UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

CENTRO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Maurício Dalla Costa Rodrigues da Silva

ANÁLISE DO POTENCIAL BIOATIVO DE VIDROS À BASE DE BOROFOSFATO

Santa Maria, RS
2019

Maurício Dalla Costa Rodrigues da Silva

ANÁLISE DO POTENCIAL BIOATIVO DE VIDROS À BASE DE BOROFOSFATO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química.**

Orientadora: Profª Drª Poliana Polizello Lopes

Santa Maria, RS
2019

Silva, Maurício Dalla Costa Rodrigues da
Análise do potencial bioativo de vidros à base de borofosfato / Maurício Dalla Costa Rodrigues da Silva.- 2019.
80 p.; 30 cm

Orientadora: Poliana Pollizello Lopes
Coorientador: Daniel Assumpção Bertuol
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, RS, 2019

1. Bioatividade 2. Vidros de borofosfato 3. Fosfatos de cálcio 4. Hidroxiapatita 5. Engenharia de Tecidos I. Lopes, Poliana Pollizello II. Bertuol, Daniel Assumpção III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2019
Todos os direitos autorais reservados a Maurício Dalla Costa Rodrigues da Silva. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.
E-mail: eng.mauriciodallacosta@gmail.com

Maurício Dalla Costa Rodrigues da Silva

ANÁLISE DO POTENCIAL BIOATIVO DE VIDROS À BASE DE BOROFOSFATO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química.**

Aprovado em 18 de fevereiro de 2019:

_____
Poliana Pollizello Lopes, Dra (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

_____
Daniel Assumpção Bertuol, Dr (UFSM)
(Coorientador)

_____
Tiago Moreno Volkmer, Dr (UFPEL)

_____
Gabriela Carvalho Collazzo, Dra (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que, mesmo nas adversidades, não desistem e continuam na busca de seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Por trás de um grande pesquisador, existe sempre uma grande equipe. A concretização deste trabalho é o reflexo do carinho e dedicação de várias pessoas. Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desse estudo e, de maneira especial, agradeço:

- à minha orientadora Poliana Pollizello Lopes pelos sábios ensinamentos e conselhos concedidos durante essa jornada, em especial, ao carinho e compreensão em momentos importantes dessa jornada;

- ao meu coorientador Daniel Bertuol pelos sábios conselhos e pelo apoio técnico fornecido durante a realização desse estudo;

- às químicas Mariana Bassaco e Margiani de Paula Fortes, e a assistente de laboratório Liégi Junges Abelin pelo auxílio técnico durante a realização desse trabalho;

- ao meu companheiro Leonan Guerra pelo amor, carinho e muita paciência durante toda essa jornada. Você é e sempre será a pessoa que me inspira todos os dias a seguir adiante;

- aos meus pais José Manoel Rodrigues da Silva e Ida Dalla Costa de Oliveira pelo apoio concedido durante toda a minha vida;

- aos meus amigos Paula Marchesan, Juliana Machado, Anelise Mossmann, Thaynoara Gonçalves, Henrique Borborema, Eduardo Dutra e Rejiane da Rosa pelos conselhos e conversas em todos os momentos desta trajetória;

- à Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de desenvolver e concretizar esse estudo;

- à Universidade Federal do Pampa, em especial a equipe de técnicos e docentes dos curso de Engenharia Química que estiveram ao meu lado durante este trabalho;

- à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro fornecido para a realização deste estudo;

- ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

Enfim, a todos aqueles que contribuem, direta e indiretamente, para o meu crescimento pessoal e profissional.

Tenho em mim todos os sonhos do mundo.
(Fernando Pessoa)

RESUMO

ANÁLISE DO POTENCIAL BIOATIVO DE VIDROS À BASE DE BOROFOSFATO

AUTOR: Maurício Dalla Costa Rodrigues da Silva
ORIENTADORA: Poliana Pollizello Lopes

O uso de vidros de fosfato e borato na regeneração do tecido ósseo vem sendo pesquisado nos últimos anos em função do seu potencial de serem reabsorvidos pelo organismo durante o processo de recuperação dos tecidos afetados. Este estudo objetiva avaliar o potencial bioativo *in vitro* de vidros de borofosfato com razões de Ca/P de 0,6 (BV1), 1,0 (BV2) e 1,4 (BV3), assim como sua estrutura, processamento, propriedades físicas, térmicas e superficiais. Os materiais foram fundidos a 1200°C em cadinho de porcelana seguido de duas rotas de resfriamento: em ar (peça) e em água (frita). Os vidros resfriados em ar foram recozidos a 600°C por 1h. As fritas foram moídas em moinho de bolas por 1 h a 60 rpm, peneiradas em 25 μm e o rendimento do processo foi calculado. O DSC foi realizado para determinar temperatura de transição vítrea dos materiais e sua estrutura foi analisada por DRX e FTIR. As densidades dos materiais foram determinadas por picnometria gasosa, e a área superficial específica e as características dos poros por BET. Os ensaios *in vitro* foram realizados pela submersão das peças vítreas em SBF (*Simulated Body Fluid*) durante 7, 14, 21 e 28 dias, seguido da medição do pH no meio, determinação das concentrações de Ca e P por ICP-OES, dos perfis de solubilidade dos materiais e a análise das mudanças superficiais por meio de MEV/EDS. Os materiais produzidos apresentaram estruturas amorfas e bandas de absorção características de vidros de borofosfato, com temperaturas de transição vítrea na faixa de 500-600°C. A moagem dos materiais apresentou rendimentos de 48,5, 65,7 e 73,7% para os vidros BV1, BV2 e BV3 respectivamente. As densidades dos vidros apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em função da variação da razão Ca/P, a área superficial específica e o volume dos poros foram inferiores aos obtidos para vidros produzidos pela técnica sol-gel. A solubilidade dos materiais apresentou relação linear com o tempo de imersão, sendo o vidro BV1 o mais solúvel. As concentrações de Ca e P no SBF ao longo dos ensaios *in vitro* indicaram que ocorreu a deposição de fosfatos de cálcio na superfície e a dissolução da rede vítrea. Análises da superfície por MEV/EDS evidenciaram a formação de hidroxiapatita no vidro BV1 entre 21-28 dias de imersão. Este estudo concluiu que a redução da razão Ca/P na composição dos vidros de borofosfato teve como efeito o aumento da solubilidade do material e melhorias na formação da camada de hidroxiapatita em meio *in vitro* acelular.

Palavras-chave: Bioatividade. Hidroxiapatita. Vidros de borofosfato.

ABSTRACT

BIOACTIVE POTENTIAL ANALYSIS OF BOROPHOSPHATE-BASED GLASSES

AUTHOR: Maurício Dalla Costa Rodrigues da Silva
ADVISOR: Poliana Pollizello Lopes

The use of phosphate and borate glasses on regeneration of bone tissue has been researched for the past years due to its potential of being reabsorbed by the organism during the recovery process of affected tissues. This study aims to evaluate the *in vitro* bioactive potential of borophosphate glasses with Ca/P ratios of 0,6 (BV1), 1,0 (BV2) and 1,4 (BV3), as well as its structure, processing, physical, thermal and surface properties. The materials were melted at 1200°C on porcelain crucible followed by quenching in two different routes: air (piece) and water (frite). The glasses quenched on air were annealed at 600°C during 1 hour. The frites were grinding in ball mill for 1 hour at 60 rpm, sieving at 25 μm and the process yield was calculated. The DSC was performed in order to determinate the glass transition temperature of the materials and its structure were analyzed by XRD and FTIR. The materials densities were determined by gas pycnometry, and the specific surface area and the pores features by BET. The *in vitro* essays were performed by soaking the glass pieces on SBF during 7, 14, 21 and 28 days, follow by media pH measurement. determination of Ca and P by ICP-OES, solubility profiles of the materials and the analysis of surface changes by MEV/EDS. The developed materials presented amorphous structures and boron-phosphate characteristic absorption bands, with glass transition temperature between 500-600°C. The materials grinding exhibited yields of 48,5, 65,7 and 73,7% for the glasses BV1, BV2 and BV3 respectively. The glasses densities revealed significant differences ($p \leq 0,05$) in terms of Ca/P ratio variability, the specific surface area and pore features were lesser than the results obtained for sol-gel glasses. The solubility of the materials presented linear relationship with soaking time, being glass BV1 the most soluble. The Ca and P concentrations along the in vitro essays indicated that calcium phosphates deposits occurred on the surface and also the glass network dissolution. Surface analysis by MEV/EDS evidenced hydroxyapatite formation on glass BV1 between 21-28 days of soaking. This study concluded that the reduction of Ca/P ratio on boron-phosphate glasses compositions had as effect the increase of solubility of the material and improvements on hydroxyapatite formation on acellular in vitro media.

Keywords: Bioactivity**.** Hydroxyapatite. Borophosphate glasses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Levantamento dos principais biovidros produzidos realizado por Kaur et al (2016). A imagem da (a) sumariza os biovidros em termos de composição da rede vítrea, ao passo que a imagem (b) condensa os resultados em termos de rota de produção.....21
Figura 2 - Diagrama volume específico/entalpia versus temperatura (T_g representa a temperatura de transição vítrea e T_m a temperatura de fusão).....23
Figura 3 - Ilustração da estrutura tetraédrica básica de silicato e fosfato.....25
Figura 4 - Unidades tetraédricas básicas de fosfato. 26
Figura 5 - Anéis boroxol da rede vítrea de boro. 29
Figura 6 - Reação de hidratação em cadeias de fosfato. 31
Figura 7 - Reação de hidrólise em cadeias de fosfato. 31
Figura 8 - Etapas do processo de fusão de vidros. 33
Figura 9 - Fluxograma de produção de vidros pelo método sol-gel.....35
Figura 10 - Espectro FTIR da hidroxiapatita em pó.....40
Figura 11 - Difratograma padrão da hidroxiapatita (JCPDS n. 09-0432).....41
Figura 12 - Fluxograma do processo experimental de produção, caracterização e avaliação do potencial bioativo dos vidros de borofosfato analisados.....42
Figura 13 - Etapas de moagem e peneiramento. 44
Figura 14 - Exemplo de amostra de vidro utilizada nos ensaios de imersão em SBF (destacado na figura).....47
Figura 15 - Formação de ligações cruzadas em estruturas vítreas de fosfato com o íon Ca^{2+}. 50
Figura 16 - Difratogramas dos vidros BV1, BV2 e BV3. 51
Figura 17 - Análise térmica dos vidros BV1, BV2 e BV3 por DSC. 52
Figura 18 - Espectros de FTIR dos vidros BV1, BV2 e BV3.....53
Figura 19 - Isotermas BET de adsorção/dessorção e distribuição BJH de dessorção dos vidros BV1 (a), BV2 (b) e BV3 (c). 59
Figura 20 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície dos vidros BV1, BV2 e BV3 (ampliação de 20000 vezes).....60
Figura 21 - Variação de pH do SBF ao longo do tempo para os vidros BV1, BV2 e BV3.....61
Figura 22 - Solubilidade dos vidros BV1, BV2 e BV3 em função do tempo de imersão em SBF.....62
Figura 23 - Solubilidade dos vidros BV1, BV2 e BV3 em função do tempo de imersão.....64
Figura 24 - Distribuição de probabilidade normal dos resíduos das regressões realizadas para a solubilidade dos vidros BV1 (a), BV2 (b) e BV3 (c) em função do tempo de imersão. 64
Figura 25 - Análise dos resíduos de regressão dos dados de solubilidade em função do tempo de imersão para os vidros BV1 (a), BV2 (b) e BV3 (c).....65
Figura 26 - Perfis de concentração de cálcio (a) e fósforo (b) no SBF ao longo dos ensaios de imersão.....66
Figura 27 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a superfície dos vidros BV1(a), BV2(b) e BV3(c) após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF. Todas as imagens possuem ampliação de 5000 vezes.....67
Figura 28 - Variação da razão Ca/P nos depósitos formados na superfície dos vidros BV1, BV2 e BV3 ao longo do tempo de imersão em SBF. 68

Figura 29 - Espectro EDS da superfície do vidro BV1 antes (a) e após 28 dias de imersão em SBF (b). 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das estruturas de fosfato em função da razão O/P e da composição (*v* representa a valência do cátion e *x* a composição molar). 27
Tabela 2 - Concentração nominal de íons nas soluções de SBF's propostas em comparação com as do plasma sanguíneo humano. 36
Tabela 3 - Fosfatos de cálcio arranjados em função da razão Ca/P. 40
Tabela 4 - Composição dos vidros de borofosfato (em %mol). 43
Tabela 5 - Condições operacionais de preparo e *degas* das amostras submetidas à fisissorção estática de nitrogênio gasoso. 46
Tabela 6 - Rendimento da moagem dos vidros em moinho de bolas para a faixa granulométrica inferior ou igual a 25µm. 49
Tabela 7 - Temperatura de transição vítrea dos três vidros. 52
Tabela 8 - Temperaturas de transição vítrea para alguns vidros de borofosfato.....53
Tabela 9 - Densidade dos vidros a base de borofosfato. 56
Tabela 10 - Área superficial específica, tamanho e volume dos poros. 58
Tabela 11 - Parâmetros da regressão dos dados de solubilidade dos vidros em função do tempo para o modelo proposto. 64

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

45S5	Biovidro 45S5
a	Comprimento da trinca
Al_2O_3	Trióxido de alumínio
As_2O_3	Trióxido de diarsênio
B_2O_3	Trióxido de diboro
BeF_4	Tetrafluoreto de berílio
BeO	Óxido de berílio
BET	Brunauer-Emmett-Teller (Isoterma)
Bi_2O_3	Trióxido de dibismuto
BJH	Barrett-Joyner-Halenda (Isoterma)
BO	Oxigênio ligante
BV1	Biovidro 1
BV2	Biovidro 2
BV3	Biovidro 3
Ca	Cálcio
CaO	Óxido de cálcio
Cl^-	Cloreto
CO_3^{2-}	Carbonato
DRX	Difração de Raios X
DSC	Análise Calorimétrica Diferencial
E	Módulo de elasticidade
F	Parâmetro F
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourrier
Ge_2O_3	Trióxido de digermânio
GeO_2	Dióxido de germânio
HA	Hidroxiapatita
HCO_3^-	Bicarbonato
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-etanossulfônico
HPO_4^{2-}	Mono-hidrogenofosfato
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
K	Potássio
k	Solubilidade
K_2O	Óxido de potássio
KBr	Brometo de potássio
Li	Lítio
M	Metal
m_0	Massa da amostra de vidro antes da imersão em SBF
$m_{d\leq25}$	Massa de vidro com diâmetro menor ou igual a 25 µm
Mg	Magnésio
m_i	Massa inicial de vidro
m_t	Massa da amostra de vidro após *t* dias de imersão em SBF
n	Número de oxigênios ligantes na estrutura básica de fosfato
N_2	Nitrogênio
Na	Sódio
Na_2O	Óxido de sódio
NBO	Oxigênio não-ligante

O	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Fósforo
p	Probabilidade
P_2O_5	Pentóxido de difósforo
pH	Potencial hidrogeniônico
Q	Unidade estrutural básica de fosfato
R	Rendimento
R^2	Coeficiente de determinação
R^2_{adj}	Coeficiente de determinação ajustado
S_a	Área geométrica total da amostra
Sb_2O_3	Trióxido de diantimônio
SBF	*Simulated Body Fluid*
Si	Silício
SiO_2	Dióxido de silício
SO_4^{2-}	Sulfato
S_t	Solubilidade do vidro após *t* dias de imersão em SBF
t	Tempo de imersão
TeO_2	Dióxido de telúrio
T_g	Temperatura de transição vítrea
TiO_2	Dióxido de titânio
T_m	Temperatura de fusão
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
v	Valência
V_2O_5	Pentóxido de divanádio
V_s	Volume de SBF
x	Composição molar
ZrF_4	Tetrafluoreto de zircônio
ZrO_2	Dióxido de zircônio
δ	Deformação angular
σ	Tensão
υ	Deformação axial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 OBJETIVOS 19
2.1 OBJETIVO GERAL 19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20
3.1 HISTÓRICO 20
3.2 VIDROS 23
3.2.1 Vidros de fosfato 24
3.2.1.1 Estrutura 24
3.2.1.2 Modificadores de rede 28
3.2.1.3 Redes de borofosfato 29
3.2.1.4 Solubilidade 30
3.3 ROTAS DE PRODUÇÃO DE VIDROS 32
3.3.1 Fusão 32
3.3.2 Sol-gel 34
3.4 BIOATIVIDADE 35
3.4.1 Ensaios in vitro 35
3.4.2 Mecanismo de formação da camada de hidroxiapatita 37
3.4.3 Fosfatos de cálcio 38
4 METODOLOGIA 42
4.1 REAGENTES 42
4.2 PRODUÇÃO DOS VIDROS 43
4.2.1 Fusão 43
4.2.2 Moagem 44
4.3 ANÁLISE ESTRUTURAL 45
4.4 PROPRIEDADES FÍSICAS. 45
4.4.1 Densidade 45
4.4.2 Propriedades Superficiais 46
4.5 ENSAIOS IN VITRO 46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 49
5.1 PRODUÇÃO DOS VIDROS 49
5.1.1 Moagem 49
5.2 ANÁLISE ESTRUTURAL 50
5.3 PROPRIEDADES FÍSICAS 56
5.3.1 Densidade 56
5.3.2 Propriedades superficiais 57
5.4 ENSAIOS IN VITRO 61
6 CONCLUSÕES 70
7 REFERÊNCIAS 72

1 INTRODUÇÃO

A sociedade brasileira vem passando por mudanças nas taxas de natalidade, mortalidade e de expectativa de vida ao longo das últimas décadas. Entre os anos de 2010 e 2017, a população acima de 50 anos passou de 20,28% para 23,96%, ao passo que a população abaixo de 20 anos obteve uma redução de 33,53% para 29,75% (BRASIL, 2018a).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a pirâmide etária brasileira, que na década de 1980 assemelhava-se com a de países subdesenvolvidos, ao longo das últimas décadas, passou por mudanças em seu perfil, exibindo transição para um formato semelhante ao de países desenvolvidos (BRASIL, 2008b).

O aumento da população acima de 50 anos requer alterações nas políticas públicas brasileiras, em especial as voltadas para a saúde. Enfermidades que até as últimas décadas não apresentavam alta incidência começam a ter aumento nos seus índices. Dentre essas, destacam-se as doenças ósseas, como a osteoporose e a osteoartrose (Camargos e Bomfim, 2008; Duarte et al, 2013).

A osteoporose é uma doença sistêmica progressiva caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura, levando à fragilidade do osso e aumentando o risco de fraturas (Eastel et al, 2016). Já a osteoartrose (também conhecida como artrose ou osteoartrite) é uma doença caracterizada pela perda progressiva da superfície da cartilagem articular, afetando diretamente todos os tecidos da articulação sinovial, como por exemplo o osso subcondral, tornando-o mais suscetível ao desenvolvimento de microfraturas (Duarte et al, 2013)

A região do esqueleto mais afetada pela incidência de osteoporose é o quadril, sendo as fraturas nessa região consideradas as mais graves e aumentam de 12 a 20% a taxa de mortalidade nos dois anos consequentes à fratura. Estima-se que mais de 50% dos pacientes que sobrevivem à fratura de quadril são incapazes de ter uma vida independente (Orwig, Chan e Magaziner, 2006).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), no mundo, 13% a 18% das mulheres e 3% a 6% dos homens, acima de 50 anos, sofrem com a

osteoporose. No Brasil, o número de pessoas que possuem a doença chega a 10 milhões e os gastos com o tratamento e a assistência no Sistema Único de Saúde (SUS), são altos: “Só em 2010, o SUS gastou aproximadamente R$ 81 milhões para a atenção ao paciente portador de osteoporose e vítima de quedas e fraturas” (Ministério de Saúde, 2017).

A osteoartrose afeta tipicamente as articulações das mãos, coluna, quadril e joelho. É o distúrbio articular mais comum, pode afetar de 6% a 12% da população adulta e mais de um terço das pessoas com mais de 65 anos de idade (Rossis, Massabki e Kairalla, 2010).

Dentre as doenças reumáticas, a osteoartrose representa cerca de 30%–40% das consultas realizadas na área de reumatologia. Estima-se que em países desenvolvidos os custos associados ao tratamento da osteoartrose chegam a 4 bilhões de dólares ao ano. Na Previdência Social brasileira, a artrose é responsável por 7,5% de todos os afastamentos do trabalho e é a quarta doença associada à aposentadoria, além dos custos associados com afastamentos e auxílios (Oliveira et al, 2012; Li, Gignac e Anis, 2006).

Neste contexto, emergiu uma nova área de estudo: a Engenharia de Tecidos (*Tissue Engineering*). A Engenharia de Tecidos surge como um ramo da ciência que tem por objetivo a investigação de materiais com a capacidade de substituição e/ou reparação de tecidos danificados por algum tipo de enfermidade (Cheng e Liu, 2016).

