos óxidos em HCl (2M), enquanto na segunda forma utilizou-se os reagentes CaO e MgO na forma particulada.

Empregou-se os reagentes HCl (3M), NaOH (6M), HNO₃ (7M) e etanol (P.A., Casa Americana) para realizar as sínteses. No presente trabalho, utilizou os valores de referência⁹² para a composição em massa do pó cerâmico precursor, exibida na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de referência para a composição em massa do pó cerâmico precursor

Componentes	Porcentagem em massa (%)
SiO ₂	49,13
CaO	43,19
MgO	7,68

Fonte: Autor da dissertação.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos materiais iniciais

A solução de TEOS, precursora de Si, foi utilizada sem nenhum tratamento adicionando-se 40 % em volume de etanol (P.A.).

A solução de silicato de sódio, outro precursor de Si, foi preparada por solubilização de $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Dinâmica Química) em água deionizada obtendo-se uma solução límpida com a concentração de SiO_2 de $49,66 \text{ g} \cdot \text{Kg}^{-1}$.

Preparou-se a solução de HCl (3M) por solubilização do ácido clorídrico concentrado (P.A., Casa Americana) em água deionizada.

Obteve-se solução de NaOH (6M) a partir da dissolução de hidróxido de sódio (P.A., Alphatec) em água deionizada.

Os reagentes CaO (Vetec) e MgO (Vetec), previamente calcinados a 900°C , foram solubilizados em HCl (2M) para obtenção das respectivas soluções clorídricas.

A solução de HNO_3 (7M) foi preparada por diluição de ácido nítrico concentrado (P.A., Casa Americana) em água deionizada.

4.2.2 Síntese dos pós cerâmicos precursores do sistema CaO-MgO-SiO₂

Neste trabalho realizou-se quatro sínteses, para a obtenção dos pós cerâmicos precursores do sistema CaO-MgO-SiO₂, indicadas nos tópicos seguintes por Síntese 1, Síntese 2, Síntese 3 e Síntese 4. Nas sínteses 1, 2 e 3 empregou-se o método sol-gel combinado com coprecipitação, enquanto a síntese 4 foi dividida em duas partes. Na primeira parte utilizou-se o sol-gel combinado com coprecipitação e na segunda parte aplicou-se apenas o método sol-gel convencional.

4.2.2.1 Síntese 1: Processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando Na_2SiO_3 , como precursor de Si, e pH ácido

As soluções de Na_2SiO_3 e clorídricas de cálcio e magnésio foram utilizadas como reagentes iniciais. O pó obtido foi denominado síntese ácida – silicato de sódio (SA-SiNa).

Inicialmente, 55 mL de solução HCl (3M) foi lentamente adicionada, sob agitação mecânica, em um béquer contendo 55,63 g de solução Na_2SiO_3 . Após repouso por 72 h obteve-se gel monolítico de sílica. Posteriormente, o gel e soluções clorídricas de Ca^{2+} e Mg^{2+} foram misturados para obtenção de uma suspensão entre gel e cloretos. Na sequência, sob agitação mecânica, adicionou-

se quantidade suficiente de NaOH (6M), para coprecipitação de Ca^{2+} e Mg^{2+} como hidróxidos. A suspensão resultante de gel e hidróxidos foi filtrada, seca a 70 °C por 24 h, lavada com água deionizada até teste negativo para Cl^- e calcinada a 900 °C por 1 h, para obtenção de pó cerâmico precursor. A Fig. 8 exibe o fluxograma do processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando Na_2SiO_3 e pH ácido.

Figura 8 – Fluxograma do processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando Na_2SiO_3 e pH ácido

Fonte: Autor da dissertação.

4.2.2.2 Síntese 2: Processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando Na_2SiO_3 , como precursor de Si, e pH básico

A solução de Na_2SiO_3 e óxidos de cálcio e magnésio foram utilizados como reagentes iniciais. O pó obtido foi denominado síntese básica – silicato de sódio (SB-SiNa).

Inicialmente, quantidade estequiométrica da solução de Na_2SiO_3 foi misturada com 10% em volume de etanol, seguido de adição lenta de 21 mL de HCl (3M), sob agitação mecânica, até pH 10 para obtenção do gel de sílica.

Os reagentes CaO e MgO foram pesados, em quantidade previamente calculada, para obtenção da composição desejada do produto. Os reagentes pesados foram solubilizados em HCl (2M) obtendo-se solução clorídrica de Ca e

Mg. Na sequência, a solução clorídrica foi lentamente adicionada em um béquer contendo NaOH (6M), sob agitação constante, para precipitação dos hidróxidos de Ca^{2+} e Mg^{2+} em pH 11.

O gel de sílica e solução de hidróxidos foram misturados, e então homogeneizados durante 20 min por agitação mecânica. A mistura resultante foi filtrada, seca a 70 °C por 24 h, lavada com água deionizada até teste negativo para Cl^- e calcinada a 900 °C por 1 h, para obtenção do pó cerâmico precursor. A Fig. 9 exibe o fluxograma do processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando Na_2SiO_3 e pH básico.

Figura 9 – Fluxograma do processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando Na_2SiO_3 e pH básico

Fonte: Autor da dissertação.

4.2.2.3 Síntese 3: Processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando TEOS, como precursor de Si, e pH ácido

As soluções de TEOS e clorídricas de cálcio e magnésio foram utilizadas como reagentes iniciais. O pó obtido foi nomeado: síntese ácida TEOS-1 (SAT-1).

Inicialmente, preparou-se a mistura de TEOS e etanol na proporção volumétrica de 1:4. A solução de HCl (3M) foi lentamente adicionada, sob agitação mecânica, em um béquer contendo esta mistura. O béquer foi deixado

em repouso e após uma semana e dois dias obteve-se gel monolítico de sílica. Posteriormente, o gel e soluções clorídricas de Ca^{2+} e Mg^{2+} foram misturados para obtenção de uma suspensão de gel e cloretos. Na sequência, adicionou-se quantidade suficiente de NaOH (6M), para coprecipitação de Ca^{2+} e Mg^{2+} como hidróxidos. A suspensão resultante foi filtrada, seca a 70 °C por 24 h, lavada com água deionizada até teste negativo para Cl^- e calcinada a 900 °C por 1 h, para obtenção do pó cerâmico precursor. A Fig. 10 exibe o fluxograma do processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando TEOS e pH ácido.

Figura 10 – Fluxograma do processo de síntese por método sol-gel combinado com coprecipitação utilizando TEOS e pH ácido

Fonte: Autor da dissertação.

4.2.2.4 Síntese 4: Processo de síntese por método sol-gel utilizando TEOS, como precursor de Si, e pH ácido

A solução de TEOS e óxidos de cálcio e magnésio foram utilizados como reagentes iniciais. O pó obtido foi nomeado síntese ácida TEOS-2 (SAT-2).

Inicialmente, os óxidos de cálcio e magnésio foram adicionados em HNO_3 (7M), para dissolução total e obtenção de solução nítrica de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Na sequência, em outro béquer, solução de TEOS foi misturada com etanol na proporção volumétrica 1:1. A solução nítrica de Ca^{2+} e Mg^{2+} foi adicionada

lentamente, sob agitação constante, no béquer contendo TEOS + etanol. O béquer foi deixado em repouso e após 6 h produziu-se gel monolítico de sílica contendo Ca^{2+} e Mg^{2+} .

Dividiu-se o gel monolítico em SAT-2A e SAT-2B. No béquer contendo SAT-2A adicionou-se NaOH (6M), para coprecipitação dos hidróxidos de Ca^{2+} e Mg^{2+} . A suspensão resultante foi filtrada, seca a 70 °C por 24 h, lavada com água deionizada e calcinada a 900 °C por 1 h. No béquer contendo SAT-2B ocorreu aquecimento em chapa para retirada dos grupos nitrogenados e posterior calcinação a 900 °C por 1 h. A fim de obter o pó cerâmico precursor, nos dois casos. A Fig. 11 exibe o fluxograma do processo de síntese por método sol-gel utilizando TEOS e pH ácido. Aquecimento em chapa seguido de calcinação (SAT-2B) e adição de NaOH para coprecipitação de hidróxidos (SAT-2A).

Figura 11 – Fluxograma do método sol-gel utilizando TEOS e pH ácido. Aquecimento em chapa seguido de calcinação (SAT-2B) e adição de NaOH para coprecipitação de hidróxidos (SAT-2A)

Fonte: Autor da dissertação.

4.3 Sinterização do pó cerâmico precursor

O pó cerâmico precursor foi moldado em um corpo cerâmico, a fim de garantir que este corpo não seja degradado durante a realização dos testes *in vitro*. Moldaram-se 10 corpos cerâmicos a partir do pó obtido em cada síntese, utilizando massa de 0,25 g em uma matriz cilíndrica de 15 mm de diâmetro. Para confeccionar 50 corpos cerâmicos ao todo, empregou-se uma prensa hidráulica

uniaxial utilizando a pressão de $2,49 \cdot 10^7$ Pa e na sequência sinterizou-se a 1200 °C por 2 h, com taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. A Fig. 12 ilustra o corpo cerâmico cilíndrico de 0,25 g obtido em uma matriz de 15 mm de diâmetro.

Figura 12 – Corpo cerâmico cilíndrico de 0,25 g obtido em uma matriz de 15 mm de diâmetro

Fonte: Autor a dissertação.

4.4 Técnicas de caracterização empregadas

4.4.1 Difração de raios X

A técnica de difração de raios X foi empregada para análise das fases cristalinas obtidas no pó cerâmico e pastilhas sinterizadas, utilizando-se um difratômetro modelo Multiflex da Rigaku, com fonte de radiação monocromática $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54148 \text{ \AA}$). As análises foram efetuadas com passo de $0,06^\circ$, na faixa angular de 10° a 90° e tempo de contagem de 4 s por passo. A identificação das fases cristalinas foi realizada com o auxílio do banco de dados ICDD.

4.4.2 Fluorescência de raios X

A técnica de fluorescência de raios X foi empregada para análise semi-quantitativa do pó cerâmico precursor, utilizando-se um espectrômetro modelo EDX-720 da Shimadzu. As análises foram realizadas em vácuo, utilizando um colimador de 10 mm.

