UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

JULIANA KELMY MACÁRIO DE FARIA DAGUANO

**Biovidros e vitrocerâmicos bioativos do sistema
 $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$ - SiO_2 - MgO para aplicações biomédicas:
processamento e caracterizações estruturais, mecânicas
e biológicas**

Lorena

2011

JULIANA KELMY MACÁRIO DE FARIA DAGUANO

**Biovidros e vitrocerâmicos bioativos do sistema
3CaO.P₂O₅-SiO₂-MgO para aplicações biomédicas:
processamento e caracterizações estruturais, mecânicas
e biológicas**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de **Doutor em Ciências** obtido no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais na área de concentração: **Materiais Metálicos, Cerâmicos e Poliméricos.**

Orientador: Prof. Dr. Claudinei dos Santos.

Edição reimpressa e corrigida

Lorena

Março, 2011

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Especializada em Engenharia de Materiais
USP/EEL

Daguano, Juliana Kelmy Macário de Faria

Biovidros e vitrocerâmicos bioativos do sistema $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$ -
 SiO_2 - MgO para aplicações biomédicas: processamento e
caracterizações estruturais, mecânicas e biológicas / Juliana
Kelmy Macário de Faria Daguan; orientador Claudinei dos
Santos – ed. reimpr., corr.-Lorena, 2011.
202 p.: il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós Graduação
em Engenharia de Materiais. Área de Concentração: Materiais
metálicos, cerâmicos e poliméricos) – Escola de Engenharia de
Lorena - Universidade de São Paulo.

1. Biomateriais 2. Biovidro 3. Cristalização 4.
Propriedades mecânicas 5. Testes in vitro I. Título.

CDU 666.3

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Hédio (*in
memorian*) e Maria, fontes inesgotáveis de amor e
compreensão, a quem devo a pessoa que sou.
Dedico este trabalho também às minhas irmãs Fernanda
e Solange (*in memorian*).

*Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem queres passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte suprema de sabedoria e conhecimento.

Aos meus pais, por todo amor, dedicação, apoio, incentivo, enfim, sem eles nada disso seria possível.

Ao Prof. Dr. Claudinei dos Santos, querido orientador, quem me trouxe à luz da Ciência, que nos anos de convivência foi também amigo e companheiro de jornada, nunca me deixando desanimar.

A Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena F. V. Fernandes (UA – Universidade de Aveiro), que possibilitou a edificação deste projeto, contribuindo com sua cultura científica.

A Escola de Engenharia de Lorena (EEL) e ao Departamento de Engenharia de Materiais (Demar) por viabilizar o desenvolvimento deste trabalho, e ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Materiais pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Doutorado Direto processo nº. 07/50510-4 e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), por permitir a realização de estudos em suas linhas de luz (D12A – XRD1 e D10B – XPD). E ao Prof. Dr. Paulo A. Suzuki, pelo apoio e dedicação a estes projetos.

À pesquisadora Sizue Ota Rogero (IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), por sempre estar animada em colaborar com os testes de citotoxicidade.

A toda família do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV – DEMa/UFSCar), em especial ao Prof. Dr. Edgar Dutra Zanotto que me abriu as portas do LaMaV e permitiu a utilização de toda a infra-estrutura do laboratório, e aos Prof. Dr. Oscar Peitl Filho e Murilo C. Crovace pela realização dos testes de bioatividade.

Ao Prof. Dr. Carlos Nelson Elias (IME – Instituto Militar de Engenharia), pela realização dos ensaios de fratura.

Ao Prof. Dr. Ervino Ziemath (Unesp/Rio Claro – Universidade Estadual Paulista), pela realização dos testes com ultrassom para determinação dos módulos elásticos e às atenciosas discussões.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Materiais, representados nas pessoas dos Prof. Dr. Sebastião Ribeiro e Prof. Dr. Durval Rodrigues Júnior, pela presteza e dedicação sempre demonstradas durante a realização deste trabalho.

À aluna de iniciação científica Marcela R. Oliveira.

Aos técnicos do DEMAR que foram muito atenciosos e prestativos na realização da parte experimental, em especial aos técnicos: Geraldo Prado, Leandro, Otávio, Jorge Rosa, e

José (LaMaV). E também à Tavânia por toda a assistência com os documentos da pós-graduação.

À minha irmã Fernanda Daguan, com quem divido todas as minhas vitórias. Obrigada por sempre estar ao meu lado. E ao meu cunhado João P. Silva, pessoas que também possuem o espírito científico.

À toda minha amada família: tios, tias, primos, primas, sobrinha, representados pela forte figura da Nona Mafalda. E também às famílias de coração, família Froelich e família Bandeira.

Aos amigos Fefê Luna, Flávia, Vivien, Letícia, Loriane, Marina, Monique, Rick, Adriana, Talita e Anne, obrigada por me acompanharem, em todos os momentos, me apoiando e torcendo por mim.

Ao grupo de Biocerâmicas e amigos: Bicalho, Felipe, Bruno, Luiz, Renato, Habibe, Palmeira, Tales e Kurt. Obrigada por poder dividir estes anos com vocês.

Aos colegas de pós-graduação pela amizade e companheirismo. Agradeço às inúmeras “ajudinhas” da Roseli, Ana Paula, Ésoly, Giseli, e do Lucas. E a todos que de certa forma contribuíram direta ou indiretamente à realização deste trabalho, torcendo sempre por mim.

Em especial, ao meu grande amor Serginho! *Somos Pescadores de ilusão*. Agradeço também a toda sua família e aos nossos queridos amigos que sempre me acolheram com tanto carinho.

*“... Mais do que saber – dominar-se;
Mais do que agir – elevar;
Mais do que estudar – aprender;
Mais do que pensar – discernir;
Mais do que falar – educar;
Mais do que aconselhar – servir;
Mais do que escutar – compreender;
Mais do que perdoar – amparar;
Mais do que sofrer – resignar-se;
Mais do que amar – sublimar.”*

André Luiz

RESUMO

Daguano, J.K.M.F. **Biovidros e vitrocerâmicos bioativos do sistema $3\text{CaO.P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ para aplicações biomédicas: processamento e caracterizações estruturais, mecânicas e biológicas.** 2010. 202p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena /SP, 2011.

Este trabalho apresenta o desenvolvimento e a caracterização de biovidros e vitrocerâmicos bioativos do sistema $3\text{CaO.P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$, com índices de cristalinidade variados, visando o uso destes materiais em implantes estruturais ósseos. Amostras de composição nominal (% em peso) 57,75% $\text{CaO.P}_2\text{O}_5$ – 30% SiO_2 – 17,25% MgO foram obtidas por fusão, e posteriormente, tratamentos térmicos foram realizados para a cristalização parcial dos vitrocerâmicos em temperaturas entre 700 °C e 1100 °C, com tempos diversos de até 480 minutos. Esses materiais foram caracterizados quanto ao seu comportamento térmico, quanto às fases cristalinas presentes e à microestrutura. Os resultados mostram que o vidro base apresenta separação de fases amorfas e os vitrocerâmicos apresentam como fase cristalina majoritária a fase whitlockite, podendo ser encontrada também a fase diopsídio, em tratamentos térmicos acima de 1050 °C. As propriedades mecânicas de dureza, tenacidade à fratura, módulo de fratura por ensaio de flexão e módulo elástico dinâmico foram determinadas. Todas as propriedades foram avaliadas em função do grau de cristalinidade do material, mostrando que a microestrutura e a fração cristalizada, bem como as diferentes fases cristalinas presentes, influenciam os resultados obtidos. O ganho máximo nas propriedades mecânicas ocorre em tratamentos térmicos a 975 °C, sendo atingidos valores próximos a 6,2 GPa, $1,7 \text{ MPa.m}^{1/2}$ e 120 MPa para a dureza, a tenacidade à fratura e o módulo de fratura, respectivamente, em comparação aos valores de 4,8 GPa, $1,1 \text{ MPa.m}^{1/2}$, 71 MPa dos vidros nucleados, o que indica aumento da ordem de 30% na dureza, 55% na tenacidade e 70% na resistência à fratura. Para o teste *in vitro* de citotoxicidade foram utilizadas células CHO como meio de cultura. Para os testes de bioatividade, as trocas iônicas entre os materiais e a solução acelular SBF ressaltam as diferenças em termos de reatividade química, sendo o efeito da cristalização de biovidros na formação da HCA observado por FTIR. Todas as amostras não apresentaram caráter citotóxico e o vitrocerâmico tratado a 775 °C mostrou ser o material mais bioativo, com início de formação da HCA em período de 24 h. Assim, os resultados obtidos indicam que o vidro e os vitrocerâmicos do sistema $3\text{CaO.P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ são promissores candidatos ao uso como implantes ósseos, com distintas características e propriedades.

Palavras-chave: Biomateriais. Biovidro. Cristalização. Propriedades Mecânicas. Testes *in vitro*.

ABSTRACT

Daguano, J.K.M.F. **Biglasses and bioactive glass-ceramics based on 3CaO.P₂O₅-SiO₂-MgO-system for biomedical applications: processing, and structural, mechanical and biological characterization.** 2010. 202p. Thesis (Doctoral in Materials Engineering) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena /SP, Brazil, 2011.

The current work presents the development and characterization of bioglass and bioactive glass-ceramic based on 3CaO.P₂O₅-SiO₂-MgO-system, with different crystallization degrees, in order to use these materials in bone restorations. Samples of nominal composition (wt%) 57.75% CaO.P₂O₅-30% SiO₂-17.25% MgO were obtained by melting and after heat-treated to partial crystallization of glass-ceramic at temperatures between 700 °C and 1100 °C, with times up to 480 minutes. These materials were characterized by thermal analysis, X-Ray diffraction and scanning electron microscopy. The results showed amorphous phase separation in glasses. In glass-ceramics, it was identified whitlockite as major crystal phase, and diopside phase above 1050 °C. Hardness, fracture toughness, bending strength and elastic moduli of the samples were evaluated. These mechanical properties were evaluated according to the matrix crystallinity degree. The microstructure and the crystallization degree must be influencing the mechanical properties results. The optimized properties were observed in samples crystallized at 975 °C, with values near to 6.2 GPa, 1.7 MPa.m^{1/2} and 120 MPa for hardness, fracture toughness and bending strength, respectively, in comparison to 4.8 GPa, 1.1 MPa.m^{1/2} and 71 MPa presented by nucleated glasses at 700 °C, which indicates increases of 30% in hardness, 55% in fracture toughness and 70% in bending strength. In the cytotoxicity test, the culture medium was CHO cells. Ionic exchanges with the SBF-K9 acellular solution during the in vitro bioactivity tests highlight the differences in terms of chemical reactivity between the glass and the glass-ceramics. The effect of crystallinity on the rates of hydroxycarbonate apatite (HCA) formation was followed by FTIR. All samples were considered not cytotoxic. The glass-ceramic obtained at 775 °C presented the most interesting result, because onset for HCA formation is about 24 hours. The results obtained indicate that glasses and glass-ceramics of the 3CaO.P₂O₅-SiO₂-MgO system are promissory candidates to be used as bonegraft implants.

Keywords: Biomaterials. Bioglass. Crystallization. Mechanical Properties. *In vitro* tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 –	Diagrama de fases da superfície líquida do sistema $3\text{CaO.P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ (% em peso), adaptado de SATA, 1958. Destaque dado a composição E (57,75% $3\text{CaO.P}_2\text{O}_5$ – 30% SiO_2 – 17,25% MgO) desenvolvida e caracterizada durante este trabalho.....	31
Figura 2.1 –	Diagrama esquemático de volume específico x temperatura de um vidro. Adaptado de Varshneya, 2006.....	34
Figura 2.2 –	Representação esquemática de tetraedros $[\text{SiO}_4]^{4-}$ formando diferentes silicatos.....	36
Figura 2.3 –	Representação esquemática de tetraedro $[\text{PO}_4]^{3-}$ formando cadeia de fosfato. Baseado em Chemistry, Structures & 3D Molecules	37
Figura 2.4 –	Micrografia da superfície de vidro recozido do sistema $3\text{CaO.P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$, mostrando separação de fase com morfologia do tipo morular.....	39
Figura 2.5 –	Análise térmica de vidro tratado termicamente (nucleado a 730°C) e vidro não nucleado, adaptado de Oliveira e colaboradores, 1998.	43
Figura 2.6 –	Classificação dos biomateriais quanto à interação tecido-implante.	46
Figura 2.7 –	Representação esquemática da formação de camada de HCA sobre a superfície de biovidros em contato com SBF, baseado em Kokubo e colaboradores, 2003.	49
Figura 2.8 –	Representação esquemática de ensaio de flexão em 4-pontos ASTM C 1161-02.....	56
Figura 2.9 –	Representação esquemática de indentação, baseada em Cook e Pharr. Parâmetros utilizados para determinar tenacidade à fratura: a é a metade do tamanho da diagonal da indentação, l é o tamanho da trinca e $c = a+l$	59
Figura 2.10 –	Representação esquemática dos sistemas de trincas da indentação Vickers, adaptado de Cook e Pharr.....	60
Figura 2.11 –	Desenho esquemático da técnica do pulso-eco.....	62
Figura 3.1 –	Fluxograma das atividades desenvolvidas neste trabalho.....	63
Figura 3.2 –	Fluxograma de preparação do material estudado neste trabalho.	64
Figura 3.3 –	Processo de obtenção de vidros por fusão/solidificação: (a) o pó é colocado em etapas no cadinho de platina, para completa homogeneização, (b) o cadinho é mantido no forno por 4 h a 1600°C , (c) o fundido é retirado do forno e vertido no molde metálico.	65

Figura 3.4 –	Difratograma representativo do método usado por Krimm e Tobolsky. Figura adaptada de ALMEIDA, 2006.....	70
Figura 3.5 –	Análise quantitativa da fase whitlockite usando método do padrão interno (estanho).....	71
Figura 3.6 –	Porta-amostra para acoplamento de amostra em câmara de alta temperatura.....	72
Figura 3.7 –	(a) Detalhe da pesagem de amostra ao ar, (b) detalhe da pesagem de amostra em água para determinação da massa específica através do método de Arquimedes.....	75
Figura 3.8 –	Indentações aceitáveis (a) e inaceitáveis (b) segundo norma ASTM C 1327-03.....	77
Figura 3.9 –	Corpos-de-prova utilizados em ensaio de resistência à fratura na dimensão de 25 x 2 x 1,5 mm.....	78
Figura 3.10 –	Realização de diluições seriadas dos extratos das amostras e dos controles positivos e negativos em fluxo laminar.....	81
Figura 3.11 –	Adição dos controles positivo/negativo e dos extratos das amostras em microplaca com cultura de células aderidas para realização do teste de citotoxicidade.....	82
Figura 3.12 –	Amostras suspensas em solução SBF-K9 para avaliação da bioatividade.....	84
Figura 4.1 –	Difratograma de raios X da mistura de pós para obtenção de vidro antes da etapa de mistura/homogeneização em moinho de atrito.	85
Figura 4.2 –	Difratograma de raios X da mistura de pós após a etapa de mistura/homogeneização em moinho de atrito.....	86
Figura 4.3 –	Curva dilatométrica do vidro desenvolvido.....	88
Figura 4.4 –	Análise térmica do vidro do sistema $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{SiO}_2 \cdot \text{MgO}$	89
Figura 4.5 –	Análise por difração de raios X de alta resolução (HRXRD) da amostra V700-8.....	91
Figura 4.6 –	Análise por difração de raios X de alta resolução (HRXRD) da amostra V775-8.....	92
Figura 4.7 –	Análise por difração de raios X de alta resolução (HRXRD) da amostra V800-4.....	92
Figura 4.8 –	Análise por difração de raios X de alta resolução (HRXRD) da amostra V850-4.....	93

Figura 4.9 –	Análise por difração de raios X de alta resolução (HRXRD) da amostra V900-4.....	93
Figura 4.10 –	Análise por difração de raios X de alta resolução (HRXRD) da amostra V975-4.....	94
Figura 4.11 –	Análise por difração de raios X de alta resolução (HRXRD) da amostra V1000-4.....	94
Figura 4.12 –	Análise por difração de raios X de alta resolução (HRXRD) da amostra V1050-4.....	95
Figura 4.13 –	Análise por difração de raios X de alta resolução (HRXRD) da amostra V1100-4.....	95
Figura 4.14 –	Indexação das fases cristalinas presentes no produto do processo de cristalização de vidros do sistema $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$, após diferentes tratamentos térmicos.....	97
Figura 4.15 –	Difratograma comparativo das fases obtidas durante tratamento térmico em diversas temperaturas.....	98
Figura 4.16 –	Porcentagem relativa da fase whitlockite (% em volume) nos vitrocerâmicos tratados a diferentes temperaturas.....	101
Figura 4.17 –	Efeito do tempo de tratamento térmico na formação de fases cristalinas em vidros do sistema $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ tratadas a $800\text{ }^\circ\text{C}$, por 15, 120, 240 e 480 minutos.....	102
Figura 4.18 –	Efeito do tempo de T.T. na cristalinidade do material.....	103
Figura 4.19 –	Simulação do arranjo atômico da whitlockite, utilizando software PowderCell®. Destaque para os sítios Ca(5) do $\beta\text{-TCP}$	105
Figura 4.20 –	Variações nos parâmetros de rede a e c da fase whitlockite mediante diferentes tratamentos térmicos.....	106
Figura 4.21 –	Variação no volume de célula unitária da fase whitlockite em função das diferentes temperaturas de tratamento térmico.....	108
Figura 4.22 –	Parâmetros de rede a e c obtidos por medidas de HRXRD em alta temperatura, em função do aumento da temperatura da medida.....	109
Figura 4.23 –	Coefficiente de expansão térmica dos eixos a e c da fase whitlockite para diferentes amostras: (a) V775-4, (b) V850-4 e V950-4, (c) V1050-4 e V1100-4.....	110
Figura 4.24 –	Micrografia da amostra V700-8 (vidro recozido) obtida por elétrons secundários, podendo ser observada a separação de fase amorfa.....	113