Dentre os vários materiais com potencial de reparação óssea, destacam-se os materiais cerâmicos. Alguns estudos apontam o uso de materiais cerâmicos em meados da década de 1970 em função de sua boa resposta à integração óssea. Ademais, sua composição mineral semelhante a do osso humano proporciona uma vantagem frente a outros materiais, como por exemplo algumas ligas metálicas.

A zircônia e alumina foram os primeiros materiais cerâmicos com utilização biomédica por apresentarem natureza inerte (Abo-Naf et al, 2015). O sucesso da aplicação de materiais cerâmicos é limitado consoante sua fragilidade e rigidez. A busca por novos materiais impulsionou a investigação do potencial do uso de vidros para a reconstrução óssea (Vallet-Regí, 2001).

O primeiro relato do uso de vidros é o *Bioglass 45S5*® desenvolvido por Hench e colaboradores em 1971. O *Bioglass 455S*® é um marco na aplicação de vidros no processo de reconstrução óssea. A partir desse material que o termo *biovidro* passou a designar a classe de vidros que apresenta uma resposta biológica específica em sua superfície proporcionando o desenvolvimento de ligações entre o tecido ósseo e à material base (Margha e Abdelghany, 2012; Montazerian e Zanotto, 2017).

Nos anos seguintes, o *Bioglass 45S5*® e seus derivados começaram a ser usados na área ortopédica e odontológica para estimular a reconstrução do tecido ósseo. Desenvolveram-se vários estudos sob a aplicação de biovidros para a aplicação biomédica, sendo uma grande parcela desses contendo sílica em sua composição (Rahaman et al, 2011). Sharmin e Rudd (2017) destacam que, embora os vidros de silicato sejam amplamente utilizados na substituição de tecidos calcificados devido sua insolubilidade, a reação a longo prazo da sílica, tanto local quanto sistêmica, no organismo ainda é desconhecida, além de possuir toxicidade.

Consequentemente, outras formulações de biovidros vem sendo desenvolvidas com o intuito de solucionar as desvantagens associadas à sílica. Dentre esses materiais, destacam-se os vidros à base de fosfato.

De acordo com Ciceo-Lucacel et al (2014), essa classe de biovidros apresentam uma característica peculiar quando comparado com os demais vidros que apresentam bioatividade: eles são solúveis. Além disso, os vidros à base de fosfato apresentam composição próxima a do osso natural.

Os principais sistemas vítreos dessa classe de material possuem o P_2O_5 como formador de rede e como modificadores de rede óxidos de metais alcalinos e alcalinos terrosos como por exemplo o Na_2O, CaO e K_2O. A solubilidade dessa classe de vidros pode ser controlada pela modificação de sua composição. Lopes et al (2011) menciona que o controle da taxa de solubilidade desses biovidros é um fator importante para promover uma proliferação celular adequada na superfície desses materiais. Altas taxas de dissolução ocasionam uma redução na taxa de reprodução celular, afetando o processo de reconstrução óssea.

Ademais, Abdelghany et al (2016) e Rahaman et al (2011) apontam que a adição do formador de rede B_2O_3, característico de vidros à base de boro, consegue auxiliar na degradação da rede vítrea em função de sua baixa durabilidade química,

promovendo uma decomposição mais rápida e conversão em materiais semelhantes à hidroxiapatita (HA).

Mesmo com as vantagens descritas, ainda existe uma lacuna na literatura em relação ao estudo dos vidros à base de borofosfato. Nesse sentido, o presente trabalho visa analisar o potencial bioativo de vidros no sistema $CaO – K_2O – P_2O_5 – B_2O_3$ para aplicações biomédicas, em especial na reconstrução de tecidos ósseos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo é avaliar o potencial bioativo de três vidros a base de borofosfato no sistema CaO – K_2O – P_2O_5 – B_2O_3 com razões de CaO/P_2O_5 de 0,6, 1,0 e 1,4.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a estrutura dos materiais desenvolvidos;

- Avaliar a redução granulométrica dos vidros em moinho de bolas;

- Determinar as propriedades físicas dos vidros;

- Determinar os perfis de solubilidade dos vidros em *Simulated Body Fluid* (SBF) ao longo do tempo;

- Determinar as variações de pH no SBF decorrentes da imersão dos vidros em função do tempo;

- Determinar as concentrações de cálcio e fósforo no SBF durante os períodos de imersão;

- Investigar a superfície dos vidros após os períodos de imersão em SBF para verificar a formação da camada bioativa de hidroxiapatita.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HISTÓRICO

A Engenharia de Tecidos (*Tissue Engineering*) é um ramo interdisciplinar da ciência que aplica os princípios da engenharia e das ciências da saúde para o desenvolvimento, crescimento e regeneração de tecidos e órgãos danificados (Khademhosseini e Langer, 2016). Durante a primeira geração desse campo de pesquisa o foco estava voltado para o desenvolvimento de materiais biomédicos inertes ou praticamente inertes, com o mínimo de toxicidade para o organismo, para seu uso como enxertos ósseos (Pina, Oliveira e Reis, 2015; Shao et al, 2015).

A introdução de dispositivos biomédicos feitos de materiais inertes no corpo humano tinha como principal objetivo a substituição do tecido afetado. No entanto, o organismo reage à inserção desse corpo estranho criando uma membrana fibrosa não aderente ao redor do implante. Esse mecanismo de defesa, juntamente com outros fatores, fez com que falhas nesses dispositivos começassem a ser detectadas (Zhang et al, 2011).

No intuito de resolver os problemas associados com o uso de materiais inertes, os cerâmicos foram introduzidos neste cenário para a aplicação biomédica com o objetivo de encontrar melhores características para a integração óssea (Vallet-Regi, 2001). O uso de materiais cerâmicos, no entanto, já era datado desde o final do século XIX na área ortopédica com o uso do gesso (sulfato de cálcio hidratado), sendo empregado para o preenchimento ósseo. Para atender os requisitos exigidos, cerâmicos de alta tecnologia começaram a ser desenvolvidos no século XX para aplicações biomédicas (Siquiera e Zanotto, 2011).

O desenvolvimento de materiais bioativos foi impulsionado pela descoberta do vidro bioativo *Bioglass 45S5*, um material que possui a habilidade de interagir com o tecido vivo, promovendo a reprodução celular em sua superfície (Montazerian e Zanotto, 2017).

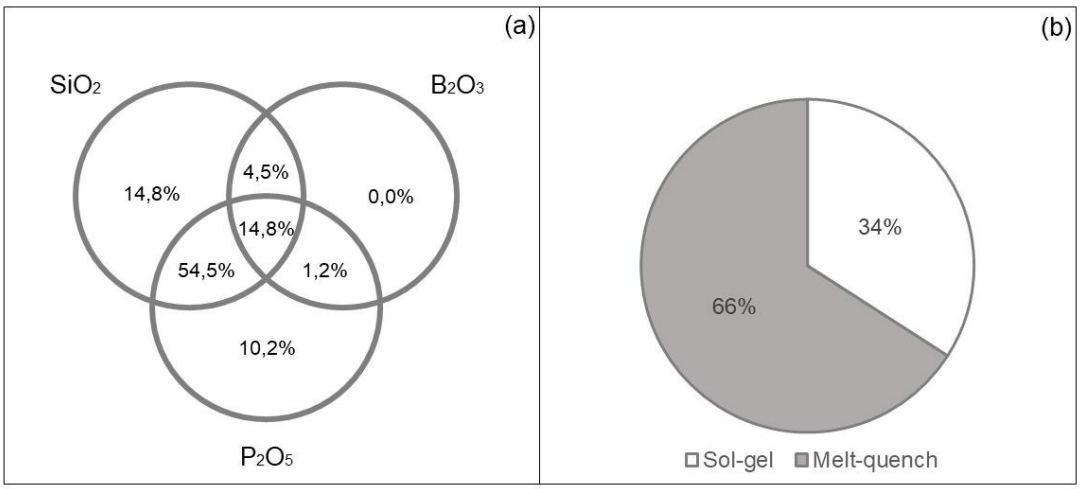
O *45S5*® é um vidro de silicato com composição de 45% SiO_2–24,5% CaO–6% P_2O_5–24,5%Na_2O (%m/m). Este vidro possui a habilidade de formar uma camada

biologicamente ativa de hidroxiapatita (HA) com composição química e estrutura semelhante a do tecido ósseo, a qual permite a formação de uma forte ligação com o tecido ósseo (Jones et al, 2016). Siqueira e Zanotto (2011) citam que o termo “bioatividade” passou a ser utilizado pela primeira vez nesta ocasião para descrever a habilidade que um material possui em ligar-se fortemente ao tecido ósseo.

A partir da descoberta do *45S5*®, novas composições de vidros e outras cerâmicas avançadas foram desenvolvidas. No que tange aos vidros, a maior parte das novas formulações desenvolvidas ao longo das últimas décadas possuem a sílica como formadora de rede. Em uma revisão e estado da arte publicada por Kaur et al (2016), realizou-se o levantamento das composições de vidros mais comuns e suas rotas de síntese. Na figura 1 observa-se de maneira resumida os números levantados por Kaur et al (2016), nos quais observa-se que a maior parte dos vidros bioativos produzidos possuem SiO_2 em sua composição e também que a técnica de produção mais utilizada é a de fusão (*melt-quench*).

-

Figura 1 - Levantamento dos principais biovidros produzidos realizado por Kaur et al (2016). A imagem da (a) sumariza os biovidros em termos de composição da rede vítrea, ao passo que a imagem (b) condensa os resultados em termos de rota de produção



Fonte: Kaur et al, 2016 (adaptado)

O *Bioglass 45S5*® é um marco no desenvolvimento de biovidros a base de silicato para aplicações médicas, obtendo sucesso em várias aplicações médicas, em especial na odontologia e ortopedia (Rizwan, Hamdi e Basirun, 2017). Além do *Bioglass 45S5*®, outros produtos derivados, como o *Perioglass*®, *NovaBone*® e

NovaMin®, são usados clinicamente em próteses de reconstrução ossicular, implantes de manutenção do rebordo ósseo, enchimentos ósseos dos mais variados tipos e cremes dentais para tratamento de hipersensibilidade da marca *Sensodyne*® (Montazerian e Zanotto, 2017).

No entanto, existem questões que são levantadas em relação ao efeito da sílica a longo prazo e a sua lenta degradação no organismo. Em função dessas limitações, a busca por novos materiais para a reparação do tecido ósseo vem sendo investigada. Nesse cenário, os biovidros à base de fosfato surgiram como uma potencial alternativa (Abou Neel et al, 2009; Sharmin e Rudd, 2017).

Os vidros a base de fosfato apresentam características únicas de dissolução em meios aquosos. Suas taxas de dissolução podem variar de horas a semanas com a mudança da composição do vidro. Ademais, tais vidros possuem composição química semelhante a do osso humano e permitem a incorporação de certos dopantes que são capazes de induzir uma função biológica específica e aumentar sua biocompatibilidade (Abou Neel et al, 2009; Ahmed et al,2004).

Além dos vidros a base de fosfato, vidros de boro apresentam taxas de dissolução mais elevadas que os vidros de fosfato quando inseridos em meio aquoso. O boro influencia a performance de algumas enzimas metabólicas e sua deficiência está associada ao crescimento prejudicado e anormal do osso (Balasubramanian et al, 2018). Saranti, Koutselas e Karakassides (2006) reportam que a adição de B_2O_3 à rede de fosfato implementa melhora na bioatividade de biovidros de fosfato.

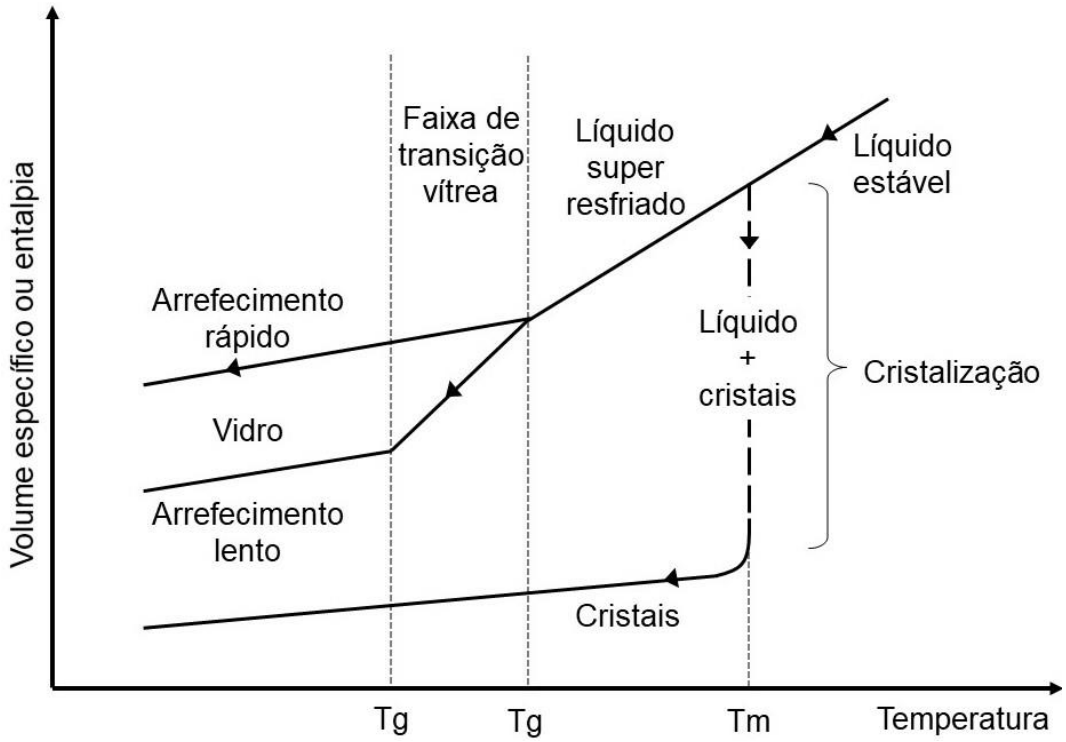
Por possuir altas taxas de dissolução, Lopes et al (2011) reporta que o crescimento celular na superfície desses vidros é prejudicado em função da alta taxa de liberação de íons no meio celular. No entanto, quando adicionado à outras redes vítreas em quantidades controladas, o boro pode reduzir a taxa de solubilidade do material em função da formação de ligações cruzadas na estrutura. Tal fato consegue controlar a taxa de dissolução do material, fazendo com que o tempo de solubilização e o tempo de crescimento celular estejam em sintonia.

As redes de borofosfato vêm sendo estudadas como uma alternativa a criação de materiais reabsorvíveis e bioativos para a regeneração óssea, além de possuírem o potencial para atuarem como libertadores controlados de fármacos e potencial de osteoestimulação e neurovascularização (Balasubramanian et al, 2017).

3.2 VIDROS

Vidros são definidos como materiais cerâmicos caracterizados por uma estrutura não-cristalina sem organização a longa distância que apresentam uma faixa de transformação vítrea, também conhecida como transição vítrea (Figura 2). Esta classe de materiais é composta quimicamente por substâncias que desempenham as mais variadas funções dentro da estrutura do material, como por exemplo a formação da rede, sua modificação, ou substituição na presença de outros agentes (Fagerlund e Hupa, 2016; Kaur et al, 2014; Shelby, 2015).

Figura 2 - Diagrama volume específico/entalpia versus temperatura (T_g representa a temperatura de transição vítrea e T_m a temperatura de fusão).



Os formadores de rede são substâncias que formam a rede vítrea primária, formando ligações com caráter iônico-covalente. As principais substâncias químicas que atuam como formadores de rede são os óxidos encontrados basicamente nos grupos IV e V da tabela periódica. Os três principais óxidos formadores de rede são o SiO_2, B_2O_3 e P_2O_5, no entanto outros óxidos como o GeO_2, Bi_2O_3, As_2O_3, Sb_2O_3, TeO_2,

Al_2O_3, Ga_2O_3 e V_2O_5 podem atuar com formadores de rede em certas circunstâncias (Brauer, 2015; Shelby, 2015).

Os modificadores de rede atuam na redução da conectividade da rede vítrea, quebrando as ligações presentes nessa estrutura e reduzindo a viscosidade do vidro. Estes são cátions com eletronegatividade muito baixa que tem uma tendência a formar ligações iônicas com o oxigênio presente na estrutura, nunca atuando como formadores de rede. São exemplos de modificadores de rede os óxidos alcalinos e alcalino terrosos. (Shelby, 2015; Silva, 2016).

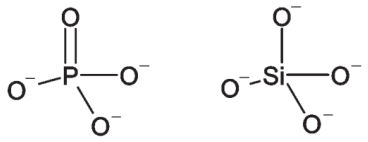
Os intermediários são óxidos que não formam por si só redes vítreas prontamente, porém produzem vidros na presença de grandes quantidades de formadores de rede e modificadores de rede. Os cátions que atuam como intermediários possuem eletronegatividades ligeiramente baixas, formando ligações com caráter levemente mais iônico com o oxigênio e substituindo os cátions formadores de rede. Por apresentarem esse comportamento, são denominados intermediários, pois atuam no meio termo entre formadores e modificadores de rede. São exemplos de intermediários o BeO, Al_2O_3, TiO_2, e o ZrO_2 (Shelby, 2015; Silva, 2016).

3.2.1 Vidros de fosfato

3.2.1.1 Estrutura

Vidros a base de fosfato diferenciam-se consideravelmente dos vidros a base de silicato em vários aspectos. O primeiro deles refere-se à estrutura básica da rede vítrea. A figura 3 mostra a estrutura básica das redes de silicato e de fosfato.

Figura 3 - Ilustração da estrutura tetraédrica básica de silicato e fosfato.



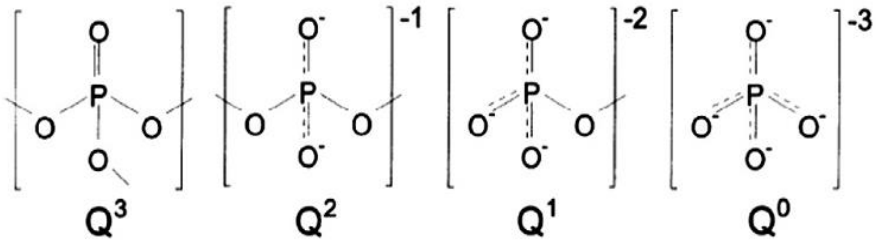
Fonte: Knowles, 2003.

O fósforo, assim como o silício, possui afinidade pelo oxigênio e, como consequência, a presença de fosfatos é comum na natureza. A unidade básica da rede de fosfato é um tetraedro, assim como na unidade básica da rede de silicato. No entanto, a carga do fósforo normalmente é 5+, ao passo que a carga do silício é 4+. Essa diferença faz com que o tetraedro SiO_4 compartilhe todos os átomos de oxigênio para a formação da rede vítrea, levando a uma relação estequiométrica de $SiO_{4/2}$ ou SiO_2, a qual é eletricamente balanceada e estável (Abou Neel et al, 2009; Sharmin e Rudd, 2017).

Em contrapartida, o fósforo somente pode compartilhar três dos quatro átomos de oxigênio disponíveis na estrutura tetraédrica para formar uma estrutura eletricamente balanceada. Este fato leva a uma relação estequiométrica $PO_{(1+3/2)}$ ou P_2O_5. Um dos vértices desse tetraedro é ocupado por um átomo de oxigênio terminal ligado ao fósforo por meio de uma dupla ligação. A presença de pelo menos um oxigênio terminal na estrutura limita a conectividade das redes vítreas de fosfato. Como consequência, a rigidez das redes de fosfato é inferior às redes de silicato (Abou Neel et al, 2009; Sharmin e Rudd, 2017).

A estrutura tetraédrica do fosfato pode ser descrita utilizando a terminologia Q^n, onde *n* representa o número de oxigênios ligantes (BO) presentes na estrutura. A figura 4 ilustra as diferentes estruturas Q^n existentes para o fosfato. O número de oxigênios ligantes na estrutura está relacionado fortemente a adição de modificadores de rede (em especial cátions monovalentes), os quais atuam rompendo as ligações entre as cadeias de fosfato (Sharmin e Rudd, 2017).

Figura 4 - Unidades tetraédricas básicas de fosfato.



Fonte: Fu e Mauro (2013).

De acordo com Fu e Mauro (2013), em fosfato condensados as três principais estruturas presentes nos blocos constituintes da rede de fosfato são Q^1 (unidade terminal), Q^2 (unidade central) e Q^3 (unidade de ramificação).

A estrutura vítrea P_2O_5 consiste somente de unidades estruturais Q^3. Essa estrutura é caracterizada pela presença de ligações covalentes nos três oxigênios presentes nos vértices da estrutura tetraédrica. A medida em que a quantidade de óxidos modificadores aumenta na composição do vidro, ocorre a despolimerização da estrutura Q^3 seguindo a ordem $Q^3 \rightarrow Q^2 \rightarrow Q^1 \rightarrow Q^0$ (Figura 4).

O aumento da quantidade de óxidos modificadores gera um aumento na razão atômica geral de O/P e essa determina o número médio de oxigênios ligantes (BO) por estrutura tetraédrica de fosfato e, consequentemente, fornece uma previsão sobre qual espécie Q^n é dominante na estrutura. A tabela 1 ilustra as principais estruturas de fosfato em função da razão O/P para vidros do sistema binário (Abou Nell et al, 2009; Sharmin e Rudd, 2017).