4.4.3 Microscopia eletrônica de varredura com canhão de emissão de campo

Micrografias eletrônicas de varredura foram obtidas para verificar a morfologia do pó cerâmico precursor. Para observação adequada da morfologia, as amostras estudadas foram previamente moídas manualmente em um almofariz

de ágata e tratadas termicamente. A microscopia eletrônica de varredura foi novamente utilizada após teste de bioatividade *in vitro*, para observar a deposição de hidroxiapatita na superfície das amostras estudadas. O equipamento utilizado foi o microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão de campo JEOL, JSM-6701F.

4.4.4 Análise térmica diferencial

Análises térmicas diferenciais foram realizadas utilizando equipamento da Setaram Labsys, empregando a faixa de temperatura ambiente até 900 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹ sob fluxo de ar sintético.

4.4.5 Área superficial específica

As áreas de superfície específica foram determinadas pela equação de Brunauer-Emmett-Teller, método BET, utilizando o instrumento Quanta Chrome Chem BET-Pulsar, equipado com um detector de condutividade térmica. Aproximadamente 0,05 g de amostra foram tratadas previamente, em fluxo de He a 200 °C durante 20 min e depois esfriado até à temperatura ambiente, para remoção de possíveis compostos orgânicos e água.

4.4.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Verificou-se a deposição de hidroxiapatita na superfície das amostras após imersão por 3, 7, 14 e 21 dias em SBF, pela técnica de infravermelho com transformada de Fourier. As análises foram efetuadas na região do infravermelho (4000 cm⁻¹ a 500 cm⁻¹), no modo de refletância total atenuada (ATR). O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro Nicolet 6700 FT-IR da Thermo Scientific, contendo detector MCT refrigerado por nitrogênio líquido com acessório de ATR da Pike Miracle e cristal detector de SeZn recoberto por diamante.

4.5 Teste de bioatividade *in vitro*

O teste de bioatividade *in vitro* foi realizado em colaboração com o Centro de Biotecnologia (IPEN), nas amostras SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B, utilizando o SBF. Preparou-se o SBF em uma garrafa de polipropileno, seguindo o protocolo de Kokubo e Takadama⁶⁰. Os reagentes foram adicionados na ordem apresentada pela Tabela 4.

Tabela 4 – Reagentes para preparação de 1L de SBF por meio do protocolo de Kokubo e Takadama

Ordem	Reagente	Quantidade (g)
1	NaCl	7,996
2	NaHCO ₃	0,350
3	KCl	0,224
4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,228
5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,305
6	HCl (1M)	40 ml
7	CaCl ₂	0,278
8	Na ₂ SO ₄	0,071
9	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,057

Fonte: Adaptado da referência 60.

O teste foi realizado, utilizando-se pastilhas de CaO-MgO-SiO₂ sinterizadas. Cada pastilha possui 1,57 cm² de área superficial e foi imersa em 5 mL de SBF (pH=7,40 e 37 °C) dentro de um tubo Falcon[®], por 3, 7, 14 e 21 dias. Dessa forma, a razão entre a superfície das pastilhas e volume de SBF foi mantida em 0,314 cm².cm⁻¹. Os tubos foram colocados em uma cuba, sob agitação mecânica, com o SBF sendo trocados a cada dois dias.

Após 3, 7, 14 e 21 dias de imersão, os tubos Falcon[®] foram retirados da cuba. As pastilhas foram lavadas em água deionizada e secas a temperatura ambiente. A modificação morfológica ocorrida na superfície das pastilhas foi verificada pelas técnicas de FT-IR e MEV-FEG.

4.6 Teste de citotoxicidade *in vitro*

Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram realizados em colaboração com o Centro de Biotecnologia (IPEN) nas amostras SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B de acordo com a norma ISO 10993-5:2009⁹³. O teste realizado foi a citotoxicidade indireta, e a preparação das amostras seguiu a norma NBR ISO 10993-12:2012⁹⁴.

4.6.1 Manutenção das células

O teste foi conduzido utilizando fibroblastos NIH/linhagem 3T3, cultivados com DMEM (meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco da Invitrogen) suplementado com 10 % de FBS (soro fetal bovino da Atená) e 1 % de solução antibiótica/antimitótica (Invitrogen) em um incubadora a 37 °C e aumento de 5 % de dióxido de carbono (CO₂). As células foram cultivadas até atingirem 80 % de confluência em um balão de cultura para células aderentes. As células foram separadas com uma solução de EDTA/tripsina (Sigma). As células na suspensão foram contadas em uma câmara de Neubauer para posteriormente serem semeadas em uma placa de 96 poços ou subcultura.

4.6.2 Preparação do extrato

O estudo da citotoxicidade foi realizado pelo método indireto. As amostras foram inicialmente esterilizadas em autoclave e o procedimento foi conduzido em fluxo laminar. As amostras foram imersas em meio de cultura suplementado para células NIH/3T3 colocadas em um tubo de centrífuga. Os tubos com a amostra e o meio de cultura na concentração de 3 cm².mL⁻¹ foram colocados em banho-maria a 37 °C por 72 h sob agitação suave.

4.6.3 Teste de citotoxicidade

Uma placa de 96 poços foi semeada com 2 x 10⁴ células por poço em 10 a 12 colunas por 24 h na incubadora a 37 °C e aumento de 5 % de dióxido de carbono (CO₂). Após esse tempo, o meio de cada poço foi trocado para o extrato das amostras SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B, o material de interesse; alumina como material de referência negativo; e látex como material de referência positivo. O extrato foi pipetado em coluna (n=8), por mais 24 h na

incubadora a 37 °C e aumento de 5 % de dióxido de carbono (CO₂). Após o segundo tempo de incubação, os extratos foram aspirados e pipetados no novo meio de cultura com MTS (Promega) e incubados novamente por 2 h na incubadora a 37 °C e aumento de 5 % de dióxido de carbono (CO₂). A cor amarelada ficou roxa quando as células vivas estavam na placa. A intensidade da cor pode ser medida em um espectrofotômetro ELISA ajustado em 490 nm. A viabilidade celular foi calculada pela seguinte equação:

$$CV (\%) = \frac{OD_c}{OD_s} \times 100$$

Onde: CV = viabilidade celular, OD c = células de controle da densidade óptica, OD s = densidade óptica do extrato da amostra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise térmica diferencial dos pós cerâmicos precursores

A técnica de ATD foi utilizada para determinar a temperatura na qual ocorre a cristalização dos pós cerâmicos precursores: SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B, conforme exibido na Fig. 13.

Figura 13 – ATD dos pós cerâmicos precursores: SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B

Fonte: Autor da dissertação.

Pela Fig. 13, observou-se a existência de picos endotérmicos em temperatura de aproximadamente 100 °C, possivelmente correspondentes à liberação de água, e picos exotérmicos em temperatura aproximadamente de 850 °C, podendo ser atribuídos a cristalização dos pós cerâmicos precursores. O valor experimental, obtido pelo ATD, está em acordo com o artigo de Tulyaganov et

al.⁶⁷ que exhibe, para o sistema CaO-MgO-SiO₂, valores de temperatura maior que 700 °C para ocorrer a cristalização.

Embasado nas informações fornecidas, pelo ATD, optou-se em utilizar a temperatura de 900 °C para calcinação das amostras e cristalização dos pós cerâmicos precursores. Desse modo, garantindo a formação de fases cristalinas para serem verificadas por DRX.

5.2 Difração de raios X dos pós cerâmicos precursores

Os espectros de DRX dos pós cerâmicos precursores SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B são apresentados nas figuras: Fig. 14, Fig. 15, Fig. 16, Fig. 17 e Fig. 18.

Para identificação das fases cristalinas, por interpretação qualitativa, utilizou-se os padrões de DRX no *software Crystallographica Search Match*. Assim, os picos observados nas amostras estudadas quando comparados com os padrões, foram consistentes com o banco de dados fornecido pelo ICDD⁹⁵ (*International Center for Diffraction Data*). Seguindo o modelo adotado no artigo de Choudhary et al.⁹⁶, pôde-se afirmar qualitativamente qual a principal fase em cada amostra.

Figura 14 – Espectro de DRX do pó precursor SA-SiNa, tratado termicamente a 900 ° C por 1 h

Fonte: Autor da dissertação.

Em SA-SiNa (Fig. 14) observa-se as fases wollastonita (CaSiO_3), monticelita (CaMgSiO_4), diopsídio ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) e akermanita ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$), de acordo com as fichas: PDF N° 76-186, PDF N° 35-590, PDF N° 83-1817 e PDF N° 87-50, respectivamente. Constatou-se que a fase wollastonita é a principal enquanto as demais são secundárias.

Figura 15 – Espectro de DRX do pó precursor SB-SiNa, tratado termicamente a 900 ° C por 1 h

Fonte: Autor da dissertação.

Na amostra SB-SiNa (Fig. 15) nota-se as fases wollastonita (CaSiO_3), diopsídio ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$), merwinita ($\text{Ca}_3\text{MgSi}_2\text{O}_8$), akermanita ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$) e quartzo (SiO_2), de acordo com as fichas: PDF N° 76-186, PDF N° 83-1817, PDF N° 35-591, PDF N° 87-50 e PDF N° 86-1562, respectivamente. Observou-se que diopsídio é a fase principal e as demais são secundárias.

Figura 16 – Espectro de DRX do pó precursor SAT-1, tratado termicamente a 900 ° C por 1 h

Fonte: Autor da dissertação.

Em SAT-1 (Fig. 16) encontram-se as fases wollastonita (CaSiO_3) e diopsídio ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$), de acordo com as fichas: PDF N° 76-186 e PDF N° 83-1817, respectivamente. Visualizou-se diopsídio como a fase majoritária enquanto wollastonita é a secundária.

Figura 17 – Espectro de DRX do pó precursor SAT-2A, tratado termicamente a 900 ° C por 1 h

Fonte: Autor da dissertação.

Em SAT-2A (Fig. 17) constata-se as fases wollastonita (CaSiO_3), diopsídio ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) e monticelita (CaMgSiO_4), de acordo com as fichas: PDF N° 76-186, PDF N° 83-1817 e PDF N° 35-590, respectivamente. Nesse espectro wollastonita é a fase principal e as outras duas são secundárias.