Figura 4.25 –	Diagrama de fase do sistema $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$ - SiO_2 - MgO com campo de imiscibilidade líquido-líquido (região de dois líquidos).....	114
Figura 4.26 –	Foto ilustrativa de barra de vidro fundido indicando o aspecto opaco típico de vidros com separação de fase.....	115
Figura 4.27 –	Micrografia da amostra V775-4 obtida por elétrons retroespalhados, com presença de mórulas amorfas de SiO_2	116
Figura 4.28 –	Micrografia da amostra V800-4 obtida por elétrons retroespalhados, onde são observadas mórulas amorfas de SiO_2 e a cristalização da fase whitlockite.....	117
Figura 4.29 –	Micrografia da amostra V975-4 obtida por elétrons secundários, onde são observadas mórulas amorfas de SiO_2 , a matriz remanescente e vazios referentes a fase whitlockite lixiviada por ataque ácido.....	117
Figura 4.30 –	Micrografia da amostra V1100-4 obtida por elétrons retroespalhados, com presença da fase diopsídio e da matriz vítrea remanescente.....	119
Figura 4.31 –	Micrografia da superfície de fratura da amostra V1100-4 obtida por elétrons secundários. Os pontos identificados como 1, 2 e 3 correspondem às fases diopsídio, whitlockite e poros, respectivamente.....	120
Figura 4.32 –	Dispositivos vitrocerâmicos utilizados em casos de restauração óssea: (a) discos intervertebrais, (b) vértebras artificiais, (c) espaçadores espinhais, (d) cristas ilíacas.....	124
Figura 4.33 –	Influência de carga de indentação e grau de cristalização na dureza Vickers.....	125
Figura 4.34 –	Dureza real e carga crítica de indentação das amostras.....	126
Figura 4.35 –	Carga de indentação x comprimento da diagonal de indentação....	127
Figura 4.36 –	Índice de Meyer (n) de vidros e vitrocerâmicos do sistema $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$ - SiO_2 - MgO	128
Figura 4.37 –	Imagens representativas do teste de indentação obtidas por microscopia óptica para as amostras V700-4 e V900-4 com cargas variando de 1,96 N a 19,6 N.....	129
Figura 4.38 –	MEV amostra V975-4 indentada sob carga (a) 1,96 N e (b) 19,6 N.	131
Figura 4.39 –	Tenacidade à fratura em função da carga de indentação (P).....	133
Figura 4.40 –	Efeito da temperatura de tratamento térmico na dureza Vickers.	134

Figura 4.41 –	Resultados de tenacidade à fratura em função da temperatura de tratamento térmico.....	135
Figura 4.42 –	Micrografia de impressão Vickers em amostra V700-4, sob carga de 19,6 N (2000 gF). No detalhe, trinca radial a partir de vértice da indentação.....	136
Figura 4.43 –	Micrografia de impressão Vickers em amostra V975-4, sob carga de 19,6 N (2000 gF). No detalhe, trinca a partir de vértice da indentação.....	137
Figura 4.44 –	MEV da superfície da amostra V975-4, sob carga de 19,6 N, onde é possível observar o efeito de deflexão de trincas e o maior caminho percorrido por esta.....	138
Figura 4.45 –	Influência do tempo de tratamento térmico na dureza Vickers.	139
Figura 4.46 –	Influência do tempo de tratamento térmico na tenacidade à fratura.	140
Figura 4.47 –	Superfície de fratura após ensaio de flexão em 4-pontos do vidro V700-4: (a) 1000x, (b) 5000x.....	142
Figura 4.48 –	Superfície de fratura após ensaio de flexão em 4-pontos da vitrocerâmica V975-4: (a) 500x, (b) 5000x.....	142
Figura 4.49 –	Superfície de fratura após ensaio de flexão em 4-pontos do vitrocerâmico V1100-4: (a) 500x, (b) 1000x.....	143
Figura 4.50 –	Velocidades ultrassônicas longitudinais (V_L) e transversais (V_T) obtidas pelo método Pulso-eco para amostras vítreas e parcialmente cristalizadas.....	144
Figura 4.51 –	Módulos elásticos das amostras V700-4, V775-4, V975-4 e V1100-4.	145
Figura 4.52 –	Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro para a amostras do sistema $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{SiO}_2 \cdot \text{MgO}$	150
Figura 4.53 –	Espectro FTIR do <i>Bioglass</i> 45S5 antes e após exposição em SBF por períodos variados entre 1 hora e 7 dias.....	152
Figura 4.54 –	Comparativo da estrutura dos vidros <i>Bioglass</i> 45S5 e V700-4 antes de imersão em SBF através dos espectros FTIR.....	154
Figura 4.55 –	Espectro FTIR do vidro V700-4 antes e após exposição ao SBF por períodos variados entre 1 hora e 14 dias.....	155

Figura 4.56 –	Bandas de ligação correspondentes a camada de sílica gel formada em vidro 45S5 em intervalo de 1h e V700-4 em intervalo de 3h, ambos em exposição ao SBF.....	156
Figura 4.57 –	Espectro FTIR do vidro V775-4 antes e após exposição ao SBF por períodos variados entre 1 hora e 14 dias.....	158
Figura 4.58 –	Espectro FTIR do vidro V975-4 antes e após exposição ao SBF por períodos variados entre 1 hora e 14 dias.....	159
Figura 4.59 –	Micrografia da superfície do <i>Bioglass</i> 45S5 após imersão ao SBF por (a) 3 dias e (b) 7 dias.....	160
Figura 4.60 –	Micrografia da superfície do vidro V700-4 após imersão em SBF por 3 dias.....	162
Figura 4.61 –	Micrografia da superfície do vidro V700-4 após imersão em SBF por 7 dias.....	163
Figura 4.62 –	Micrografia da superfície do vidro V700-4 após imersão em SBF por 14 dias.....	163
Figura 4.63 –	Micrografia da superfície do vitrocerâmico V775-4 após imersão em SBF por 3 dias.....	164
Figura 4.64 –	Micrografia da superfície do vitrocerâmico V775-4 após imersão em SBF por 7 dias.....	165
Figura 4.65 –	Micrografia da superfície do vitrocerâmico V775-4 após imersão em SBF por 14 dias.	165
Figura 4.66 –	Micrografia da superfície do vitrocerâmico V975-4 após imersão em SBF por 3 dias.....	166
Figura 4.67 –	Micrografia da superfície do vitrocerâmico V975-4 após imersão em SBF por 7 dias. Diferentes características da camada de HCA podem ser observadas em função das regiões da superfície do VC.	167
Figura 4.68 –	Micrografia da superfície do vitrocerâmico V975-4 após imersão em SBF por 14 dias.....	167
Figura 4.69 –	Micrografia da superfície do vitrocerâmico V975-4 após 5 dias de exposição ao SBF.....	169
Figura B.1 –	Moinho de atrito utilizado na etapa de mistura/homogeneização.	192
Figura B.2 –	Forno tipo mufla EDG usado para recozimento dos vidros no LaMaV/UFSCar.....	192

Figura B.3 –	Forno Lindberg/Blue M. utilizado no processo de cristalização dos vidros.....	192
Figura B.4 –	Dilatômetro BAHR Thermoanalyse GmbH 2000 Modelo DIL801L, pertencente a Universidade de Aveiro.....	193
Figura B.5 –	Forno de DSC Netzsch modelo STA-404.....	193
Figura B.6 –	Difratômetro de raios X Shimadzu modelo XRD-6000.....	193
Figura B.7 –	Difratômetro Habber com câmara de alta temperatura acoplada, linha de luz D10B – XPD no LNLS. Em detalhe, detector de raios X, câmara de alta temperatura onde é acondicionada a amostra, e porta-amostra para fixação na câmara de alta temperatura.....	194
Figura B.8 –	Politriz automática utilizada na preparação das amostras por ceramografia.....	194
Figura B.9 –	Metalizadora modelo BalTec MED 020.....	194
Figura B.10 –	Microscópio eletrônico de varredura LEO 1450VP.....	195
Figura B.11 –	Rugosímetro modelo Mitutoyo SJ-201.....	195
Figura B.12 –	Aparato utilizado para medidas dos módulos elásticos através do método do pulso-eco, UNESP – Rio Claro. O transdutor maior é usado para pulsos transversais e o menor para pulsos longitudinais. Na tela do osciloscópio está congelado o sinal (ecos) obtido para amostra.....	195
Figura B.13 –	Incubadora úmida com atmosfera de CO ₂ utilizada em testes de citotoxicidade realizados no IPEN. Em destaque, frascos contendo extratos do material analisado.....	196
Figura B.14 –	Leitor de ELISA para quantificação da densidade óptica da microplaca em teste de citotoxicidade, IPEN.....	196
Figura B.15 –	Banho-maria marca Nova Técnica modelo CT269 com amostras durante teste de bioatividade realizado no LaMaV/UFSCar.....	196
Figura B.16 –	Equipamento FTIR marca Perkin Elmer modelo Spectrum GX, LaMaV/UFSCar.	197
Figura E.1 –	Análise térmica do vidro 3CaO.P ₂ O ₅ -SiO ₂ -MgO, resultados de DTA e TG.....	201

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 –	Concentração iônica (mM) da solução simuladora do fluido corpóreo (SBF-K9) e do plasma sanguíneo humano.....	47
Tabela 2.2 –	Propriedades mecânicas de cerâmicas bioativas comerciais e do osso.....	53
Tabela 2.3 –	Classificação dos fosfatos de cálcio em função da razão molar Ca:P e do produto de solubilidade (K_{ps}).....	54
Tabela 3.1 –	Designação das amostras obtidas pelo processo de tratamento térmico de cristalização.....	67
Tabela 3.2 –	Relação entre a massa das amostras V775-4, V850-4, V950-4, V975-4 e V1100-4 e do estanho metálico (padrão interno).....	70
Tabela 3.3 –	Sequência de colocação dos reagentes para preparo da solução SBF-K9.....	83
Tabela 4.1 –	Comparação entre a composição química nominal e a composição determinada por análise química.....	87
Tabela 4.2 –	Temperaturas referentes ao início de cristalização (T_x) e de máxima cristalização (T_p) das fases formadas.....	90
Tabela 4.3 –	Quantificação estimada da fase whitlockite em alguns vitrocerâmicos pelo método do padrão interno.....	100
Tabela 4.4 –	Relação de fase vítrea e fase cristalina presentes nos materiais.....	104
Tabela 4.5 –	Massa específica, densidade relativa e porosidade aparente das amostras V700-4, V775-4, V975-4 e V1100-4.....	121
Tabela 4.6 –	Análise de regressão linear dos dados experimentais de acordo com equação proposta por Sargent (Equação 4.1).....	127
Tabela 4.7 –	Parâmetros da indentação em função da carga de indentação (P) determinados para as amostras V700-4, V775-4, V800-4 e V900-4.....	132
Tabela 4.8 –	Módulo de Ruptura e rugosidade superficial das amostras em estudo.....	141
Tabela 4.9 –	Comparação das velocidades ultrassônicas longitudinais (V_L) e transversais (V_T) do vidro e vitrocerâmicos investigados neste estudo com dados obtidos da literatura.....	145

Tabela 4.10 –	Coeficiente de Poisson (ν) e correlação da porosidade com o módulo de Young (E_0).....	147
Tabela 4.11 –	Propriedades elásticas (E – Módulo de Young, G – Módulo de Cisalhamento, K – Módulo Volumétrico, ν – Coeficiente de Poisson) de fosfatos, do osso e do dente comparados com as propriedades obtidas para o material em estudo.....	148
Tabela 4.12 –	Resultados do ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do corante vermelho neutro.....	149
Tabela 4.13 –	Correlação das mudanças ocorridas no espectro de FTIR da superfície do <i>Bioglass</i> 45S5 com as principais reações de formação da camada de HCA.....	153
Tabela D.1 –	Resultado da análise química do vidro emitido pelo CCDM UFSCar/DEMa.....	200

LISTA DE SIGLAS

NBO – *Non Bridging Oxygen*

NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*

VC – vitrocerâmico(s)

DTA – *Differential Thermal Analysis*

DSC – *Differential Scanning Calorimetry*

β -TCP – *β -Tricalcium Phosphate*

SBF-K9 – *Simulated Body Fluid* – Kokubo nº 9

β -TCMP – *β -Tricalcium Magnesium Phosphate*

HCA – Hidroxicarbonatoapatita

ACP – *Amorphous Calcium Phosphate*

OCP – *Octacalcium Phosphate*

CaP – Fosfato de cálcio

ISE – *Indentation Size Effect*

DRX – Difractometria de raios X

HRXRD – *High Resolution X-ray Diffraction*

JCPDS – *Joint Committee Powder Diffraction Standards*

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

DR – Densidade Relativa

FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

PDF – *Powder Diffraction File*

IC – Índice de cristalinidade

CET – Coeficiente de Expansão Térmica

LISTA DE SÍMBOLOS

T_m	– Temperatura de fusão do cristal
T_g	– Temperatura de transição de vítrea ou temperatura de transformação vítrea
I_B	– Índice de bioatividade
HV	– Dureza Vickers
σ_f	– Resistência à fratura
E	– Módulo de Young
K_{Ic}	– Tenacidade à fratura
P	– Carga de indentação
a	– metade do tamanho da diagonal de indentação
l	– tamanho da trinca formada após teste de indentação Vickers
ν	– Coeficiente de Poisson
G	– Módulo de cisalhamento
K	– Módulo volumétrico
T_x	– Temperatura de início do processo de cristalização
2θ	– Ângulo de difração
P_{ap}	– Porosidade aparente
ρ	– Massa específica
V_L	– Velocidade longitudinal
V_T	– Velocidade transversal
T_p	– Temperatura de máxima taxa de cristalização
H_o	– Dureza real
P_o	– Carga de indentação crítica
IC_{50}	– Índice de citotoxicidade
V700-1	– amostra tratada termicamente a 700 °C por 15 minutos
V700-4	– amostra tratada termicamente a 700 °C por 4 horas (240 minutos)
V700-8	– amostra tratada termicamente a 700 °C por 8 horas (480 minutos)
V775-1	– amostra tratada termicamente a 775 °C por 15 minutos
V775-4	– amostra tratada termicamente a 775 °C por 4 horas (240 minutos)
V775-8	– amostra tratada termicamente a 775 °C por 8 horas (480 minutos)
V800-1	– amostra tratada termicamente a 800 °C por 15 minutos
V800-2	– amostra tratada termicamente a 800 °C por 2 horas (120 minutos)

V800-4 – amostra tratada termicamente a 800 °C por 4 horas (240 minutos)
V800-8 – amostra tratada termicamente a 800 °C por 8 horas (480 minutos)
V850-1 – amostra tratada termicamente a 850 °C por 15 minutos
V850-2 – amostra tratada termicamente a 850 °C por 2 horas (120 minutos)
V850-4 – amostra tratada termicamente a 850 °C por 4 horas (240 minutos)
V850-8 – amostra tratada termicamente a 850 °C por 8 horas (480 minutos)
V900-1 – amostra tratada termicamente a 900 °C por 15 minutos
V900-2 – amostra tratada termicamente a 900 °C por 2 horas (120 minutos)
V900-4 – amostra tratada termicamente a 900 °C por 4 horas (240 minutos)
V900-8 – amostra tratada termicamente a 900 °C por 8 horas (480 minutos)
V975-1 – amostra tratada termicamente a 975 °C por 15 minutos
V975-2 – amostra tratada termicamente a 975 °C por 2 horas (120 minutos)
V975-4 – amostra tratada termicamente a 975 °C por 4 horas (240 minutos)
V975-8 – amostra tratada termicamente a 975 °C por 8 horas (480 minutos)
V1000-4 – amostra tratada termicamente a 1000 °C por 4 horas (240 minutos)
V1050-4 – amostra tratada termicamente a 1050 °C por 4 horas (240 minutos)
V1100-4 – amostra tratada termicamente a 1100 °C por 4 horas (240 minutos)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
1.1	JUSTIFICATIVAS	32
1.2	OBJETIVOS	33
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
2.1	VIDROS	34
2.1.1	O conceito de estado vítreo	34
2.1.2	Estrutura vítrea	35
2.1.3	Separação de fases	37
2.2	VITROCERÂMICOS	39
2.2.1	Propriedades	40
2.2.2	Processo de cristalização	41
2.3	BIOMATERIAIS	43
2.3.1	Bioatividade	46
2.3.1.1	As etapas de formação da hidroxicarbonatoapatita (HCA)	48
2.3.2	Biovidros e vitrocerâmicos bioativos	51
2.3.3	Biomateriais à base de fosfato de cálcio	53
2.4	PROPRIEDADES MECÂNICAS	55
2.4.1	Módulo de ruptura	55
2.4.2	Dureza	57
2.4.3	Tenacidade à fratura	58
2.4.4	Módulo de elasticidade	60
3	MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.1	MATERIAIS	63
3.2	MÉTODOS EXPERIMENTAIS	64

3.2.1	Preparação do biovidro	64
3.2.2	Preparação das vitrocerâmicas – Tratamentos térmicos	66
3.2.3	Técnicas de caracterização	67
3.2.3.1	Análise térmica	67
3.2.3.2	Análise por difratometria de raios X	68
3.2.3.3	Determinação dos coeficientes de expansão térmica das fases cristalinas utilizando difratometria de raios X de alta resolução em alta temperatura	71
3.2.3.4	Análise microestrutural por microscopia	73
3.2.3.5	Determinação da massa específica, densidade relativa e porosidade aparente	74
3.3	PROPRIEDADES MECÂNICAS	75
3.3.1	Dureza Vickers (HV)	75
3.3.2	Tenacidade à fratura (K_{IC})	76
3.3.3	Módulo de ruptura por flexão em 4-pontos (σ_f)	78
3.3.4	Módulos Elásticos	79
3.4	AVALIAÇÃO BIOLÓGICA	80
3.4.1	Teste de Citotoxicidade	80
3.4.2	Teste de bioatividade	82
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA MISTURA DE PÓS	85
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS VIDROS E DOS VITROCERÂMICOS	86
4.2.1	Caracterização Química	86
4.2.2	Caracterização Térmica	87
4.2.3	Caracterização das fases cristalinas presentes	91
4.2.3.1	Avaliação das fases cristalinas em função da temperatura de tratamento térmico	91
4.2.3.2	Avaliação das fases cristalinas em função do tempo de tratamento térmico	101
4.2.3.3	Caracterização estrutural da fase whitlockite	105
4.2.4	Caracterização microestrutural por microscopia	112