Ultrafosfatos são estruturas tridimensionais com um alto número de ligações cruzadas entre unidades Q^3 com três oxigênios ligantes (BO) para razões O/P de 2,5. A medida que a quantidade de óxidos modificadores aumenta, a razão O/P tem seu valor acrescido e ocorre a despolimerização da estrutura tridimensional de fosfato em função da redução do número de oxigênios ligantes disponíveis na estrutura. Para razões no intervalo de $3,0 \leq O/P \leq 2,5$ a estrutura de ultrafosfato apresenta unidades Q^3 e Q^2 predominantes (Sharmin e Rudd, 2017).

Estruturas de metafosfato são compostas por unidades Q^2 com dois oxigênios ligantes no tetraedro PO_4^{3-}. Nesse tipo de estrutura a razão O/P é igual a 3,0 e é

usualmente composta por longas cadeias e/ou anéis. Estruturas com razão O/P superior a 3,0 são denominadas de polifosfato e apresentam suas cadeias baseadas em unidades Q^2 com unidades Q^1 em suas extremidades (Sharmin e Rudd, 2017).

Tabela 1 - Classificação das estruturas de fosfato em função da razão O/P e da composição (*v* representa a valência do cátion e *x* a composição molar).

Razão O/P	Composição	Estrutura	Características
$3{,}0 \leq O/P \leq 2{,}5$	$(M_{2/v}O)_x(P_2O_5)_{1-x}$ $0 \leq x \leq 0{,}5$	Ultrafosfato	Unidades Q^2 e Q^3 predominantes
$O/P = 3$	$(M_{2/v}O)_{0,5}(P_2O_5)_{0,5}$	Metafosfato	Unidades Q^2 formando longas cadeias e/ou anéis
$O/P > 3$	$(M_{2/v}O)_x(P_2O_5)_{1-x}$ $x > 0{,}5$	Polifosfato	Cadeias compostas por unidades Q^2 com unidades terminais Q^1
			$O/P = 3{,}5$ - Dímeros com duas unidades Q^1 compartilhando 1 BO (Pirofosfato)
			$O/P = 4{,}0$ - Unidades Q^0 isoladas somente (Ortofosfato)

Fonte: Abou Nell et al, 2009; Brow, 2000; Sharmin e Rudd, 2017 (adaptado).

Polifosfatos com razão O/P igual a 3,5 são denominados de pirofosfatos e são caracterizados pela predominância de unidades Q^1 compartilhando 1 oxigênio ligante formando dímeros. Estruturas de polifosfato com razão O/P igual a 4 são denominadas de ortofosfatos e tem como sua principal característica a predominância de unidades Q^0 sem a presença de oxigênios ligantes (Sharmin e Rudd, 2017).

3.2.1.2 Modificadores de rede

Os dois modificadores de rede mais comumente usados são o Na_2O e o CaO. Em redes de fosfato a adição de modificadores de rede aumenta sua durabilidade, pois o pentóxido de fósforo é instável sob condições atmosféricas, sofrendo hidrólise da ligação P-O-P. O uso de modificadores melhora a estabilidade devido às ligações $P\text{-}O\text{-}M^+$ serem mais estáveis (Abou Neel et al, 2009).

O sódio é o principal cátion presente no fluido extracelular, sendo responsável pela regulação do volume de plasma, manutenção da pressão osmótica e transmissão de impulsos nervosos. Já o cálcio está presente na fase mineral dos ossos e dentes, atua na regulação de nervos e ativação de enzimas (Kaur et al, 2014).

Na rede vítrea o sódio atua rompendo as ligações presentes na estrutura vítrea tridimensional de fosfato puro, produzindo um número maior de oxigênios não-ligantes (NBO) e alterando a configuração da estrutura para a forma de longas cadeias e/ou anéis. Cátion divalentes (como por exemplo o cálcio) também possuem o potencial de causar disruptura na rede vítrea, no entanto, por possuírem carga 2+, permitem a formação de ligações cruzadas (*crosslink*) entre cadeias de fosfato, aumentando a rigidez da estrutura (Sharmin et al, 2016; Waclawska e Szumera, 2006).

Ademais, a adição de Na_2O e CaO reduz a temperatura de fusão dos vidros, e reduz sua viscosidade, facilitando seu processamento. No entanto, a adição de modificadores pode reduzir a temperatura de cristalização do material, aumentando sua tendência a cristalização, o que reduz sua bioatividade (Xia, Zhang e Chang, 2007).

Além dos óxidos de cálcio e sódio, outros óxidos vêm sendo estudados para a incorporação em vidros de fosfato. O óxido de potássio (K_2O) apresenta uma série de vantagens quando comparado com o óxido de sódio. No que tange às propriedades térmicas, a adição de K_2O aumenta a temperatura de cristalização dos vidros quando comparado ao Na_2O. Isso faz que tais vidros possam ser trabalhados a temperaturas menores evitando sua cristalização (Rabiee et al, 2015).

A substituição do óxido de sódio pelo óxido de potássio causa um aumento na disruptura da rede em função do raio iônico do potássio ser maior que o do sódio.

Ademais, por possuir massa atômica maior, os valores de densidade e microdureza Vickers apresentam um incremento (Rabiee et al, 2015).

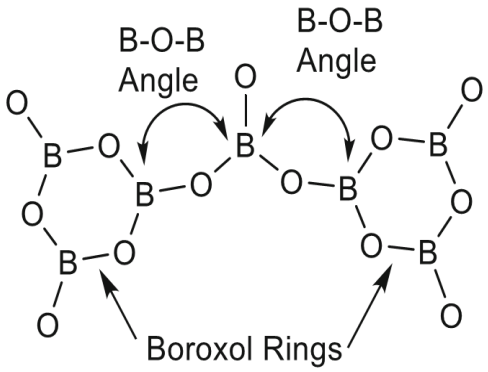
Em contrapartida, a adição de K_2O pode prejudicar a formação da camada bioativa de hidroxiapatita (Kim et al, 2012; Salman, Salama e Abo-Mosallam, 2015). No entanto, vidros dos sistemas P_2O_5-CaO-K_2O, P_2O_5-CaO-K_2O-Na_2O e SiO_2-CaO-K_2O apresentam bioatividades aceitáveis (Rabiee et al, 2015; Zia et al, 2018).

3.2.1.3 Redes de borofosfato

Alguns vidros de fosfato podem apresentar em sua composição outros óxidos formadores de rede ou óxidos intermediários. Dentre esses óxidos, destaca-se o trióxido de diboro (B_2O_3), também chamado de óxido de boro.

O boro é um elemento químico que influencia na performance no metabolismo de uma série de enzimas. A deficiência de boro está associada a problemas no crescimento e desenvolvimento ósseo (Balasubramanian et al, 2018). O cátion boro possui carga 3+, permitindo a formação de ligações cruzadas e anéis boroxol (Figura 5). Quando adicionado às redes de fosfato, o B_2O_3 pode formar dois tipos de estrutura: tetraédrica e trigonal.

Figura 5 - Anéis boroxol da rede vítrea de boro.



Fonte: Balasubramanian et al, 2018.

A estrutura tetraédrica (BO_4) é predominante em vidros de borofosfato quando a quantidade de óxidos modificadores é grande (Hasan, Werner-Zwanziger e Boyd, 2015). Nesse caso o óxido de boro torna-se parte da rede vítrea formando ligações P-O-B entre as cadeias, as quais aumentam a durabilidade do material. Nessas condições, a adição de óxido de boro tem também como efeito a redução do número de oxigênio não-ligantes (NBO), acarretando no aumento da temperatura de transição vítrea do material (Gao, Tan, Wang, 2004; Sharmin et al, 2016).

Em contrapartida, em vidros com grandes quantidades de B_2O_3, a estrutura trigonal é predominante, podendo causar a destruição da rede de fosfato e reduzindo a durabilidade do material. Tal fato faz com que as redes vítreas de boro apresentem como principal característica uma durabilidade inferior às redes de fosfato (Gao, Tan, Wang, 2004).

A adição de boro em pequenas quantidades proporciona um aumento na estabilidade térmica e mecânica das redes de fosfato, reduzindo a tendência a cristalização e aumentando seu módulo de elasticidade e dureza (Hidi et al, 2013).

Em termos de bioatividade, Saranti, Koutselas e Karakassides (2006) reportam que a adição de B_2O_3 em redes vítreas de P_2O_5-CaO tem um efeito catalítico na formação da camada bioativa em materiais que até então eram bioinertes. Durand et al (2015) reportam que a presença de 2% wt de B_2O_3 no biovidro 45S5 produz efeito osteogênico e angiogênico. Em contrapartida, Lopes et al (2011) reportam que em vidros de boro com 24,5% mol de B_2O_3 ocorre a inibição da proliferação celular em função da alta taxa de degradação do material.

3.2.1.4 Solubilidade

A solubilidade dos vidros de fosfato é uma de suas principais características. Essa propriedade faz que o uso desses materiais vá além da regeneração do tecido ósseo, sendo utilizado na liberação terapêutica de íons. A solubilidade desses vidros pode ser controlada a partir de sua composição (Lakhkar et al, 2013).

A perda de massa dos vidros de fosfato apresenta um comportamento linear ao longo do tempo para uma ampla faixa de composições. A adição de certos

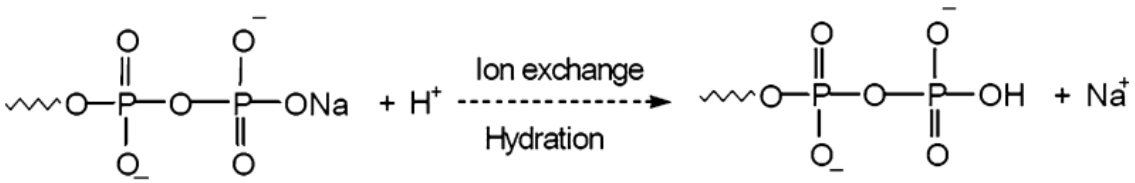
modificadores tem como o efeito o aumento ou a redução da solubilidade desses materiais (Lakhkar et al, 2013). Além da composição, outros fatores influenciam na dissolução desses vidros, tais como o pH do meio, temperatura, área superficial por volume de solução e histórico térmico do material (Sharmin e Rudd, 2017).

As redes de fosfato sofrem decomposição em meios aquosos basicamente por três mecanismos: reações ácido/base, hidratação e hidrólise. Delahaye et al (1998) reportam reações de decomposição ácida das cadeias de fosfato em pH=3,0 através da fragmentação de camadas externas sem que ocorra hidrólise.

As reações de hidratação (Figura 6) são caracterizadas pela troca iônica entre íons H_3O^+ e íons com alta mobilidade (Na^+ e K^+, por exemplo). Como resultado dessa troca iônica, ocorre a formação de uma camada hidratada na superfície do vidro na interface vidro-meio aquoso (Gao, Tan, Wang, 2004; Sharmin e Rudd, 2017).

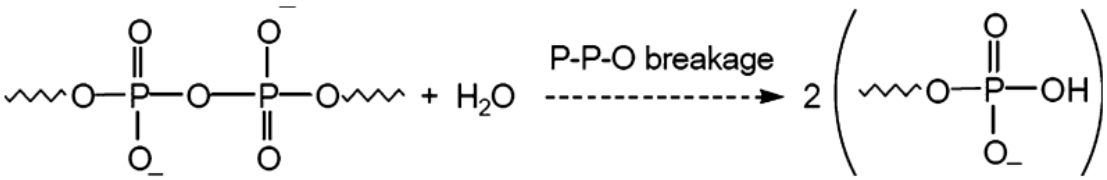
As reações de hidrólise (Figura 7) ocorrem através da camada hidratada presente na superfície do material, resultando no rompimento das ligações P-O-P. Como consequência, ocorre a quebra da rede de fosfato e cadeias com diferentes tamanhos são liberadas na solução. Essa etapa é fortemente dependente do pH, sendo catalisadas em meios ácidos (Gao, Tan, Wang, 2004; Sharmin e Rudd, 2017).

Figura 6 - Reação de hidratação em cadeias de fosfato.



Fonte: Sharmin e Rudd, 2017.

Figura 7 - Reação de hidrólise em cadeias de fosfato.



Fonte: Sharmin e Rudd, 2017.

A carga, tamanho e campo elétrico dos cátions afetam fortemente a durabilidade dos vidros a base de fosfato. O acréscimo na composição de CaO tem como efeito a redução da solubilidade dos vidros de fosfato. Por possuir carga 2+, os íons cálcio tem o potencial de formar ligações cruzadas entre as cadeias da rede vítrea, aumentando sua rigidez (Ahmed et al, 2004). Em contrapartida, o aumento da composição de K_2O tem com efeito o aumento da biodegradabilidade do vidro, pois o íon K^+ possuir raio iônico maior e energia de ionização menor que o de outros metais alcalinos (por exemplo o Na^+ e Li^+). Tais fatores fazem com que a estrutura vítrea tenha um maior grau de disruptura, enfraquecendo a estrutura e aumentando sua solubilidade, consequentemente (Kim et al, 2012).

O aumento da concentração de P_2O_5 tende a causar uma redução da durabilidade dos vidros de fosfato, pois a rede P_2O_5 pura, formada por unidades tridimensionais Q^3, é instável e altamente higroscópica, sofrendo quebra por hidrólise. Enquanto que a adição de óxidos modificadores gera um aumento na durabilidade em função da ligação P-O-M ser mais estável que a ligação P-O-P.

A presença de óxido de boro na rede de fosfato pode ter diferentes efeitos na solubilidade. Em grandes quantidades, o óxido de boro pode causar um alto grau de disruptura na rede de fosfato, tornando a estrutura menos rígida e mais solúvel em meios aquosos. No entanto, quando em concentrações menores, a incorporação de B_2O_3 permite a formação de ligações P-O-B entre as cadeias de fosfato, aumentando sua conectividade e diminuindo sua solubilidade (Gao, Tan, Wang, 2004; Sharmin et al, 2016).

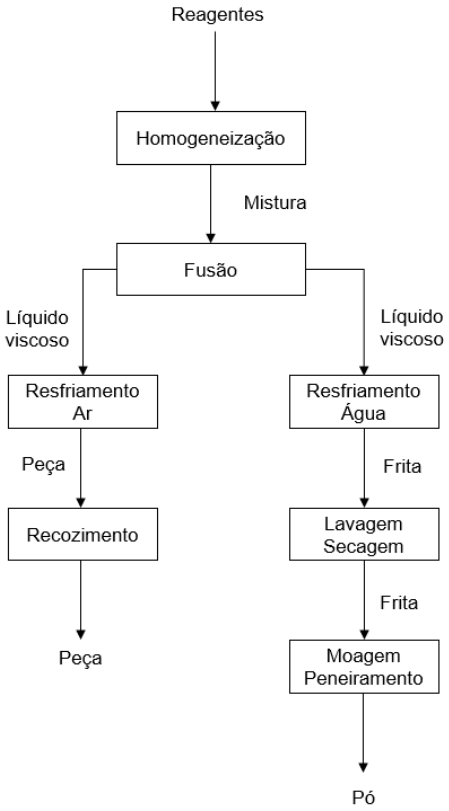
3.3 ROTAS DE PRODUÇÃO DE VIDROS

3.3.1 Fusão

O método mais comum para a produção de biovidros é a fusão seguida de têmpera (*melt-quench*). O fluxograma de produção de vidros por fusão é ilustrado na figura 8. Nessa rota, os reagentes são compostos pelos formadores, intermediários

ou modificadores de rede, podendo ser utilizados na sua forma de óxido ou reagentes precursores (por exemplo carbonatos).

Figura 8 - Etapas do processo de fusão de vidros.



Após a pesagem das quantidades estequiométricas, os reagentes devem ser misturados em moinho de bolas ou em gral e pistilo. O pó obtido após a mistura deve ser homogêneo para evitar variações de composição dentro do vidro, sendo, então, fundido em altas temperaturas em um forno de alta resistência (Kaur et al, 2014).

O líquido viscoso obtido após a fusão pode ser resfriado de duas maneiras: em ar ou em água. No resfriamento a ar, o vidro fundido é vazado em um molde metálico (geralmente cobre) previamente aquecido. Nesse tipo de resfriamento faz-se necessário o recozimento do vidro em temperaturas acima da temperatura de transição vítrea do material para que ocorra o alívio das tensões internas do vidro. O material obtido apresenta a forma geométrica do molde.

No resfriamento em água, o líquido viscoso é vazado em um recipiente metálico contendo água. A taxa de resfriamento maior faz com que o vidro fragmente-se em função das tensões internas, gerando um particulado final denominado *frita*. A frita é posteriormente lavada, secada e passa por processamento (moagem e peneiramento) para a obtenção do vidro na forma de pó.

Vidros de fosfato apresentam temperaturas de fusão inferiores a de vidros de silicato. A adição de modificadores de rede tem como efeito a redução da temperatura de fusão dos vidros e a redução de sua viscosidade. Além disso, alguns modificadores podem evitar a cristalização de vidros de fosfato, permitindo uma maior faixa de trabalho (Kaur et al, 2014; Vallet-Regi, 2001).

Os vidros produzidos por fusão apresentam propriedades mecânicas superiores a de vidros produzidos pela técnica sol-gel. No entanto, em termos de propriedades superficiais, esses materiais quando fabricados por fusão apresentam área superficial específica e porosidade inferior ao dos obtidos pela rota sol-gel (Kaur et al, 2014).

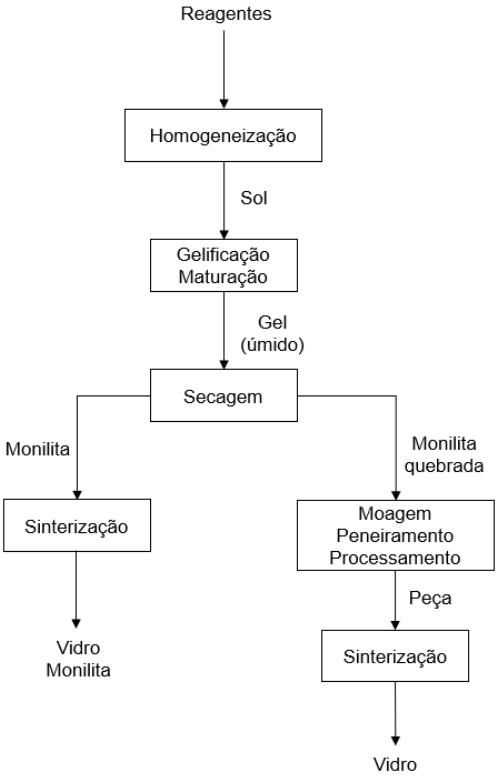
3.3.2 Sol-gel

O método sol-gel de produção de cerâmicos permite a formação de vidros bioativos com alta pureza e homogeneidade. Esse método ainda permite a produção de vidros em uma grande faixa de composições quando comparado a técnica de fusão. A figura 9 apresenta o fluxograma de produção de vidros pela rota sol-gel.

Essa rota é baseada na formação inicial de uma solução coloidal denominada sol, onde as partículas coloidais estão dispersas em um líquido, seguida da sua transformação em um sistema gel, devido a capacidade de ligação entre as unidades coloidais que formam uma rede tridimensional e aprisiona o líquido em seus interstícios. O processo envolve a polimerização de materiais inorgânicos pela reação com um precursor organometálico. A polimerização dos reagentes ocorre através de reações de gelificação e maturação. O gel obtido deve ser passar por secagem para a remoção do líquido entre os poros da rede, formando uma estrutura chamada de monolita (Kaur et al, 2014; Juhasz e Best, 2012).

A monolita formada pode ser diretamente sinterizada ou pode passar por um processamento para a formação de uma peça cerâmica. Os vidros produzidos por sol-gel apresentam área superficial específica, porosidade e interconectividade dos poros superior aos vidros produzidos por fusão. Em contrapartida, as propriedades mecânicas dos vidros produzidos por essa técnica são inferiores a dos produzidos por fusão, tendo sua aplicação limitada a locais com aplicação de carga reduzida (Kaur et al, 2014; Juhasz e Best, 2012; Vallet-Regi, 2001).

Figura 9 - Fluxograma de produção de vidros pelo método sol-gel.



3.4 BIOATIVIDADE

3.4.1 Ensaios in vitro

O potencial bioativo de um biomaterial é determinado a partir da formação de uma camada biologicamente ativa de hidroxiapatita quando em contato com tecidos

vivos, ligando-se quimicamente ao tecido ósseo. No entanto, em função dos problemas éticos vinculados ao uso de testes *in vivo*, a avaliação da bioatividade deve ser realizada primeiramente *in vitro* (Siqueira e Zanotto, 2011).

A formação da camada de hidroxiapatita na superfície do material em soluções fisiológicas sintéticas acelulares apresenta uma relação com a sua ligação ao tecido ósseo *in vivo*.