Figura 18 – Espectro de DRX do pó precursor SAT-2B, tratado termicamente a 900 ° C por 1 h

Fonte: Autor da dissertação

Por fim, em SAT-2B (Fig. 18) observa-se as fases diopsídio ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$), merwinita ($\text{Ca}_3\text{MgSi}_2\text{O}_8$), akermanita ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$) e bredigite ($\text{Ca}_7\text{MgSi}_4\text{O}_{16}$), de acordo com as fichas: PDF N° 83-1817, PDF N° 35-591, PDF N° 87-50 e PDF N° 36-399, respectivamente. A fase diopsídio é majoritária e as demais são secundárias. Observou-se que as amostras de pós cerâmicos sintetizados apresentam aspecto multifásico.

A relação entre as amostras, fases majoritárias e fórmulas químicas verificadas no DRX dos pós cerâmicos precursores são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Relação entre as amostras, fases majoritárias e fórmulas químicas verificadas no DRX dos pós cerâmicos precursores

Amostras	Precursor de Si	Fase majoritária	Formula Química
SA-SiNa	Na ₂ SiO ₃	Wolastonita	CaSiO ₃
SB-SiNa	Na ₂ SiO ₃	Diopsídio	CaMgSi ₂ O ₆
SAT-1	TEOS	Diopsídio	CaMgSi ₂ O ₆
SAT-2A	TEOS	Wolastonita	CaSiO ₃
SAT-2B	TEOS	Diopsídio	CaMgSi ₂ O ₆

Fonte: Autor da dissertação.

Os espectros de DRX, apresentados nas figuras: Fig. 14, Fig. 15, Fig. 16, Fig. 17 e Fig. 18, confirmaram a temperatura de cristalização (850 °C) dos pós cerâmicos precursores indicados por ATD na figura: Fig. 13. Essa confirmação foi embasada na análise dos espectros, que exibem picos bem definidos, referentes a formação de cristais multifásicos no tratamento térmico realizado a 900 °C.

O aspecto multifásico existente nos pós cerâmicos precursores é uma característica desejável para a aplicação biomédica. Chen et al.⁶⁶ sugere que materiais contendo característica multifásica são capazes de simular as propriedades dos ossos e dentes naturais, que também são multifásicos. De acordo com Salinas et al.⁹⁷ a cristalização desses materiais aparenta ser um modo eficiente para simular tecidos duros, sem considerar as propriedades mecânicas dos materiais.

As biocerâmicas de silicato^{70,98} formadas por óxidos ternários podem formar as fases cristalinas wollastonita (CaSiO₃), diopsídio (CaMgSi₂O₆), merwinita (Ca₃MgSi₂O₈), akermanita (Ca₂MgSi₂O₇), monticelita (CaMgSiO₄) e bredigite (Ca₇MgSi₄O₁₆), que por possuírem composições químicas diversificadas podem contribuir na obtenção de propriedades mecânicas como a resistência mecânica, bioatividade e degradação do vitrocerâmico adequadas para o ambiente fisiológico. Estudos indicam que a maioria das fases presentes em biocerâmicas de silicato⁷⁰ exibe propriedades mecânicas similares ao osso cortical, o que pode influenciar positivamente no processo de osteogênese, para ocorrer uma melhor integração entre esses vitrocerâmicos e o tecido vivo, através da formação de uma camada de hidroxiapatita na interface do material.

As amostras SB-SiNa, SAT-1 e SAT-2B apresentaram a fase diopsídio como majoritária em seus espectros. De acordo com Ning⁹⁸, o diopsídio exibe bioatividade visto que pode induzir a formação de hidroxiapatita (HA) em solução de SBF e a taxa de perda de massa nessa solução é pequena. No estágio inicial de formação de HA, a liberação de Ca da superfície do diopsídio, inicia-se de modo acelerado e eventualmente estabiliza-se, enquanto a liberação de Mg e Si é mais lenta possuindo valores de taxas similares.

As amostras SA-SiNa e SAT-2A exibem a fase wollastonita como majoritária em seus espectros. Novamente, de acordo com Ning⁹⁸, a wollastonita também exibe bioatividade visto que pode induzir a formação de hidroxiapatita (HA) em solução de SBF, sendo maiores a taxa de formação de HA e perda de massa em relação ao que ocorre nas demais fases.

Conforme explanado nos parágrafos acima, as fases diopsídio e wollastonita, nas amostras SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B devem possuir as características necessárias, para obtenção de resultados positivos nos testes de bioatividade *in vitro*.

5.3 Fluorescência de raios X dos pós cerâmicos precursores

As amostras foram analisadas por FRX, após calcinação a 900 °C por 1 h, para determinação semi-quantitativa dos teores de CaO, MgO e SiO₂. Utilizou-se o princípio dos parâmetros fundamentais baseados na porcentagem de óxidos totais para determinação dos teores apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – FRX dos teores de CaO, MgO e SiO₂, dos pós cerâmicos precursores, após calcinação a 900 °C por 1 h

Amostras	Valores em massa (%)		
	CaO	MgO	SiO ₂
Nominal (Referência)	43,19	7,68	49,13
SA-SiNa	50,48	9,88	36,73
SB-SiNa	35,55	8,01	53,39
SAT-1	35,19	10,96	49,97
SAT-2A	42,54	8,04	48,91
SAT-2B	49,85	6,80	40,69

Fonte: Autor da dissertação.

A composição em massa de CaO, MgO e SiO₂ para a referência foi apresentada na Tabela 6. De acordo com Chen et al.⁹² o material referência possui as fases cristalinas akermanita e wollastonita exibindo biocompatibilidade, bioatividade *in vitro* e propriedades mecânicas próximas ao do osso cortical²⁰.

Segundo a literatura^{7,43,63,76} o teor de SiO₂ determina a bioatividade do material, uma vez que o silício envolve-se no processo de mineralização do osso. Assim, fundamenta-se que teores entre 40–52 % em massa de sílica (SAT-1, SAT-2A e SAT-2B) exibem ligação rápida entre a superfície do material e o tecido, de 52–60 % (SB-SiNa) apresentam ligação lenta e maiores que 60 % não formam ligações ao exibir caráter inerte, devido a elevada estabilidade química do material. A amostra SA-SiNa apresenta composição com 36,73 % de SiO₂ e na literatura^{43,76,99}, valores próximos de 35 % não apresentam bioatividade, uma vez que ocorre desestabilização da rede tridimensional de silicatos devido a elevada concentração de cátions presentes no sistema.

Pela Tabela 6, verifica-se que as amostras SAT-1 e SAT-2A apresentaram teores de SiO₂ próximos a referência, assim as duas amostras devem possuir características adequadas de bioatividade. As amostras SB-SiNa e SAT-2B exibem teores de SiO₂ diferentes da referência, porém dentro da faixa de valores necessária para ocorrer uma ligação entre o material e o tecido, desse modo essas amostras podem exibir bioatividade.

As cinco amostras da Tabela 6, exibem teores de MgO acima da referência. De acordo com Vallet-Regí et al.¹⁰⁰, dentro do sistema CaO-MgO-SiO₂, a concentração de MgO influencia a cinética de formação da hidroxiapatita quando submetido a testes *in vitro* de bioatividade.

As amostras da Tabela 6 também apresentam teores de CaO acima da referência. De acordo com Ohtsuki et al.¹⁶, sugere-se que o aumento de Ca²⁺ permite uma maior troca iônica, durante a primeira etapa do processo de formação de HA em SBF, produzindo maior quantidade de ligações silanol que resultam em uma camada porosa de sílica gel. O desenvolvimento dessa camada porosa, permite uma elevada deposição de íons Ca²⁺ e (PO₄)³⁻ e rápida formação da camada de HA.

5.4 Microscopia eletrônica de varredura dos pós cerâmicos precursores

As micrografias dos pós cerâmicos precursores SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B são apresentadas nas figuras: Fig. 19, Fig. 20 e Fig. 21. Nestas micrografias observa-se a presença de aglomerados contendo tamanhos variados de até 100 μm , apresentando morfologia irregular e aparente aspecto poroso em sua superfície.

Na micrografia SA-SiNa (Fig. 19a) é possível visualizar que a maioria dos aglomerados exibe um aspecto superficial mais liso e denso relacionado ao processo de gelificação mais lento que forma moléculas de longas cadeias ramificadas na reação de catálise ácida realizada durante a síntese. Na micrografia SB-SiNa (Fig. 19b) observa-se aglomerados de aspecto superficial poroso, aparentemente fracos e com pequena concentração de partículas dispersas próximas ao centro da imagem, relacionado ao processo de gelificação mais rápido que forma pequenos aglomerados ramificados na reação de catálise básica realizada durante a síntese. Na micrografia SAT-1 (Fig. 20a) verifica-se aglomerados grandes (próximos de 100 μm) onde alguns aglomerados apresentam aspecto superficial poroso, enquanto outros exibem um aspecto superficial mais liso e denso. Em SAT-2A (Fig. 20b) nota-se alguns aglomerados de morfologia arredondada, com aspecto superficial poroso e em alguns aglomerados percebe-se que a superfície possui poros largos. Na micrografia SAT-2B (Fig. 21a) observam-se aglomerados grandes (próximos de 100 μm) e muitos desses aglomerados possuem aspecto superficial poroso, contendo poros amplos, enquanto poucos aglomerados exibem um aspecto superficial mais liso e denso. As características observadas nas micrografias SAT-1, SAT-2A e SAT-2B estão relacionadas ao processo de gelificação mais lento que forma moléculas de longas cadeias ramificadas na reação de catálise ácida realizada durante a síntese.

A existência de aglomerados visualizados nas micrografias dos pós cerâmicos precursores de SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B da figura: Fig.31 sugere que durante o tratamento térmico realizado a 900 °C ocorreu uma coalescência das partículas constituintes do pó.

Figura 19 – Micrografias obtidas por MEV dos pós cerâmicos precursores SA-SiNa (a) e SB-SiNa (b)

(a)

(b)

Fonte: Autor da dissertação.

Figura 20 – Micrografias obtidas por MEV dos pós cerâmicos precursores SAT-1 (a) e SAT-2A (b)

(a)

(b)

Fonte: Autor da dissertação.