4.2.5	Massa específica, densidade relativa e porosidade aparente	121
4.3	PROPRIEDADES MECÂNICAS	123
4.3.1	Dureza e Tenacidade à fratura	123
4.3.1.1	Efeito da carga de indentação Vickers na dureza e tenacidade à fratura	124
4.3.1.2	Efeito da temperatura de tratamento térmico na dureza e tenacidade à fratura	134
4.3.1.3	Efeito do tempo de tratamento térmico na dureza e tenacidade à fratura	138
4.3.2	Módulo de Ruptura	141
4.3.3	Módulos Elásticos	143
4.4	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	148
4.4.1	Avaliação da citotoxicidade	148
4.4.2	Avaliação da bioatividade	151
5	CONCLUSÕES	169
5.1	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	172
	REFERÊNCIAS	173
	APÊNDICE A – CÁLCULO DA MASSA DE CADA REAGENTE PARA OBTENÇÃO DE VIDRO DO SISTEMA $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{SiO}_2 \cdot \text{MgO}$	190
	APÊNDICE B – FOTOS ILUSTRATIVAS DOS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	192
	APÊNDICE C – CÁLCULO DA MASSA DE CADA REAGENTE PARA OBTENÇÃO DE VIDRO <i>BIOGLASS</i> 45S5	198
	APÊNDICE D – ANÁLISE QUÍMICA DO VIDRO	200
	APÊNDICE E – ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA) E TERMOGRAVIMETRIA (TG) DO VIDRO	201

1. INTRODUÇÃO

Os constantes avanços obtidos na medicina vêm conduzindo a um evidente aumento da expectativa de vida da população mundial, e consequentemente, estão proporcionando maior qualidade de vida às pessoas que se encontram na “melhor idade”. Entretanto, o desgaste e a redução das propriedades e atividades dos tecidos e órgãos que constituem o corpo humano são processos inerentes ao envelhecimento dos seres vivos. Uma prova da limitação do corpo humano é que, mesmo com o prolongamento da vida e a manutenção dos altos padrões trazidos pelos avanços tecnológicos, no final da década de 90, oito milhões de cirurgias envolvendo patologias e falhas em tecidos e órgãos foram realizadas nos Estados Unidos da América [1].

Frente a esta problemática, busca-se o desenvolvimento de tecnologias para a produção de novos recursos, como pesquisas na área de biomateriais que possam substituir os ditos Biomateriais Tradicionais. Estes biomateriais Tradicionais foram os primeiros a serem utilizados, os quais foram inicialmente desenvolvidos para serem aplicados em outras áreas da engenharia que não a biomédicas (exemplo, algumas ligas de titânio usadas em aplicações aeroespaciais), mas que após testes *in vitro*, *in vivo* e ensaios clínicos preliminares foram escolhidos para serem utilizados como biomateriais. Por não terem sido propriamente desenvolvidos para tal aplicação, os Biomateriais Tradicionais após implantados são reconhecidos como agentes estranhos pelo organismo, causando, em alguns casos, resposta inflamatória através de processo de reparo por cicatrização, o que não é conveniente ao organismo. Os Novos Biomateriais seriam então projetados já especificamente para uma determinada aplicação biomédica e aptos a conduzir processos inflamatórios e imunológicos para viabilizar regeneração do tecido anfitrião, em termos morfológicos e de biofuncionalidade [2].

A utilização clínica de vidros como biomaterial surgiu através do trabalho pioneiro de Larry Hench na década de 60, com o desenvolvimento do *Bioglass*[®] 45S5 [2]. A principal característica diferenciadora deste material biocompatível [3] é a sua capacidade para promover uma rápida e durável ligação química, através de uma interface apatítica, com o tecido ósseo, o que lhe valeu a designação de vidro bioativo. Com o seu desenvolvimento, nasceu o conceito de bioatividade e acelerou-se toda a investigação realizada no campo dos materiais para restauração óssea.

Vidros como o *Bioglass*[®] 45S5, alguns VC, e ainda, os materiais cerâmicos à base de fosfato de cálcio, constituem um vasto grupo de materiais designados por biocerâmicos. Os biocerâmicos são geralmente classificados em bioinertes (exemplo: alumina e zircônia), porosos (ex: hidroxiapatita porosa), reabsorvíveis (exemplo: fosfato tricálcico), além dos bioativos já referenciados [4].

Apesar de alguns sistemas de vidros apresentarem boa bioatividade, esses materiais possuem baixa resistência mecânica e baixa tenacidade à fratura, reduzindo a possibilidade de sua aplicação em situações estruturais de alta confiabilidade e limitando o uso dos biovidros comerciais na forma de particulados ou granulados. Devido a esta limitação, poucos implantes comerciais usinados são atualmente encontrados, tal como o A-W Cerabone [3], sendo, portanto, de interesse deste trabalho o desenvolvimento de materiais bioativos com boas propriedades mecânicas que possibilitem a sua usinagem. Notadamente, a forma mais utilizada para a manipulação da microestrutura de sistemas de vidros, a qual possibilita uma considerável melhoria das propriedades mecânicas e consequentemente, a ampliação do uso destes materiais em sistemas de implantes, é a cristalização parcial [5-7]. Porém, é sabido que a cristalização parcial de vidros pode diminuir o nível de bioatividade, a tal ponto que um vidro bioativo pode tornar-se um material inerte [8], sendo necessário então para o desenvolvimento de um material saber contrabalancear estas propriedades.

O desenvolvimento de vidros do sistema $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ tem recebido crescente atenção, principalmente durante as duas últimas décadas, devido a sua apropriada aplicação biomédica [5,9-11]. Tem sido reportado que alguns VC deste sistema após processo de cristalização indicaram a presença de fases fosfatadas, como apatita e whitlockite, e/ou silicatadas como β -wollastonita e diopsídio, e apresentam boas propriedades mecânicas e a habilidade de formar ligações químicas fortes com o osso [12,13]. O efeito de mudanças da composição na bioatividade e no comportamento da cristalização de alguns VC também tem sido investigado, para diferentes regiões localizadas no sistema $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ [14-16].

Diferentes composições dentro do diagrama de fases $3\text{CaO.P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ (Figura 1.1) são estudadas há mais de 20 anos por pesquisadores da Universidade de Aveiro, em especial pelo grupo coordenado pela Prof^a Dr^a Maria Helena F. V. Fernandes. Estas composições, circundadas no diagrama, possuem boa bioatividade [17,18], favorecendo seu uso como biomateriais em caso de preenchimento ósseo parcial, por exemplo. Foi observado um bom número de trabalhos que avaliam os efeitos da

cristalização parcial desse material na bioatividade [9,14,17,19], porém, pouco destaque foi dado para os seus efeitos nas propriedades mecânicas.

Desta forma, buscando a obtenção de materiais bioativos em formato consolidado, a composição E (57,75% $3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5$ – 30% SiO_2 – 17,25% MgO) destacada no diagrama de fases foi escolhida em comum acordo com os pesquisadores da Universidade de Aveiro para ser desenvolvida e caracterizada durante o desenvolvimento deste trabalho de tese. Esta composição foi escolhida por apresentar duas importantes características: a boa bioatividade do vidro [14,17] e a usinabilidade mostrada pelo VC, em estudos preliminares. Uma vez definida a composição a ser desenvolvida, alguns estudos tornaram-se de grande interesse, tais como os estudos relativos aos parâmetros de processamento do material e também as avaliações do efeito da cristalização do vidro sobre as propriedades mecânicas e biológicas.

Figura 1.1 – Diagrama de fases da superfície líquida do sistema $3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5$ - SiO_2 - MgO (% em peso), adaptado de SATA, 1958 [20]. Destaque dado a composição E (57,75% $3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5$ – 30% SiO_2 – 17,25% MgO) desenvolvida e caracterizada durante este trabalho.

1.1. JUSTIFICATIVAS

A motivação para o desenvolvimento de biomateriais se dá em diferentes aspectos, são previstos ganhos importantes na área da saúde, mas também os avanços poderão ditar novos rumos para a indústria de biotecnologia no Brasil [2]. Produtos desenvolvidos com conhecimentos biotecnológicos possuem grande valor agregado e, portanto, elevado valor de mercado. Os países desenvolvidos mais uma vez já saíram na frente desta corrida tecnológica, e assim, países em desenvolvimento, como o Brasil, devem se mobilizar para que, num futuro próximo, não sejam dependentes desta nova tecnologia. Assim, busca-se com a atual tese contribuir para o desenvolvimento científico e tecnológico do campo dos biomateriais bioativos no País, o qual é bastante dependente da tecnologia externa, através da consolidação de uma classe de materiais para diferentes aplicações que visam à restauração óssea.

A seleção e o desenvolvimento de um biomaterial para implante exigem sempre, além das considerações anatômicas e funcionais ligadas à forma e à função da estrutura a ser substituída, três considerações básicas: - propriedades do material, - interação do material com o sistema biológico, - projeto e processo de manufatura, cuja intersecção entre estes três planos determina as melhores condições de trabalho a serem adotadas. Por isso, no estudo de biovidros e VC bioativos desta tese, avaliações mecânicas (dureza, tenacidade à fratura, módulos elásticos e resistência à fratura) e biológicas (citotoxicidade e bioatividade) foram fatores relevantes no projeto do biomaterial.

Na presente tese, o desenvolvimento de VC com diferentes graus de cristalinidade objetiva a obtenção de classes de materiais com melhor desempenho mecânico que o vidro base, e com variados índices de bioatividade, diversificando suas propriedades e adequando-as às condições necessárias para determinada aplicação.

A composição escolhida neste trabalho (57,75% $3\text{CaO.P}_2\text{O}_5$ – 30% SiO_2 – 17,25% MgO) foi inicialmente caracterizada por trabalhos anteriores, os quais enfocam a estrutura vítrea do material, o processo de separação de fases, a cinética de cristalização e a bioatividade do material vítreo, entretanto a avaliação das propriedades mecânicas e a relação destas com as fases cristalinas presentes, bem como a bioatividade de VC desta composição, ainda não foram estudadas. Daí, o interesse em correlacionar propriedades mecânicas x bioatividade x cristalização.

Além disso, diferentes estudos sobre as fases cristalinas presentes nos VC foram abordados, tais como: determinação do coeficiente de expansão térmica da fase cristalina principal; caracterização cristalográfica das fases pelo uso de difração de raios X de alta resolução; e determinação da fração volumétrica da fase cristalina. Isto porque, segundo Strnad [21], as propriedades dos VC dependem primeiramente das propriedades físico-químicas da fase cristalina principal, a qual ocupa um maior volume no material. Em seguida, as propriedades da fase residual vítrea devem ser consideradas, dependendo da quantidade presente no volume total do material.

1.2. OBJETIVOS

O objetivo central do presente trabalho é o desenvolvimento e a caracterização de VC bioativos obtidos a partir da composição 57,75% $3\text{CaO.P}_2\text{O}_5$ – 30% SiO_2 – 17,25% MgO (% peso), com diferentes graus de cristalização, estando presentes fases cristalinas que melhorem o desempenho mecânico do vidro original, visando o uso destes materiais em implantes ósseos usinados. Além disso, visa-se analisar o efeito da cristalização parcial na bioatividade. Dessa forma é possível destacar os seguintes itens, pertinentes ao estudo proposto:

- Estabelecer o comportamento térmico dos vidros perante o processo de cristalização.
- Identificar as fases cristalinas decorrentes do processo de cristalização, verificar o efeito dos parâmetros de tratamento térmico (tempo e temperatura) no grau de cristalização dos VC, e caracterizar as fases cristalinas por difração de raios X de alta resolução, usando Método de Rietveld.
- Analisar por microscopia o aspecto morfológico das superfícies dos vidros e VC.
- Estudar a influência dos parâmetros de tratamento térmico (tempo e temperatura) e conseqüente cristalização dos vidros nas propriedades mecânicas, tais como dureza, tenacidade à fratura, módulo de fratura por flexão e módulo elástico.
- Avaliar o comportamento biológico dos vidros e VC por meio de testes *in vitro* de citotoxicidade e de bioatividade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. VIDROS

2.1.1 O conceito de Estado Vítreo

Estruturalmente, os vidros apresentam ordenação atômica apenas em curto alcance, isto é, são amorfos, assemelhando-se a líquidos, embora à temperatura ambiente, estes aparentam-se com materiais sólidos, devido a sua rigidez mecânica [22]. Assim, os termos *sólidos não-cristalinos* ou *líquidos super-resfriados* são as designações mais comuns utilizadas para definir os materiais vítreos.

Com base em diagramas volume específico x temperatura, tal como o apresentado na Figura 2.1, uma melhor definição da estrutura do vidro pode ser dada. Esta definição leva em consideração o conceito de temperatura de transição vítrea, o qual constitui a diferença fundamental entre vidros e sólidos cristalinos.

Figura 2.1 – Diagrama esquemático de volume específico x temperatura de um vidro. Adaptado de Varshneya, 2006 [23].

Considerando o diagrama apresentado na Figura 2.1, um dado material encontra-se na forma líquida em temperaturas mais elevadas. Durante o resfriamento, o volume

específico deste material diminui gradualmente. O ponto T_m corresponde ao ponto de fusão do cristal, sendo definido como a temperatura em que o sólido e o líquido possuem a mesma energia livre de Gibbs, isto é, uma quantidade infinitamente pequena de cristais está termodinamicamente em equilíbrio com o líquido [23]. Abaixo desta temperatura, há dois possíveis trajetos a serem cumpridos durante o resfriamento contínuo. Um deles é o caminho da cristalização, o qual pode ocorrer caso (i) exista um número grande de núcleos presentes no fundido, e (ii) exista uma taxa de crescimento de cristais alta o suficiente [23]. Este caminho leva a uma brusca diminuição do volume específico do material, o que caracteriza o processo de solidificação.

O outro trajeto ocorrerá caso o processo de cristalização não seja possível, geralmente devido à alta taxa de resfriamento, e corresponde a formação de líquido super-resfriado. A estrutura do líquido se reorganiza continuamente em um menor volume ao longo do resfriamento, o que requer uma menor energia do sistema. Conforme o resfriamento prossegue, as moléculas do material tornam-se cada vez menos móveis, até que os grupos moleculares não possam mais se rearranjar em velocidade rápida suficiente para alcançar o volume característico daquela temperatura. O material seguindo pela reta de resfriamento, em temperatura abaixo da curva de transformação, comporta-se essencialmente como um sólido. Este é o *estado vítreo*. Sumarizando, os sólidos cristalinos representam um estado termodinamicamente estável enquanto que os vidros, abaixo de T_g , representam um estado termodinamicamente metaestável, os quais não passam à forma estável cristalina porque a cinética da transformação à temperatura ambiente é praticamente nula [24].

A região da Figura 2.1 marcada como intervalo de transição vítrea é a faixa de temperatura necessária para que ocorra relaxação, ou seja, acomodação dos átomos na estrutura, e é denominada *região de transição vítrea* ou *região de transformação vítrea*. A transição vítrea é o fenômeno que caracteriza o estado vítreo, e então, vidros podem ser definidos como material não-cristalino que apresenta o fenômeno de relaxação estrutural, ou seja, temperatura de transição vítrea [24].

2.1.2 Estrutura Vítrea

Ao se tratar da estrutura de vidros do sistema $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{SiO}_2 \cdot \text{MgO}$, é possível abordar o assunto relacionando-o a estrutura dos vidros silicatos e fosfatados, além do

comportamento dos elementos alcalino-terrosos nesta. A conectividade do vidro é um parâmetro importante no estudo da bioatividade, pois o comportamento bioativo está diretamente ligado à reatividade do material. O tema bioatividade será abordado posteriormente no item 2.3.1.

A unidade básica dos vidros de silicato é o grupo $[\text{SiO}_4]^{4-}$, representado estereoquimicamente por uma coordenação de quatro íons O^{2-} ao redor de cada íon Si^{4+} . Vidros exibem ordem apenas a curta distância, a qual é conferida pela presença destes poliedros de coordenação, e cuja regularidade de frequência determina o grau de ordem a média distância [25]. As redes dos vidros de silicato e dos silicatos cristalinos se formam a partir da união dos grupos $[\text{SiO}_4]^{4-}$, como unidades estruturais primárias, mostradas na Figura 2.2.

Figura 2.2 – Representação esquemática de tetraedros $[\text{SiO}_4]^{4-}$ formando diferentes silicatos.

Os vidros de fosfato, assim como os vidros silicatos, apresentam unidades estruturais tetraédricas PO_4^{3-} ; mas ao contrário dos silicatos, essas unidades podem se ligar a no máximo três unidades similares, formando anéis ou cadeias, como representado na Figura 2.3.

Em vidros bioativos de sistemas contendo os elementos silício e fósforo, o silício é que acaba atuando como o elemento formador de rede. O fósforo, embora origine estruturas do tipo PO_2 e seja considerado também um formador de rede, nos biovidros ele tende a formar agregados isolados do tipo orto-fosfato $[\text{PO}_4]^{3-}$ [26,27].

Figura 2.3 – Representação esquemática de tetraedro $[PO_4]^{3-}$ formando cadeia de fosfato. Baseado em Chemistry, Structures & 3D Molecules @ 3Dchem.com.