Alguns testes de bioatividade *in vitro* foram desenvolvidos ao longo das últimas décadas com o propósito de avaliar a formação da camada de hidroxiapatita. No entanto, o método de imersão mais bem aceito e validado foi proposto por Kokubo e colaboradores. Em 1990, esses autores desenvolveram uma solução sintética acelular com concentração de íons semelhante ao do plasma sanguíneo humano, tabela 2, capaz de induzir mudanças superficiais em materiais que possibilitam prever a bioatividade encontrada *in vivo*. Tal solução recebe o nome de *Simulated Body Fluid*, sendo representada pela sigla SBF (Kokubo e Takadama, 2006).

Tabela 2 - Concentração nominal de íons nas soluções de SBF's propostas em comparação com as do plasma sanguíneo humano.

Íon	Concentração dos íons (mmol L^{-1})				
	Plasma sanguíneo	SBF original	SBF corrigida (ISO 23317: 2007)	SBF revisada	SBF melhorada
Na^+	142,0	142,0	142,0	142,0	142,0
K^+	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Mg^{2+}	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Ca^{2+}	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Cl^-	103,0	148,8	147,8	103,0	103,0
HCO_3^-	27,0	4,2	4,2	27,0	4,2
HPO_4^{2-}	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
SO_4^{2-}	0,5	-	0,5	0,5	0,5

Fonte: Kokubo e Takadama, 2006

A primeira solução de SBF foi corrigida em relação a concentração de íons Cl^- e SO_4^{2-}. Outras mudanças na composição foram propostas, conforme pode ser visualizado na tabela 2. As versões original e corrigida utilizam como tampão o TRIS (tris(hidroximetil)aminometano) ao passo que a revisada e a melhorada utilizam o tampão HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazino-N'-2-etanossulfônico). O pH da solução de SBF é igual a 7,40, dentro da faixa de pH (7,20-7,40) prevista para o plasma sanguíneo (Siqueira e Zanotto, 2011; Kokubo e Takadama, 2006).

Após a realização de ensaios de verificação em 10 institutos de pesquisa, em 2007 a solução corrigida de SBF foi validada e aprovada pela Organização Internacional de Normalização (ISO 23317: 2007) como solução indicada para avaliar a capacidade de formação *in vitro* da camada hidroxiapatita na superfície de materiais destinados a implantes (Siqueira e Zanotto, 2011).

3.4.2 Mecanismo de formação da camada de hidroxiapatita

O mecanismo de formação da camada de hidroxiapatita em vidros bioativos do sistema $SiO_2-CaO-Na_2O-P_2O_5$ é bem descrito na literatura (Baino, 2018; Kaur et al, 2014; Siqueira e Zanotto, 2011; Jones, 2013). O mecanismo é dividido em 5 estágios:

1° estágio: Rápida troca iônica dos íons Ca^{2+} e Na^+ da superfície do vidro por íons H^+ da solução, formando uma camada de grupos silanol (Si-OH) e aumentando o pH da solução. Esse estágio é geralmente controlado por difusão.

$$Si - O - Na^+ + H^+ + OH^- \rightarrow Si - OH + Na^+ + OH^-$$

2° estágio: Liberação da sílica solúvel do material para a solução na forma de $Si(OH)_4$, resultado da quebra das ligações Si-O-Si (siloxano) e formação de novos grupos silanol.

$$Si - O - Si + H_2O \rightarrow Si - OH + Si - OH$$

3° estágio: Policondensação e polimerização dos grupos silanol presentes na superfície formando uma camada porosa de sílica gel sem a presença de cátions alcalinos e alcalino-terrosos.

$$-Si - OH + OH - Si- \rightarrow -Si - O - Si- + H_2O$$

4º estágio: Migração de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} para a superfície da camada de sílica gel, o que conduz a formação de um fino filme amorfo rico em fosfato de cálcio, CaO-P_2O_5, seguido do seu crescimento pela incorporação de mais cálcio e fosfatos solúveis da solução.

5° estágio: Cristalização do filme amorfo de CaO-P_2O_5 pela incorporação de íons OH^- e CO_3^{2-}, formando a camada de hidroxiapatita.

Os vidros de borofosfato apresentam mecanismos de degradação descritos por reações de hidratação/troca iônica e hidrólise (Sharmin e Rudd, 2017). Em vidros de fosfato, borato e borofosfato a dissolução da rede vítrea libera espécies químicas para o meio externo (cátions e porções da rede vítrea), ao passo que ocorre a precipitação de fosfatos de cálcio na superfície simultaneamente. A troca iônica decorrente dessas reações influencia diretamente no pH da solução, o qual afeta a nucleação e cristalização da HA. (Abou Neel, Salih e Knowles, 2017).

A taxa de dissolução do material é um fator importante, pois altas taxas de dissolução fazem com que a aderência de camadas biologicamente ativas de apatitas e células ósseas sejam prejudicadas (Balasubramanian et al, 2018). A dissolução dos vidros de borofosfato pode ser controlada a partir de sua composição, no entanto, outros fatores podem influênciar a solubilização do material como a história térmica do material, meio de imersão e condições ambientais por exemplo (Abou Neel, Salih e Knowles, 2017).

Em vidros de fosfato e borofosfato a ausência do silício impede o desenvolvimento da camada porosa de sílica gel. No entanto, Knowles (2003) reporta que o mecanismo para a formação da camada de hidroxiapatita é semelhante ao de vidros do sistema SiO_2−CaO−Na_2O−P_2O_5.

3.4.3 Fosfatos de cálcio

A matriz óssea apresenta constituintes orgânicos e inorgânicos. A porção orgânica, que corresponde a cerca de 35% do peso do osso humano seco, é predominantemente constituída de colágeno do tipo I (80 a 90% da composição orgânica) sob a forma de grandes fibrilas (50 a 70 nm de diâmetro) com periodicidade

de 67 nm. O colágeno tipo I presente no tecido ósseo apresenta uma grande quantidade de ligações cruzadas, o que impede sua extração com facilidade (Gartner, 2017).

A porção inorgânica corresponde a cerca de 65% do peso do osso humano seco, sendo composta principalmente por cálcio e fósforo sob a forma de cristais de hidroxiapatita (40 nm de comprimento por 25 nm de largura e 1,5 a 3 nm de espessura) dispostos de maneira ordenada ao longo das fibras de colágeno tipo I. No entanto o fosfato de cálcio também está presente na sua forma amorfa (Gartner, 2017).

A hidroxiapatita (HA) é um tipo de fosfato de cálcio presente nos ossos e dentes cuja fórmula química é $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. A formação da camada de hidroxiapatita na superfície de materiais imersos em SBF configura-lhes o aspecto bioativo.

O mecanismo de formação da hidroxiapatita ocorre a partir da cristalização de uma camada amorfa de $CaO\text{-}P_2O_5$ pela incorporação de íons hidroxila e carbonato da solução (Baino, 2018; Jones, 2013; Siqueira e Zanotto, 2011). A identificação do tipo de fosfato de cálcio presente na superfície dos materiais pode ser realizada por diferentes técnicas.

A identificação do tipo de fosfato de cálcio pode ser realizada através da sua razão Ca/P realizada por EDS. Na tabela 3 são expostos os diferentes tipos de fosfato de cálcio e suas respectivas razões Ca/P. A hidroxiapatita é caracterizada pela razão Ca/P igual a 1,67. Ademais, a razão Ca/P também é importante para a avaliação da solubilidade desses compostos, pois quanto maior for a razão Ca/P, menor será a solubilidade do fosfato de cálcio (Gomes et al, 2012; Masson et al, 2016).

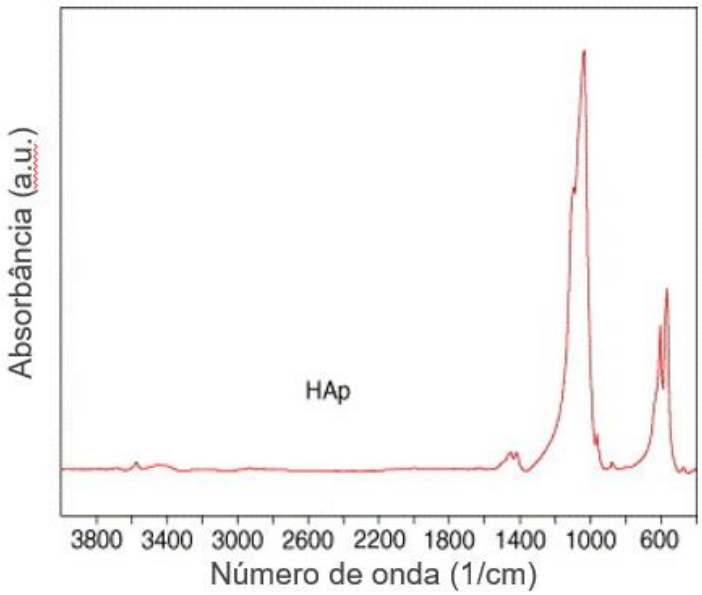
A identificação da camada de hidroxiapatita em vidros após a imersão pode ser realizada por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A figura 10 apresenta o espectro da HA na faixa de 400-4000 cm^{-1}. As bandas de absorção do fosfato encontram-se próximas a 1091, 1027, 960, 609, 561 e 469 cm^{-1} (Ciobanu e Harja, 2019; Latocha et al, 20118; Neamtu et al, 2017) e as bandas de absorção do carbonato encontram-se aproximadamente em 1450, 1415 e 870 cm^{-1} (Slosarczyka, Paszkiewicza e Paluszkiewicz, 2005; Wang et al, 2010).

Tabela 3 - Fosfatos de cálcio arranjados em função da razão Ca/P.

Nome	Abreviatura	Ca/P
Fosfato tetracálcico	TeCP	2,0
Hidroxiapatita	HAp	1,67
Fosfato de cálcio amorfo	ACP	-
Fosfato tricálcico (α, β, γ)	TCP	1,50
Fosfato octacálcico	OCP	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado (brushite)	DCPD	1,0
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (monetite)	DCP	1,0
Pirofosfato de cálcio (α, β, γ)	CPP	1,0
Pirofosfato de cálcio di-hidratado	CPPD	1,0
Fosfato heptacálcico	HCP	0,7
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico	TDHP	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado	MCPM	0,5
Metafosfato de cálcio (α, β, γ)	CMP	0,5

Fonte: Masson et al, 2016 (adaptado).

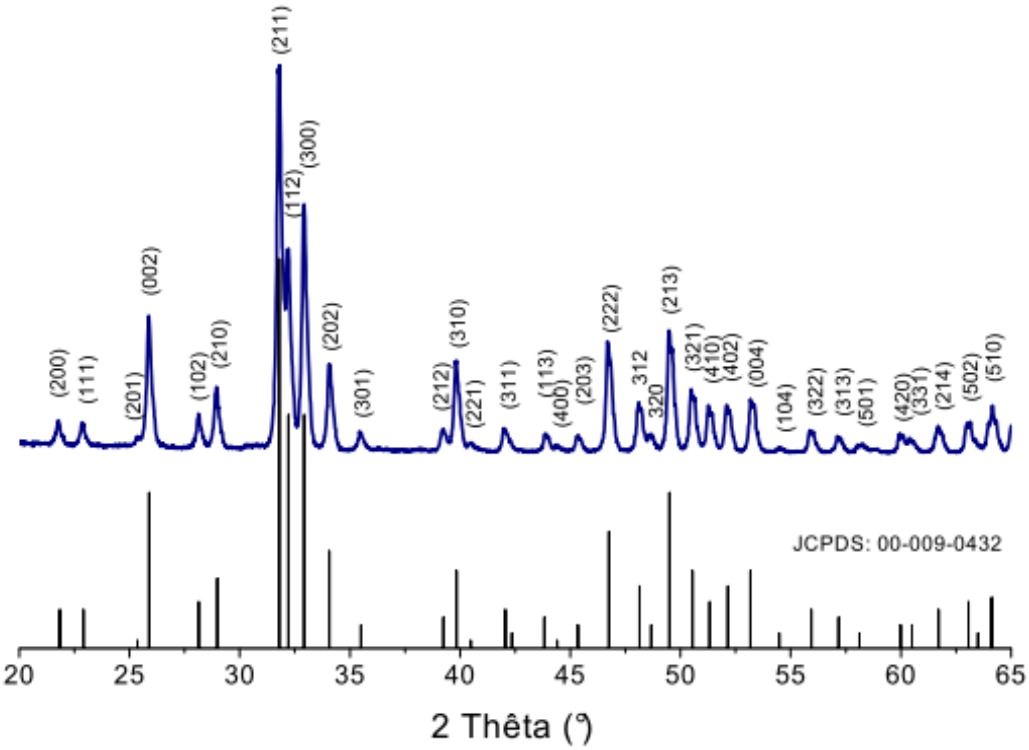
Figura 10 - Espectro FTIR da hidroxiapatita em pó.



Fonte: Slosarczyka, Paszkiewicza e Paluszkiewicz, 2005 (traduzido).

Outra maneira de identificar a formação de HA na superfície de vidros imersos em SBF é através da análise da estrutura cristalina por meio de difração de raios X. O difratograma da hidroxiapatita (PDF# 09-0432) é apresentado na figura 11. Os picos de difração (002) e (211), centrados em 2θ igual a 26 e 32° respectivamente, são característicos da hidroxiapatita e amplamente utilizados por vários autores na sua identificação (Ciobanu e Harja, 2018; Latocha et al, 2018; Lopes et al, 2011).

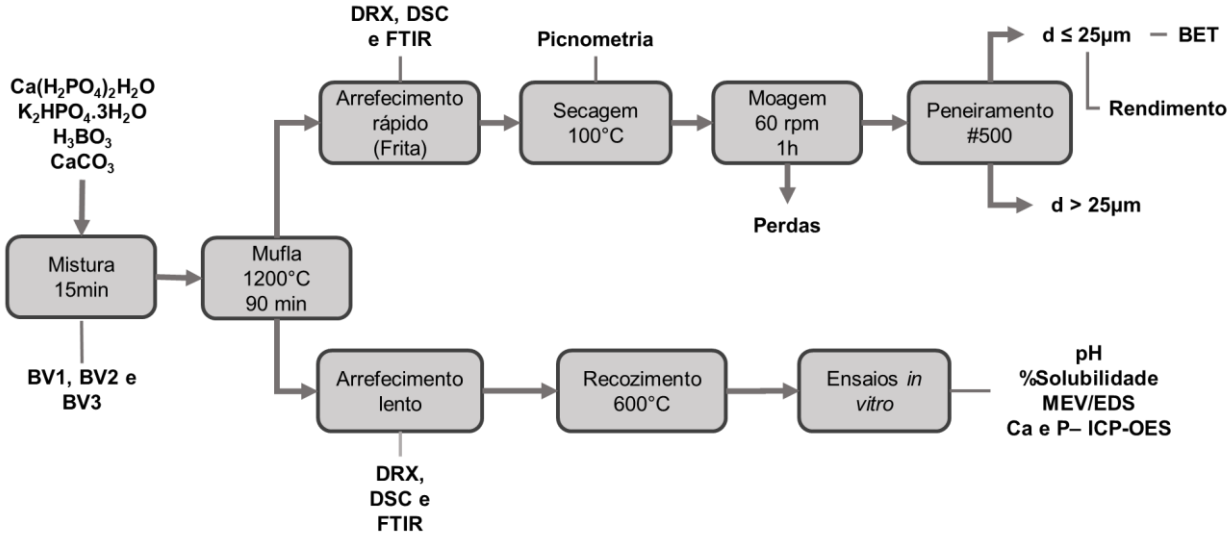
Figura 11 - Difratograma padrão da hidroxiapatita (JCPDS n. 09-0432).



4 METODOLOGIA

O fluxograma com todos os processos realizados na metodologia desse estudo encontra-se exposto na figura 12. Nos próximos tópicos descrevem-se todas as etapas experimentais deste trabalho.

Figura 12 - Fluxograma do processo experimental de produção, caracterização e avaliação do potencial bioativo dos vidros de borofosfato analisados.



4.1 REAGENTES

Nesse estudo utilizou-se os reagentes cloreto de sódio (marca Alphatec, pureza ≥ 99,5%), bicarbonato de sódio (marca Neon, pureza≥99,5%), cloreto de potássio (marca Alphatec, pureza ≥ 99,5%), mono-hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (marca Alphatec, pureza ≥ 99,0%), cloreto de magnésio hexa-hidratado (marca Alphatec, pureza ≥ 98,0%), cloreto de cálcio (marca Alphatec, pureza ≥ 95,0%), sulfato de sódio (marca Alphatec, pureza ≥ 99,0%), Tris(hidroximetil)aminometano-TRIS (marca Biotecnologia, pureza ≥ 99,0%) e ácido clorídrico 1,0 M para o preparo da solução de SBF.

Para o preparo do vidro, os seguintes reagentes foram utilizados: di-hidrogenofosfato de cálcio mono-hidratado (marca Vetec, pureza≥85%), mono-

hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado (marca Alphatec, pureza≥98,0%), ácido bórico (marca Alphatec, pureza ≥ 99,5%) e carbonato de cálcio (marca Alphatec, pureza ≥ 99,0%).

4.2 PRODUÇÃO DOS VIDROS

4.2.1 Fusão

Os cerâmicos produzidos neste estudo foram preparados por meio da mistura dos reagentes em gral de porcelana por 15 minutos. A quantidade total de reagentes utilizada foi de 20 gramas por síntese. A composição dos vidros é exposta na tabela 4. Após realizada a homogeneização, a mistura sólida foi transferida a um cadinho de porcelana de 100 mL e, posteriormente, foram fundidas em mufla (marca Magnu's modelo 01.09) por 90 minutos a 1200°C e com uma taxa de aquecimento de 10°C/min. Os cadinhos de porcelana utilizados foram descartados, para evitar contaminação de sílica e alumina (presentes na porcelana) e em função da formação de trincas após o processo de fusão devido a contração dos resquícios de vidro após o resfriamento.

Tabela 4 - Composição dos vidros de borofosfato (em %mol).

Vidro	CaO	P_2O_5	K_2O	B_2O_3	Ca/P
BV1	23,9	37,2	26,6	12,3	0,6
BV2	34,0	33,4	20,8	11,8	1,0
BV3	43,3	29,9	15,4	11,4	1,4

O vidro BV1 apresenta maior teor dos óxidos P_2O_5, K_2O e B_2O_3 e menor teor de CaO e razão Ca/P. A partir da composição do vidro BV1, modificações foram realizadas na sua composição (aumento do CaO e redução do P_2O_5, K_2O e B_2O_3) para obter vidros com razões Ca/P maiores e mais próximas a da hidroxiapatita (Ca/P=1,67). Com essas modificações, espera-se que os vidros BV2 e BV3 apresentem diferenças nas suas solubilidades e bioatividades quando comparado com o vidro BV1.

O resfriamento ao ar foi realizado vertendo os vidros fundidos em uma placa de aço, arrefecidos lentamente até entrarem em equilíbrio térmico com o ambiente externo. Em seguida, as placas de vidro obtidas foram recozidas em forno a 600°C por 1h com taxa de aquecimento de 10°C/min. Os vidros recozidos foram resfriados lentamente dentro do forno até entrarem em equilíbrio térmico com o ambiente externo.

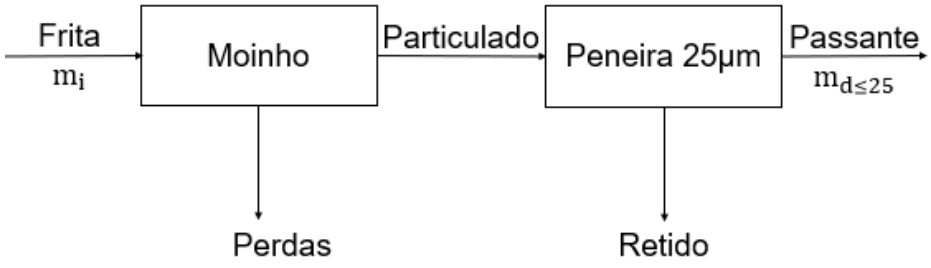
4.2.2 Moagem

As fritas obtidas dos vidros BV1, BV2 e BV3 foram moídas a seco em moinho de bolas de alumina (marca Marconi modelo MA500) sob rotação de 60 rpm por 60 minutos para a obtenção de um particulado com diâmetro menor ou igual a 25 µm.

Após a moagem, o particulado obtido foi separado em peneira (marca A Bronzinox modelo INOX 8X2 500TY) com abertura de 25 µm e calculou-se o rendimento das moagens ($\%R$) por meio da equação 1, onde $m_{d\leq 25}$ e m_i são, respectivamente, as massas de amostra que passaram pela peneira de 25 µm e a massa inicial de vidro. A figura 13 ilustra o procedimento de moagem.

$$\% \, R = 100 \left(\frac{m_{d\leq 25}}{m_i} \right) \tag{1}$$

Figura 13 - Etapas de moagem e peneiramento.



4.3 ANÁLISE ESTRUTURAL

A estrutura dos cerâmicos desenvolvidos foi analisada por meio de difração de raios X (DRX), infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Para verificar o tipo de estrutura cristalina presente nos materiais desenvolvidos, utilizou-se o DRX (marca Rigaku modelo Miniflex 300) com radiação de CuKα monocromática com fonte de energia de 30kV e 10 mA, na faixa 2θ de 5° a 65° e com resolução de 0,03°.