Figura 21 – Micrografia obtidas por MEV do pó cerâmico precursor SAT-2B (a)

(a)

Fonte: Autor da dissertação.

Nas micrografias da superfície dos aglomerados de pós cerâmicos precursores de SA-SiNa (a), SB-SiNa (b), SAT-1 (c), SAT-2A (d) e SAT-2B (e), exibidas na figura: Fig. 22 é possível observar que a superfície desses aglomerados, após tratamento térmico a 900 °C, encontram-se em diferentes estágios de sinterização¹⁰¹. Na micrografia SA-SiNa (Fig. 22a) verifica-se a sinterização no estágio intermediário, devido à existência de poros abertos e crescimento de grãos com tamanho de alguns nanômetros. Em SB-SiNa (Fig. 22b) percebe-se a sinterização no estágio inicial, em razão dos pescoços formados entre as partículas. Em SAT-1 (Fig. 22c) constatou-se a sinterização no estágio final, uma vez que verifica-se a presença de contorno de grãos. Em SAT-2A (Fig. 22d) nota-se a existência de grãos formados em uma possível matriz, sem a presença de poros. Em SAT-2B (Fig. 22e) observa-se a formação de pescoço entre as partículas, indicando estágio inicial de sinterização e nessa micrografia existe indício da formação de outra fase cristalina devido a existente de uma protuberância com um aspecto diferenciado na imagem.

Figura 22 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos aglomerados dos pós cerâmicos precursores de SA-SiNa (a), SB-SiNa (b), SAT-1 (c), SAT-2A (d) e SAT-2B (e)

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

Fonte: Autor da dissertação.

5.5 Área superficial específica por método BET

Os valores de área superficial específica dos pós cerâmicos precursores SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B, determinados por método BET, são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Área superficial específica dos pós cerâmicos precursores

Amostras	Área superficial específica (m².g⁻¹)
SA-SiNa	3,613
SB-SiNa	19,130
SAT-1	0,669
SAT-2A	0,708
SAT-2B	2,871

Fonte: Autor da dissertação.

Na Tabela 7, pode-se perceber que as amostras exibem valores, de área superficial específica, muito inferiores ao observado em artigos de síntese de pós cerâmicos a base de sílica por sol-gel¹⁰², sendo da ordem de algumas centenas de m².g⁻¹. Os baixos valores exibidos na Tabela 7 estão em acordo com as micrografias obtidas por MEV das figuras: Fig. 19, Fig. 20 e Fig. 21, onde foi possível verificar diferentes estágios de sinterização, que indicam a redução de poros e consequentemente a área superficial específica dos pós.

Pela tabela 7, verifica-se que as amostras SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B possuem diferentes valores de área superficial específica. Os valores de SAT-1, SAT-2A e SAT-2B indicam que a sinterização foi maior, visto que essas amostras possivelmente apresentam elevada energia superficial¹⁰¹ e por esse motivo sinterizaram na temperatura de calcinação. Os valores de área superficial específica das amostras SA-SiNa e SB-SiNa indicam que possivelmente exibem menor energia superficial.

5.6 Difração de raios X do corpo cerâmico conformado

Os espectros de DRX dos corpos cerâmicos SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B são apresentados nas figuras: Fig. 23, Fig. 24, Fig. 25, Fig. 26 e Fig. 27. Nesses espectros, a cor vermelha e notação 1200 °C são referentes ao

corpo cerâmico conformado, enquanto a cor preta e notação 900 °C são os do pó cerâmico precursor. Comparando-se os espectros de DRX obtidos para os corpos cerâmicos com os dos pós cerâmicos precursores, observa-se que as amostras sinterizadas mantiveram o aspecto multifásico observado anteriormente nos pós precursores calcinados.

Novamente utilizou-se o *software Crystallographica Search Match* para identificação das fases cristalinas por interpretação qualitativa. Os picos exibidos nas amostras sinterizadas quando comparados com os padrões, foram consistentes com o banco de dados fornecido pelo ICDD⁹⁵. Seguindo o modelo adotado por Choudhary et al.⁹⁶, pôde-se afirmar qualitativamente qual a principal fase em cada amostra.

Figura 23 – Espectro de DRX do corpo cerâmico SA-SiNa, sinterizado a 1200 °C por 2 h e do pó cerâmico precursor calcinado a 900 °C por 1 h

Fonte: Autor da dissertação.

Em SA-SiNa (Fig. 23) observa-se as fases wollastonita, monticelita, diopsídio e akermanita, de acordo com as fichas: PDF N° 76-186, PDF N° 35-590, PDF N° 83-1817 e PDF N° 87-50, respectivamente. Constatou-se que a fase wollastonita é a principal enquanto as demais são secundárias.

Figura 24 – Espectro de DRX do corpo cerâmico SB-SiNa, sinterizado a 1200 ° C por 2 h e do pó cerâmico precursor calcinado a 900 °C por 1 h

Fonte: Autor da dissertação.

Na amostra SB-SiNa (Fig. 24) nota-se as fases wollastonita, diopsídio, merwinita, akermanita e quartzo, de acordo com as fichas: PDF N° 76-186, PDF N° 83-1817, PDF N° 35-591, PDF N° 87-50 e PDF N° 86-1562, respectivamente. Observou-se que diopsídio é a fase principal e as demais são secundárias.

Figura 25 – Espectro de DRX do corpo cerâmico SAT-1, sinterizado a 1200 ° C por 2 h e do pó cerâmico precursor calcinado a 900 °C por 1 h

Fonte: Autor da dissertação.

Em SAT-1 (Fig. 25) encontram-se as fases wollastonita e diopsídio, de acordo com as fichas: PDF N° 76-186 e PDF N° 83-1817, respectivamente. Visualizou-se diopsídio como a fase majoritária enquanto wollastonita é a secundária.

Figura 26 – Espectro de DRX do corpo cerâmico SAT-2A, sinterizado a 1200 ° C por 2 h e do pó cerâmico precursor calcinado a 900 °C por 1 h

Fonte: Autor da dissertação.

Em SAT-2A (Fig. 26) constata-se as fases wollastonita, diopsídio e monticelita, de acordo com as fichas: PDF N° 76-186, PDF N° 83-1817 e PDF N° 35-590, respectivamente. Nesse espectro wollastonita é a fase principal e as outras duas são secundárias.

Figura 27 – Espectro de DRX do corpo cerâmico SAT-2B, sinterizado a 1200 °C por 2 h e do pó cerâmico precursor calcinado a 900 °C por 1 h

Fonte: Autor da dissertação.

Por fim em SAT-2B (Fig. 27) observa-se as fases diopsídio, merwinita, akermanita e bredigite, de acordo com as fichas: PDF N° 83-1817, PDF N° 35-591, PDF N° 87-50 e PDF N° 36-399, respectivamente. A fase akermanita é majoritária e as demais são secundárias. A relação entre as amostras, fases majoritárias e fórmulas químicas verificadas no DRX dos corpos cerâmicos conformados são apresentadas na Tabela 8.

Os espectros de DRX dos corpos cerâmicos conformados (espectros de cor vermelha), apresentados nas figuras: Fig. 23, Fig. 24, Fig. 25, Fig. 26 e Fig. 27 aparentam um aumento em sua cristalinidade devido ao aumento da intensidade dos picos e redução na linha base dos espectros. Pode-se relacionar o aumento da cristalinidade, apresentada pelos corpos cerâmicos, devido ao tratamento térmico realizado a 1200 °C por 2 h.

Tabela 8 – Relação entre as amostras, fases majoritárias e fórmulas químicas verificadas no DRX dos corpos cerâmicos conformados

Amostras	Precursor de Si	Fase majoritária	Formula Química
SA-SiNa	Na_2SiO_3	Wolastonita	CaSiO_3
SB-SiNa	Na_2SiO_3	Diopsídio	$\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$
SAT-1	TEOS	Diopsídio	$\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$
SAT-2A	TEOS	Wolastonita	CaSiO_3
SAT-2B	TEOS	Akermanita	$\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$

Fonte: Autor da dissertação.

Na amostra SB-SiNa (Fig. 24) verifica-se a existência de um pico intenso de quartzo, em 2θ próximo a 20° , no espectro do corpo cerâmico conformado em vermelho, que pode ser explicado devido a uma dissolução parcial ocorrida em uma das fases cristalinas secundárias existentes nessa amostra, durante o tratamento térmico realizado a 1200°C . É provável que a sílica livre, da dissolução de uma das fases cristalinas secundárias cristalizou-se na forma de quartzo livre durante a etapa de resfriamento. Por entender-se que o silício participa do processo de mineralização dos ossos^{63,70} acredita-se que a presença de quartzo livre não comprometerá os resultados dos testes *in vitro*.

Na amostra SAT-1 (Fig. 25) verifica-se que o pico de wollastonita, em 2θ próximo a 20° no espectro do pó cerâmico precursor em preto, não está presente no espectro do corpo cerâmico conformado em vermelho. A ausência desse pico pode ser explicado devido a possível dissolução dessa fase cristalina durante o tratamento térmico a 1200°C . É provável que os componentes da fase wollastonita, referentes a esse pico, tenham sido incorporados as demais fases presentes no espectro do corpo cerâmico conformado, desse modo elevando sua cristalinidade.

Nas amostras SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B, referentes ao corpo cerâmico conformado exibidos nas figuras: Fig. 23, Fig. 24, Fig. 25, Fig. 26 e Fig. 27, observou-se que ocorreu uma preservação das fases cristalinas obtidas no tratamento térmico realizado a 900°C por 1 h e verificadas nas figuras: Fig. 14, Fig. 15, Fig. 16, Fig. 17 e Fig. 18. A preservação dessas fases foi aguardada, visto que a sinterização ocorreu em baixas temperaturas⁶⁷ para o sistema estudado.

Os corpos cerâmicos conformados SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B por apresentarem as fases majoritárias wollastonita (CaSiO_3), diopsídio ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) e akermanita ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$) possuem comportamentos reativos diferentes em relação a formação da camada interfacial de hidroxiapatita (HA). Entende-se que a habilidade de formar uma camada de HA⁷⁰ na superfície do vitrocerâmico, para as fases verificadas no DRX, está diretamente relacionada com a composição química e taxa de degradação (perda de massa) da fase durante as etapas do mecanismo de formação de HA. Desse modo, estudos⁷⁰ indicam que a wollastonita exibe a melhor habilidade para formação de HA na superfície do vitrocerâmico, junto de uma elevada taxa de degradação. Na akermanita, em relação à wollastonita, a taxa de formação de HA é maior e a de degradação é moderada. No diopsídio, em relação à wollastonita e akermanita, a taxa para formar HA é moderada e a de degradação é baixa.