A adição de óxidos alcalinos e alcalino-terrosos aos vidros silicatos e fosfatos rompe ligações do oxigênio com a rede estrutural e gera oxigênios não ligantes (NBO) que funcionam quase sempre como modificadores de rede.

Em estudo realizado por Oliveira e colaboradores [28] com espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), foram investigados aspectos estruturais de vidros do sistema $3CaO.P_2O_5-SiO_2-MgO$, sugerindo que íons Si^{4+} estão presente em quádrupla coordenação e os íons P^{4+} aparecem em estrutura de orto-fosfatos. Os íons Mg^{2+} , agindo como modificadores de rede, não só substituem os íons de Ca^{2+} , mas também promovem a reação de desproporcionamento $2Q^2 \leftrightarrow Q^4 + Q^0$, rompendo com ligações Si-O-Si, aumentando o número de NBO, e consequentemente, diminuindo a T_g e a viscosidade do material. Com a substituição de Ca^{2+} por Mg^{2+} , há maior quantidade de fase amorfa separada, a qual apresenta os átomos de Si arranjados em espécies Q^4 , enquanto que na matriz vítrea os átomos de Si aparecem como espécies Q^2 , e em menores quantidades, como espécies Q^0 .

2.1.3 Separação de fases

Alguns sistemas formadores de vidros exibem imiscibilidade líquido-líquido, o que resulta em fases amorfas separadas presentes em um mesmo material. A explicação bem simples de como ocorre o processo de separação de fases é baseada no comportamento da energia livre do sistema [29]. Se a mistura de dois componentes resultar em uma menor

energia livre, a mistura será homogênea. Caso contrário, se termodinamicamente for favorável a separação da mistura em duas fases, ela ocorrerá, levando-se em consideração fatores cinéticos.

O processo de separação de fases amorfas pode ser classificado em dois tipos: nucleação e crescimento e spinodal. Quando o processo de separação de fases é do tipo nucleação e crescimento o vidro é formado por uma matriz e uma ou mais fases dispersas, as quais apresentam tendência para adquirir a forma esférica; neste caso, as fases dispersas não apresentam conectividade nem variação composicional e os seus contornos são bem definidos, distribuindo-se aleatoriamente na matriz, quer em tamanho quer em posição. Quando o processo é o de decomposição spinodal o vidro é formado por uma matriz e uma ou mais fases que apresentam uma tendência preferencial para adquirir uma forma não esférica de elevada conectividade; estas fases apresentam variação composicional e distribuem-se regularmente na matriz, quer em tamanho, quer em posição [30-32].

Uma modificação incomum do primeiro tipo de microestrutura é relatada para certas composições em alguns sistemas formadores de vidros, tais como $\text{SrO-B}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ [33], Mg-Si-Al-O-N [34,35] e $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ [36-38]. Nesta modificação, partículas dispersadas ricas em sílica estão desenvolvidas em formatos altamente convolutos, ao invés das usuais gotas esféricas. Os autores atribuíram a formação das mórulas ao processo de agregação de gotas e a sua preservação às diferenças de viscosidade existentes entre a fase dispersa e a matriz.

Shelby [30] afirma que se for levado em consideração o papel importante que a viscosidade tem na determinação da taxa de transporte de massa em fundidos, fica fácil entender o seu efeito na cinética de separação de fase. Seguindo esta mesma linha de raciocínio, Taylor [39] propõe que a elevada fluidez da matriz, permitindo o desenvolvimento de gradiente de difusão a distâncias de muitos micrometros, e a existência de uma fase dispersa em crescimento suficientemente viscosa para reter as instabilidades, são responsáveis pelo desenvolvimento deste tipo de morfologia durante o resfriamento de fundidos.

Em trabalhos realizados no sistema $3\text{CaO.P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$, Oliveira e colaboradores [36,38] observaram a existência de mórulas de sílica amorfa, sendo determinado que há na matriz um conteúdo de SiO_2 separada em torno de 7 – 7,5 % em peso, como mostra a micrografia apresentada na Figura 2.4.

Figura 2.4 – Micrografia da superfície de vidro recozido do sistema $3\text{CaO}.\text{P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$, mostrando separação de fase com morfologia do tipo morular. [38]

Ainda não é possível afirmar certamente qual o mecanismo responsável pelo desenvolvimento das formações morulares, mas sabe-se que este tipo peculiar de morfologia é observado somente em sistemas ternários ou mais complexos. Para maior compreensão da formação deste tipo de entidades são necessários trabalhos científicos desenvolvidos especificamente com este objetivo.

2.2. VITROCERÂMICOS

Vitrocerâmicos (VC) são materiais inorgânicos policristalinos contendo fase vítrea residual, obtidos através de processo de cristalização controlada de sistemas vítreos apropriados [40]. Essa nomenclatura indica que estes materiais cerâmicos não são processados da maneira usual, mas através de duas etapas: a primeira envolvendo fusão e conformação do artigo vítreo no formato desejado; e uma segunda etapa envolvendo a transformação do vidro num material policristalino (mono ou multifásico) através dos mecanismos de nucleação e crescimento de cristais. Em função da composição e dos tratamentos térmicos adotados, em princípio é possível a obtenção de VC com diferentes microestruturas, tais como materiais livres de poros e trincas, com variadas porcentagens de diferentes fases cristalinas, microestrutura com grãos finos ou grandes, randomicamente ou preferencialmente orientados, conseqüentemente, abrangendo ampla faixa de

propriedades [41,42]. É possível encontrar estes VC nos mais diversos e exigentes ambientes, desde certas aplicações em utensílios domésticos, estruturais, térmicos, elétricos e espaciais, até biomédicos [43].

De particular interesse é a obtenção de biomateriais que possam ser utilizados em restaurações ósseas. Entretanto, algumas diferenças importantes devem ser salientadas no desenvolvimento de vitrocerâmicos para tais aplicações biomédicas. Para os materiais utilizados como implantes ósseos são desejadas características tais como: biocompatibilidade, e em muitos casos bioatividade, alto módulo de fratura, alta tenacidade à fratura, e módulo de Young baixo compatível ao do osso ($\sim 30\text{GPa}$) [10].

2.2.1 Propriedades

Há quase duas décadas atrás, mais de 1200 patentes já cobriam o campo dos vitrocerâmicos, através de publicações científicas e tecnológicas [43]. Holand e Beall [41] discorrem sobre um amplo leque de propriedades que podem ser apresentadas. Algumas dessas propriedades são fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e serão citadas a seguir.

- Propriedades Químicas:

Propriedades variando entre a estabilidade química e a capacidade de reabsorção podem ser controladas de acordo com a natureza do cristal, da matriz vítrea ou a natureza da interface entre o vidro e o cristal. Como um resultado, vitrocerâmicos reabsorvíveis ou então quimicamente estáveis podem ser produzidos.

- Propriedades Biológicas:

Vitrocerâmicas biocompatíveis têm sido desenvolvidas para medicina humana e para odontologia. Além disso, materiais bioativos são usados em implantologia, em casos de ortopedia, cirurgias do ouvido médio, espaçador intervertebral e reconstruções maxilo-faciais e ósseas diversas. Algumas composições de vitrocerâmicos com fase residual vítrea quando introduzidas em meio tal como os fluidos corpóreos, sofrem dissolução parcial de cálcio e fósforo, promovendo uma rápida e durável ligação química, através de uma

interface composta de apatita, com o tecido ósseo, sendo portanto bioativos. Estes materiais são também capazes de suportar cargas funcionais oriundas do local de implantação.

- Propriedades Mecânicas:

Apesar de altos valores de tensão de ruptura ainda não serem alcançados em vitrocerâmicas, tal como encontrado para ligas metálicas, é possível alcançar resultados de até 500 MPa [41]. A tenacidade à fratura também tem sido aumentada consideravelmente ao longo dos últimos anos, valores de tenacidade à fratura maiores que $3 \text{ MPa.m}^{1/2}$ tem sido atingidos [41]. Nenhum outro material é capaz de unir estas propriedades à translucidez, e ainda permitir ser prensado ou fundido sem retração ou desenvolvimento de poros, como é o caso de vitrocerâmicos monolíticos.

2.2.2 Processo de Cristalização

A cristalização pode ser definida como a formação de uma fase sólida, com ordenação geométrica regular, a partir de uma fase estruturalmente desordenada. Esta mudança de fase requer uma diminuição da energia livre do sistema para que o processo seja espontâneo. Considerando-se que o vidro está num estado metaestável, a cristalização ocorrerá no sentido de alcançar o equilíbrio termodinâmico, com uma energia livre menor [40]. A cristalização pode ocorrer de forma controlada ou não (devitrificação). O termo cristalização refere-se então à combinação de dois processos: nucleação e crescimento de cristal. Estes dois processos requerem inicialmente a presença de um núcleo (nucleação) sobre o qual um cristal irá subsequentemente se desenvolver (crescimento de cristais) até um tamanho detectável [44].

No século XVII realizaram-se as primeiras tentativas de produção de materiais policristalinos a partir da cristalização controlada de vidros. Contudo, o primeiro vitrocerâmico comercial foi desenvolvido por Stookey, para a Corning Glass Works, em 1957 [45].

A cinética de cristalização deve então ser apropriadamente compreendida para a obtenção de materiais vitrocerâmicos com microestrutura e propriedades controladas. Os

tratamentos termodinâmicos e cinéticos destes processos encontram-se descritos em várias literaturas [25,41,46,47]. Estes estudos são geralmente baseados na dependência da fração de cristais formada com o tempo e/ou temperatura, a qual pode ser avaliada sob condições isotérmicas, através de técnicas de microscopia tradicional, ou em condições não-isotérmicas, por DTA/DSC.

O estudo da cinética de cristalização é bastante complexo face às características da componente experimental, pois neste trabalho estão envolvidas sucessivas e repetidas contagens do número de cristais em diferentes amostras. Em processos isotérmicos, além da dificuldade inerente à técnica, existe ainda o problema de se analisarem zonas muito localizadas das amostras, o que por si só pode inviabilizar os resultados. O recurso a técnicas alternativas envolvendo processos não-isotérmicos, como é o caso das técnicas termo-analíticas, veio dinamizar esta área [48-51].

A análise térmica diferencial (DTA) e a análise por calorimetria exploratória de varredura (DSC) são técnicas muito utilizadas no estudo cinético de transformação de fases em materiais, nomeadamente em vidros. Se estas técnicas forem devidamente utilizadas, elas acabam sendo uma ferramenta relativamente simples, de ampla divulgação, que requer um reduzido tempo de execução e que pode ser aplicada continuamente, podendo atingir temperaturas da ordem dos 1500 °C, utilizando apenas uma pequena quantidade de amostra (tipicamente 50 – 200 mg).

Em trabalho recente, Fokin e colaboradores [52] compararam as técnicas analíticas (DSC/DTA) com o método de microscopia tradicional, para estimar o intervalo de temperatura de máxima taxa de nucleação e o número de núcleos supercríticos. Foi mostrado que se as técnicas não-isotérmicas forem adequadamente empregadas, interessantes informações sobre a cinética de cristalização podem ser extraídas, o que inclui a fração cristalizada e as taxas de nucleação. Entretanto, para obterem-se resultados quantitativos são necessários alguns dados preliminares, o que torna a técnica (DTA/DSC) tão trabalhosa quanto às técnicas tradicionais de microscopia.

Oliveira e colaboradores [53] estudaram o processo de cristalização de vidros do sistema $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$ através de análise térmica diferencial (DTA) com dois tipos de amostras, amostras não nucleadas e amostras nucleadas a 730 °C. Os resultados de DTA, mostrados na Figura 2.5, demonstram que prévia nucleação isothermal abaixa a temperatura do primeiro pico exotérmico, mas em adição, a análise por difratometria de raios X sugere que o crescimento de cristais permanece negligenciável durante este estágio de nucleação. O início da cristalização ocorre então em temperaturas maiores que 800 °C,

sendo o primeiro pico exotérmico atribuído à cristalização de β -tricálcio fosfato com Mg substituído (whitlockite), $3(\text{Ca,Mg})\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$.

Figura 2.5 – Análise térmica de vidro tratado termicamente (nucleado a 730 °C) e vidro não nucleado, adaptado de Oliveira e colaboradores, 1998 [53].

2.3. BIOMATERIAIS

O termo biomaterial foi definido na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento em Saúde em 1982, como: “Qualquer substância (outra que não seja droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo” [54].

Biomateriais devem apresentar propriedades especiais, as quais devem ser adaptadas de acordo com a aplicação a que destinam. De forma geral, não devem produzir qualquer resposta biológica adversa, local ou sistêmica, devem ser resistente à corrosão e ao desgaste [2]. Entretanto, dependendo da sua aplicação diferentes pré-requisitos podem ser requeridos, sendo em alguns casos, completamente opostos. Por exemplo, implantes ósseos do tipo scaffold polimérico precisam ser biodegradáveis, pois serão substituídos ao longo do tempo por tecido celular do próprio paciente. Já os componentes de válvulas mecânicas cardíacas precisam ser materiais bioestáveis, resistentes ao desgaste e não degradáveis com o tempo, pois poderão ser usadas por períodos de 20 anos ou mais.

Os pré-requisitos que um biomaterial deve preencher podem ser divididos em quatro grupos [55]:

- Biocompatibilidade: o implante deve resistir ao ataque do sistema biológico sem sofrer degradação ou perda de função e sem liberar substâncias lesivas ao hospedeiro, ao mesmo tempo em que o hospedeiro não deve sofrer problemas físicos ou químicos pela presença do material.
- Biofuncionalidade: propriedades físicas e mecânicas que permitem que um biomaterial desempenhe a função planejada.
- Esterilização: o material deve ser apto a ser submetido à esterilização, não afetando suas propriedades. Técnicas de esterilização incluem o uso de radiação gama, de gás oxí-etileno, e o processo de autoclavagem.
- Manufatura: o implante deve ser conformado na forma desejada, usando métodos economicamente viáveis, sem comprometimento das propriedades do material. Entretanto, esta última etapa é a que dificulta a produção real do dispositivo médico.

Conceitualmente, três gerações de biomateriais na ortopedia e na odontologia podem ser identificadas: materiais bioinertes (Primeira Geração), materiais bioativos e biodegradáveis (Segunda Geração) e os materiais designados para estimular reposta celular específica em nível molecular (Terceira Geração) [54-56].

Na Primeira Geração, a forma empírica era responsável pela escolha e eficiência do material, tendo o foco voltado para os materiais que combinassem propriedades físicas com a mínima resposta imunológica do tecido hospedeiro. Dentre os materiais metálicos, se destacam o aço inoxidável, as ligas de Co-Cr e as ligas de Ti (Ti6Al4V, NiTi, TiNb), para os materiais cerâmicos são enfatizadas a zircônia (ZrO₂), a alumina (α -Al₂O₃) e cerâmicas porosas, e dentre os poliméricos são evidenciados o silicone, PE (polietileno) e UHMWPE (polietileno de alto peso molecular), resinas acrílicas, poliuretanos, PMMA (polimetilmetacrilato) e PP (polipropileno) entre outros materiais, os quais eram utilizados em implantes ortopédicos e dentais, para a reposição de articulação, em válvulas cardíacas e em marcapassos, por exemplo [54-56].

A Segunda Geração pode ser definida pelo desenvolvimento de biomateriais com a capacidade de interagir com o meio biológico melhorando a resposta biológica e a ligação tecido/superfície, bem como pelo desenvolvimento de materiais reabsorvíveis que sofrem

degradação progressiva durante a regeneração do novo tecido. Nesta classe são encontrados os biovidros, os bio-vitrocerâmicos e os fosfatos de cálcio, e também os polímeros biodegradáveis de origem sintética ou natural, como o PGA (ácidos poliglicolídeo), o PLA (ácido polilático), o PCL (poli 3-caprolactona), o PHB (polihidroxibutirato), a quitosana, o PHEMA (poli 2-hidroxi-metacrilato de etila), o ácido hialurônico e os hidrogéis [54-56]

Pode-se dizer que atualmente a Terceira Geração de biomateriais está trazendo novas oportunidades de tratamentos e aplicações, combinando conceitos de bioatividade e biodegradabilidade, mas sem substituir plenamente os materiais das gerações anteriores. Esta geração é regida pela Engenharia de Tecidos e a utilização de materiais e implantes bioengenherados, onde podemos citar materiais que apresentam a capacidade de regenerar o tecido e não simplesmente substituí-lo, tal como a pele artificial (*Integra[®] Life Science*), cartilagem para regeneração de articulações (*Carticel[®], Genzyme Co.*), cimentos ósseos reabsorvíveis, componentes biológicos geneticamente engenheirados (como células ou proteínas morfogenéticas ósseas - BMP2) associadas com cerâmicas de fosfato de cálcio, colágeno ou hidrogéis, superfícies de titânio com revestimentos nanométricos de cerâmicas de fosfato de cálcio e estruturas tridimensionais (scaffolds) de cerâmicas de fosfato de cálcio associadas às células [54-56].

Quando um biomaterial sintético é alocado dentro do corpo humano, o tecido local reage ao redor do implante de diferentes maneiras, dependendo do tipo de material. O mecanismo de interação tecido-implante depende da resposta tecidual à superfície do implante (Figura 2.6), de forma que os biomateriais podem ser classificados [57] em:

1. Inerte (ou quase inerte): material após implantado exerce mínima interação com o tecido ao redor. Em geral, este tipo de material necessita de fixação do tipo morfológica, através de sutura ou parafusos, podendo ser cimentado, pois apresentam pequena aderência e crescimento ósseo apenas na superfície, na forma de cápsula fibrosa. Exemplo: Metais, Al_2O_3 , ZrO_2 , PE.
2. Poroso: a fixação deste tipo de biomaterial ocorre através do crescimento tissular para dentro de seus poros, com ligação mecânica, sendo conhecida por fixação do tipo biológica. Exemplo: hidroxiapatita porosa, metais revestidos com HA.
3. Bioativo: este tipo de biomaterial interage com os tecidos ósseos, através da cinética de modificações de sua superfície que é desencadeada pela sua implantação dentro do osso vivo. Reações de troca iônica entre o implante bioativo e os fluidos

corpóreos ao redor resultam na formação de camada de apatita carbonatada biologicamente ativa, a qual é quimicamente e cristalograficamente equivalente a fase mineral do osso. Assim, a fixação ocorre por ligação entre cristais de hidroxicarbonatoapatita e colágeno. Exemplo: hidroxipatita sintética, *Bioglass*[®], A-W *Cerabone*[®].