O DSC (marca Shimadzu modelo DSC-60 Plus) foi realizado a uma taxa de aquecimento de 10°C/min até 600°C para avaliar o comportamento térmico dos vidros produzidos.

Já o FT-IR (marca Shimadzu modelo IRPrestige-21) foi executado utilizando pastilha de KBr (brometo de potássio) no intervalo de 400 – 3900 cm^{-1}, com varredura de 45 *scans* e resolução de 2 cm^{-1}, para identificar as ligações presentes na estrutura dos materiais produzidos. As pastilhas foram prensadas por 15 minutos a 80KN sob vácuo. Após a prensagem, essas foram secas em estufa a 120ºC por 30 minutos e transferidas para um dessecador com o objetivo de reduzir a quantidade de umidade absorvida.

4.4 PROPRIEDADES FÍSICAS.

4.4.1 Densidade

A densidade dos vidros foi determinada por meio de picnometria gasosa (marca Quantachrome Instruments modelo ULTRAPYC 1200) com gás hélio. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando a ferramenta ANOVA com fator único e a comparação entre os grupos foi realizado por teste de Tukey considerando significativas as diferenças estatísticas com $p \leq 0{,}05$.

4.4.2 Propriedades Superficiais

Análises de área superficial específica BET (Brunauer-Emmett-Teller), volume, tamanho e distribuição dos poros BJH (Barrett-Joyner-Halenda) foram realizadas por fisissorção estática de nitrogênio gasoso (5.0 analítico), em um aparelho ASAP 2020 Surface Area and Porosity Analyser da marca Micromeritics com os vidros previamente cominuídos (d≤25 μm). As isotermas foram obtidas a temperatura de -195,85 °C e os cálculos foram feitos automaticamente pelo software ASAP 2020. Todas as amostras analisadas possuem o mesmo preparo e *degas*. Essas condições são sumarizadas na tabela 5.

Tabela 5 - Condições operacionais de preparo e *degas* das amostras submetidas à fisissorção estática de nitrogênio gasoso.

Etapa		Condições
Preparo		Método: secagem Temperatura: 120ºC Tempo: 24h
Degas	Evacuação	Rampa: 10ºC/min *Target temperature*: 30ºC Taxa de evacuação: 1,0 mmHg/s *Vacuum set point*: 15µmHg *Hold pressure*: 100 mmHg Tempo: 60 min
	Aquecimento	Rampa: 10ºC/min *Hold pressure*: 100 mmHg *Hold temperature*: 150ºC Tempo → ∞

4.5 ENSAIOS IN VITRO

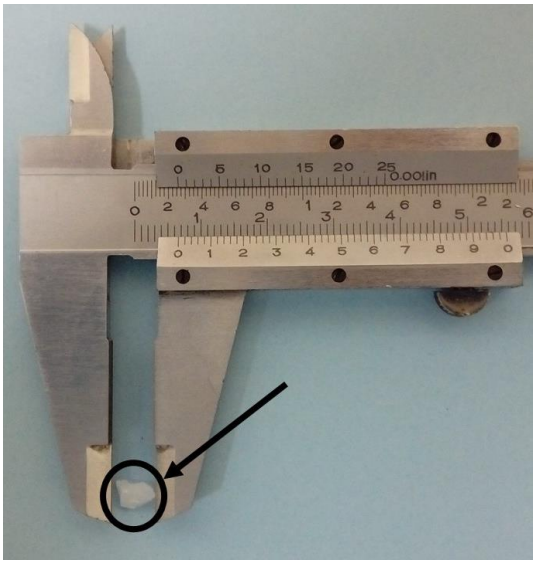
Os ensaios de imersão em SBF foram realizados nos períodos 7, 14, 21 e 28 dias em triplicata sob temperatura de 37°C ± 1°C em tubos de polietileno de 15 mL. A solução fisiológica sintética foi preparada de acordo com a metodologia proposta por Kokubo e Takadama (2006) com concentração de íons muito próxima a do plasma humano, conforme foi exposto na tabela 2. O SBF com composição corrigida foi o utilizado, pois este é o meio validado e aprovado pela ISO 23317: 2007, havendo um

consenso que a bioatividade de um material *in vivo* pode ser prevista através da sua imersão nesta solução de SBF.

As amostras utilizadas no ensaio de imersão são oriundas dos vidros resfriados a ar e recozidos, possuindo dimensões características de 0,532±0,085 cm *x* 0,417±0,049 cm *x* 0,323±0,078 cm. O volume de SBF utilizado (V_s) foi de 10 mL de acordo com o estimado pela equação 2 proposta por Kokubo e Takadama (2006), onde S_a é a área geométrica total da amostra em mm^2. Na figura 14 pode ser observada uma amostra utilizada nos ensaios de imersão em SBF.

$$V_s = \frac{S_a}{10} \tag{2}$$

Figura 14 - Exemplo de amostra de vidro utilizada nos ensaios de imersão em SBF (destacado na figura).



Após o período imersão, as amostras de material foram secas, determinadas suas massas em balança analítica (marca Shimadzu modelo AY 220), e o pH da solução de SBF medido com auxílio de um pHmetro (marca Ionlab, modelo PHB-500; eletrodo PHC, modelo G10). O percentual de solubilidade do vidro ao longo do tempo $\%S_t$) foi calculado através da equação 3, conforme Abo-Naf et al (2015), onde m_0 e m_t são, respectivamente, as massas das amostras de vidro antes e após a imersão.

$$\% \, S_t = 100 \left(\frac{m_0 - m_t}{m_0} \right) \quad (3)$$

Os dados de solubilidade foram analisados estatisticamente para verificar a existência de dependência da solubilidade dos vidros em função do tempo de imersão de acordo com o que Lakhkar et al (2013) e Lakhkar et al (2009). Para tal, foi realizada a regressão dos dados de solubilidade em função do tempo para o modelo exposto na equação 4, onde *t* é o tempo de imersão (dias) e *k* é a solubilidade (g g^{-1} $dias^{-1}$) do material. Avaliou-se o coeficiente de determinação (R^2), o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}), a distribuição de probabilidade normal dos resíduos e a análise dos resíduos da regressão.

$$S_t = kt \quad (4)$$

As concentrações de cálcio e fósforo na solução de SBF após a imersão das amostras foram determinadas através de espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) operando com vista axial (modelo Optima 4300 DV, PerkinElmer, Shelton, EUA) em triplicata. O equipamento apresenta um nebulizador pneumático do tipo GemCone® acoplado a uma câmera de nebulização ciclônica. A vazão dos gases principal, auxiliar e de nebulização foram de 15, 0,2 e 0,7 L min^{-1}, respectivamente, com potência do gerador de radiofrequência fixada em 1400 W.

Para avaliar a bioatividade do material, as modificações na superfície das amostras foram investigadas por meio de MEV-EDS (marca Tescan modelo VEGA3) para demonstrar a formação de precipitados de fosfato de cálcio. A identificação desses produtos foi realizada em função da razão Ca/P.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DOS VIDROS

5.1.1 Moagem

Os vidros produzidos por fusão e resfriado em água (fritas) foram cominuídos em moinho de bolas para atingir granulometria menor ou igual a 25μm. A tabela 6 apresenta o rendimento da moagem desses vidros.

Tabela 6 - Rendimento da moagem dos vidros em moinho de bolas para a faixa granulométrica inferior ou igual a 25µm.

Vidro	Razão Ca/P	%R
BV1	0,6	48,5
BV2	1,0	65,7
BV3	1,4	73,7

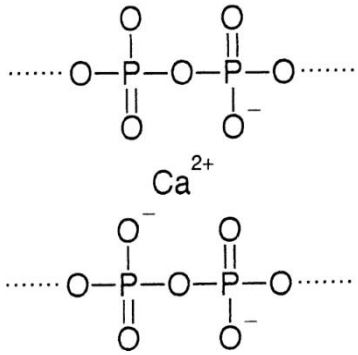
Observa-se que com o aumento da razão Ca/P nos vidros ocorre um aumento no rendimento da moagem. Harker, Backhurst e Richardson (2013) citam que a redução no tamanho de um material ocorre por meio da propagação de trincas acima de um parâmetro crítico *F* definido pela equação 5, onde σ é a tensão, a é o comprimento da trinca e E é o módulo de elasticidade.

$$F = \frac{\sigma^2 a}{E} \tag{5}$$

Abou Neel, Salih e Knowles, 2017, Sharmin et al (2016) e Waclawska e Szumera (2006) mencionam que o aumento da composição de CaO em vidros de fosfato tem como efeito o aumento da força de ligação da rede vítrea em função da formação de ligações cruzadas entre oxigênios não-ligantes entre cadeias diferentes

conforme pode ser ilustrado na figura 14. Abo-Naf et al (2015) reporta que a adição de B_2O_3 à rede vítrea de fosfato aumenta o número de ligações cruzadas na estrutura, tornando-a mais rígida. O fortalecimento na rede de vítrea teria como efeito, portanto, um aumento no módulo de elasticidade do material.

Figura 15 - Formação de ligações cruzadas em estruturas vítreas de fosfato com o íon Ca^{2+}.



Fonte: Uo et al, 1998.

Com o aumento do módulo de elasticidade ($E_{BV1} < E_{BV2} < E_{BV3}$), os valores para o parâmetro F diminuem ($F_{BV3} < F_{BV2} < F_{BV1}$), fazendo com que, consequentemente, o rendimento da cominuição dos particulados aumente ($\%R_{BV1} < \%R_{BV2} < \%R_{BV3}$) com o aumento da razão Ca/P sob as mesmas condições operacionais.

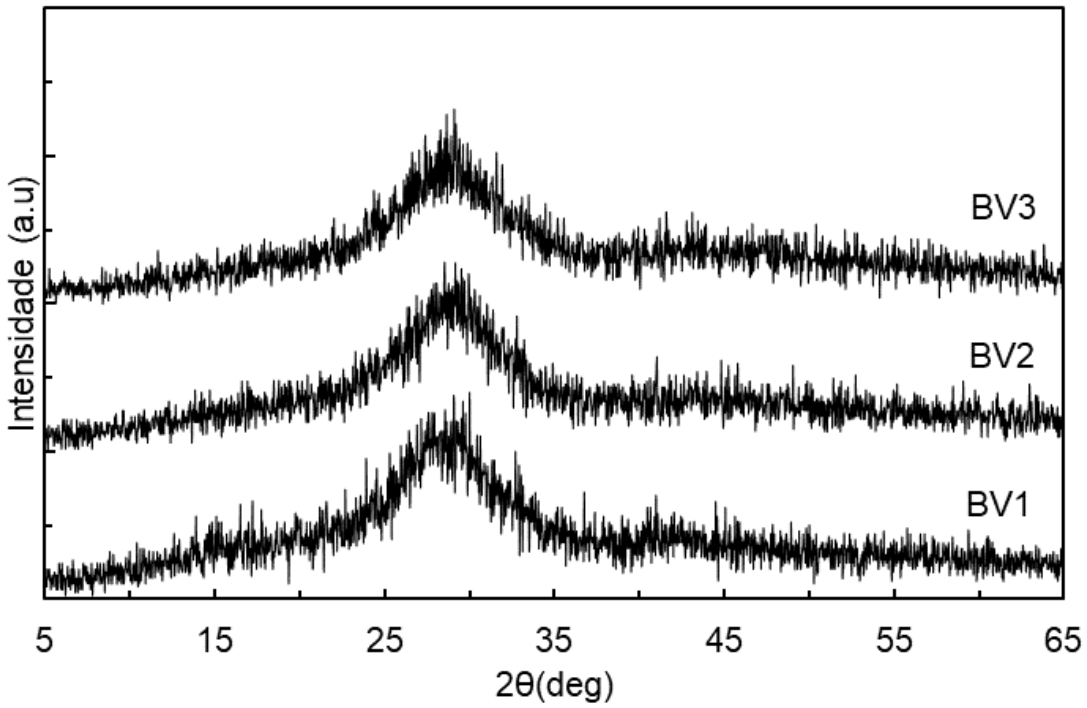
5.2 ANÁLISE ESTRUTURAL

A difração de raios X foi realizada nas peças resfriadas em ar seguidas de recozimento para avaliar sua estrutura. A figura 16 apresenta os difratogramas das amostras BV1, BV2 e BV3, é possível observar a falta de picos de difração definidos, devido a ausência de fase cristalinas indicando uma estrutura amorfa nos três materiais desenvolvidos em virtude da presença de uma banda difusa. O mesmo comportamento foi obtido para as fritas, indicando que o tratamento térmico realizado

faz com que o material apresente estrutura amorfa. Portanto, os materiais cerâmicos obtidos são de fatos vidros.

O aumento da razão Ca/P não ocasionou a formação de fases cristalinas nos vidros. Os difratogramas ilustrados na figura 16 assemelham-se com os apresentados na literatura para vidros com rede vítrea de boro-fosfato (Abo-Naf et al, 2015; Hidi et al, 2013; Lucacel et al, 2016; Saranti, Koutselas e Karakassides, 2006; Sharmin et al, 2013; Zheng et al, 2012).

Figura 16 - Difratogramas dos vidros BV1, BV2 e BV3.



A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada nas fritas com o objetivo de analisar as transições térmicas dos vidros desenvolvidos. A figura 17 apresenta os resultados obtidos.

A partir dos dados obtidos pelo DSC pode-se determinar a presença da transição vítrea (T_g) dos materiais na faixa de 500°C a 600°C através da mudança de linha de base. Na tabela 7 são apresentados os valores das transições vidro em função da razão Ca/P. Através deste parâmetro foi possível determinar a temperatura de recozimento dos vidros arrefecidos no ar de modo a garantir o alívio das tensões

internas. O recozimento dos vidros foi realizado a 600°C por 1 hora com taxa de aquecimento de 10°C/min.

Figura 17 - Análise térmica dos vidros BV1, BV2 e BV3 por DSC.

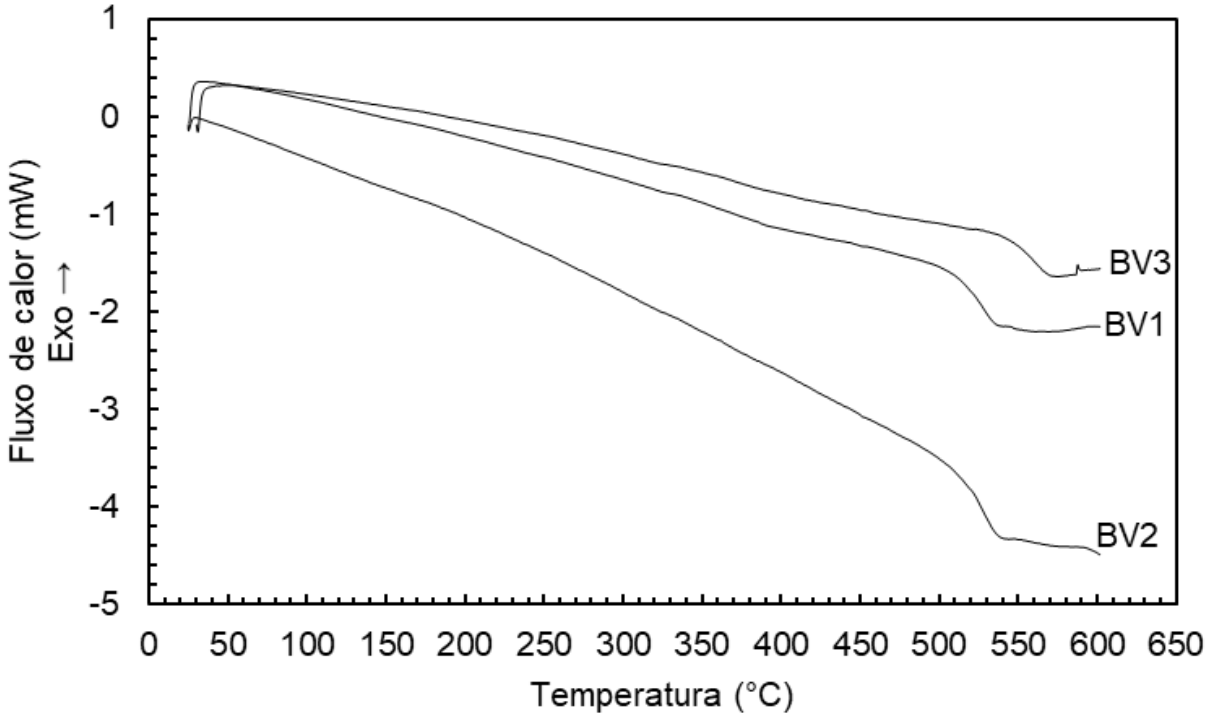


Tabela 7 - Temperatura de transição vítrea dos três vidros.

Vidro	Ca/P	T_g (°C)
BV1	0,6	523
BV2	1,0	524
BV3	1,4	559

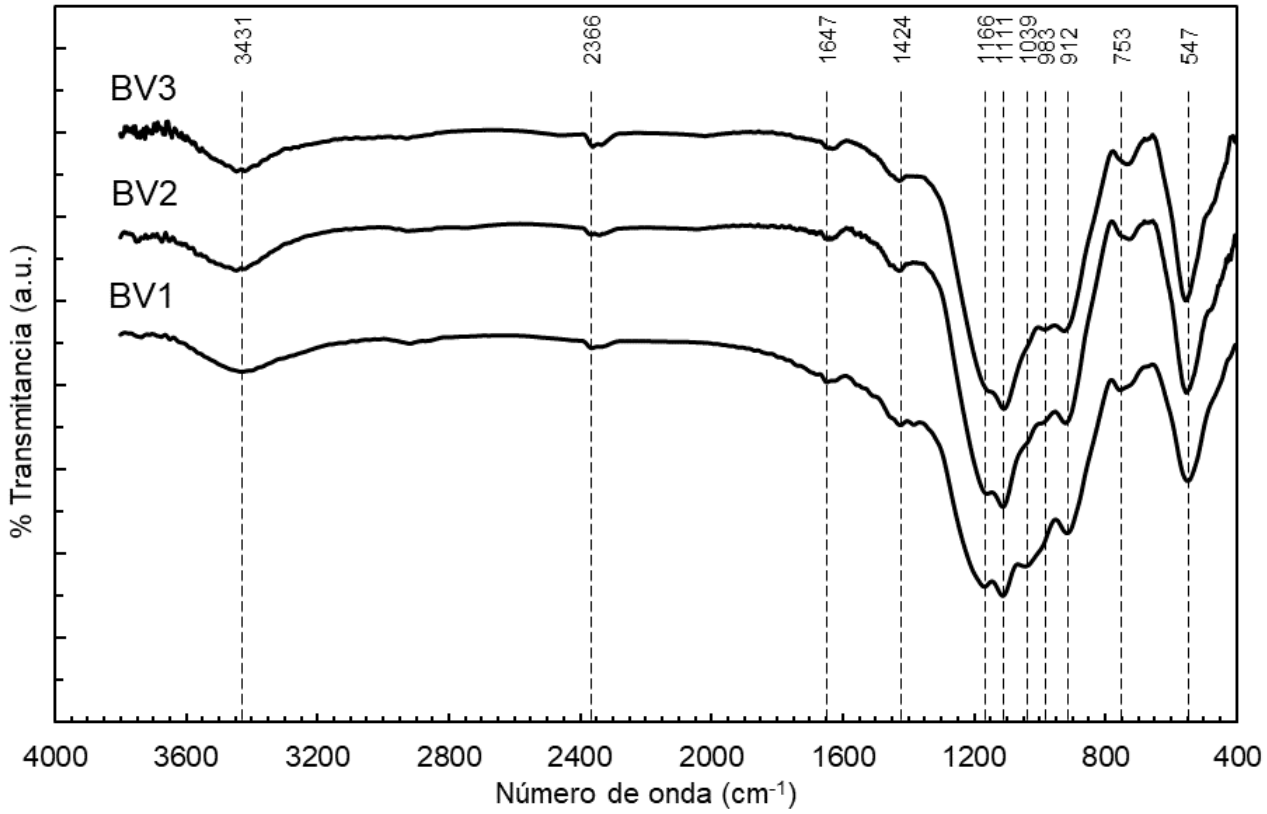
Outros autores também realizaram análise térmica a para vidros do sistema borofosfato. Na tabela 8 são apresentados alguns resultados. A partir desses dados, pode-se concluir que a temperatura de transição vítrea dos vidros produzidos vai ao encontro dos valores descritos na literatura para vidros de borofosfato com razões de Ca/P semelhantes.

Tabela 8 - Temperaturas de transição vítrea para alguns vidros de borofosfato.