Os corpos cerâmicos foram conformados e sinterizados para garantir que não acontecesse uma possível degradação destes corpos, durante a realização dos testes *in vitro*. A preparação para o teste de citotoxicidade ocorreu de acordo com a norma NBR ISO 10993-12:2012⁹⁴, onde é necessário que a relação entre a superfície da amostra, do corpo cerâmico conformado, e o volume do meio de cultura contendo soro fetal bovino (10%) e antibióticos (1%) seja $3 \text{ cm}^2.\text{mL}^{-1}$.

5.7 Testes de bioatividade *in vitro*

5.7.1 Verificação de hidroxiapatita por FT-IR

Os espectros de FT-IR dos corpos cerâmicos conformados SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B, antes e depois de ocorrer a imersão em SBF pelo período de 3, 7, 14 e 21 dias são apresentados nas figuras: Fig. 28, Fig. 29 e Fig. 30.

No espectro das amostras indicado por 0 dias observa-se a existência de banda típica para a sílica, pois segundo a literatura^{103,104} ocorre um pico na região próxima de 2500 cm^{-1} e um pico menos intenso na região de 600 cm^{-1} . A primeira região corresponde a ligação silanol, enquanto a segunda região exibe a ligação siloxano. Nos espectros indicados por 3, 7, 14 e 21 dias verifica-se a

existência de bandas típicas que podem ser atribuídas a hidroxiapatita¹⁰⁵, devido a identificação de ligações $(\text{PO}_4)^{3-}$ e $(\text{CO}_3)^{2-}$ na superfície do corpo cerâmico. As bandas identificadas, após imersão em SBF, exibem picos intensos de absorção no infravermelho entre $1000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ para $(\text{PO}_4)^{3-}$ e entre $1380\text{--}1580\text{ cm}^{-1}$ para $(\text{CO}_3)^{2-}$, respectivamente^{106–108}. Segundo Slósarczyk et al.¹⁰⁷ os grupos $(\text{CO}_3)^{2-}$ e $(\text{PO}_4)^{3-}$ também apresentam picos brandos aproximadamente em 870 cm^{-1} e 963 cm^{-1} , respectivamente. Verifica-se que os espectros da superfície dos corpos cerâmicos conformados, antes e depois da imersão em SBF, exibiram valores para a banda de absorção em acordo com a literatura.

Figura 28 – Espectro de FT-IR do corpo cerâmico SA-SiNa (a) e SB-SiNa (b), após imersão em SBF por 3, 7, 14 e 21 dias

(a)

(b)

Fonte: Autor da dissertação.

Figura 29 – Espectro de FT-IR do corpo cerâmico SAT-1 (a) e SAT-2A (b), após imersão em SBF por 3, 7, 14 e 21 dias

(a)

(b)

Fonte: Autor da dissertação.

Figura 30 – Espectro de FT-IR do corpo cerâmico SAT-2B (a), após imersão em SBF por 3, 7, 14 e 21 dias

(a)

Fonte: Autor da dissertação.

Os valores das bandas de absorção, antes e depois da imersão em SBF por 21 dias, referente a superfície dos corpos cerâmicos conformados foram agrupados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores referentes as bandas de absorção na superfície das cerâmicas após imersão em SBF por 21 dias

Amostras	Picos Intensos			Picos Brandos		
	Sílica	$(\text{PO}_4)^{3-}$	$(\text{CO}_3)^{2-}$	Sílica	$(\text{PO}_4)^{3-}$	$(\text{CO}_3)^{2-}$
SA-SiNa	2355	1022	1508	681	—	869
SB-SiNa	2355	1020	1510	681	960	862
SAT-1	2355	1022	1510	681	960	863
SAT-2A	2355	1016	1510	681	—	863
SAT-2B	2355	1022	1510	681	—	869

Fonte: Autor da dissertação.

Pelos espectros de SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B nas figuras: Fig. 28, Fig. 29 e Fig. 30 observa-se que as cinco amostras identificadas

por 0 dias, referente ao corpo cerâmico antes da realização do teste *in vitro* para bioatividade em SBF, possuem bandas típicas para as ligações silanol e siloxano identificadas em sua superfície, de acordo com a análise de FT-IR. O dado obtido demonstrou que a superfície dos corpos cerâmicos analisados foram constituídas principalmente por Si após realizar-se a sinterização. Nas mesmas figuras observa-se que as amostras identificadas por 3, 7, 14 e 21 dias, referente ao corpo cerâmico depois da realização do teste *in vitro* para bioatividade em SBF, exibem as ligações dos grupos $(\text{PO}_4)^{3-}$ e $(\text{CO}_3)^{2-}$ em sua superfície. Os dados obtidos, após o teste *in vitro*, podem ser relacionados com as etapas do mecanismo de formação da hidroxiapatita^{7,63,64} que recobriu a superfície das amostras, durante a realização o teste no período determinado e alterou as ligações químicas que foram verificadas anteriormente. Através desse mecanismo entende-se que ocorreu uma deposição de íons $(\text{PO}_4)^{3-}$ e $(\text{CO}_3)^{2-}$ na superfície dos corpos cerâmicos conformados, para que desse modo fosse formada a camada globular típica de hidroxiapatita através das ligações químicas que ocorrem entre a sílica, existente na superfície das amostras e os grupos químicos determinados pela análise de FT-IR.

Através da análise de FT-IR verificou-se que as amostras em 0 dias possuem bandas típicas da sílica em sua superfície, e após a imersão em SBF essas mesmas amostras em 3, 7, 14 e 21 dias possuem bandas típicas de fosfato e carbonato na sua superfície. A modificação ocorrida nas bandas de absorção das amostras analisadas, durante o período determinado, identificam que houve a formação de hidroxiapatita na superfície das amostras estudadas.

5.7.2 Observação de hidroxiapatita por MEV

As micrografias do corpo cerâmico conformado SAT-2A, após imersão em SBF por 3, 7, 14 e 21 dias, são apresentadas na figura: Fig. 31. Informa-se que as micrografias de SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1 e SAT-2B, para o mesmo período de tempo, apresentaram resultados semelhantes. Nessas micrografias verificou-se uma gradual formação de hidroxiapatita (HA) na superfície de SAT-2A, conforme transcorreu-se os dias.

A Fig. 31 (a) exhibe a superfície da amostra SAT-2A antes da imersão em solução de SBF, verificando-se uma microestrutura de grãos diferenciados de

tamanho variado, que estão associados uns aos outros devido ao processo de sinterização. Na Fig. 31 (b) observa-se que a superfície da amostra SAT-2A após imersão de 3 dias no SBF foi recoberta por uma fina camada de aparência cristalizada (cor cinza claro), que pode representar a etapa de cristalização^{63,64} da camada amorfa de $\text{CaO-P}_2\text{O}_6$ devido a incorporação dos íons OH^- ou $(\text{CO}_3)^{2-}$ nessa camada, indicando o início de formação de HA. Transcorrido 7 dias após imersão em SBF, na Fig. 31 (c) verifica-se que o crescimento da camada de HA iniciou-se na superfície de SAT-2A devido a formação de glóbulos de aspecto fibroso^{109,110} que aos poucos recobrem o corpo cerâmico conformado. Na Fig. 31 (d), após transcorrer 14 dias, verifica-se que ocorreu um desenvolvimento desses glóbulos ao iniciar a formação de uma camada globular de aspecto fibroso, devido a união que acontece entre os glóbulos. Por fim, na Fig. 31 (e), após 21 dias, verifica-se que a superfície de SAT-2A foi completamente recoberta pela camada globular de aspecto fibroso. Utilizando-se uma menor ampliação na micrografia da Fig. 31 (f), referente a amostra SAT-2A imersa em SBF após 21 dias, é possível observar que a camada globular típica de HA exibiu um recobrimento homogêneo ao longo da superfície do corpo cerâmico conformado.

As micrografias do corpo cerâmico conformado após imersão em SBF apresentadas nas figuras: Fig. 31 e Fig. 32, confirmam a formação de HA indicada por FT-IR nas figuras: Fig. 28, Fig. 29 e Fig. 30. Essa confirmação foi embasada na análise visual das micrografias, que exibem uma gradual formação da camada globular típica de hidroxiapatita na superfície das amostras estudadas.

As amostras SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B exibem elevada cristalinidade, conforme verificou-se nos espectros de DRX dos corpos cerâmicos conformados, e de acordo com a literatura¹¹¹ essa característica melhora a adesão da camada de HA na superfície do vitrocerâmico em relação ao vidro bioativo. Os motivos que permitem ocorrer uma melhor adesão de HA na superfície do vitrocerâmico ainda não são completamente compreendidos e poucas explicações foram apontadas na literatura. Desse modo sugere-se que a superfície dos vitrocerâmicos¹¹¹ ofereçam estruturas dispostas adequadamente (sítios específicos) que servem de suporte para ocorrer o crescimento da camada globular, conforme observado nas figuras: Fig. 31 e Fig. 32.

Os corpos cerâmicos conformados SA-SiNa e SAT-2A possuem a fase cristalina majoritária diopsídio ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$), identificada por DRX, e após serem

imersos em SBF por 21 dias apresentaram a formação de camadas globulares fibrosas semelhantes entre si, de acordo com as micrografias nas figuras: Fig. 31 (e) e Fig. 32 (a). Os corpos cerâmicos SB-SiNa e SAT-1 apresentam wollastonita (CaSiO_3) como fase cristalina majoritária, e de acordo com as micrografias nas figuras: Fig. 32 (b) e Fig. 32 (c), verificou-se a formação de camadas globulares fibrosas semelhantes entre si após 21 dias em SBF. Em SAT-2B, a fase cristalina majoritária é akermanita ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$) e através da figura: Fig. 32 (d) observou-se uma camada globular fibrosa diferente das anteriores na superfície desse corpo cerâmico conformado. As teorias que possivelmente relacionam as fases cristalinas existentes no vitrocerâmico com as características topográficas exibidas pela camada globular fibrosa são muito escassas. Desse modo sugere-se que a composição química dos vitrocerâmicos, concentração de cálcio liberado na solução de SBF, a velocidade de liberação dos íons para iniciar o mecanismo de formação da hidroxiapatita e os sítios específicos existentes na superfície dos corpos cerâmicos conformados influenciaram na forma como as camadas globulares de HA foram formadas.