4. Reabsorvível: após implantação, o biomaterial começa a se dissolver (ser absorvido) e lentamente é substituído por tecido fibroso. Exemplo: ácido polilático, polímeros biodegradáveis, sais de fosfato de cálcio, β -TCP.

Figura 2.6 – Classificação dos biomateriais quanto à interação tecido-implante [2].

2.3.1 Bioatividade

Em 1967, Larry L. Hench foi incumbido de tentar resolver o problema de milhares de soldados que voltavam da Guerra do Vietnã e estavam tendo braços e pernas amputados, devido a implantes defeituosos. O cientista iniciou o trabalho em 1969 e dois meses depois apresentou um vidro que se soldava tão bem aos ossos e tecidos de ratos, que os pesquisadores não conseguiam separá-los. Aparentemente o vidro que Hench havia desenvolvido atraía as células ósseas. Em 1985, a *Food & Drug Administration* aprovou a petição da *U.S. Biomaterials Corp.* de utilizar o *Bioglass*[®], para substituir os ossos do ouvido médio, restaurando a audição [54-56]. Hench havia descoberto uma nova classe de materiais médicos, também conhecidos como bioativos.

Assim, o conceito de bioatividade foi introduzido por Hench [58] como a capacidade de um material provocar reação biológica específica na interface com o tecido hospedeiro, formando uma ligação forte entre o tecido vivo e o material. Definiu-se também o índice de bioatividade do material, I_B , um índice que quantifica o tempo necessário para ser formada mais que 50% da ligação entre o implante e o tecido vivo [58].

Este potencial de bioatividade pode ser avaliado através da formação de uma camada apatítica quando o material é colocado em contato com líquido acelular que simule os fluidos corpóreos. Atualmente, a solução mais utilizada em testes de avaliação da bioatividade é a SBF-K9 (*simulated body fluid*), uma solução aquosa acelular e aprroteica com concentração iônica próxima ao do plasma sanguíneo, desenvolvida por Kokubo e Takadama [59]. Na Tabela 2.1 é apresentada a concentração iônica da solução SBF-K9, em comparação à concentração do plasma sanguíneo.

Tabela 2.1 – Concentração iônica (mM) da solução simuladora do fluido corpóreo (SBF-K9) e do plasma sanguíneo humano [59].

	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ⁻
Simulated Body Fluid-K9	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Plasma sanguíneo	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

Os materiais bioativos abrangem uma classe de materiais que têm a capacidade de formar uma ligação interfacial forte com o tecido vivo adjacente, entretanto, o tempo para que esta ligação ocorra, o mecanismo da ligação, a espessura da zona de ligação e as propriedades mecânicas desta camada formada vão variar para cada material [58]. Hench e Wilson [57] falam que esta ligação ocorre através da formação de camada de hidroxycarbonatoapatita (HCA), a qual possui composição e estrutura equivalente à fase mineral do osso, na superfície do material. Esta HCA cresce como aglomerados policristalinos, e fibrilas de colágeno são incorporadas dentro destes aglomerados, vinculando a superfície inorgânica do implante aos constituintes orgânicos do tecido. A interface formada é similar àquela que ocorre naturalmente entre os ossos, os tendões e os ligamentos.

Como forma de distinguir estes diferentes materiais bioativos, Hench e Wilson [57] propuseram duas classes de bioatividade, nas quais os implantes se dividem em osteoindutores e em osteocondutores. Os implantes osteoindutores (Classe A) provocam uma resposta intracelular e outra extracelular, onde a resposta intracelular consta da presença de fatores que estimulam a diferenciação fenotípica em osteoblastos (osteoindução), possibilitando a proliferação de tecido ósseo em sua superfície, devido a um aumento da atividade destes osteoblastos. Estes implantes podem formar ligações tanto com tecidos moles como com o osso e apresentam elevados índices de bioatividade, $I_B = 8 - 13$. Nesta classe encontramos o *Bioglass*® 45S5 como representante, o qual possui $I_B =$

12. Em contrapartida, os implantes osteocondutores (Classe B) provocam apenas uma resposta extracelular à sua superfície, ou seja, o implante simplesmente providencia uma interface biocompatível, sobre a qual células responsáveis pela produção de tecido ósseo consigam aderir, crescer e atravessar todo o material (osteocondução). Os implantes Classe B, tais como A-W *Cerabone*[®], *Ceravital*[®] e a hidroxiapatita, ligam-se apenas ao osso e apresentam índices de bioatividade menores, $I_B = 3 - 6$ [60]. É interessante ressaltar que os implantes Classe A são osteoindutores e osteocondutores.

2.3.1.1 As etapas de formação da hidroxicarbonatoapatita (HCA)

A base do processo de ligação do osso aos vidros bioativos é a reatividade química, pois são as reações químicas que ocorrem na superfície do biomaterial que possibilitam a formação de HCA. Estas reações são determinadas pela sequência: lixiviação, dissolução e precipitação. Hench e Andersson [61] propõem um mecanismo para explicar a formação da camada de HCA na superfície de vidros silicatados, onde as primeiras etapas ou reações ocorrem na interface na presença de água destilada, solução tris-tampão ou SBF, não necessitando da presença de tecidos vivos:

1. Troca rápida de íons alcalinos como Na^+ e K^+ com H^+ e H_3O^+ , entre o vidro e a solução. Esta etapa geralmente é controlada por difusão, exibindo uma dependência do tempo do tipo $t^{-1/2}$.

2. Perda de sílica solúvel do vidro para a solução. Ocorre devido à dissolução da sílica da rede vítrea por ataque dos íons hidroxila que provocam a quebra de ligações Si-O-Si e a formação de silanol. Esta etapa é em geral controlada por reação interfacial, exibindo uma dependência direta com o tempo.

3. Condensação e repolimerização de espécies formadas na superfície empobrecida de íons alcalinos e alcalino-terrosos, resultando numa camada superficial rica em SiO_2 . Esta etapa pode ser ligeiramente acelerada por íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} presentes em solução [62].

4. Migração de grupos de Ca^{2+} e PO_4^{3-} do vidro para a superfície, através da camada rica em SiO_2 . Há formação de um filme amorfo rico em $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ (ACP – fosfato de cálcio amorfo) sobre a camada rica em sílica em poucos minutos, uma vez que os passos anteriores são rápidos.
5. Cristalização da camada amorfa rica em $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$. A cristalização desta camada dá-se por incorporação de OH^- , CO_3^{2-} e F^- .
6. Adsorção de proteínas específicas na camada de SiO_2 -HCA.
7. Ação de macrófagos.
8. Adesão e diferenciação celular.
9. Formação de matriz extracelular.
10. Mineralização da matriz.

As cinco primeiras etapas são mais rápidas e não dependem da presença de tecidos, estando representadas na Figura 2.7. A cinética destas reações depende apenas da composição dos vidros [63]. As demais etapas são reações de interação com o tecido.

Figura 2.7 – Representação esquemática da formação de camada de HCA sobre a superfície de biovidros em contato com SBF, baseado em Kokubo e colaboradores, 2003.¹⁰

As primeiras etapas de formação da camada de hidroxiapatita, em meio fisiológico natural ou simulado, como sugerido anteriormente pelo mecanismo de Hench e Andersson [61], mostram que a rede vítrea começa por sofrer hidroxilação superficial (etapa 1), seguida por policondensação dos grupos silanol assim formados (etapas 2 e 3), originando

uma camada de sílica-gel hidratada que favorece a mineralização. Entre estas etapas podem aparecer fases precursoras da hidroxiapatita, tais como o ACP (fosfato de cálcio amorfo - $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}]$) e o OCP (fosfato octacálcico - $[\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$), os quais parecem precipitar em sítios carregados negativamente entre as unidades $\text{Si}(\text{OSi})_3\text{O}^-$ da camada de sílica gel [64].

Estes precipitados, cuja composição se aproxima do TCP (fosfato tricálcico - $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$), são considerados responsáveis pela nucleação e a cristalização da hidroxiapatita [10]. Quando fosfatos de cálcio são precipitados a partir de soluções aquosas supersaturadas, neutras ou alcalinas, contendo íons cálcio e fósforo, a fase amorfa metaestável denominada fosfato de cálcio amorfo (ACP) forma-se rapidamente nos estágios iniciais da reação [65,66]. O OCP é amplamente reconhecido como uma fase precursora da HCA na mineralização dos biovidros, ou como uma fase que tende a favorecer a nucleação heterogênea e posterior crescimento da HA [67]. Dessa forma, o OCP pode se converter em HCA.

O sistema de vidros estudado neste trabalho não possui íons alcalinos em sua composição, mas íons alcalino-terrosos Mg^{2+} e Ca^{2+} , o que pode influenciar a cinética de formação da camada de HCA. Alguns estudos [68-71] sugerem que a etapa 1 do mecanismo de Hench possa ser estendida aos íons alcalino-terrosos e não apenas aos íons alcalinos. No entanto, os resultados de Wallace e colaboradores [72] mostraram que, em vidros de composição molar $(3-x) \text{CaO} \cdot x\text{Na}_2\text{O} \cdot 0,07\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 3\text{SiO}_2$, a cinética de permuta dos íons alcalino-terrosos Ca^{2+} pelo hidrônio deverá ser bastante mais lenta que a do íon alcalino Na^+ . O papel do íon Mg^{2+} ainda é foco de discussão, mas é sabido que este íon pode ser introduzido com relativa facilidade na estrutura da HA, conduzindo a um decréscimo da cristalinidade de sua estrutura, acompanhada por uma maior solubilidade [73-76].

Segundo Queiroz [16], em estudos *in vitro*, o efeito do magnésio sobre a mineralização da camada de ligação osso-implante parece dever-se essencialmente a três tipos de influência: efeito da adsorção de íons Mg^{2+} na camada de fosfato; efeito que a lixiviação de íons Mg^{2+} para a solução exerce sobre os níveis de sobressaturação dos diferentes ortofosfatos que poderão precipitar; efeito da lixiviação de ânions de fosfato e íons hidroxila para a solução, juntamente com a lixiviação de Mg^{2+} , devido à manutenção do balanço de cargas. Influencia-se também deste modo, pelo lado aniônico, a sobressaturação dos diferentes fosfatos que poderão precipitar. No caso da avaliação *in vivo*, a influência do Mg^{2+} nos processos de adesão e proliferação celular é mais complexa,

devido à intervenção de fatores bioquímicos e biológicos. Em estudo realizado por Yamasaki e colaboradores [77] é mostrado que o Mg^{2+} adsorvido pela HCA poderá contribuir para melhorar a adesão dos osteoblastos (efeito verificado em compósitos de colágeno e hidroxiapatita), relativamente a uma menor adesão verificada na ausência do íon adsorvido.

2.3.2 Biovidros e vitrocerâmicos bioativos

A partir da década de 70, vidros em diferentes formas (pó moído, microesferas, fibras, etc.) foram utilizados em aplicações biomédicas. Estas aplicações variam desde o preenchimento de cavidades ósseas, espaçador intervertebral, tratamento de infecções do seio frontal, tratamentos odontológicos, veículo de agentes radioativos para tratamentos localizados de tumores por radioterapia (em especial do fígado), até aplicações cirúrgicas onde são utilizadas fibras do vidro bioativo ou combinação dele com polímeros bioativos [78].

No desenvolvimento de vidros e VC para aplicações biomédicas, dois tipos de materiais devem ser reportados, os quais diferem quanto ao meio da aplicação e às propriedades requeridas. Há os materiais utilizados em restaurações dentárias, onde os pré-requisitos desejados são: não citotoxicidade, compatibilidade com o meio oral, translucidez, coloração e dureza similares a de dentes, alta tenacidade, resistência química e resistência ao desgaste compatíveis com as propriedades dos dentes naturais [79]. E os materiais utilizados como implantes ósseos, onde são desejadas características tais como: biocompatibilidade, e em muitos casos bioatividade, resistência à flexão, tenacidade à fratura e módulo de Young compatível ao do osso [80]. O desenvolvimento desta tese visa à obtenção de biovidros e vitrocerâmicos bioativos para o uso em implantes estruturais para a restauração óssea.

O uso de biovidros teve seu início através do desenvolvimento do *Bioglass*[®] 45S5 (% p/p: 45 SiO₂ – 6 P₂O₅ – 24,5 CaO – 24,5 Na₂O) sendo este atualmente considerado o modelo standard dos vidros bioativos. Em diversos trabalhos, Oonishi e colaboradores [81-83] comprovam a boa capacidade do *Bioglass*[®] 45S5 para estimular o crescimento ósseo, excedendo a dos implantes à base de HA. No entanto, a baixa resistência mecânica não permite a sua aplicação em regiões de carga e também a sua usinabilidade. Assim, buscou-

se o desenvolvimento de vidros bioativos parcialmente cristalizados dotados de resistência mecânica suficiente para serem facilmente usinados, quando destinados a aplicação cirúrgica ou dentária. Os vidros bioativos, cristalizados ou parcialmente, têm sido utilizados em implantes sujeitos a cargas estáticas, evitando-se a sua utilização em implantes sujeitos a esforços dinâmicos.

Em sistemas formadores de vidros, estudos têm mostrado que a cristalização parcial de vidros pode diminuir o nível de bioatividade [7,9,84-86], sendo que um vidro bioativo pode tornar-se um material inerte. Mas em muitos casos, dependendo da aplicação do material, a formação de fases cristalinas através de um processo de tratamento térmico torna-se interessante, pois de forma geral aumenta suas propriedades mecânicas. Com o desenvolvimento de VC contendo fosfato de cálcio foi possível estender a utilização destes materiais à área das aplicações biomédicas. Em geral, os VC bioativos apresentam boas propriedades mecânicas (à exceção do módulo de Young) e são estáveis durante um período de tempo considerável, devido à menor solubilidade quando comparados aos respectivos vidros base.

Em ordem cronológica, os primeiros VC bioativos utilizados clinicamente surgiram em meados da década de 1970, na Alemanha, através do trabalho de Brömer e colaboradores. Estes VC são comercialmente designados por *Ceravital*[®] [87,88] e apresentam a fase cristalina apatita. Durante a década de 1980, também na Alemanha, foram desenvolvidos os vitrocerâmicos *Bioverit*[®] I e II [89], cuja composição apresenta magnésio que permite que estes VC sejam usináveis, graças à presença da mica flogopita, o que igualmente ocorre ao VC comercialmente designado por *Macor*[®]. Um pouco mais tarde, os mesmos pesquisadores desenvolveram o *Bioverit*[®] III, um VC não silicatado, rico em P₂O₅, e que apresenta as fases apatita e berlinita. Na década de 80, o VC comercialmente designado por A-W *Cerabone*[®] foi desenvolvido por Kokubo [90,91], e este material é composto por matriz vítrea formada por MgO—CaO—SiO₂ e as fases cristalinas oxifluoroapatita e β -wollastonita, cuja estrutura de silicato em cadeia contribui para o reforço das propriedades mecânicas. Devido ao fato destes vitrocerâmicos serem produzidos por sinterização de vidro finamente pulverizado, diferentes temperaturas de tratamento térmico podem ser utilizadas, com diferentes fases cristalinas sendo obtidas, e conseqüentemente, propriedades mecânicas distintas.

Algumas propriedades mecânicas de cerâmicas bioativas comerciais utilizadas em casos clínicos e também do osso cortical e do osso esponjoso são apresentadas na Tabela 2.2. Após implantação do material bioativo, é mostrado que em testes de resistência

mecânica a fratura ocorre no osso ou no material implantado e não através da interface formada. Esta característica de não ocorrer fratura na interface formada entre o biomaterial e o tecido ósseo, quando sob tensão mecânica, é um diferencial que caracteriza os materiais bioativos, já que os outros tipos de biomateriais apresentam falhas justamente na cápsula fibrosa formada após implantação [92].

Tabela 2.2 – Propriedades mecânicas de cerâmicas bioativas comerciais e do osso [55,89,92].

Material	Dureza Vickers (HV)	Resistência à compressão (MPa)	Módulo de ruptura - σ_f (MPa)	Módulo elástico - E (GPa)	Tenacidade à fratura - K_{Ic} (MPa.m ^{1/2})
Bioglass[®] 45S5	458	–	40 – 60	30 – 35	–
Ceravital[®]	–	500	–	100 – 150	–
A-W Cerabone[®]	680	1080	215	218	2,0
Bioverit[®] I e II	500 – 800	450 – 500	90 – 180	70 – 88	1,2 – 2,1
Bioverit[®] III	–	–	60 – 90	45	0,6
HA sinterizada	600	500 – 1000	115 – 200	80 – 110	1,0
β-TCP sinterizado	–	460 – 687	140 – 154	33 – 90	–
Osso cortical	–	88 – 164	50 – 150	7 – 30	2 – 12
Osso esponjoso	–	33	10 – 20	0,05 – 0,5	–

2.3.3 Biomateriais à base de fosfato de cálcio

Cerâmicas de fosfato de cálcio têm sido utilizadas como osso artificial, através da sua sintetização e posterior manufatura na forma de implantes, quer sejam sólidos compactos, pós para preenchimento ou filmes porosos. Atualmente, os biomateriais à base de cálcio e fósforo são largamente utilizados em aplicações ortopédicas e odontológicas, como reparos de defeitos ósseos, aumento e manutenção de cristas ósseas alveolares, recolocação de raiz dentária, implantes auriculares, fusão espinhal e recobrimento de implantes metálicos [93]. Isto se deve a natureza química destes materiais, basicamente

cálcio e fosfato, contribui ativamente no equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica [94].