Autor	Composição (molar)	Ca/P	T_g(°C)
Ren et al, 2013	50%CaO - 40%P_2O_5 - 7%Na_2O - 3%B_2O_3	1,25	~550
Shi, 1993	(50-0,5x)CaO - (50-0,5x)P_2O_5 - xB_2O_3, 0≤x≤35	1,00	556-617
Sharmin et al, 2013	45%P_2O_5 - 16%CaO - 24% MgO – (15-x)Na_2O - xB_2O_3, 0≤x≤10	0,36	440-500
	50%P_2O_5 - 16%CaO - 24% MgO – (10-x)Na_2O - xB_2O_3, 0≤x≤10	0,32	452-552
Zheng et al, 2012	10%Na_2O - 10%K_2O - 20%CaO - 5%MgO - 5%SrO - 10%B_2O_3 - 40%P_2O_5	0,50	560,5

O infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foi executado para analisar as ligações existentes na estrutura dos vidros produzidos. A figura 18 mostra os espectros obtidos na faixa de 3900 cm^{-1} a 400 cm^{-1}.

Figura 18 - Espectros de FTIR dos vidros BV1, BV2 e BV3.



Basicamente, a interpretação do FT-IR é baseada nas vibrações moleculares que podem ser classificadas em dois tipos: deformação axial (υ) que envolve a alteração no comprimento da ligação, e a deformação angular (δ) cuja alteração é no ângulo da ligação. Os espectros obtidos para as fritas e peças resfriadas em ar seguidas de recozidas não apresentaram diferenças em função da rota de resfriamento. Na faixa de 1600 - 3900 cm^{-1} encontram-se presentes bandas relacionadas com as vibrações fundamentais da água e do dióxido de carbono. A banda em 3431 cm^{-1} relaciona-se com a vibração υ_s (H–O–H) e a banda presente em 1647 cm^{-1} está relacionado com a vibração δ(H–O), ambos atrelados à molécula de água. A banda situada em 2366 cm^{-1} está relacionada com as vibrações υ_{as} (CO_2) da molécula de dióxido de carbono (Carta et al, 2007; Hidi et al, 2013; Silverstein, Webster e Kiemie, 2006).

A presença de bandas de absorção de água é esperada quando a técnica da pastilha de KBr é aplicada. Mesmo com a secagem das pastilhas, os vidros de fosfato e o brometo de potássio apresentam caráter hidroscópico, absorvendo umidade do ar. A presença da banda de absorção do dióxido de carbono está relacionada com a presença de pequenas quantidades desse gás no compartimento de análise. Por mais que o equipamento possua sistema de degasagem, algumas moléculas de dióxido de carbono remanescem, absorvendo uma pequena fração do feixe de energia.

De acordo com Saranti, Koutselas e Karakassides (2006) a adição de B_2O_3 a redes vítreas de fosfato tem como principal efeito o desenvolvimento bandas de absorção em 1400 cm^{-1} e 1160 cm^{-1}. Gautam, Yadav e Singh (2012) reportam que em vidros de borato com o modificador K_2O os principais picos de absorção encontram-se próximos a 1420 cm^{-1} e 1210 cm^{-1}. Nos espectros dos três vidros desenvolvidos pode-se observar a presença da banda em 1424 cm^{-1} e do pico presente em 1166 cm^{-1} comprovando a presença de B_2O_3 na rede vítrea.

De acordo com Ren et al (2013) e Garrigou-Lagrange, Ouchetto e Elouadi, (1985) picos de absorção próximos a 1105 cm^{-1} são característicos da vibração da ligação υ_s (O–P–O) da unidade Q^2 em vidros com composição molar de 0 a 20% de B_2O_3 e 70 a 50% de P_2O_5. O pico presente em 1111 cm^{-1} encontra-se próximo ao reportado na literatura, caracterizando, portanto, a presença dessa ligação na estrutura dos três vidros.

Cai et al (2009) cita que bandas próximas a 1100 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} são características de grupos terminais P-O e grupos PO_3 respectivamente. Além disso, Carta et al (2008) menciona que a região entre 1150 cm^{-1} e 900 cm^{-1} é característica dos grupos terminais P-O e PO_3. No espectro do vidro BV1 existe uma banda de absorção em 1039 cm^{-1} que pode ser associada com a vibração das ligações referenciadas. Com o aumento gradativo da razão Ca/P nos vidros BV2 e BV3 observa-se que essa banda reduz sua intensidade gradativamente, indicando que ocorre uma redução da composição de P_2O_5 nos vidros.

Associada com a redução da intensidade da banda em 1039 cm^{-1}, o pico em 983 cm^{-1} aparece nos espectros dos vidros BV2 e BV3. Regos, Lucacel e Ardelean (2011) citam que picos próximos a 983 cm^{-1} estão relacionados com as vibrações υ_s $(PO_4)^{3-}$ em vidros da rede K_2O-P_2O_5-CaO. Ren et al (2013) menciona que bandas próximas a 970 cm^{-1} são características da ligação υ_s (B–O–B) em vidros da rede CaO-P_2O_5-Na_2O-B_2O_3. O surgimento desse novo pico pode estar associado com a vibração da ligação υ_s (B–O–B) associada com a vibração do υ_s $(PO_4)^{3-}$ do íon.

Regos, Lucacel e Ardelean (2011) mencionam que próximo a 912 cm^{-1} a banda de absorção está associada a vibração da ligação δ_{as} (P-O-P) em vidros da rede K_2O-P_2O_5-CaO. A presença do pico em 912 cm^{-1} é indicativo da presença desse tipo de ligação na estrutura dos três vidros desenvolvidos. Ademais, a redução na intensidade desse pico é evidente, podendo ser associada com a redução da composição de P_2O_5 na rede vítrea dos vidros BV2 e BV3 quando comparado com o vidro BV1.

Hidi et al (2013) cita que bandas próximas a 760 cm^{-1} estão associadas a vibração da ligação υ_s (P–O–P) das unidades Q^2 em vidros do sistema B_2O_3-P_2O_5-Na_2O com 0% a 20% molar de B_2O_3. Carta et al menciona que bandas na região 750 cm^{-1} - 700 cm^{-1} estão associadas a vibrações υ_s (P–O–P) da unidade Q^2. Byun et al (1995) cita que em vidros da rede Na_2O-RO-P_2O_5 (R = Mg, Ca, Sr e Ba) a vibração υ_s (P–O–P) encontra-se localizada na região entre 790 cm^{-1} e 690 cm^{-1}. A banda localizada em 753 cm^{-1}, portanto, pode estar relacionada com a vibrações da ligação υ_s (P–O–P).

Baia et al (2007) cita que em 540 cm^{-1} existe uma banda de vibração relacionada com a ligação δ(P-O-P) em vidros da rede P_2O_5-CaO-Na_2O. Hidi et al (2013) menciona que a vibração da ligação δ(P-O-P) localiza-se em 530 cm^{-1} para a

rede vítrea B_2O_3-Na_2O-P_2O_5. Carta et al (2008) cita que em vidros da rede P_2O_5-B_2O_3-Na_2O a vibração da ligação δ(P-O-P) encontra-se situada em 530 cm^{-1}. De posse dessas informações, é possível relacionar o pico existe em 547 cm^{-1} nos três espectros com a vibração da ligação δ(P-O-P).

5.3 PROPRIEDADES FÍSICAS

5.3.1 Densidade

Os valores das densidades dos vidros analisados pela técnica de picnometria gasosa encontram-se expostos na tabela 9. A análise estatística realizada mostra que existe diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores obtidos para os três vidros.

Tabela 9 - Densidade dos vidros a base de borofosfato.

Vidro	Densidade (g cm^{-3})
BV1	$2,6066 \pm 0,0003^a$
BV2	$2,6591 \pm 0,0024^b$
BV3	$2,7058 \pm 0,0009^c$

A análise estatística foi realizada com a ferramenta ANOVA, considerando $p \leq 0,05$ como diferenças significativas.

Zielniok, Cramer e Eckert (2007) reportam que vidros do sistema Na_2O-B_2O_3-P_2O_5 apresentam densidades na faixa de 2,39 - 2,56 g cm^{-3}. Para vidros do sistema K_2O-B_2O_3-P_2O_5, Larink et al (2012) relatam valores na faixa de 2,30 - 2,47 g cm^{-3}. Wójcik et al (2018) mencionam que para o vidro 28,6%Na_2O-14,3%CaO-57,1%$PO_{5/2}$ (em %mol) a densidade encontrada foi de 2,61 g cm^{-3}, Riguidel e Muñoz (2011) demonstraram que os valores deste parâmetro ficou na faixa de 2,47 - 2,59 g cm^{-3} para vidros do sistema Na_2O–K_2O–CaO–P_2O_5 e Ahmed, Ali e El-Fiqi (2018) apresentam densidades para vidros do sistema P_2O_5–CaO–Na_2O na faixa de 2,38 a 2,72 g cm^{-3}. Todos dos autores citados determinaram a densidade dos materiais utilizando o método de Arquimedes.

A técnica de picnometria a gás consegue determinar a densidade do sólido com mais rigor quando comparado com o método de Arquimedes, sem problemas relacionados com a presença de bolhas de ar presas e degradação física ou físico-química do material (Tamari, 2004; Tamari e Aguilar Chávez, 2005). A divergência existente entre os valores de densidade apresentados para vidros de sistemas semelhantes aos estudados neste trabalho pode ser atribuída a esse fator. No entanto, os valores das densidades obtidas para os vidros BV1, BV2 e BV3 encontram-se próximos aos valores encontrados na literatura para vidros de boro e vidros de fosfato.

O aumento na composição de CaO nos vidros associado com a redução da composição de P_2O_5 teve como efeito o aumento da densidade do material. Ahmed, Ali e El-Fiqi (2018) salientam que o aumento da concentração de CaO em vidros do sistema P_2O_5–CaO–Na_2O teve como efeito um crescimento nos valores da densidade do material. Ademais, a substituição do Na_2O pelo K_2O causa um acréscimo na densidade dos vidros em função do íon K^+ possuir massa atômica maior que a do íon Na^+ (Rabiee et al, 2015).

Em termos estruturais, a adição de B_2O_3 à rede vítrea de fosfato aumenta o número de ligações cruzadas na estrutura, além da presença da ligação P-O-B que torna a estrutura mais rígida e compacta (Abo-Naf et al, 2015). Aliado a isso, Uo et al (1998) cita que o íon Ca^{2+} forma ligações cruzadas na rede vítrea de fosfato, tornando a estrutura mais compacta.

5.3.2 Propriedades superficiais

Os resultados obtidos para a área superficial específica BET, volume, e largura dos poros dos vidros desenvolvidos são expostos na tabela 10. As isotermas de adsorção/dessorção BET e distribuição de dessorção BJH para os vidros BV1, BV2 e BV3 são apresentadas na figura 19.

Tabela 10 - Área superficial específica, tamanho e volume dos poros.

Vidro	Área superficial específica BET ($m^2 g^{-1}$)	Tamanho médio de poro (nm)	Volume total de poro ($cm^3 g^{-1}$)
BV1	2,8589	22,6535	0,012889
BV2	2,8682	20,0851	0,012444
BV3	2,1809	20,6428	0,009168

As isotermas de adsorção/dessorção BET dos vidros BV1, BV2 e BV3 (Figura 19) apresentam formato característico do tipo II de acordo com a classificação da IUPAC (Thommes et al, 2015), indicando a possibilidade da presença de poros na estrutura dos particulados vítreos. A figura 20 mostra a superfície dos vidros desenvolvidos arrefecidos em ar e, conforme pode ser visualizado, todos os três vidros possuem poros em sua superfície.

A formação dos poros está associada a liberação de gases (como o CO_2, por exemplo) durante a etapa de fusão dos vidros. Portanto, é esperado que poros oclusos estejam presentes no interior do material após sua produção. Com a redução granulométrica do material, tais poros tornam-se, portanto, abertos.

A porosidade presente no material deve-se a presença de poros superficiais com uma grande faixa de tamanhos conforme pode ser visualizado na distribuição BJH de dessorção (Figura 19). O tamanho dos poros da superfície (tabela 11) obtidos através dos dados da distribuição BJH de dessorção encontram-se no intervalo entre 2 nm e 50 nm, sendo portanto classificados como mesoporos (Thommes et al, 2015) Os valores baixos para o volume dos poros podem ser confirmados a partir da análise das imagens de microscopia eletrônica expostas na figura 20.

Figura 19 - Isotermas BET de adsorção/dessorção e distribuição BJH de dessorção dos vidros BV1 (a), BV2 (b) e BV3 (c).

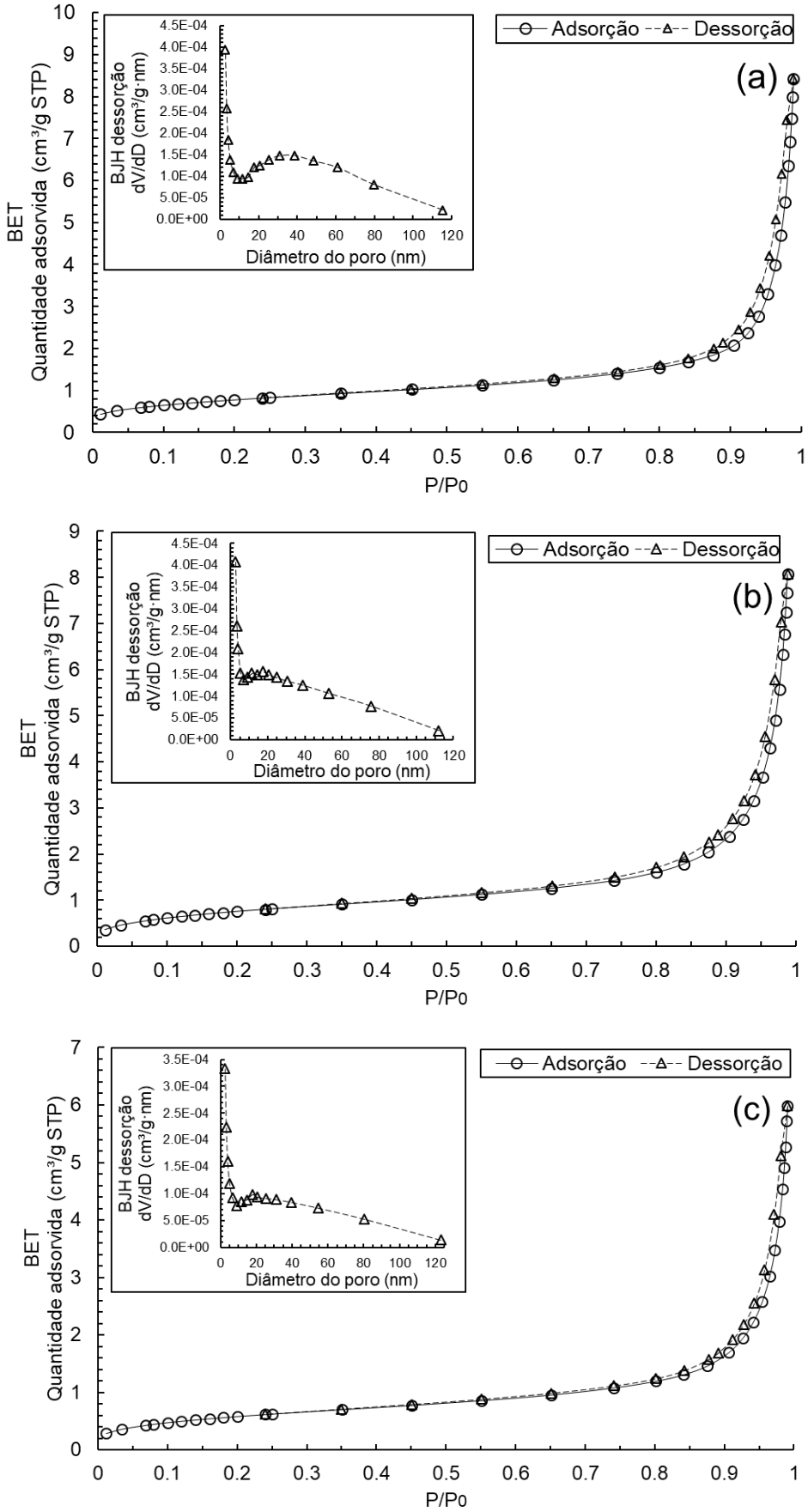
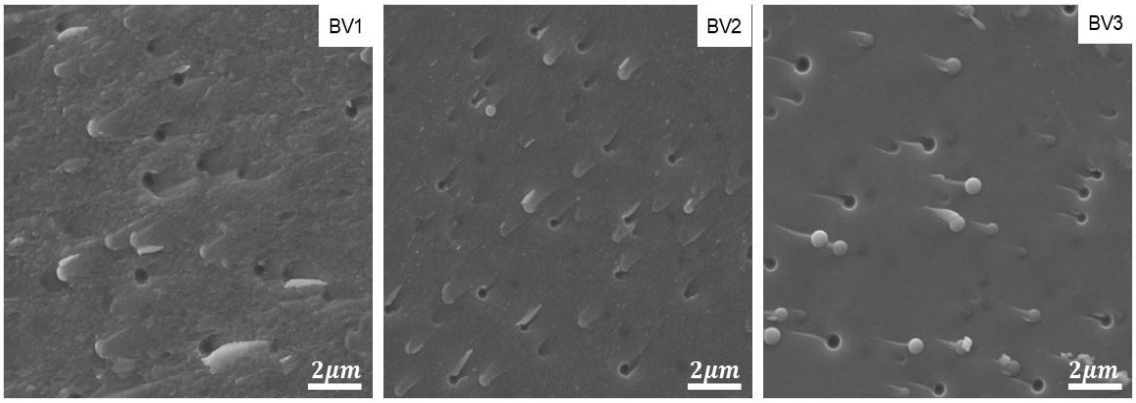


Figura 20 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície dos vidros BV1, BV2 e BV3 (ampliação de 20000 vezes).



Uo et al (1998) obteve para vidros do sistema Na_2O-CaO-P_2O_5 produzidos por fusão com granulometria de 500 mesh uma área superficial específica de 0,38 m^2g^{-1}. Hossain et al (2018) reportam uma área específica de 0,90 m^2g^{-1} - 0,34 m^2g^{-1} na faixa granulométrica de 63 μm - 300 μm, respectivamente, para microesferas porosas de vidros de fosfato de cálcio produzidos por fusão e seguidos de esferoidização em chama.

Pelo método sol-gel, Naseri et al (2019) reportam áreas superficiais específicas de 75 m^2g^{-1} para o vidro 46%B_2O_3-3%P_2O_5-27%CaO (%mol) com granulometria de 48,4 μm, e 240,2 m^2g^{-1} para o vidro 60%B_2O_3-4%P_2O_5-36%CaO (%mol) com granulometria de 48,3 μm. Lepry, Smih e Nazha (2018) obtiveram vidros do sistema B_2O_3-CaO-P_2O_5-Na_2O produzidos pela técnica sol-gel com área superficial específica de 168 m^2g^{-1} a 91 m^2g^{-1} para partículas de tamanho entre 31 μm a 45,3 μm.

Os valores de área superficial específica BET determinados para os vidros BV1, BV2 e BV3 (tabela 10) são inferiores aos citados na literatura para vidros de fosfato e borofosfato obtidos pela técnica sol-gel. Esse comportamento é esperado tendo em vista que vidros produzidos pelo método de fusão tipicamente apresentam áreas superficiais específicas e porosidade inferiores às obtidas pelo método sol-gel (Vallet-Regí, 2001). No entanto, os valores das áreas superficiais dos vidros desenvolvidos encontram-se acima das reportadas para vidros de fosfato produzidos via fusão com tamanho de partícula superior a 25 μm.

No que tange aos poros para os vidros de borofosfato produzidos via sol-gel, Lepry, Smih e Nazha (2018) reportam vidros com poros de tamanho na faixa de 10 nm a 26 nm e volume de 0,61 cm^3g^{-1} a 0,99 cm^3g^{-1}. Ademais, Naseri et al (2019) obtiveram vidros de borofosfato com mesoporos de 3,53 nm/0,23 cm^3g^{-1} e 24,6 nm/0,69 cm^3g^{-1}. Os valores experimentais encontrados para o tamanho dos poros dos vidros produzidos encontram-se dentro da faixa dos vidros produzidos pela técnica sol-gel, indicando que essa variável não apresenta fortes oscilações quando comparada com o método tradicional de fusão. No entanto, o volume dos poros encontra-se muito abaixo dos valores encontrados pela técnica de sol-gel, indicando que os vidros de borofosfato produzidos por fusão apresentam porosidade inferior aos produzidos por sol-gel.

5.4 ENSAIOS IN VITRO

Os ensaios *in vitro* foram realizados através da imersão dos vidros em solução de SBF ao longo de diferentes intervalos de tempo. Após a imersão, avaliou-se a variação de pH da solução de SBF, a solubilidade do material, a variação de cálcio e fósforo na solução e os produtos formados na superfície. A figura 21 mostra a variação de pH do meio em função do tempo, ao passo que a figura 22 ilustra a solubilidade dos vidros ao longo dos ensaios *in vitro*.

Figura 21 - Variação de pH do SBF ao longo do tempo para os vidros BV1, BV2 e BV3.