Apesar da amostra SA-SiNa apresentar concentração de 35 % de SiO_2 , de acordo com o resultado de FRX, supostamente não exibindo bioatividade, foi possível observar o recobrimento de sua superfície por uma camada globular de aspecto fibroso conforme exibida na micrografia da Fig. 32 (a), após imersão em SBF por 21 dias. O recobrimento da superfície de SA-SiNa provavelmente ocorreu devido a alta concentração de Ca que induziu uma maior troca iônica, durante a primeira etapa do mecanismo de formação de HA, produzindo maior quantidade de ligações silanol que resultam em uma maior quantidade da camada porosa de sílica gel utilizada para adsorver os íons Ca^{2+} e $(\text{PO}_4)^{3-}$ presentes no SBF e formar uma camada amorfa de $\text{CaO-P}_2\text{O}_6$ iniciando a formação da camada globular típica.

De acordo com Vallet-Regí et al.¹⁰⁰ o teor de 4,58 % em massa de MgO pode reduzir a cinética de formação de HA nas etapas 4 e 5 do mecanismo de bioatividade, porém observou-se que após 3 dias ocorreu a formação de uma camada de aspecto cristalizado na superfície das amostras imersas em SBF. Conforme verificado nas análises de FT-IR, essa camada de aspecto cristalizado exhibe a presença de ligações de fosfato e carbonato que indicam o início da formação de HA.

A partir dos dados obtidos verificou-se que as amostras SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B exibiram bioatividade, visto que as fases cristalinas²⁰ majoritárias wollastonita, diopsídio e akermanita apresentam uma composição química que favoreceu a formação de HA na solução de SBF. Essas composições possuem uma concentração de Ca adequada, conforme verificou-se por FRX, permitindo o início do mecanismo de formação de HA na superfície do corpo cerâmico conformado. Desse modo, as amostras estudadas estão em acordo com a literatura e apresentaram um mecanismo de formação de HA⁹² análogo ao estudado no Bioglass[®] (45S5), proposto por Larry Hench.

Figura 31 – Micrografias do corpo cerâmico conformado de SAT-2A antes (a) e depois de ser imersa em SBF por 3 (b), 7 (c), 14 (d) e 21 (e) dias. Em (f) visualiza-se SAT-2A após imersão em 21 dias com ampliação de 400 vezes

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

Fonte: Autor da dissertação.

Na Fig. 32 observa-se as micrografias das amostras SA-SiNa (a), SB-SiNa (b), SAT-1 (c) e SAT-2B (d) imersas em SBF durante 21 dias. Através dessas micrografias foi possível verificar o completo recobrimento da superfície dos corpos cerâmicos conformados por uma camada globular típica de HA.

Figura 32 – Micrografias das amostras SA-SiNa (a), SB-SiNa (b), SAT-1 (c) e SAT-2B (d) imersas em SBF durante 21 dias indica formação da camada globular típica de HA

Fonte: Autor da dissertação.

5.8 Testes de citotoxicidade *in vitro*

Realizaram-se testes de citotoxicidade *in vitro* para determinar a toxicidade dos corpos cerâmicos conformados SA-SiNa, SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B previamente esterilizados, assim como possíveis toxicidades ocorridas por contaminação durante as etapas de prensagem e sinterização do material.

O gráfico de colunas, representado na Fig. 33, exibe o resultado do teste de citotoxicidade indireta, cujo ensaio de viabilidade celular¹¹² triou moléculas, obtidas a partir do extrato líquido das amostras, que possuem efeitos tóxicos na proliferação de fibroblastos e eventualmente conduzem essa célula a morte. Utilizou-se células fibroblásticas (controle), material de referência negativo alumina (não citotóxico) e referência positivo látex (citotóxico) como parâmetros, para determinação da concentração de células que foram conduzidas a morte devido ao contato com as possíveis moléculas tóxicas, presentes no extrato líquido.

Figura 33 – Gráfico exibindo o resultado do teste de citotoxicidade indireta do ensaio de viabilidade celular

Fonte: Autor da dissertação.

Os resultados observados na Fig. 33 revelam que as amostras não são citotóxicas, uma vez que as colunas SB-SiNa, SAT-1, SAT-2A e SAT-2B exibiram viabilidade celular aproximadamente maior ou igual a 90 %, enquanto a coluna de SA-SiNa apresentou viabilidade celular maior que 70 %. A não toxicidade exibida pelas amostras está em acordo com a norma ISO 10993-5:2009⁹³ responsável por definir os parâmetros existentes no teste de citotoxicidade indireta. Esse

parâmetro define uma taxa de sobrevivência celular maior ou igual a 70 %, como valor limite para o teste ser considerado adequado.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, sintetizou-se pós cerâmicos de aspecto multifásico no sistema CaO-MgO-SiO₂, sendo quatro amostras obtidas através da metodologia proposta e uma amostra por método sol-gel convencional.

Constatou-se que as temperaturas de cristalização para a obtenção das fases wollastonita, monticelita, diopsídio, akermanita, merwinita e bredigite, nas amostras sintetizadas, são muito próximas do valor de 850 °C.

Os pós cerâmicos calcinados a 900 °C por 1 h, apresentaram valores muito baixos de área superficial específica, determinado pelo método BET, devido a ocorrência de sinterização na temperatura de calcinação escolhida.

O tempo necessário para ocorrer a formação de uma camada de hidroxiapatita nos testes *in vitro*, referente as amostras sinterizadas, foi de 3 dias sendo um tempo menor quando comparado aos resultados da literatura. Todas as amostras estudadas exibiram a presença de camada globular típica semelhantes entre si (camada de hidroxiapatita) e após 21 dias imersos em SBF verificou-se que as superfícies dessas amostras estavam totalmente recobertas.

As amostras sinterizadas não apresentaram toxicidade, durante a realização do teste de citotoxicidade, uma vez que o ensaio de viabilidade celular indicou uma concentração de fibroblastos vivos maior que 70 %, estando em acordo com a norma ISO 10993-5:2009.

Em vista dos resultados experimentais apresentados verificou-se que a metodologia proposta pelo escopo do trabalho (consistindo da combinação do método sol-gel com coprecipitação), apesar de diferir do método sol-gel convencional, produziu pós cerâmicos que exibiram propriedades de bioatividade e não toxicidade semelhantes as encontradas na literatura. Desse modo, os pós cerâmicos sintetizados pelo método proposto possuem potencial aplicação na área médica.

Por fim, após a análise dos resultados positivos, apresentados neste trabalho, o método proposto (não descrito na literatura) poderá ser aplicado na obtenção de pós cerâmicos referentes a outros sistemas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HILDEBRAND, H.F. Biomaterials – a history of 7000 years. **BioNanoMaterials**, v. 14, n. 3–4, p. 119–133, 2013.
2. BAUER, S.; SCHMUKI, P.; VON DER MARK, K.; PARK, J. Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces. **Progress in Materials Science**, v. 58, n. 3, p. 261–326, 2013.
3. BERGMANN, C.P.; STUMPF, A. Biomaterials. In: **Dental Ceramics. Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering**. Berlin, Heidelberg: Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 9–13.
4. CHEN, Q.; THOUAS, G.A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 87, p. 1–57, 2015.
5. SAKAGUCHI, R.; FERRACANE, J.; POWERS, J. Biocompatibility and Tissue Reaction to Biomaterials. In: **Craig's Restorative Dental Materials**. Elsevier, 2012. p. 109–133.
6. DOS SANTOS, V.; BRANDALISE, R. N.; SAVARIS, M. Biomaterials: Characteristics and Properties. In: **Engineering of Biomaterials**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 5–15.
7. PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, Â.M. Biomaterials: types, applications and market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.
8. SIRAPARAPU, Y.D.; BASSA, S.; SANASI, P.D. A Review on Recent Applications of Biomaterials. **International Journal of Science and Research**, p. 70–75, 2014.
9. RAGHAVENDRA, G.M.; VARAPRASAD, K.; JAYARAMUDU, T. Biomaterials: design, development and biomedical applications. In: **Nanotechnology Applications for Tissue Engineering**. Elsevier, 2015. p. 21–44.

10. ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura médica, 2006. p. 59–83.
11. SÁENZ, A.; RIVERA–MUÑOZ, E.; BROSTOW, W.; CASTAÑO, V.M. Ceramic biomaterials: an introductory overview. **Journal of Materials Education**, v. 21, n. 5–6, p. 297–306, 1999.
12. HULBERT, S.F.; HENCH, L.L.; FORBERS, D.; BOWMAN, L.S. History of bioceramics. **Ceramics International**, v. 8, n. 4, p. 131–140, 1982.
13. PARIDA, P.; BEHERA, A.; MISHRA, S.C. Classification of biomaterials used in medicine. **International Journal of Advances in Applied Sciences (IJAAS)**, v. 1, n. 3, p. 31–35, 2012.
14. GINEBRA, M.-P.; ESPANOL, M.; MAAZOUZ, Y.; BERGEZ, V.; PASTORINO, D. Bioceramics and bone healing. **EFORT Open Reviews**, v. 3, n. 5, p. 173–183, 2018.
15. ZHU, Y.; LIU, Q.; XU, P.; LI, P.; JIANG, H.; BAI, Y. Bioactivity of calcium phosphate bioceramic coating fabricated by laser cladding. **Laser Physics Letters**, v. 13, n. 5, p. 1–6, 2016.
16. OHTSUKI, C.; KAMITAKAHARA, M.; MIYAZAKI, T. Bioactive ceramic-based materials with designed reactivity for bone tissue regeneration. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 6, n. 3, p. 349–360, 2009.
17. HENCH, L.L. Bioceramics: From Concept to Clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487–1510, 1991.
18. SHEPHERD, J.H.; FRIEDERICH, R.J.; BEST, S.M. Synthetic hydroxyapatite for tissue engineering applications. In: **Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications**. Elsevier, 2015. p. 235–267.
19. HUANG, J.; BEST, S. Ceramic biomaterials for tissue engineering. In: **Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers**. 2° ed. Oxford: Elsevier, 2014. p. 3–34.