Uma forma conveniente de classificar os vários fosfatos de cálcio é através da razão molar Ca:P, a qual pode variar entre 0,5 e 2,0, como mostra a Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Classificação dos fosfatos de cálcio em função da razão molar Ca:P e do produto de solubilidade (K_{ps}) [94,95].

Nome	Símbolo	Ca:P	Fórmula	K_{ps}
Diidrogeno fosfato de cálcio monohidratado	MCPM	0,5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$1,0 \times 10^{-3}$
Hidrogeno fosfato de cálcio diidratado (brushita)	DCPD	1,0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,87 \times 10^{-7}$
Hidrogeno fosfato de cálcio (monetita)	DCP	1,0	CaHPO_4	$1,26 \times 10^{-7}$
Fosfato octacálcico	OCP	1,33	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$5,01 \times 10^{-15}$
Fosfato tricálcico (β , α)	TCP	1,50	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$2,83 \times 10^{-30}$
Hidroxiapatita	HA	1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	$2,35 \times 10^{-59}$
Fosfato tetracálcico	TTCP	2,0	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	-

A solubilidade (Tabela 2.3) é uma das mais importantes propriedades dos fosfatos de cálcio, pois alguns destes são materiais reabsorvíveis, o que interfere diretamente no processo de degradação *in vivo*. Conforme a razão Ca:P aumenta, o produto de solubilidade diminui, e assim, a razão de degradação também é reduzida [96]. Por exemplo, um implante ósseo constituído de HA permanecerá integrado ao organismo por período de 3 a 4 anos, enquanto que o TCP poderá ser reabsorvido, em um intervalo de 6 a 15 semanas, dependendo da estequiometria e da porosidade [97]. Alguns fatores que tendem a diminuir a taxa de biodegradação são a substituição de F^- em HA, a substituição de Mg^{2+} em β -TCP, e menor relação β -TCP/HA em fosfatos de cálcio bifásicos [98]. A velocidade de degradação, entretanto, pode ser aumentada através de maior área superficial do material (pó > sólido poroso > sólido denso), do decréscimo da cristalinidade (OCP > TCP > HA), e, no caso da hidroxiapatita, por substituições de CO_3^{2-} nos sítios do fosfato e de Mg^{2+} e Sr^{2+} nos sítios do cálcio [98].

Dentre todos os fosfatos de cálcio, o fosfato tricálcico e a hidroxiapatita são os que têm despertado maior interesse de estudo para aplicações biológicas, por serem bastante compatíveis com o tecido ósseo, podendo ser usados como substituintes ósseos na forma granular ou em sólidos compactados. O fosfato de cálcio na forma de HA é considerado a fase mais similar à fase mineral dos ossos e dos dentes e é considerado um material bioativo. Por ter excelente capacidade osteocondutora e ser altamente biocompatível, a hidroxiapatita é ótima alternativa aos enxertos de osso esponjoso homólogo e autógeno em falhas ósseas no ser humano [99]. Já a fase TCP é reconhecida pela sua característica reabsorvível [100].

2.4. PROPRIEDADES MECÂNICAS

Como dito anteriormente, o processo de cristalização em vidros propicia uma melhora nas propriedades mecânicas do material, com conseqüente possibilidade de perda da bioatividade. Entretanto, como o objetivo da presente tese é o desenvolvimento de materiais bioativos para aplicações de restauração óssea onde seja requerido o material em formato consolidado, a obtenção de VC é interessante, desde que sejam contrabalanceadas a biofuncionalidade e a biocompatibilidade do material. Assim, os VC obtidos serão caracterizados quanto a sua bioatividade e características mecânicas, e os mesmos ensaios serão realizados no vidro base, para que se possa avaliar os ganhos obtidos em desempenho mecânico e compará-los a possíveis perdas do grau de bioatividade.

A seguir serão expostas as propriedades mecânicas avaliadas neste trabalho.

2.4.1 Módulo de ruptura

Como avaliação do módulo de ruptura dos vidros e VC estudados neste trabalho, foi adotado o ensaio de flexão com carregamento em quatro pontos, como mostrado na Figura 2.8. No ponto de carregamento, a superfície superior do corpo-de-prova é colocada em compressão, enquanto a superfície inferior encontra-se em tração, sendo o ponto de tração máxima diretamente abaixo do ponto de aplicação de carga. No ensaio de flexão em

4-pontos, o momento fletor entre os dois pontos de aplicação de carga é constante, produzindo em todos os pontos inferiores da barra uma tensão de tração constante. Este fato sugere que o ensaio em 4-pontos seja mais confiável, já que a probabilidade de se encontrar um defeito crítico na região de máxima tensão é maior, e por isso esta técnica foi escolhida.

Figura 2.8 – Representação esquemática de ensaio de flexão em 4-pontos ASTM C 1161-02 [101].

Os materiais vítreos seguem a mecânica de fratura de materiais frágeis. A fratura frágil ocorre sem qualquer deformação plástica considerável e consiste na formação e rápida propagação de trincas através da seção reta do material em uma direção perpendicular à carga aplicada. Neste caso pode ocorrer fratura catastrófica, com muito pouca absorção de energia.

Na década de 1920, A.A. Griffith [102] propôs que a discrepância entre módulo de ruptura teórico e calculado para um mesmo material poderia ser explicada pela existência de minúsculos defeitos existentes no material, os quais atuam como fatores de concentração de tensões e são capazes de iniciar uma trinca, pois amplificam a tensão aplicada. Para o caso de vidros, a redução da resistência é atribuída a defeitos em sua superfície. Portanto, quando avaliada a tensão de fratura de vidros é importante conhecer previamente a superfície das amostras a serem ensaiadas, podendo ser utilizadas técnicas de microscopia ou até mesmo avaliação da rugosidade da superfície do material.

O módulo de ruptura de vidros pode ser calculado pela Equação 2.1:

$$\sigma_f = \frac{3}{2} F_A \frac{(I_1 - I_2)}{b.h^2} \quad (2.1)$$

onde σ_f é módulo de ruptura (MPa), F_A é a carga de ruptura (N), b é a largura da amostra (mm), h é a altura da amostra (mm), I_1 é o maior espaço entre roletes (mm) e I_2 é o menor

espaço entre roletes (mm). Como pode ser observado, o tamanho da amostra também influencia o módulo de ruptura, pois quanto maior a amostra, maior a probabilidade de ser encontrado um defeito, e consequentemente, menor a resistência à fratura. Por este motivo, foi empregado o ensaio de flexão transversal, onde um corpo de prova na forma de uma barra com seção reta retangular é flexionado até sua fratura, e adotado o tamanho de amostra reduzido de 25 x 2 x 1,5 mm.

Em relação aos biovidros comerciais, a maioria deles apresenta módulo de ruptura com valores na faixa de 40 a 60 MPa, o que os tornam impróprios para o uso em implantes estruturais, já que o valor estimado de máxima tensão a que uma prótese é submetida, pode atingir até 130 MPa [55].

2.4.2 Dureza

Técnicas quantitativas para determinação da dureza foram desenvolvidas ao longo dos anos, nas quais um pequeno penetrador é forçado contra a superfície de um material a ser testado, sob condições controladas de carga e taxa de aplicação. Medidas da profundidade ou do tamanho da impressão resultantes são relacionadas a um índice de dureza, quanto mais macio o material, maior e mais profunda é a impressão, e menor é o índice de dureza. Por exemplo, em relação à dureza Vickers, vidros óxidos abrangem um intervalo de 2 a 8 GPa, atingindo valores de 11 GPa para vidros nitretados, mesmo assim, menores do que a dureza Vickers do diamante, 100 GPa. Vidros boratos, germanatos e fosfatos são tipicamente mais macios que os vidros silicatos [21].

Uma forma simples, rápida, de baixo custo e que necessita de pouco material-teste para avaliar propriedades mecânicas é o Método de indentação Vickers. Assim, a avaliação da dureza utilizando este método tornou-se bastante comum e vantajoso. Além disso, esta técnica vem sendo utilizada para descrever numerosos parâmetros de materiais, não sendo usada apenas para medição de uma característica mecânica, mas também contribuindo para a determinação de alguns parâmetros correlatos tais como tenacidade à fratura [103], índice de Meyer [104], Módulo de Young [105] e densificação induzida pela própria indentação [106].

Ainda através do Método de indentação Vickers é possível averiguar o clássico efeito do tamanho da indentação (ISE) na dureza [107], o qual relata a diminuição da

dureza de um material conforme o aumento da carga de indentação. Nos últimos anos, estudos vêm sendo propostos no sentido de investigar a dependência do tamanho da indentação, ou da carga utilizada, nos resultados de dureza de materiais cerâmicos e vítreos [108-110]. Entretanto, há pouca informação referente a este efeito em materiais VC.

2.4.3 Tenacidade à fratura

A tenacidade de um material está relacionada à sua habilidade em absorver energia até sua fratura. Em outras palavras, tenacidade é uma propriedade indicativa da resistência do material à fratura quando este possui uma trinca.

Existem vários métodos disponíveis para medir a tenacidade à fratura, mas a técnica mais simples consiste na avaliação através de ensaios de dureza Vickers, que utiliza um equipamento básico (microdurômetro) para produzir as impressões. Quando o indentador piramidal é introduzido no material, uma deformação plástica é formada durante o estágio de carregamento, e com a remoção do indentador, trincas são originadas nos vértices da impressão, devido às tensões residuais. Conhecendo-se o tamanho destas trincas, pode-se então determinar K_{IC} , desde que se tenha conhecimento de outras propriedades do material, tal como o módulo de elasticidade, porosidade, dureza, etc.

Apesar do método de indentação Vickers ser amplamente utilizado para determinar a tenacidade à fratura de um material, devido as suas facilidades e vantagens, recentemente alguns autores vem criticando arduamente o seu uso [111] e propondo adaptações da técnica, no caso de vidros e VC [111-114]. Eles afirmam que este método nem sempre permite que o fator de intensidade de tensão crítica, K_{IC} , seja corretamente determinado [111]. Porém, devido ao efeito comparativo e à complexidade de preparação dos corpos-de-prova para os testes utilizando métodos como o *Single Edge V-Notch Beam* (SEVNB), foi adotada a técnica de indentação Vickers para determinação dos vidros e vitrocerâmicos estudados neste trabalho.

Além disso, a medida correta de tenacidade à fratura de cerâmicas é outro obstáculo à determinação desta propriedade mecânica. Com o decorrer dos anos, modelos foram desenvolvidos tentando relacionar os campos de tensão existentes no material e a deformação por eles induzidas, e conseqüentemente, diferentes equações foram propostas para se obter valores mais próximos do verdadeiro valor de tenacidade à fratura [115].

Assim, por haverem várias equações que possibilitam o cálculo da tenacidade à fratura, é necessário ser cauteloso à escolha da equação a ser utilizada, observando-se a discrepância entre os valores de K_{IC} em função da expressão utilizada para o cálculo.

Para a escolha das equações utilizadas na determinação da tenacidade à fratura por indentação (K_{IC}) dos vidros e vitrocerâmicos do sistema $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{SiO}_2 \cdot \text{MgO}$ foi levada em consideração a razão c/a proposta por Niihara [116]. Os parâmetros a , c e l são mostrados esquematicamente na Figura 2.9.

Figura 2.9 – Representação esquemática de indentação, baseada em Cook e Pharr [117]. Parâmetros utilizados para determinar tenacidade à fratura: a é a metade do tamanho da diagonal da indentação, l é o tamanho da trinca e $c = a + l$.

De acordo com Niihara, se $c/a < 3,5$ o comportamento de trincas apresentado é do tipo Palmqvist [116], Equação 2.2:

$$K_{IC} = 0,084 \left(\frac{E}{HV} \right)^{0,4} \left[\frac{P}{(a \cdot l^{1/2})} \right] \quad (2.2)$$

onde E é o módulo de Young (GPa), HV é a dureza (GPa), P é a carga de indentação aplicada (N), a e l são parâmetros de indentação (μm).

Trincas Palmqvist aparecem quando alguma deformação plástica é atingida e o campo de tensão elástica próxima ao indentador é reduzido, apresentando-se como trincas radiais rasas diretamente abaixo da superfície, e em geral com profundidade iguais a da indentação.

Entretanto, se for apresentada a razão $c/a > 2,5$, o modelo utilizado é para o sistema de trincas do tipo Half-penny ou Radial-mediano, proposto por Anstis [118] e mostrado na Equação 2.3. Foi adotado este modelo por ser o mais aceitável, já que ele está baseado em análises na qual o campo de tensão elástico-plástico abaixo do indentador é resolvido em

duas componentes, uma elástica reversível e outra residual irreversível [102].

$$K_{IC} = 0,016 \left(\frac{E}{HV} \right)^{0,5} \left(\frac{P}{c^{3/2}} \right) \quad (2.3)$$

onde as constantes permanecem as mesmas da Equação 2.2.

As trincas do tipo Half-penny são similares as trincas Palmqvist, mas geralmente são formadas sob maiores cargas e surgem abaixo do centro da indentação, percorrendo o caminho de um vértice da indentação ao outro da mesma diagonal. As diferenças entre os dois sistemas de trincas podem ser observadas na Figura 2.10.

Figura 2.10 – Representação esquemática dos sistemas de trincas da indentação Vickers, adaptado de Cook e Pharr [117].

2.4.4 Módulo de Elasticidade

O módulo de elasticidade avalia a resistência do material à deformação elástica, sendo assim uma medida da sua rigidez. Materiais com baixo módulo deformam muito elasticamente quando sujeitos a solicitações mecânicas.

O módulo de elasticidade é definido através da lei de Hooke. Esta lei descreve matematicamente o comportamento experimental de determinados materiais, nos quais a deformação (ϵ) é praticamente proporcional à tensão (σ), quando as deformações são

pequenas, e a constante de proporcionalidade (E) é o Módulo de elasticidade, como mostra a Equação 2.4:

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (2.4)$$

De forma similar, a deformação de cisalhamento e a volumétrica são proporcionais à tensão de cisalhamento e à pressão hidrostática, respectivamente. No caso do cisalhamento, a constante de proporcionalidade recebe o nome de módulo de cisalhamento. Quando da pressão isostática, a constante é o módulo volumétrico, o qual relaciona a deformação às tensões hidrostáticas aplicadas ao material, onde atua um sistema triaxial de tensões exatamente iguais [119].

Ainda no caso de materiais isotrópicos como os vidros, os módulos de cisalhamento podem ser relacionados entre si através do coeficiente de Poisson (ν) de acordo com a Equação 2.5 [120].

$$\nu = E/2G - 1 \quad (2.5)$$

onde ν é o coeficiente de Poisson, E é o módulo de Young (GPa) e G é o módulo de cisalhamento (GPa).

A determinação dos módulos elásticos do material estudado nesta tese se deu pelo método do ultrassom, um ensaio não-destrutivo que possibilita a avaliação da microestrutura/propriedades mecânicas dos materiais sem comprometer sua integridade física, além de ser um método prático, rápido e de baixo custo.

Os métodos de ensaio por ultrassom baseiam-se na indução por um transdutor de ondas ultrassônicas, correspondentes a porção do espectro acústico com frequências tipicamente de 1 MHz a 25 MHz, que se propagam através do material analisado e ecoam. Transdutor é todo o dispositivo que converte um tipo de energia em outro, neste caso, energia elétrica em energia mecânica de vibração. Pelo eco captado no receptor é possível determinar a existência de discontinuidades [119]. A forma mais comum de produzir ultrassom nestes ensaios é utilizando cristais piezoelétricos (sulfato de lítio, titanato de bário, quartzo) que ao receber corrente elétrica alternada de alta frequência vibram na mesma frequência, gerando o ultrassom. Na captação do eco ocorre o inverso, o ultrassom faz o cristal vibrar gerando um sinal elétrico de alta frequência [121].

Na técnica de ensaio do pulso-eco o transdutor é colocado em contato direto com o material e, portanto, deve ser usado um acoplante (óleo, água, glicerina, entre outros) na

forma de uma película entre o material e o transdutor, para que o ultrassom passe do transdutor para o material com a mínima interferência [121]. A Figura 2.11 apresenta um desenho esquemático desta técnica.

Figura 2.11 – Desenho esquemático da técnica do pulso-eco [122].

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os procedimentos realizados nas etapas de processamento e caracterização dos materiais utilizados neste trabalho. A Figura 3.1 mostra um fluxograma resumido que detalha a rota de desenvolvimento deste projeto.

Figura 3.1 – Fluxograma das atividades desenvolvidas neste trabalho.

3.1. MATERIAIS

As amostras confeccionadas neste trabalho foram produzidas com as matérias-primas comerciais descritas a seguir:

- Óxido de silício, SiO₂, pureza 99,9% (COD. 83340), FLUKA (Alemanha);
- Carbonato de cálcio, CaCO₃, pureza 99,97% (COD. 81704), SYNTH (Brasil);
- Di-hidrogenofosfato de cálcio monohidratado, Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, pureza 85,0% (COD. F1027.13.AH), SYNTH (Brasil);
- Óxido de magnésio, MgO, pureza 95% (COD. 687), VETEC (Brasil).

3.2. MÉTODOS EXPERIMENTAIS

Este item apresenta todos os passos envolvidos na execução dos experimentos adotados neste trabalho, detalhando as componentes apresentadas na Figura 3.1.

3.2.1 Preparação do biovidro

No desenvolvimento dos biovidros, foi adotada uma composição referente ao sistema $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-MgO}$, a qual é capaz de originar por tratamento térmico fases cristalinas que melhorem as propriedades mecânicas. A composição $52,75\ 3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 - 30,00\ \text{SiO}_2 - 17,25\ \text{MgO}$ (% em peso) foi relatada por Oliveira e colaboradores [14] e apresenta elevada bioatividade. Os cálculos da massa de cada reagente, visando à obtenção da composição citada, estão apresentados no ‘Apêndice A’.