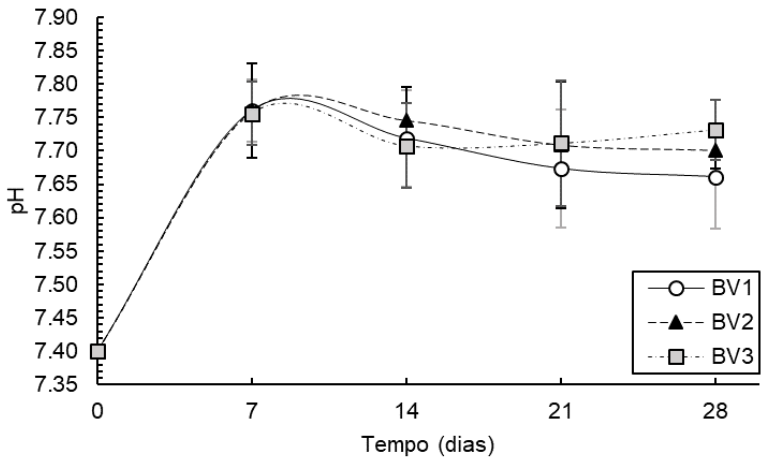
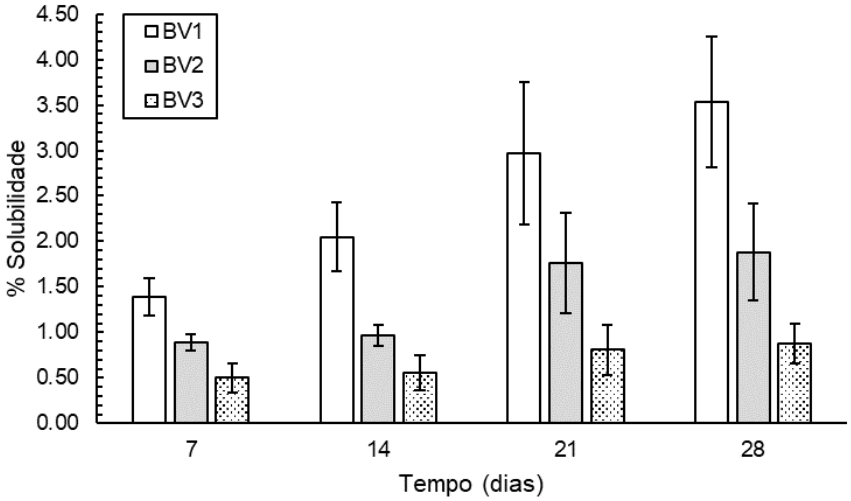


Figura 22 - Solubilidade dos vidros BV1, BV2 e BV3 em função do tempo de imersão em SBF.



Nos primeiros 7 dias de imersão todos vidros provocam um aumento no pH do SBF de 7,40 para 7,76. Após esse período inicial, o pH sofre um decréscimo, mantendo-se praticamente constante para todos os materiais. No vidro BV1 nota-se que no intervalo de 14 a 28 dias o pH do meio estabiliza-se em torno de 7,70, ao passo que os vidros BV2 e BV3 possuem valores em torno de 7,75.

Quando imersos em SBF, vidros que possuem B_2O_3 predominante em sua composição apresentam um aumento de pH na solução, considerando intervalos de tempos longos, em função do ataque químico à rede vítrea de boro pelas espécies H^+, $H3O^+$ e OH^- presentes no SBF e liberação de íons alcalino e alcalino-terrosos (Thind et al, 2007).

No caso dos vidros desenvolvidos, observa-se que as variações de pH reduzem após 7 dias de imersão, indicando que a rede vítrea apresenta uma energia de ligação maior em função da formação de ligações P-O-B, as quais aumentam a rigidez da estrutura (Abo-Naf et al, 2015). Rajkumar et al (2018) citam que vidros do sistema P_2O_5-CaO-Na_2O quando imersos em SBF reduzem o pH da solução após 7 dias, fato que pode ser observado no comportamento dos vidros BV1, BV2 e BV3.

O aumento da porcentagem de CaO nos vidros BV2 e BV3 (e consequentemente o aumento da razão Ca/P) reduz a solubilidade do material conforme é reportado na literatura, gerando variações de pH menores em comparação ao vidro BV1 (Abou Neel, Salih e Knowles, 2017; Sharmin et al, 2016).

As alterações no pH do SBF indicam que ocorreu dissolução dos vidros em função da mudança na concentração de íons na solução, independentemente de como ela ocorre. Conforme pode ser verificado na figura 21, de fato ocorre dissolução dos vidros quando imersos em SBF. Os perfis obtidos para a variação de pH dos três materiais vão ao encontro com o que Abou Neel, Salih e Knowles (2017) reportam para o mecanismo de formação de camadas bioativas de hidroxiapatita.

A reduzida razão Ca/P no vidro BV1 ocasiona em uma maior solubilidade do material. Esse resultado encontra-se em conformidade com o que é reportado na literatura, pois o aumento da composição de P_2O_5 e a redução do conteúdo de CaO tem como efeito a redução da durabilidade do material. Ademais, observa-se para os vidros BV2 e BV3, os quais possuem razão Ca/P superior a do vidro BV1, a solubilidade é reduzida (Abou Neel, Salih e Knowles, 2017; Sharmin et al, 2016; Thind et al, 2007).

Em termos estruturais, a presença de CaO na rede de borofosfato cria ligações cruzadas na rede vítrea, tornando a estrutura mais rígida e com maior energia de ligação (Abou Neel, Salih e Knowles, 2017; Sharmin et al, 2016). A presença de K_2O ao invés de Na_2O aumenta a solubilidade dos vidros, pois o raio iônico do íon K^+ é superior ao do íon Na^+, causando disruptura maior na rede vítrea, enfraquecendo-a. A redução da composição de K_2O nos vidros BV2 e BV3 em comparação ao vidro BV1 é outro fator que tem como efeito a redução na solubilidade dos materiais (Rabiee et al, 2015).

A dependência da solubilidade dos materiais com o tempo pode ser visualizada na figura 23. Lakhkar et al (2013) e Lakhkar et al (2009) afirmam que existe uma dependência linear entre a solubilidade do material e o tempo. A análise de regressão de acordo com o modelo proposto pelos autores encontra-se exposto na tabela 11 e nas figuras 24 e 25.

O aumento da solubilidade associado a redução da razão Ca/P pode ser comprovado pela curva de solubilidade dos vidros exposta na figura 23. A solubilidade dos materiais pode ser verificada a partir dos valores do parâmetro *k*, onde o aumento da razão de Ca/P tem efeito contrário reduzindo este parâmetro. Matematicamente, essa alteração pode ser observada através da redução da inclinação das retas.

Figura 23 - Solubilidade dos vidros BV1, BV2 e BV3 em função do tempo de imersão.

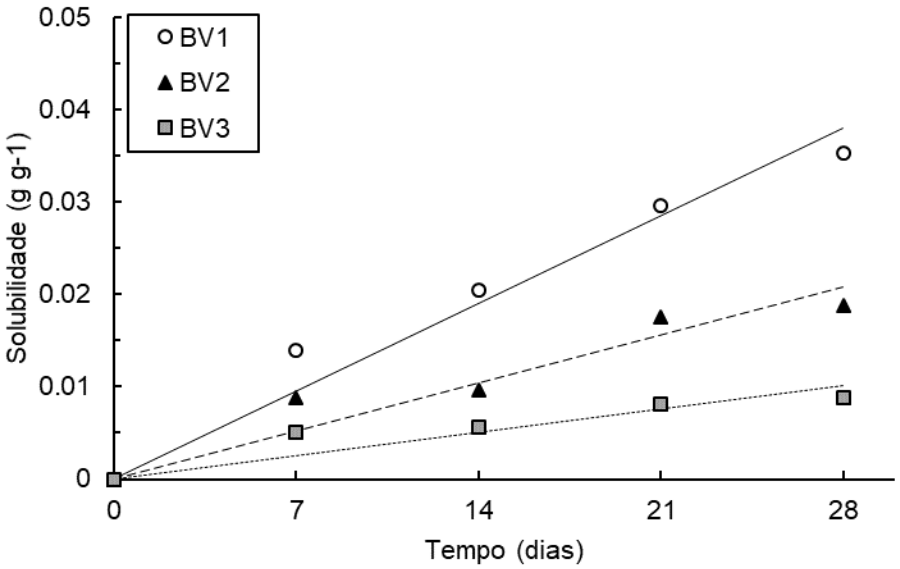


Tabela 11 - Parâmetros da regressão dos dados de solubilidade dos vidros em função do tempo para o modelo proposto.

Vidro	Ca/P	k (g g^{-1} $dias^{-1}$)	R^2	R^2_{adj}
BV1	0,6	0,001358	0,9891	0,9863
BV2	1,0	0,000744	0,9737	0,9671
BV3	1,4	0,000360	0,9548	0,9435

Figura 24 - Distribuição de probabilidade normal dos resíduos das regressões realizadas para a solubilidade dos vidros BV1 (a), BV2 (b) e BV3 (c) em função do tempo de imersão.

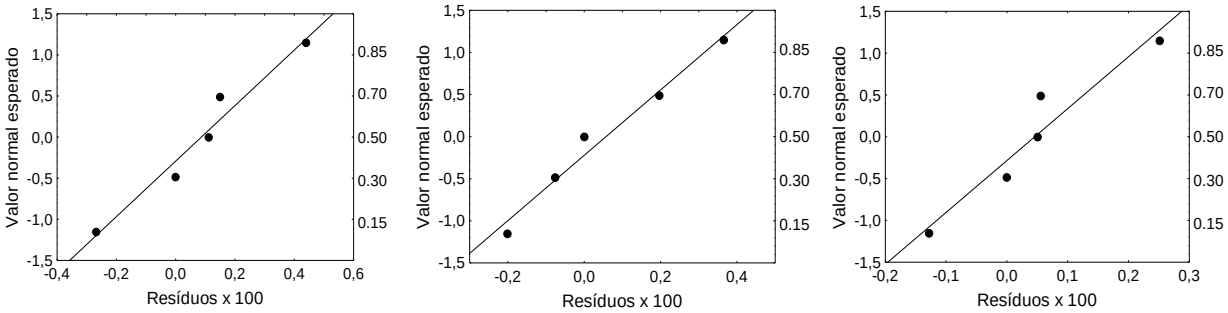
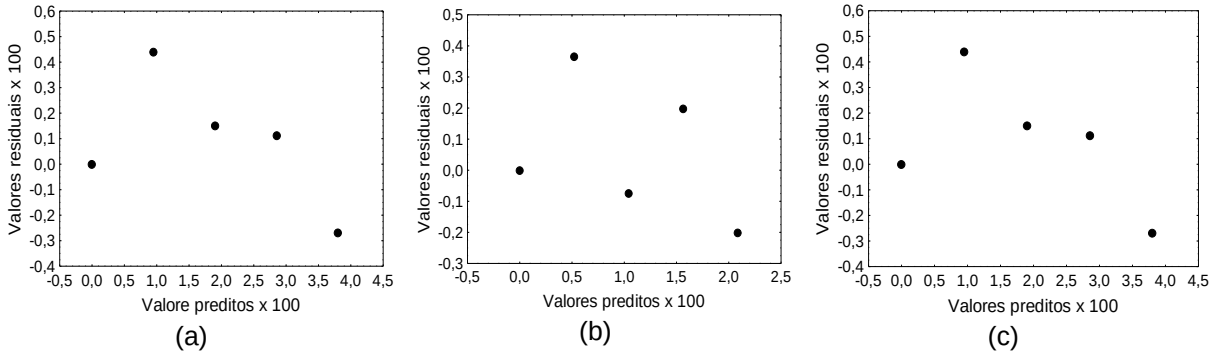


Figura 25 - Análise dos resíduos de regressão dos dados de solubilidade em função do tempo de imersão para os vidros BV1 (a), BV2 (b) e BV3 (c).

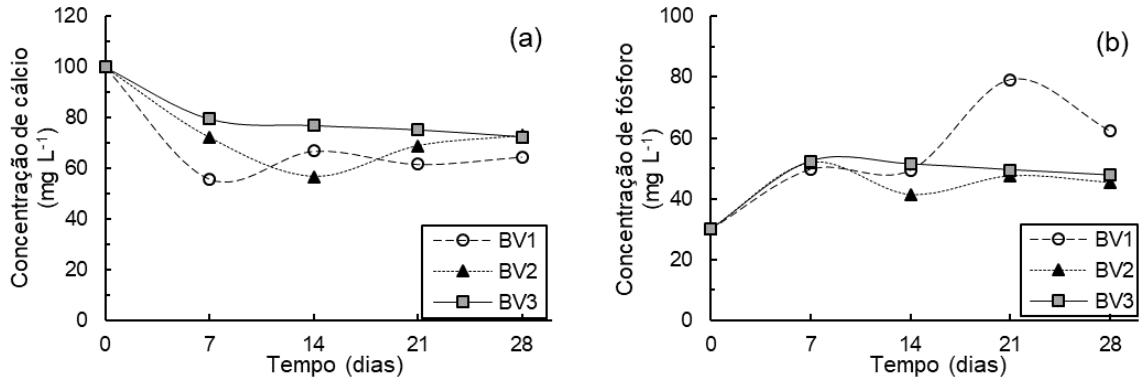


A análise de regressão mostra que o modelo proposto por Lakhkar et al (2013) e Lakhkar et al (2009) consegue representar matematicamente a situação estudada. Os resíduos da regressão estão distribuídos de maneira normal (Figura 24) e aleatória (Figura 25) de maneira que o modelo utilizado adequa-se a situação analisada e não possui tendências associadas aos dados experimentais. Os elevados valores para os coeficientes de determinação e para o coeficiente de determinação ajustado indicam que o modelo proposto consegue correlacionar os dados experimentais de solubilidade dos vidros em função do tempo.

A dissolução da rede vítrea no SBF ocasiona mudanças na concentração iônica da solução. A figura 26 ilustra as variações de cálcio e fósforo no SBF ao longo do tempo de imersão.

Como pode ser verificado na figura 26, a concentração de fósforo no SBF na imersão vidro BV1 é crescente, indicando que dentre os três vidros produzidos, este possui uma solubilidade maior. Esse resultado comprova o que foi discutido a partir dos resultados da variação de pH e solubilidade do material em função da razão de Ca/P. Para os vidros BV2 e BV3 observa-se que após 7 dias de imersão a concentração de fósforo apresenta pequenas variações em função da baixa degradabilidade desses materiais.

Figura 26 - Perfis de concentração de cálcio (a) e fósforo (b) no SBF ao longo dos ensaios de imersão.



Em relação a concentração de cálcio, percebe-se que ocorre uma redução nos seus valores ao longo do tempo. Esse resultado é indicativo que uma precipitação pode estar acontecendo, formando fosfatos de cálcio na superfície dos vidros. Gomes et al (2012) e Masson et al (2016) sugerem que os fosfatos de cálcio precipitados na superfície de vidros bioativos podem ser identificados em função da sua razão Ca/P.

A hidroxiapatita (HA) é um dos tipos de fosfato de cálcio que podem ser formados na superfície quando o material se encontra submerso em SBF. A presença desta camada é caracterizada pela razão Ca/P de 1,67. Abo-Naf et al (2015) citam que a formação da camada de HA em vidros bioativos de borofosfato ocorre pelo aumento da razão Ca/P nos fosfatos de cálcio precipitados ao longo do tempo de imersão.

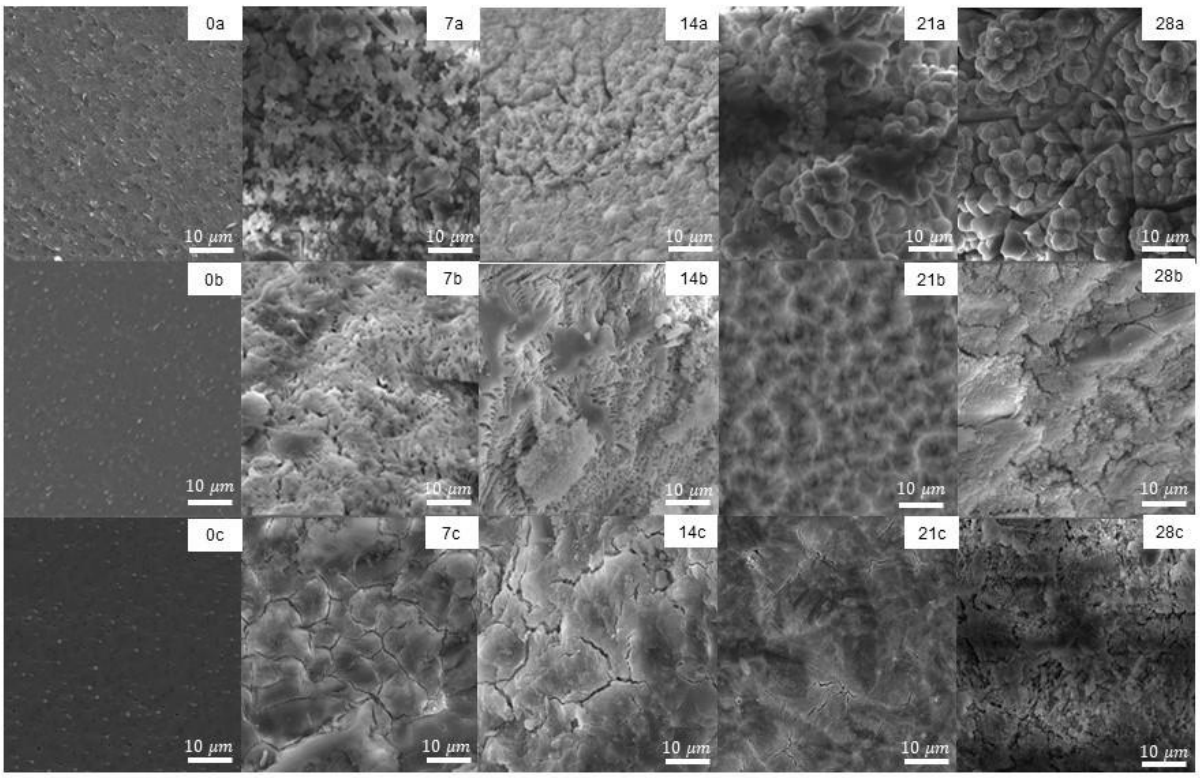
O consumo dos íons H^+ e OH^- nos períodos iniciais é fundamental para a formação da camada de $CaHPO_4$. O aumento do pH nos períodos iniciais está associado com essa etapa. Após esse período inicial, o pH do meio decresce para valores próximos a 7,0 permitindo a conversão das camadas de $CaHPO_4$ em HA (Abou Neel, Salih e Knowles, 2017). Esses mecanismos são identificados a partir da análise dos perfis de pH (Figura 21).

A conversão da camada de $CaHPO_4$ (Ca/P=1,0) em HA (Ca/P =1,67) ocorre pelo aumento na concentração de Ca associado com a troca iônica que acontece no meio. A redução nas concentrações de cálcio no SBF é superior para o vidro BV1, indicando uma precipitação maior desse íon na superfície do material, sugerindo que

a camada de fosfato de cálcio presente pode evoluir mais facilmente para hidroxiapatita.

Observa-se na figura 27 as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura para análise das alterações geradas na superfície dos vidros BV1, BV2 e BV3 durante o período de imersão. Em todos os vidros percebe-se mudanças na sua morfologia após diferentes tempos de imersão no SBF, indicando que ocorre a formação de precipitados.

Figura 27 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a superfície dos vidros BV1(a), BV2(b) e BV3(c) após 0, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF. Todas as imagens possuem ampliação de 5000 vezes.



Nas imagens de microscopia percebe-se uma maior evolução na morfologia dos precipitados formados na superfície do vidro BV1. Esses precipitados apresentam, ao fim de 28 dias de imersão em SBF, um formato esférico semelhante a constituição da hidroxiapatita, conforme Abo-Naf et al (2015) reportam.

As alterações na superfície dos vidros podem ser analisadas a partir dos dados de EDS expostos na figura 28, que apresenta a evolução da razão Ca/P dos depósitos

presentes na superfície dos vidros. A identificação dos precipitados em função da razão Ca/P indica a formação de diferentes tipos de fosfato de cálcio na superfície dos vidros após a imersão em SBF (Abo-Naf et al, 2015).

O EDS do vidro BV1 antes e após a imersão em SBF durante 28 dias é exposto na figura 29. A partir desses dois espectros observa-se que ocorre uma mudança superficial após a imersão em SBF. Os espectros para os demais tempos de imersão apresentam comportamentos semelhantes, sendo seus resultados resumidos na figura 28.

Figura 28 - Variação da razão Ca/P nos depósitos formados na superfície dos vidros BV1, BV2 e BV3 ao longo do tempo de imersão em SBF.