20. MOHAMMADI, H.; SEPANTAFAR, M.; OSTADRAHIMI, A. The Role of Bioinorganics in Improving the Mechanical Properties of Silicate Ceramics as Bone Regenerative Materials. **Journal of Ceramic Science and Technology**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2015.
21. ESSIEN, E.R.; ATASIE, V.N.; UDOBANG, E.U. Microwave energy-assisted formation of bioactive CaO–MgO–SiO₂ ternary glass from bio-wastes. **Bulletin of Materials Science**, v. 39, n. 4, p. 989–995, 2016.
22. DIBA, M.; GOUDOURI, O.; TAPIA, F.; BOCCACCINI, A.R. Magnesium-containing bioactive polycrystalline silicate-based ceramics and glass-ceramics for biomedical applications. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 18, n. 3, p. 147–167, 2014.
23. LOMBARDI, M.; GREMILLARD, L.; CHEVALIER, J.; LEFEBVRE, L.; CACCIOTTI, I.; BIANCO, A.; MONTANARO, L. A Comparative Study between Melt-Derived and Sol-Gel Synthesized 45S5 Bioactive Glasses. **Key Engineering Materials**, v. 541, p. 15–30, 2013.
24. LI, P.; OHTSUKI, C.; KOKUBO, T.; NAKANISHI, K.; SOGA, N.; NAKAMURA, T.; YAMAMURO, T. Apatite Formation Induced by Silica Gel in a Simulated Body Fluid. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 75, n. 8, p. 2094–2097, 1992.
25. MARTIN, R.A.; YUE, S.; HANNA, J.V.; LEE, P.D.; NEWPORT, R.J.; SMITH, M.E.; JONES, J.R. Characterizing the hierarchical structures of bioactive sol-gel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 370, n. 1963, p. 1422–1443, 2012.
26. SALERNO, A.; NETTI, P.A. Introduction to biomedical foams. In: **Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications**. Elsevier, 2014. p. 3–39.
27. OTHMAN, Z.; CILLERO PASTOR, B.; VAN RIJT, S.; HABIBOVIC, P. Understanding interactions between biomaterials and biological systems using proteomics. **Biomaterials**, v. 167, p. 191–204, 2018.

28. TEMENOFF, J.S.; MIKOS, A.G. **Biomaterials: the Intersection of biology and materials science**. Upper Saddle River, N.J: Pearson/Prentice Hall, 2008. p. 1–21.

29. **Biomaterials - an Overview**. 2001. Disponível em: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=108>>. Acesso em: 11 abr. 2019.

30. HUDECKI, A.; KIRYCZYŃSKI, G.; ŁOS, M.J. Biomaterials, Definition, Overview. In: **Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine**. Elsevier, 2019. p. 85–98.

31. CALLISTER J.R.; WILLIAM D. **Fundamentos da ciência e engenharia de materiais**. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2006.

32. ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A.; BOSE, S. Ceramics in Bone Grafts and Coated Implants. In: **Materials for Bone Disorders**. Elsevier, 2017. p. 265–314.

33. ARCOS, D.; VALLET-REGÍ, M. Bioceramics for drug delivery. **Acta Materialia**, v. 61, n. 3, p. 890–911, 2013.

34. VYAS, C.; POOLOGASUNDARAMPILLAI, G.; HOYLAND, J.; BARTOLO, P. 3D printing of biocomposites for osteochondral tissue engineering. In: **Biomedical Composites**. Elsevier, 2017. p. 261–302.

35. HENCH, L.L. Bioceramics: Research and Development Opportunities. **Brazilian Journal of Physics**, v. 22, n. 2, p. 70–76, 1992.

36. BOCCACCINI, A.R. Ceramics. In: **Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering**. Elsevier, 2005. p. 26–36.

37. HENCH, L.L. Bioceramics. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 81, n. 7, p. 1705–1728, 1998.

38. SHANMUGAM, K.; SAHADEVAN, R. Bioceramics — an introductory overview. In: **Fundamental Biomaterials: Ceramics**. Elsevier, 2018. p. 1–46.
39. ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**, v. 10, n. 2, p. 96–101, 2001.
40. LEMONS, J.E. Ceramics: Past, present, and future. **Bone**, v. 19, n. 1, p. S121–S128, 1996.
41. BAINO, F.; HAMZEHLLOU, S.; KARGOZAR, S. Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going? **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, p. 25, 2018.
42. HENCH, L.L.; SPLINTER, R.J.; ALLEN, W.C. GREENLEE, T.K. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 5, n. 6, p. 117–141, 1971.
43. EL-MELIEGY, E.; VAN NOORT, R. Bioactive Glasses. In: **Glasses and Glass Ceramics for Medical Applications**. New York, NY: Springer New York, 2012. p. 221–227.
44. HÖLAND, W.; BEALL, G.H. Principles of designing glass-ceramic formation In: **Glass-ceramic technology**. Hoboken, N.J.: Wiley : American Ceramic Society, 2012. p. 1–74.
45. RAWLINGS, R.D.; WU, J.P.; BOCCACCINI, A.R. Glass-ceramics: Their production from wastes—A Review. **Journal of Materials Science**, v. 41, n. 3, p. 733–761, 2006.
46. CADIOLI, L.P.; BAITILO, L.G. Materiais cerâmicos: Um estudo sobre vitrocerâmico. **Revista de Ciências Exatas e Tecnologia**, v. 4, n. 4, p. 147–161, 2009.

47. AGATHOPOULOS, S.; TULYAGANOV, D.U.; VENTURA, J.M.G.; KANNAN, S.; SARANTI, A.; KARAKASSIDES, M.A.; FERREIRA, J.M.F. Structural analysis and devitrification of glasses based on the CaO–MgO–SiO₂ system with B₂O₃, Na₂O, CaF₂ and P₂O₅ additives. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 352, n. 4, p. 322–328, 2006.
48. DUCHEYNE, P.; GRAINGER, D.W.; HEALY, K.E.; HUTMACHER, D.W.; KIRKPATRICK, C.J. **Comprehensive biomaterials II**. 2° ed. Amsterdam Boston Heidelberg: Elsevier, 2017. p. 235–243.
49. KARTHIKA, S.; RADHAKRISHNAN, T.K.; KALAICHELVI, P. A Review of Classical and Nonclassical Nucleation Theories. **Crystal Growth & Design**, v. 16, n. 11, p. 6663–6681, 2016.
50. KINGERY, W.D. **Introduction to ceramics**. 3° ed. New York: John Wiley & Sons, 1965. p. 286–342.
51. FOLGUERAS, M. **Obtenção de vitrocerâmicos sintetizados a partir da combinação de escórias siderúrgicas e cinzas volantes**. 2001. Tese - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 144 p.
52. EL-MELIEGY, E.; VAN NOORT, R. Design of medical glass-ceramics. In: **Glasses and Glass Ceramics for Medical Applications**. New York, NY: Springer New York, 2012. p. 109–131.
53. RATNER, B.D. The Biocompatibility of Implant Materials. In: **Host Response to Biomaterials**. Elsevier, 2015. p. 37–51.
54. SISWOMIHARDJO, W. Biocompatibility Issues of Biomaterials. In: **Biomaterials and Medical Devices**. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 58p. 41–65.
55. QIN, Y. Biocompatibility testing for medical textile products. In: **Medical Textile Materials**. Elsevier, 2016. p. 191–201.
56. HARMATA, A.J.; GUELCHER, S.A. Effects of surface modification on polymeric biocomposites for orthopedic applications. In: **Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration**. Elsevier, 2016. p. 67–91.

57. BIGI, A.; BOANINI, E.; GAZZANO, M. Ion substitution in biological and synthetic apatites. In: **Biom mineralization and Biomaterials**. Elsevier, 2016. p. 235–266.
58. OYANE, A.; KIM, H.; FURUYA, T.; KOKUBO, T.; MIYAZAKI, T.; NAKAMURA, T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 65A, n. 2, p. 188–195, 2003.
59. KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. Simulated Body Fluid (SBF) as a Standard Tool to Test the Bioactivity of Implants. In: **Handbook of Biom mineralization**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2007. p. 97–109.
60. KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907–2915, 2006.
61. KOKUBO, T. Surface chemistry of bioactive glass-ceramics. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 120, n. 1–3, p. 138–151, 1990.
62. KOKUBO, T. Bioactive glass ceramics: properties and applications. **Biomaterials**, v. 12, n. 2, p. 155–163, 1991.
63. MOHAMMADI, H.; HAFEZI, M.; NEZAFATI, M.; HEASARKI, S.; NADERNEZHAD, A.; GHAZANFARI, S.M.H.; SEPANTAFAR, M. Bioinorganics in Bioactive Calcium Silicate Ceramics for Bone Tissue Repair: Bioactivity and Biological Properties. **Journal of Ceramic Science and Technology**, v. 05, n. 01, p. 1–12, 2014.
64. DIBA, M.; TAPIA, F.; BOCCACCINI, A.R.; STROBEL, L.A. Magnesium-Containing Bioactive Glasses for Biomedical Applications. **International Journal of Applied Glass Science**, v. 3, n. 3, p. 189–286, 2012.
65. HUANG, J. Design and Development of Ceramics and Glasses. In: **Biology and Engineering of Stem Cell Niches**. Elsevier, 2017. p. 315–329.