A Figura 3.2 apresenta fluxograma que detalha a rota de obtenção do material estudado.

Figura 3.2 – Fluxograma de preparação do material estudado neste trabalho.

Figuras referentes aos equipamentos utilizados em toda a rotina experimental desta tese são apresentadas no ‘Apêndice B’. Para os equipamentos citados e as etapas experimentais executadas que não seja referida uma instituição de origem, deve-se entender que a instituição é a Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP.

Os pós de $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 , SiO_2 e MgO , os quais foram pesados em balança analítica, foram misturados em moinho de atrito por 1h, em rotação de 1000 rpm, utilizando etanol como veículo e bolas de $\text{ZrO}_2(\text{Y}_2\text{O}_3)$ sinterizada como meio de moagem, para que houvesse uma completa homogeneização da mistura de pós. Após a mistura, os pós foram secados em estufa a 110 °C, por 24 h. Os pós foram então desaglomerados, utilizando conjunto de peneiras até malha mínima de 125 μm (malha 120).

A fusão da mistura de pós foi realizada no LaMaV – UFSCar. Para a fusão, utilizou-se cadinho de platina e forno vertical com elevação de acionamento pneumático (modelo DELTECH DT-33-RS-812-C), a temperatura de 1600 °C por 4 h, ao ar. O fundido foi retirado do forno e imediatamente vertido em molde metálico de latão (resfriamento rápido) para a formação de fritas, sendo realizadas três refusões no total. Barras paralelepípidas com dimensões próximas a 40 x 10 x 10 mm foram confeccionadas. A Figura 3.3 mostra a sequência para a obtenção do biovidro.

(a)

(b)

(c)

Figura 3.3 – Processo de obtenção de vidros por fusão/solidificação: (a) o pó é colocado em etapas no cadinho de platina, para completa homogeneização, (b) o cadinho é mantido no forno por 4 h a 1600 °C, (c) o fundido é retirado do forno e vertido no molde metálico.

As barras de biovidro foram submetidas ao recozimento a 700 °C por 2 h, em forno tipo mufla modelo EDG-7000, com taxa de resfriamento de 3 °C/min, minimizando geração de tensões térmicas no material.

3.2.2 Preparação das vitrocerâmicas – Tratamentos térmicos

Para a obtenção de vitrocerâmicas foram realizados tratamentos térmicos isotérmicos em diferentes temperaturas, variando o tempo em 15, 120, 240 e 480 minutos (0,25 h, 2 h, 4 h e 8 h), com taxa de aquecimento de 15 °C/min e taxa de resfriamento de 3 °C/min, visando à cristalização parcial da fase amorfa presente nos biovidros originalmente obtidos. O critério para escolha das temperaturas de tratamento térmico foi o resultado da análise térmica do biovidro, de forma que as amostras fossem tratadas em temperaturas inferiores e superiores às temperaturas de máxima cristalização (T_x), sem que houvesse uma porcentagem de fração cristalizada pré-estabelecida. O forno Lindberg/Blue M. foi utilizado para o processo de cristalização das amostras.

Na Tabela 3.1 estão designadas as amostras obtidas no processo de cristalização e o tratamento térmico adotado.

Tabela 3.1 – Designação das amostras obtidas pelo processo de tratamento térmico de cristalização.

Temperatura de Tratamento Térmico (°C)	Tempo em minutos (em horas)			
	15 (0,25)	120 (2)	240 (4)	480 (8)
700	V700-1	-	V700-4	V700-8
775	V775-1	-	V775-4	V775-8
800	V800-1	V800-2	V800-4	V800-8
850	V850-1	V850-2	V850-4	V850-8
900	V900-1	V900-2	V900-4	V900-8
975	V975-1	V975-2	V975-4	V975-8
1000	-	-	V1000-4	-
1050	-	-	V1050-4	-
1100	-	-	V1100-4	-

3.2.3 Técnicas de caracterização

3.2.3.1 Análise térmica

Os fenômenos de transição vítrea (T_g), cristalização (T_x) e fusão do cristal (T_m) são expressos por eventos térmicos que podem ser detectados e registrados em equipamentos empregados pelas técnicas de análise térmica, tal como a análise por calorimetria exploratória de varredura (DSC). Assim, o comportamento térmico dos vidros desenvolvidos nesse trabalho foi estudado utilizando estas técnicas. Além disso, os coeficientes de expansão térmica do vidro e a temperatura de transição vítrea da composição estudada foram inicialmente determinados por dilatometria.

Os ensaios de dilatometria foram realizados na Universidade de Aveiro-Portugal, utilizando Dilatômetro - BAHR Thermoanalyse GmbH 2000 Modelo DIL801L, forno 7040. Amostras de 3 x 3 x 10 mm de comprimento foram confeccionadas com medida baseada em padrão de Al_2O_3 , e aquecidas ao ar até atingir o amolecimento, com taxas de aquecimento de 25 °C/min.

Para determinação das temperaturas de transição vítrea, cristalização e fusão do cristal, foram realizadas análises por calorimetria exploratória de varredura (DSC) no LaMaV-DEMa-UFSCar. A fim de se verificar também o tipo de cristalização ocorrida durante processo de tratamento térmico, para análise em DSC foram adotadas amostras em pó e em bulk, cujos resultados obtidos foram posteriormente comparados e então avaliado se havia ocorrido cristalização superficial ou volumétrica das fases. As medidas foram realizadas em cadinho de platina até temperaturas de 1200 °C, com taxa de aquecimento de 15 °C/min, utilizando equipamento da marca Netzsch, modelo STA-404.

3.2.3.2 Análises por difratometria de raios X

A mistura de pós obtida após etapa de mistura/homogeneização, e antes da fusão, foi analisada por difração de raios X, em equipamento da marca Shimadzu modelo XRD 6000, visando avaliar possíveis alterações das matérias-primas durante mistura em moinho e posterior secagem. As fases cristalinas presentes foram identificadas utilizando radiação $\text{CuK}\alpha$ com varredura entre 10° e 90°, aplicando-se passo angular de 0,05° e tempo de 3 s/contagem.

Para determinação das fases cristalinas presentes nos materiais vitrocerâmicos, a seção transversal das amostras foi submetida à análise por difração de raios X utilizando radiação $\text{CuK}\alpha$, com limite de detecção entre 3-5% em volume, adotando-se condições de varredura $2\theta = 8^\circ - 62^\circ$, aplicando-se passo angular de 0,05° e 3 s/contagem. Posteriormente, para averiguação do tipo de cristalização ocorrida (superficial ou volumétrica), as amostras foram fragmentadas até tamanho de partícula menor que 63 μm , e os pós então analisados sob as condições anteriores. Os resultados obtidos para a seção transversal e para os pós das amostras foram comparados.

Dentre estes pós de vitrocerâmicos, algumas condições de tratamento térmico foram selecionadas para análise de Difratometria de Raios X de Alta Resolução (HRXRD), pois esta técnica permite maior resolução e confiabilidade dos resultados, sendo possível escolher a radiação a ser utilizada, e identificar fases presentes em menores quantidades (limite de detecção 1 – 2% em volume). A análise foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), na linha de luz D12A – XRD1, utilizando difratômetro HUBBER

de múltiplos eixos. As medidas foram feitas em configuração de dois círculos concêntricos acoplados ($\omega - 2\theta$), com incidência de feixe monocromatizado de 9,9985 keV ($\lambda = 1,2398$ Å). Os pós com tamanho de partícula menor que 32 μm foram pulverizados em suporte cilíndrico (10 mm de diâmetro e 2 mm de profundidade), e este, mantido em rotação para promover a aleatoriedade dos planos cristalinos. O feixe difratado foi coletado por cristal analisador de germânio (200) e detector de cintilação. Para tanto, foi realizada uma varredura entre 8° e 62° , com passo angular de $0,01^\circ$ e tempo de 1 s/contagem.

Para determinação das fases presentes, os difratogramas obtidos foram comparados com as fichas catalogadas na base de dados JCPDS [123]. A fração cristalizada presentes nos VC foi estipulada com base no método usado por Krimm e Tobolsky [124], onde pode-se quantificar a cristalinidade ou fração cristalizada através da razão entre a área cristalina difratada (A_c) e a área total difratada ($A_T = \text{cristalina} + \text{amorfa}$), conforme Equação 3.1:

$$IC = \left(\frac{A_c}{A_c + A_a} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

onde IC é o índice de cristalinidade (%), A_c é a área cristalina difratada e A_a é a área amorfa difratada.

A Figura 3.4 exemplifica o método utilizado por Krimm e Tobolsky [124] para quantificação da fração cristalizada ou índice de cristalinidade (IC) em um material. A região delimitada pela linha de base 1 (tracejada) e a linha do difratograma do vitrocerâmico (preta) corresponde à área total difratada que é a soma da área cristalina difratada (A_c) mais a área amorfa difratada ou “background” (A_a). Para determinar apenas a área cristalina difratada delimita-se a região pela linha de base 2 (cinza) e a linha do difratograma. Para o cálculo das áreas foi utilizado o software Origin8[®] da OriginLab Corporation.

Figura 3.4 – Difratograma representativo do método usado por Krimm e Tobolsky. Figura adaptada de ALMEIDA, 2006 [125].

Após a determinação do índice de cristalinidade, foi estimada a quantidade da fase cristalina majoritária nos VC, utilizando a técnica do padrão interno. A técnica do padrão interno consiste em relacionar as intensidades dos picos cristalinos difratados de uma fase e do padrão interno com a proporção volumétrica destes. Assim, para esta análise foram misturadas massas conhecidas de uma dada amostra e de estanho metálico (padrão interno), como mostra a Tabela 3.2, e posteriormente esta mistura de pós foi analisada por DRX, adotando-se condições de varredura entre 8° e 62°, passo angular de 0,05° e 3 s/contagem.

Tabela 3.2 – Relação entre a massa das amostras V775-4, V850-4, V950-4, V975-4 e V1100-4 e do estanho metálico (padrão interno).

Amostra	m _{vidro} (g)	m _{estanho} (g)	m _{vidro} /m _{estanho}
V775-4	0,875	1,595	0,55
V850-4	0,446	0,849	0,53
V950-4	0,349	0,701	0,5
V975-4	0,704	1,320	0,53
V1100-4	0,704	1,329	0,53

Pelo difratograma obtido foi determinada a relação entre as intensidades dos picos de uma fase e do padrão interno, calculando-se as áreas debaixo dos picos difratados, como

exemplifica a Figura 3.5. Com isso leva-se em consideração a contribuição total difratada por um determinado plano cristalográfico. A escolha do estanho metálico para atuar como um padrão interno foi devido a sobreposição que a maioria dos elementos e dos compostos apresentou em relação aos picos difratados presentes nas amostras. O estanho foi um dos únicos a não apresentar sobreposição ((211) em $2\theta = 44,8^\circ$), portanto a escolha deste elemento como padrão interno.

Figura 3.5 – Análise quantitativa da fase whitlockite usando método do padrão interno (estanho).

3.2.3.3 Determinação dos coeficientes de expansão térmica das fases cristalinas utilizando difratometria de raios X de alta resolução em alta temperatura

O coeficiente de expansão térmica da fase cristalina majoritariamente encontrada em algumas condições de tratamento térmico, whitlockite, foi determinado através da

variação do parâmetro de rede desta, em função da temperatura na qual foi realizada a análise de difração de raios X de alta resolução. Estes ensaios foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, na linha de luz D10B – XPD.

As medidas de difratometria de raios X em altas temperaturas com radiação Síncrotron foram realizadas utilizando um forno de alta temperatura acoplado a um difratômetro Hubber. A energia adotada para as análises de HRXRD em alta temperatura foi de 9,500 keV ($\lambda = 1,3051 \text{ \AA}$).

Neste ensaio, foram utilizadas amostras cilíndricas V775-4, V850-4, V975-4, V1050-4 e V1100-4 com diâmetro de 10 mm e espessura aproximada a 2 mm, de forma a permitir o encaixe no porta-amostra (Figura 3.6).

Para que as medidas fossem inicializadas, primeiramente foi verificada a temperatura real da amostra dentro da câmara de alta temperatura em relação à temperatura programada no forno. Para esta verificação foram realizadas medidas de difratometria de raios X em altas temperaturas utilizando MgO de estrutura cúbica como padrão, já que este composto é estável no intervalo de temperatura estudada e possui o parâmetro de rede a de sua estrutura bem conhecido. Pela comparação dos valores do parâmetro de rede do MgO obtidos durante a calibração do forno com os dados de expansão térmica da fase MgO na literatura [126], foi possível determinar precisamente a temperatura real da amostra em cada medida.

Figura 3.6 – Amostra sobre porta-amostra para acoplamento em câmara de alta temperatura.

Após os ajustes iniciais, as amostras foram acondicionadas no porta-amostra dentro da câmara de alta temperatura, com atmosfera ao ar. O forno foi conduzido a diferentes temperaturas com taxa de aquecimento de $15 \text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, e após estabilização da temperatura, as amostras foram submetidas à análise por difratometria de alta resolução com radiação Síncrotron. As temperaturas escolhidas variaram desde a temperatura ambiente até $800 \text{ }^{\circ}\text{C}$,

com incrementos de 200 °C. As varreduras foram realizadas nas mesmas condições adotadas anteriormente.

Os coeficientes de expansão térmica foram determinados a partir da derivada da função que descreve os parâmetros de rede em relação à temperatura, conforme Equação 3.2. Os parâmetros de rede, por sua vez, foram determinados através do refinamento de estruturas cristalinas das fases presentes pelo método de Rietveld, utilizando o programa *FullProf Suíte* [127], em cada uma das temperaturas.

$$\alpha_l = \frac{1}{l_T} \left(\frac{\partial l_T}{\partial T} \right)_p \quad (3.2)$$

onde α_l é o coeficiente de expansão térmica na direção do eixo cristalográfico l , l_T é o parâmetro de rede num determinado eixo cristalográfico, na temperatura T , e $\partial l_T / \partial T$ é a derivada da função que descreve a variação do parâmetro de rede l em função da temperatura.

3.2.3.4 Análise microestrutural por microscopia

Para análise da microestrutura do material, as seções transversais das amostras foram primeiramente preparadas em ceramografia. As amostras foram cortadas com disco diamantado acoplado à retífica, e em seguida, as superfícies foram lixadas com lixa de até 20 μm , e sequencialmente polidas com suspensões adiamantadas contendo partículas de 15, 9, 6, 3 e 1 μm , respectivamente, utilizando politriz automática modelo JEAN WIRTZ – Phoenix 4000.

As amostras foram inicialmente observadas em microscópio óptico, modelo Stereo Zoom Baush & Lomb com auxílio do analisador de imagem modelo IMAGE IA-3001.

Para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), as superfícies dos materiais vítreos e vitrocerâmicos foram reveladas por ataque químico com ácido nítrico HNO_3 0,5 M por 30 s. Este ataque foi necessário devido à grande dificuldade de observação da microestrutura do material, sendo desenvolvido após várias tentativas, com base em experimentos de pesquisadores da Universidade de Aveiro. Para a observação da microestrutura, promoveu-se também a metalização da superfície das amostras com filme de ouro, tornando-as condutoras, através de metalizadora Bal Tec modelo MED 020.

As observações dos materiais por microscopia eletrônica de varredura foram

executadas utilizando microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 1450VP.

3.2.3.5 Determinação da massa específica, densidade relativa e porosidade aparente

A técnica de picnometria de gás hélio foi utilizada para a determinação da massa específica real dos materiais estudados. As medidas foram realizadas em equipamento AccuPyc 1330, marca Micromeritics, no DEMA/UFSCar. Foram utilizados pós com tamanho de partícula inferior a 63 μm , oriundos das amostras tratadas por 4 h, em cinco diferentes temperaturas, V700-4, V775-4, V975-4 e V1100-4.

Para determinação da massa específica aparente das amostras V700-4, V775-4, V975-4 e V1100-4 utilizou-se o método de imersão proposto por Arquimedes. Amostras em forma de pastilhas com dimensões de $\varnothing$ 12 mm x 2,5 mm aproximadamente, tiveram suas superfícies desbastadas com lixas de carvão de silício (SiC) com granulometria até #800.

No método de imersão proposto por Arquimedes foi utilizada balança Mettler Toledo modelo AX 204 (Figura 3.7), sendo realizadas 10 medições por amostra. Cada amostra foi primeiramente colocada no prato superior da balança, como mostra Figura 3.7 (a), para medição do peso seco. Em seguida, cada amostra foi colocada em uma cesta imersa em água destilada (Figura 3.7 b), para medição do peso imerso. A determinação da massa específica aparente da amostra é dada pela Equação 3.3:

$$\rho_a = \frac{A}{A-B}(\rho_o - \rho_L) + \rho_L \quad (3.3)$$

onde ρ_a é a massa específica aparente da amostra (g/cm^3), A é o peso da amostra ao ar (g), B é o peso da amostra na água (g), ρ_o é a massa específica da água em uma dada temperatura (g/cm^3) e ρ_L é a massa específica do ar ($0,0012 \text{ g}/\text{cm}^3$).

A determinação da densidade relativa (DR) das amostras foi dada pela Equação 3.4:

$$DR = \frac{\rho_{aparente}}{\rho_{real}} \quad (3.4)$$

sendo $\rho_{aparente}$ a massa específica medida pelo método de Arquimedes (g/cm^3) e ρ_{real} a massa específica medida por picnometria de He (g/cm^3).

A porosidade aparente (P_{ap}) foi determinada pelo método de absorção de água utilizando a Equação 3.5:

$$P = \frac{m_{úmida} - m_{seca}}{m_{úmida} - m_{imersa}} \times 100 \quad (3.5)$$

onde m_u é a massa do corpo-de-prova úmido (g), m_s é a massa do corpo-de-prova seco (g) e m_i é a massa do corpo-de-prova imerso em água destilada (g).