66. CHEN, X.; WEI, Y.; HUANG, Z.; KANG, Y.; YIN, G. Synthesis and characterization of multiphase bioactive glass-ceramics in the CaO–MgO–SiO₂ system with B₂O₃ additive. **Journal of Materials Research**, v. 23, n. 11, p. 2873–2879, 2008.
67. TULYAGANOV, D.U.; AGATHOPOULOS, S.; VENTURA, J.M.; KARAKASSIDES, M.A.; FABRICHNAYA, O. FERREIRA, J.M.F. Synthesis of glass–ceramics in the CaO–MgO–SiO₂ system with B₂O₃, P₂O₅, Na₂O and CaF₂ additives. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 26, n. 8, p. 1463–1471, 2006.
68. ARCOS, D.; VALLET-REGÍ, M. Sol–gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 8, p. 2874–2888, 2010.
69. WANG, G.C.; LU, Z.F.; ZREIQAT, H. Bioceramics for skeletal bone regeneration. In: **Bone Substitute Biomaterials**. Elsevier, 2014. p. 180–216.
70. WU, C.; CHANG, J. A review of bioactive silicate ceramics. **Biomedical Materials**, v. 8, n. 3, p. 1–12, 2013.
71. SOARES, V.O.; DAGUANO, J.; LOMBELLO, C.; BIANCHIN, O.S.; GONÇALVES, L.M.G.; ZANOTTO, E.D. New sintered wollastonite glass-ceramic for biomedical applications. **Ceramics International**, v. 44, n. 16, p. 20019–20027, 2018.
72. JURASKI, A.D.C.; RODAS, A.C.D.; ELSAYED, H.; SOARES, V.O.; DAGUANO, J. The In Vitro Bioactivity, Degradation, and Cytotoxicity of Polymer-Derived Wollastonite-Diopside Glass-Ceramics. **Materials**, v. 10, n. 4, p. 425–444, 2017.
73. VICHERY, C.; NEDELEC, J.-M. Bioactive Glass Nanoparticles: From Synthesis to Materials Design for Biomedical Applications. **Materials**, v. 9, n. 4, p. 2–17, 2016.
74. WU, C.; XIAO, Y.; CHANG, J. Silicate-Based Bioactive Ceramics for Bone Regeneration Application. In: **Advanced Bioactive Inorganic Materials for Bone Regeneration and Drug Delivery**. CRC Press, 2013. p. 25–46.

75. DE AZA, P.N.; PENA, P. Bioactive Glasses and Glass-Ceramics. **Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**, v. 46, n. 2, p. 45–55, 2007.
76. EL-GHANNAM, A.; DUCHEYNE, P. Bioactive Ceramics. In: **Comprehensive Biomaterials**. Elsevier, 2011. p. 157–179.
77. MONTAZERIAN, M.; ZANOTTO, E.D. Bioactive Glass-ceramics: Processing, Properties and Applications. In: **Smart Materials Series**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2016. p. 27–60.
78. ZEIMARAN, E.; POURSHAHRESTANI, S.; SHIRAZI, S.F.; PINGGUAN-MURPHY, B.; KADRI, N.A.; TOWLER, M.R. Hydrothermal synthesis and characterisation of bioactive glass-ceramic nanorods. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 443, p. 118–124, 2016.
79. XU, Q.-T.; LI, J.-C.; XUE, H.-G.; GUO, S.-P. Binary iron sulfides as anode materials for rechargeable batteries: Crystal structures, syntheses, and electrochemical performance. **Journal of Power Sources**, v. 379, p. 41–52, 2018.
80. RAO, B.G.; MUKHERJEE, D.; REDDY, B.M. Novel approaches for preparation of nanoparticles. In: **Nanostructures for Novel Therapy**. Elsevier, 2017. p. 1–36.
81. ÖZEN, M.; MERTENS, M.; SNIJKERS, F.; COOL, P. Hydrothermal synthesis and formation mechanism of tetragonal barium titanate in a highly concentrated alkaline solution. **Ceramics International**, v. 42, n. 9, p. 10967–10975, 2016.
82. ASMATULU, R. Nanocoatings for corrosion protection of aerospace alloys. In: **Corrosion Protection and Control Using Nanomaterials**. Elsevier, 2012. p. 357–374.
83. BARAKET, L.; GHORBEL, A. Control preparation of aluminium chromium mixed oxides by Sol-Gel process. In: **Studies in Surface Science and Catalysis**. Elsevier, 1998. v. 118p. 657–667.

84. NEACȘU, I.A.; NICOARĂ, A.I.; VASILE, O.R.; VASILE, B.Ș. Inorganic micro- and nanostructured implants for tissue engineering. In: **Nanobiomaterials in Hard Tissue Engineering**. Elsevier, 2016. p. 271–295.
85. SAKKA, S. Sol–Gel Process and Applications. In: **Handbook of Advanced Ceramics**. 2° ed. Elsevier, 2013. p. 883–910.
86. KHAN, M.S.; RAB, A.; MUHAMMAD, H.; ZIA, A.; HUMAYUN, M. Synthesis and Characterization of Poly(vinyl) Alcohol-AlOOH/LiClO₄ Hybrids. **Journal of The Chemical Society of Pakistan**, v. 39, n. 4, p. 591–598, 2017.
87. HENCH, L.L.; WEST, J.K. The sol-gel process. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 1, p. 33–72, 1990.
88. WRIGHT, J.D.; SOMMERDIJK, N.A. J.M. **Sol-gel materials: chemistry and applications**. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers, 2000. p. 61–62.
89. YAMAGATA, C. **Influência das condições de síntese por precipitação nas características da zircônia estabilizada com MgO e aplicação no sistema ZrO₂-MgO-Y₂O₃**. 2004. 165 p.
90. DE SOUZA, A.T. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa)**. 2011. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto, 111 p.
91. PANTA, P.C. **Obtenção de nanopartículas de óxido de ferro por coprecipitação, sua estabilização com surfactantes e caracterização quanto à morfologia, cristalinidade e comportamento magnético**. 2013. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 106 p.
92. CHEN, X.; LIAO, X.; HUANG, Z.; YOU, P.; CHEN, C.; KANG, Y.; YIN, G. Synthesis and characterization of novel multiphase bioactive glass-ceramics in the CaO-MgO-SiO₂ system. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 93B, n. 1, p. 194–202, 2010.

93. **ISO 10993-5:2009**. Disponível em:
<<http://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/03/64/36406.html>>. Acesso em: 12 fev. 2019.
94. **ISO 10993-12:2012**. Disponível em:
<<http://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/05/34/53468.html>>. Acesso em: 12 fev. 2019.
95. **ICDD Database Search**. Disponível em:
<<http://www.icdd.com/index.php/pdfsearch/>>. Acesso em: 4 mar. 2019.
96. CHOUDHARY, R.; KOPPALA, S.; SWAMIAPPAN, S. Bioactivity studies of calcium magnesium silicate prepared from eggshell waste by sol–gel combustion synthesis. **Journal of Asian Ceramic Societies**, v. 3, n. 2, p. 173–177, 2015.
97. SALINAS, A.J.; ROMÁN, J.; VALLET-REGÍ, M.; OLIVEIRA, J.M.; CORREIA, R.N.; FERNANDES, M.H. In vitro bioactivity of glass and glass-ceramics of the $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5\text{--CaO} \cdot \text{SiO}_2\text{--CaO} \cdot \text{MgO} \cdot 2\text{SiO}_2$ system. **Biomaterials**, v. 21, n. 3, p. 251–257, 2000.
98. NING, C. Biomaterials for Bone Tissue Engineering. In: **Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics**. London: Springer London, 2016. p. 35–57.
99. TILOCCA, A. Models of structure, dynamics and reactivity of bioglasses: a review. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 33, p. 6848–6858, 2010.
100. VALLET-REGÍ, M.; SALINAS, A.J.; ROMÁN, J. GIL, M. Effect of magnesium content on the in vitro bioactivity of $\text{CaO-MgO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ sol-gel glasses. **Journal of Materials Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 515–518, 1999.
101. GERMAN, R.M. Thermodynamics of sintering. In: **Sintering of Advanced Materials**. Elsevier, 2010. p. 3–32.
102. BESBES, M.; FAKHFAKH, N.; BENZINA, M. Characterization of silica gel prepared by using sol–gel process. **Physics Procedia**, v. 2, n. 3, p. 1087–1095, 2009.

103. SWANN, G.E.A.; PATWARDHAN, S.V. Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for assessing biogenic silica sample purity in geochemical analyses and palaeoenvironmental research. **Climate of the Past**, v. 7, n. 1, p. 65–74, 2011.
104. KHAN, A.S.; KHALID, H.; SARFRAZ, Z.; KHAN, M.; IQBAL, J.; MUHAMMAD, N.; FAREED, M.A. REHMAN, I.U. Vibrational spectroscopy of selective dental restorative materials. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 52, n. 6, p. 507–540, 2017.
105. GHEISARI, H.; KARAMIAN, E.; ABDELLAHI, M. A novel hydroxyapatite – Hardystonite nanocomposite ceramic. **Ceramics International**, v. 41, n. 4, p. 5967–5975, 2015.
106. ŚLÓŠARCZYK, A.; PASZKIEWICZ, Z.; PALUSZKIEWICZ, C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. **Journal of Molecular Structure**, v. 744–747, p. 657–661, 2005.
107. CHANDRASEKAR, A.; SAGADEVAN, S.; DAKSHNAMOORTHY, A. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite (n-HAP) using the wet chemical technique. **International Journal of Physical Sciences**, v. 8, n. 32, p. 1639–1645, 2013.
108. SIRIPHANNON, P.; KAMESHIMA, Y.; YASUMORI, A.; OKADA, K.; HAYASHI, S. Formation of hydroxyapatite on CaSiO_3 powders in simulated body fluid. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 22, n. 4, p. 511–520, 2002.
109. MEDEIROS, E.L.G.; SANTOS, A.M.C.; MEDEIROS, E.S.; MENEZES, R.R. Scaffolds de Vidros Bioativos: Desenvolvimento de Estruturas Bioativas Nanoestruturadas. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 12, n. 3, p. 16, 2017.
110. CHAVAN, P.N.; BAHIR, M.M.; MENE, R.U.; MAHABOLE, M.P.; KHAIRNAR, R.S. Study of nanobiomaterial hydroxyapatite in simulated body fluid: Formation and growth of apatite. **Materials Science and Engineering: B**, v. 168, n. 1–3, p. 224–230, 2010.

111. QUEIROZ, C.M. **Cristalização de biomateriais vitrocerâmicos e mineralização em meio fisiológico simulado**. Tese - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2005.
112. RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L. DUELLMAN, S. **Cell Viability Assays - Assay Guidance Manual - NCBI Bookshelf**. NCBI. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>>. Acesso em: 20 abr. 2019.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

**O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada
à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela
Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.**