Figura 3.7 – (a) Detalhe da pesagem de amostra ao ar, (b) detalhe da pesagem de amostra em água para determinação da massa específica através do método de Arquimedes.

Os corpos-de-prova foram pesados em balança analítica e então colocados em água destilada por 24 h. A seguir, o peso úmido foi obtido pela pesagem direta do corpo-de-prova úmido e o peso imerso foi obtido pela pesagem deste quando imerso em água destilada.

3.3. PROPRIEDADES MECÂNICAS

3.3.1 Dureza Vickers (HV)

A metodologia utilizada para a determinação dos valores de dureza das amostras seguiu a norma ASTM C 1327-99 [128], a qual fornece o método de teste padrão para a obtenção da dureza Vickers de cerâmicas avançadas. Por razões estatísticas, foram

realizadas cerca de 20 impressões Vickers nas superfícies de cada uma das amostras, utilizando-se e aplicando diferentes cargas de indentação (de 0,98N a 49N) durante 30 segundos, em durômetro da marca Future Tech, modelo FTM1e, pertencente ao Laboratório de Ensaios Mecânicos, do AMR/IAE/CTA.

Para a determinação das propriedades mecânicas, as superfícies das amostras foram lixadas com lixa de até 20 µm e polidas com suspensões adiamantadas de 15, 9, 6, 3 e 1 µm, utilizando politriz automática modelo JEAN WIRTZ – Phoenix 4000. Durante esta etapa, as amostras foram observadas em microscópio óptico, modelo Stero Zoom Baush & Lomb, para a avaliação do processo de polimento, comportamento quanto aos riscos, poros e arrancamentos. O tempo de polimento variou em função da evolução do processo.

As impressões foram realizadas de tal forma que a distância entre os centros das impressões sejam superior a quatro vezes a diagonal da indentação (4 d), evitando qualquer possibilidade de interferência do campo de tensão da indentação anterior na nova indentação. As diagonais de impressão são medidas utilizando o microscópio óptico e analisador de imagens acoplado ao microdurômetro, com aumento de 100 x. As impressões foram digitalizadas, utilizando microscópio óptico modelo Stero Zoom Baush & Lomb, com auxílio do analisador de imagem modelo IMAGE IA-3001, num intervalo máximo de 60 segundos após cada indentação.

Após a medição das diagonais de impressão, foram calculados os valores da dureza Vickers do material (GPa), conforme a Equação 3.6:

$$HV = 1,8544 \frac{P}{d^2} \quad (3.6)$$

onde P é a carga teste aplicada (N), d é o comprimento da diagonal da indentação (µm) e 1,8544 é a constante geométrica do indentador piramidal de diamante.

3.3.2 Tenacidade à Fratura (K_{IC})

A metodologia utilizada para a determinação da tenacidade à fratura por indentação Vickers das amostras segue a norma ASTM C 1421-99 [129], a qual fornece o método de teste padrão para a obtenção da tenacidade à fratura de cerâmicas avançadas em temperatura ambiente.

Cada impressão Vickers apresentou dois pares de trincas radiais. Nos cálculos, foram utilizados para cada amostra, pelo menos 20 indentações, ou 40 pares de trincas aceitáveis, ou seja, aquelas que não apresentaram interações com imperfeições de polimento e desvios da trajetória da trinca nucleada a partir dos vértices das indentações, como mostra Figura 3.8. A medida do comprimento das trincas foi realizada logo após o ensaio de dureza, buscando evitar o crescimento lento de trinca após a impressão, iniciado pelo campo de tensão que atua após o carregamento.

Figura 3.8 – Indentações aceitáveis (a) e inaceitáveis (b), norma ASTM C 1327-03 [130].

Após determinação dos valores de tenacidade à fratura, para observação de detalhes da indentação e das trincas formadas durante ensaio de indentação Vickers, a superfície das amostras V700-4, V900-4 e V975-4 foi primeiramente atacada com HNO_3 0,5 M por 30 s, em seguida esta foi indentada sob diferentes cargas de indentação e então observada por MEV.

Para a escolha da equação utilizada para determinar da tenacidade à fratura por indentação (K_{IC}) foi levada em consideração a razão c/a proposta por Niihara [116]. De acordo com Niihara, se $c/a < 3,5$ o comportamento de trincas apresentado é do tipo Palmqvist [112], e a tenacidade à fratura é calculada de acordo com a Equação 2.2. Entretanto, se for apresentada a razão $c/a > 2,5$, o modelo utilizado é para o sistema de trincas do tipo Half-penny, proposto por Anstis [118] e mostrado na Equação 2.3.

3.3.3 Módulo de ruptura por flexão em 4-pontos (σ_f)

Os valores de tensão de ruptura dos materiais desenvolvidos foram obtidos por meio de ensaios de resistência à flexão em 4-pontos, os quais foram realizados no Instituto Militar de Engenharia – IME.

No ensaio de flexão foi estudada a tensão de ruptura de materiais vítreos e vitrocerâmicos tratados termicamente a 700, 800, 900, 975 e 1100 °C, por 4 h, sendo utilizados seis corpos-de-prova para cada temperatura avaliada, devido à dificuldade de manufatura das amostras. Os corpos-de-prova foram confeccionados na dimensão de 25 x 2 x 1,5 mm, como mostra Figura 3.9, posteriormente, uma das faces de cada paralelepípedo foi lixada e em seguida, polida sequencialmente com suspensões adiamantadas com tamanhos de partículas de 9, 6, 3 e 1 μm , utilizando politriz automática.

Figura 3.9 – Corpos-de-prova utilizados em ensaio de resistência à fratura na dimensão de 25 x 2 x 1,5 mm.

O módulo de ruptura por flexão foi determinado por teste de flexão em 4-pontos, utilizando dispositivo com espaçamento entre os roletes de 20 e 10 mm, externo e interno, respectivamente, seguindo a norma ASTM C 1161-02c [101]. A velocidade de deslocamento do atuador foi de 0,2 mm/min a temperatura ambiente, usando máquina de ensaio MTS 810 (50 N). Os valores de resistência à flexão das amostras foram calculados pela Equação 2.1. Para cada amostra ensaiada, todas as dimensões foram medidas em duplicata, utilizando-se paquímetro com precisão de 0,01 mm.

Para avaliar se o acabamento superficial das amostras poderia ter algum efeito nas propriedades mecânicas, a rugosidade das superfícies polidas foi medida, usando um medidor de rugosidade superficial Mitutoyo SJ-201 em ambas as direções, longitudinais e transversais, da superfície da amostra submetida a esforços de tração durante o ensaio.

As avaliações foram feitas através de três leituras na direção longitudinal de cinco varreduras de 2,5 mm cada e três leituras de uma varredura de 0,8 mm na direção

transversal. A cada leitura o medidor oferece a média entre os valores absolutos de picos e vales (R_a), a diferença entre a maior altura de pico e a maior profundidade de vale (R_y) e o desvio padrão (R_q) correspondente a média.

3.3.4 Módulos Elásticos

As medidas para determinação dos módulos elásticos das amostras foram realizadas no Departamento de Física, da Universidade Estadual Paulista – UNESP (Rio Claro). Foi empregado o método do pulso-eco (ultrassom), onde são determinadas as velocidades de propagação de pulsos mecânicos longitudinais e transversais nas amostras.

Foram submetidas a estas medidas as amostras V700-4, V725-4, V775-4, V975-4 e V1100-4 em forma de pastilhas com dimensão de aproximadamente $\varnothing$ 12 mm x 2,5 mm, sendo que suas superfícies foram desbastadas com lixas de SiC com granulometria até #800, e mantendo-se as faces opostas suficientemente e paralelas.

As velocidades de propagação dos pulsos mecânicos longitudinais (V_L) e transversais (V_T) foram determinadas com auxílio de um Pulser/Receiver da Panametrics-NDT/Olympus, modelo 5072-PR, e de um osciloscópio Minipa, modelo MO-1150D 150 MHz, o qual foi usado para medir o tempo de percurso (t) dos pulsos. Para gerar os pulsos longitudinais e transversais foram necessários transdutores de quartzo apropriados, sendo utilizado o modelo V202-RM para os pulsos longitudinais e o modelo V221-BA-RM para os pulsos transversais, ambos com diâmetro de 0,25'', e frequência de 10 MHz. Como fluidos acoplantes, os quais facilitam a transmissão da energia sonora das ondas ultrassônicas entre o transdutor e a amostra sem perdas, foram utilizados água para os pulsos longitudinais e SWC (Shear Wave Couplant - Panametrics) para os pulsos transversais. A montagem experimental está apresentada no Apêndice B.

As velocidades de propagação foram então calculadas através da relação $v = 2l/t$, onde l é a espessura da amostra. Esta espessura foi medida com um relógio comparador da Mitutoyo modelo 2119F, com resolução de $\pm 1 \mu\text{m}$. Os módulos elásticos E, G, K e o coeficiente de Poisson foram calculados pelas Equações 3.8, 3.9, 3.10 e 3.11, como apresentado respectivamente.

$$E = \rho v_t^2 \frac{3v_l^2 - 4v_t^2}{v_l^2 - v_t^2} \quad (3.8)$$

$$G = \rho v_t^2 \quad (3.9)$$

$$K = \rho/3 (3v_l^2 - 4v_t^2) \quad (3.10)$$

$$\nu = \frac{v_l^2 - 2v_t^2}{2(v_l^2 - v_t^2)} \quad (3.11)$$

onde E é o módulo de Young (GPa), G é o módulo de cisalhamento (GPa), K é o módulo volumétrico (GPa), ν é o coeficiente de Poisson, v_t é a velocidade transversal (m/s), v_l é a velocidade longitudinal (m/s) e ρ é a massa específica real do material (g/cm³).

3.4. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

O teste de citotoxicidade é uma forma qualitativa de avaliação biológica *in vitro*, onde utilizam-se extratos dos materiais a serem testados em contato indireto com cultura de células de mamíferos, em microplacas para cultura celular. Neste trabalho, a avaliação da citotoxicidade foi realizada utilizando-se o método de incorporação do corante vital vermelho neutro [131].

3.4.1 Teste de citotoxicidade

O ensaio ocorreu nos laboratórios do IPEN, segundo as normas de procedimentos metodológicos ISO 10993-5 [132], conforme apresentado a seguir e encontrado em maiores detalhes na literatura [133].

Como análise preliminar das propriedades biológicas, foi avaliada a citotoxicidade dos materiais vítreos e VC. As amostras V700-4, V725-4, V775-4, V975-4 e V1100-4 foram fragmentadas e peneiradas até que tivessem tamanho de partícula menor que 63 µm, visando minimizar a influência da superfície sobre os resultados. Os pós foram então esterilizados por aquecimento em estufa a 160 °C durante 1 h.

Para o preparo da suspensão celular, primeiramente houve o cultivo das células

NCTCclone L929 de tecido conectivo de camundongo, originária da American Type Culture Collection [ATCC-(CCL1)], em garrafa de cultura celular, em meio de cultura (MEM com adição de 10 % de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais e piruvato de sódio). Após crescimento confluyente a cultura foi tratada com solução ATV (Trypsina 0,2 % e Versene 0,02 %), para o destaque das células. O número de células foi contado em hemocitômetro e a suspensão celular foi aproximada para $3,5 \times 10^5$ células por mL.

Os pós dos materiais foram adicionados na proporção de 0,1 g/mL em meio de cultura-uso, e então incubados por 48 h a 37 °C. Diluições seriadas (100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % e 6,25 %) foram feitas dos extratos de amostras, do controle negativo (polietileno de alta densidade) e do controle positivo (filme de látex de borracha natural). Esta etapa está apresentada na Figura 3.10.

Posteriormente, preparou-se a microplaca através da distribuição de 200 µL da suspensão celular em cada poço (7×10^4 células/poço). A placa foi então incubada em estufa úmida a 37 °C e atmosfera com 5 % CO₂ por cerca de 24 h, para atingir a confluência desejada.

Figura 3.10 – Realização de diluições seriadas dos extratos das amostras e dos controles positivos e negativos em fluxo laminar.

O ensaio propriamente dito foi realizado através da adição de 200 µL de cada diluição, controles positivo/negativo e extrato das amostras, em cada poço com células aderidas, em triplicata, conforme Figura 3.11. Os poços com controle de células receberam meio-uso e este controle corresponde a 100 % de sobrevivência celular. A placa foi então mantida em estufa úmida a 37 °C e atmosfera com 5 % CO₂ por 24 h. Decorrido este período os meios foram trocados por meio-uso fresco contendo 50 µg do corante vermelho neutro/mL e a placa foi incubada por 3 h para a incorporação do corante. Após esta etapa a

placa foi lavada duas vezes com a solução tampão PBS (*Phosphate Buffer Solution*) e uma vez com a solução de lavagem, e em seguida cada poço recebeu 200 μ L da solução de extração.

Figura 3.11 – Adição dos controles positivo/negativo e dos extratos das amostras em microplaca com cultura de células aderidas para realização do teste de citotoxicidade.

O teste de incorporação do vermelho neutro consiste no fato de que este é um corante solúvel em água e que passa através da membrana plasmática, se concentrando nos lisossomas de células vivas, onde se fixam por ligações eletrostáticas com sítios aniônicos na matriz lisossomal. Quando uma substância tóxica causa um dano às células, há um decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro, possibilitando a distinção entre células vivas e mortas pela medida da intensidade de cor final. Assim, foi realizada a quantificação de densidade óptica dos micropoços da placa através de espectrofotômetro leitor de ELISA, utilizando-se filtro de 540 nm.

A porcentagem de sobrevivência celular em cada diluição foi calculada através da média de densidade óptica de cada diluição e a média de densidade óptica do controle de células (100 %).

3.4.2 Teste de bioatividade

A bioatividade dos materiais desenvolvidos neste projeto foi analisada no Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos – LAMAV/UFSCar.

Inicialmente, a solução SBF-K9 foi preparada seguindo os passos descritos por Kokubo e Takadama [59]. O preparo da solução SBF-K9 para os testes de bioatividade é um processo bem delicado e sua metodologia deve seguir uma seqüência inflexível, caso contrário pode haver a precipitação de sais na solução, o que resulta na sua inutilização. Dessa forma, colocou-se 500 mL de água destilada e deionizada em béquer de um litro coberto com filme plástico, sendo mantido em agitação com agitador magnético, enquanto os reagentes foram adicionados na água, um a um e na mesma ordem dada pela Tabela 3.3, somente sendo adicionado o próximo reagente quando o anterior estivesse completamente dissolvido. A quantidade dos reagentes apresentada na Tabela 3.3 é para um litro de solução a ser preparada. A temperatura e o pH da solução foram mantidos sob constante monitoramento durante todo o tempo de preparo da solução, sendo necessário portanto, fixar um termômetro e um eletrodo no béquer utilizado.

Tabela 3.3 – Sequência de colocação dos reagentes para preparo da solução SBF-K9.

Ordem	Reagentes	Quantidade (g) por litro de solução
1	NaCl	7,996
2	NaHCO ₃	0,35
3	KCl	0,224
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,228
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,305
6	HCl 1N	40 mL
7	CaCl ₂	0,278
8	Na ₂ SO ₄	0,071
9	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	6,057

Após a colocação de todos os reagentes e a estabilização da solução, a temperatura foi ajustada a 36,5 °C e o pH para 7,25, através da adição de solução de HCl 1 N. A solução SBF-K9 foi transferida do béquer, após seu resfriamento a temperatura ambiente, para um balão volumétrico, e então, o volume total foi ajustado em um litro adicionando água deionizada. Por fim, a solução foi transferida para um frasco de polietileno e armazenada em refrigerador com temperatura entre 5 e 10 °C.

Foi avaliada a bioatividade das amostras V700-4, V725-4, V775-4 e V975-4, tendo como padrão o biovidro *Bioglass* 45S5 desenvolvido por Hench [4]. Para a realização do teste de bioatividade, pastilhas das amostras e do padrão com dimensões de aproximadamente ø 12 mm x 3 mm foram utilizadas. O cálculo da massa de cada reagente

e o procedimento experimental adotado visando à obtenção do *Bioglass* 45S5 estão apresentados no ‘Apêndice C’.

Estas pastilhas foram desbastadas em lixas de carbeto de silício até a gramatura de #400, imersos em álcool isopropílico e limpos em equipamento de ultrassom. Em seguida, foram suspensas por um fio de nylon de 0,15 mm no interior de frascos de polietileno contendo a solução SBF-K9, como representa a imagem da Figura 3.12. O volume da solução foi calculado de acordo com a relação área superficial da pastilha e volume da solução igual a $0,1 \text{ cm}^3$.

Os testes foram realizados a temperatura de $36,7^\circ\text{C}$ em um banho-maria marca Nova Técnica modelo CT269 com controle rigoroso de temperatura (controlador Gefran 500), variando somente $\pm 0,1^\circ\text{C}$. O ensaio foi realizado em períodos variados, quais sejam 1 h, 3 h, 6 h, 24 h (1 dia), 48 h (2 dias), 72 h (3 dias), 120 h (5 dias), 168 h (7 dias) e 336 h (14 dias).

Figura 3.12 – Amostras suspensas em solução SBF-K9 para avaliação da bioatividade.

Após os testes de bioatividade, as amostras foram retiradas dos frascos e mergulhadas em acetona para a retirada da solução e paralisação das reações. Anteriormente ao teste de bioatividade e após cada experimento, as amostras foram analisadas em ambos os lados paralelos por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em equipamento da marca Perkin Elmer modelo Spectrum GX, com reflectância difusa. Os espectros foram obtidos entre 1800 e 400 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} , usando TGS (sulfato de triglicerina) como detector.

Análise por MEV foi usada para avaliar as modificações na superfície das amostras após imersão e a formação da camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA), para as amostras submersas por períodos de 3, 7 e 14 dias. Estes períodos foram estabelecidos em função dos resultados de FTIR, sendo estes períodos de tempo intermediários.