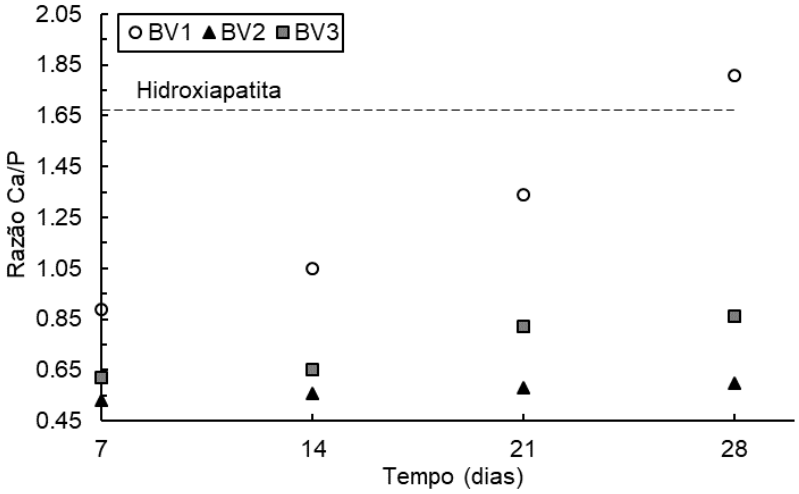
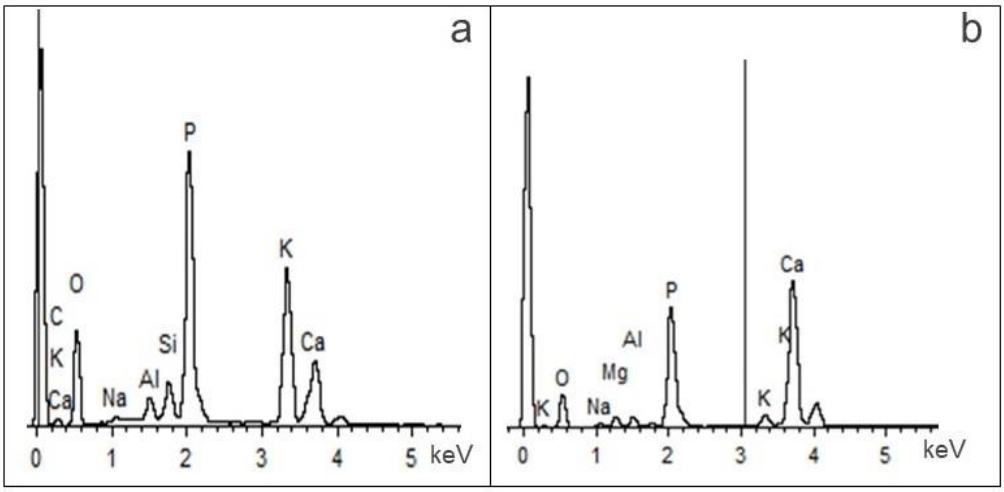


Figura 29 - Espectro EDS da superfície do vidro BV1 antes (a) e após 28 dias de imersão em SBF (b).



Os resultados apresentados para o vidro BV1 vão ao encontro do mecanismo proposto (Abou Neel, Salih e Knowles, 2017), onde em valores de pH menores ocorre a formação de precipitados com razão Ca/P maiores no decorrer do tempo. As variações de cálcio e fósforo no SBF, assim como as taxas de dissolução maiores para o vidro BV1, confirmam que a troca iônica entre o material e a solução ocasionou a formação de um precipitado de fosfato de cálcio com razões de Ca/P próximas a da hidroxiapatita no período entre 21 e 28 dias.

Saranti, Koutselas e Karakasides (2006) reporta que vidros do sistema CaO-P_2O_5-B_2O_3 com razões Ca/P iguais a 4,0 e 5,0 apresentam a formação de hidroxiapatita na superfície dos materiais após 72 horas de imersão em SBF, ao passo que para vidros com razão Ca/P igual a 2 sem a presença de boro na sua composição a formação de hidroxiapatita ocorre em 45 dias. O vidro BV1 apresenta uma razão Ca/P inferior a 1,0 e forma hidroxiapatita na superfície entre 21 e 28 dias.

Para os vidros BV2 e BV3, o aumento da razão Ca/P na composição dos vidros não acelerou o processo de formação da camada de hidroxiapatita em comparação ao vidro BV1. No entanto, observa-se na figura 27 que o vidro BV3 apresenta um aumento na razão Ca/P dos depósitos da superfície mais acelerado que o vidro BV2. Esse resultado vai ao encontro com o que Saranti, Koutselas e Karakasides (2006) e Abo-Naf et al (2015) reportam.

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento de novos materiais com potencial bioativo para auxiliar no processo de reconstrução do tecido ósseo é um ponto importante na recuperação de pacientes afetados por doenças que afetam o sistema de sustentação do corpo humano. Nesse cenário, os vidros de borofosfato, pouco estudados na literatura, são considerados uma alternativa como materiais bioativos. O referente trabalho avaliou o potencial bioativo de três vidros com diferentes razões Ca/P no sistema CaO – K_2O – P_2O_5 – B_2O_3.

Os materiais desenvolvidos neste estudo são amorfos como pode ser comprovado pela análise de difração de raios-X, podendo de fato ser designados vidros. Além disso, a calorimetria exploratória diferencial confirmou a existência de uma temperatura de transição vítrea característica destes materiais. A análise da estrutura por infravermelho com transformada de Fourier mostrou a presença das ligações características da rede vítrea de borofosfato, onde o aumento da razão Ca/P ocasiona diferenças pronunciáveis nos espectros.

A moagem dos vidros resfriados em água em moinho de bolas mostrou que com o aumento da razão Ca/P, aumenta o rendimento da cominuição realizada a seco para granulometria igual ou menor que 25 µm. Associa-se tal fato ao aumento da rigidez da rede vítrea em função do aumento das ligações cruzadas presentes na estrutura com o aumento da razão de Ca/P.

Observa-se nos resultados de picnometria gasosa que o aumento da razão Ca/P para os vidros ocasiona um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na densidade dos materiais. Em termos de propriedades superficiais, os vidros apresentam mesoporos em sua superfície com uma ampla faixa de distribuição de tamanhos conforme determinado pela distribuição BJH de dessorção. A área superficial específica e o volume dos poros dos vidros encontram-se abaixo dos valores para vidros produzidos pela técnica sol-gel, porém o tamanho dos poros não apresenta variações tão pronunciáveis.

Os ensaios *in vitro* revelam que a redução na razão Ca/P nos vidros ocasiona aumento da solubilidade desses quando imersos em *Simulated Body Fluid* (SBF) ao

longo do tempo. A solubilidade dos vidros em função do tempo pode ser representada por um modelo linear conforme reportado pela análise de regressão realizada.

As variações do pH no SBF ao longo do tempo comprovam que ocorre mudança na concentração iônica da solução em função da solubilização do material e formação de depósitos na superfície. Os perfis de pH estão em concordância com o previsto para vidros bioativos de fosfato.

As concentrações de cálcio e fósforo na solução de SBF determinadas por ICP-OES apresentam alterações com o tempo, indicando que ocorre solubilização da rede vítrea e deposição de cálcio na superfície dos vidros.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura com EDS acoplado comprovam a formação de depósitos na superfície dos materiais, sendo que o vidro com razão Ca/P menor (BV1) apresenta formações características de hidroxiapatita entre 21 e 28 dias, mostrando potencial bioativo para esse intervalo de tempo. Os demais vidros (BV2 e BV3) apresentam formação de precipitados de fosfato de cálcio, porém os precipitados formados apresentam baixas razões de Ca/P dentro do intervalo estudado. No entanto, também percebe-se uma evolução na relação cálcio e fósforo dos vidros BV2 e BV3, indicando que em intervalos de tempo maiores tais precipitados podem evoluir e cristalizar para uma camada de hidroxiapatita.

Estudos complementares sobre essa classe de vidro fazem-se necessários para otimizar as propriedades bioativas obtidas *in vitro*, assim com a avaliação de seu potencial *in vivo* para aplicações biomédicas.

7 REFERÊNCIAS

ABDELGHANY, A. M. et al. Role of SrO on the bioactivity behavior of some ternary borate glasses and their glass ceramic derivatives. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 152, p. 126–133, 2016.

ABO-NAF, S. M. et al. In vitro bioactivity evaluation, mechanical properties and microstructural characterization of Na_2O–CaO–B_2O_3–P_2O_5 glasses. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 144, p. 88–98, 2015.

ABOU NEEL, E. A. et al. Bioactive functional materials: a perspective on phosphate-based glasses. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, p. 690-701, 2009.

ABOU NEEL, E. A.; SALIH, V.; KNOWLES, J. C. Phosphate-based glasses. In: HEALY, K.; HUTMACHER, D. W.; GRAINGER, D. W.; KIRKPATRICK, C. J. (Eds). **Comprehensive Biomaterials II**. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, 2017, cap. 1.18, p. 392-405.

AHMED, A. A.; ALI, A. A.; EL-FIQI, A. Glass-forming compositions and physicochemical properties of degradable phosphate and silver-doped phosphate glasses in the P_2O_5–CaO–Na_2O–Ag_2O system. **Journal of Materials Research and Technology**, 2018.

AHMED, I. et al. Phosphate glasses for tissue engineering: Part 2. Processing and characterization of a ternary-based P_2O_5–CaO–Na_2O glass fibre system. **Biomaterials**, n. 25, p. 501–507, 2004.

BAINO, F. Bioactive glasses–When glass science and technology meet regenerative medicine. **Ceramics International**, v.44, p. 14953–14966, 2018.

BALASUBRAMANIAN, P. et al. Angiogenic potential of boron-containing bioactive glasses: in vitro study. **Journal of Materials Science**, v. 52, p. 8785-8792, 2017.

BALASUBRAMANIAN, P.et al. Boron-containing bioactive glasses in bone and soft tissue engineering. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 38, p. 855-869, 2018.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeções e estimativas da população do Brasil e das Unidades da Federação. **BRASIL**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>. Acesso em: 12 de set. 2018a.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção da população. **BRASIL**. Disponível em: https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/piramide/piramide.shtm>. Acesso em 12 de set. 2018b.

BRAUER, D. S. Bioactive Glasses - Structure and Properties. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 54, p. 4160-4181, 2015.

BROW, R. K. Review: the structure of simple phosphate glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 263-264, p. 1-28, 2000.

CAMARGOS, M. C. S.; BOMFIM, W. C. Osteoporose e Expectativa de Vida Saudável: estimativas para o Brasil em 2008. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 25, n. 1, p 106-112, 2008.

CHENG, F. -M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 53, p. 86-168, 2016.

CICEO-LUCACEL, R. et al. Novel selenium containing boro-phosphate glasses: Preparation and structural study. **Materials Science and Engineering C**, v. 39, p. 61–66, 2014.

CIOBANU, G.; HARJA, M. Cerium-doped hydroxyapatite/collagen coatings on titanium for bone implants. **Ceramics International**, v. 45, p. 2852–2857, 2019.

DELAHAYE, F. et al. Acid dissolution of sodium-calcium metaphosphate glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 242, p. 25-32, 1998.

DUARTE, V. S. et al. Exercícios físicos e osteoartrose: uma revisão sistemática. **Fisioterapia em Movimento**, v. 26(1), p. 192-202, 2013.

DURAND, L. A. H. et al. Angiogenic effects of ionic dissolution products released from a boron-doped 45S5 bioactive glass. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, p. 1142-1148, 2015.

EASTEL, R. et al. Postmenopausal osteoporosis. **Nature Reviews: Disease Primers**, v. 2, p. 1-16, 2016.

FAGERLUND, S.; HUPA, L. Melt-derived Bioactive Silicate Glasses In: BOCCACCINI, A.; BRAUER, D. S.; HUPA, L. (Eds). **Bioactive Glasses: Fundamentals, Technology and Applications**. [S.l.]: Royal Society of Chemistry, 2016. cap. 1, p. 1-26.

FU, A. I.; MAURO, J. C. Topology of alkali phosphate glass networks. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 361, p. 57-62, 2013.

GAO, H.; TAN, T.; WANG, D. Dissolution mechanism and release kinetics of phosphate controlled release glasses in aqueous medium. **Journal of Controlled Release**, v. 96, p. 29-36, 2004.

GARTNER, L. **Tratado de Histologia**. [S.l.]: Elsevier, 2017. cap. 7, p. 131-160.

GAUTAM, C.; YUDAV, A. K.; SINGH, A. K. A Review on Infrared Spectroscopy of Borate Glasses with Effects of Different Additives. **International Scholarly Research Network Ceramics**, v. 2012, 17 p, 2012.

GOMES, L. C. et al. Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha. **Cerâmica**, v. 58, p. 448-452, 2012.

HARKER, J. H.; BACKHURST, J. R.; RICHARDSON, J.F. **Chemical Engineering**. [S.l]: Elsevier Science, 2013, v. 2. cap. 2, p. 95-145.

HASAN, M. S.; WERNER-ZWANZIGER, U.; BOYD, D. Composition-structure-properties relationship of strontium borate glasses for medical applications. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 103A(7), p. 2344-2354.

HIDI, I. J. et al. The study of the structure and bioactivity of the B_2O_3 -Na_2O - P_2O_5 system. **Journal of Raman Spectrosocpy**, v. 44, p. 1187–1194, 2013.

HOSSAIN, K. M. Z. et al. Porous calcium phosphate glass microspheres for orthobiologic applications. **Acta Biomaterialia,** v.72, p. 396–406, 2018.

JONES, J. R. et al. Bioglass and Bioactive Glasses and Their Impact on Healthcare. **International Journal of Applied Glass Science**, v. 7(4), p. 423–434, 2016.

JONES, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 4457–4486, 2013.

JUHASZ, J. A.; BEST, S. M. Bioactive ceramics: processing, structures and properties. **Journal of Materials Science**, v. 47, p. 610-624, 2012.

KAUR, G. et al. A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication, and apatite formation. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 102A(1), p. 254-274, 2014.

KAUR, G. et al. Review and the state of the art: Sol–gel and melt quenched bioactive glasses for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 104B(6), 2016.

KHADEMHOSSEINI, A.; LANGER, R. A decade of progress in tissue engineering. **Nature Protocols**, v. 11(10), p. 1775-1781, 2016.

KIM, T. et al. Effects of Substitution of K_2O for Na_2O on the Bioactivity of CaO-Na_2O-SiO_2-P_2O_5 Glasses. **Electronic Materials Letters**, v. 8(5), p. 541-544, 2012.

KNOWLES, J. C. Phosphate based glasses for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 13, p. 2395-2401, 2003.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 26, p. 2907-215, 2006.

LAKHKAR, N. J. et al. Bone formation controlled by biologically relevant inorganic ions: Role and controlled delivery from phosphate-based glasses. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 405-420, 2013.

LAKHKAR, N. J. et al. Strontium oxide doped quaternary glasses: effect on structure, degradation and cytocompatibility. **Journal of Materials in Science: Materials in Medicine**, v. 20, p.1339-1346, 2009.

LARINK, D. et al. Mixed Network Former Effect in Ion-Conducting Alkali Borophosphate Glasses: Structure/Property Correlations in the System $[M_2O]_{⅓}[(B_2O_3)_x(P_2O_5)_{1-x}]_{⅔}$(M = Li, K, Cs). **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, p. 26162−26176, 2012.

LATOCHA, J. et al. Precipitation of hydroxyapatite nanoparticles in 3D-printed reactors. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v. 133, p. 221–233, 2018.

LEPRY, W. C.; SMITH, S.; NAZHAT, S. Effect of sodium on bioactive sol-gel-derived borate glasses. Journal of Non-Crystalline Solids, v.500, p.141-148, 2018.

LI, X.; GIGNAC, A. M. M.; ANIS, A. H. The Indirect Costs of Arthritis Resulting From Unemployment, Reduced Performance, and Occupational Changes While at Work. **Medical Care**, v. 44, p. 304-310.

LOPES, P. P. et al. Silicate and borate glasses as composite fillers: a bioactivity and biocompatibility study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, p. 1501-1510, 2011.

LUCACEL, R. C. et al. Synthesis, structure, bioactivity and biocompatibility of melt-derived P_2O_5-CaO-B_2O_3-K_2O-MoO_3 glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 439, p. 67–73, 2016.

MARGHA, F. H.; ABDELGHANY, A. M. Bone bonding ability of some borate bio-glasses and their corresponding glass-ceramic derivatives. **Processing and Application of Ceramics**, v. 6(4), p. 183–192, 2012.

MASSON, J. -D. et al. Calcium phosphate: a substitute for aluminum adjuvants? **Expert Review of Vaccines**, v. 16(3), 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Prevenção à osteoporose deve começar na infância. **BRASIL**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/saude-em-dia/mais-sobre-saude-em-dia>. Acesso em: 17 de novembro de 2017.

MONTAZERIAN, M.; ZANOTTO, E. D. A guided walk through Larry Hench's monumental discoveries. **Journal of Materials Science**, v. 52, p. 8695-8732, 2017.

NASERI, S. et al. Development and characterization of silver-doped sol-gel-derived borate glasses with anti-bacterial activity. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v.505, p.438–446, 2019.

NEAMTU, J. et al. Hydroxyapatite–alendronate composite systems for biocompatible materials. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, p. 1567-1582, 2017.

OLIVEIRA, A. M. I. et al. Impacto dos exercícios na capacidade funcional e dor em pacientes com osteoartrite de joelhos: ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56(2), p.870-882, 2012.

ORWIG, D. L.; CHAN, J.; MAGAZINER, J. **Orthopedic Clinics of North America,** v. 37(4), p. 611-622, 2006.

PINA, S. OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L. Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review. **Advanced Materials**, v. 27, p. 1143-1169, 2015.

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

RAHAMAN, N. M. et al. Bioactive glass in tissue engineering: Review. **Acta Biomaterialia**, 7 ed., p. 2355–2373, 2011.

REN, M. et al. Preparation and chemical stability of CaO–P2O5–Na2O–B2O3 porous glass ceramics. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 380, p. 78–85, 2013.

RIGUIDEL, Q.; MUÑOZ, F. Effect of nitridation on the aqueous dissolution of Na_2O–K_2O–CaO–P_2O_5 metaphosphate glasses. **Acta Biomaterialia**, v.7, p. 2631–2636, 2011.

RIZWAN, M.; HAMDI, M.; BASURIN, W. J. Bioglass® 45S5-based composites for bone tissue engineering and functional applications. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 105A (11), p. 3197-3223, 2017.

ROSSIS, R. G.; MASSABKI, P. S.; KAIRALLA, M. Osteoartrite: avaliação clínica e epidemiológica de pacientes idosos em instituição de longa permanência. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 8(2), p. 101-108, 2010.

SALMAN, S. M.; SALAMA, S. N.; ABO-MOSALLAM, H. A. The role of strontium and potassium on crystallization and bioactivity of Na_2O–CaO–P_2O_5–SiO_2 glasses. **Ceramics International**, v.38, p. 55–63, 2012.

SARANTI, A.; KOUTSELAS, I.; KARAKASSIDES, M. A. Bioactive glasses in the system $CaO–B_2O_3–P_2O_5$: Preparation, structural study and in vitro evaluation. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 352, p. 390-398, 2006.

SHAO, R. et al. Porous hydroxyapatite bioceramics in bone tissue engineering: current uses and perspectives. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, v. 123(1), p. 17-20, 2015.

SHARMIN, N. et al. Effect of Boron Addition on the Thermal, Degradation, and Cytocompatibility Properties of Phosphate-Based Glasses. **BioMed Research International**, v. 2013, Article ID 902427, 12 p., 2013.

SHARMIN, N. et al. Structure, viscosity and fibre drawing properties of phosphate-based glasses: effect of boron and iron oxide addition. **Journal of Materials Science**, v. 51, p. 7523-7535, 2016.

SHARMIN, N.; RUDD, C. D. Structure, thermal properties, dissolution behaviour and biomedical applications of phosphate glasses and fibres: a review. **Journal of Materials Science**, v. 52, p. 8733-8760, 2017.

SHELBY, J. E. **Introduction to Glass Science and Technology**, 2ª ed. The Royal Society of Chemistry, 2015, p. 7-25.

SILVA, A. C. Structure and Percolation of Bioglasses. In: MARCHI, J. (Ed). **Biocompatible Glasses: From Bone Regeneration to Cancer Treatment**. [S.l.]: Springer, 2016. cap. 3, p. 49-84.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, X.; KIEMIE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2006. cap. 2, p. 72-78.

SIQUEIRA, R. L.; ZANOTTO, E. D. Biosilicato®: Histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. **Química Nova**, v. 34(7), p. 1231-1241, 2011.

SLOSARCZYKA, A.; PASZKIEWICZA, Z.; PALUSZKIEWICZ, C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. **Journal of Molecular Structure**, v. 744–747, p. 657–661, 2005.

TAMARI, S. Optimum design of the constant-volume gas pycnometer for determining the volume of solid particles. **Measurement Science and Technology**, v.15, p.549–558, 2004.

TAMARI, S.; AGUILAR-CHÁVEZ, A. Optimum Design of Gas Pycnometers for Determining the Volume of Solid Particles. **Journal of Testing and Evaluation**, v.33(2), 2005.

THIND, K. S. et al. Soluble Borate Glasses: In Vitro Analysis. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 90(2), p. 467-471,2007.

THOMMES, M. et al. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 87 (9-10), 1051-1069, 2015.

UO, M. et al. Properties and cytotoxicity of water soluble Na2O - CaO - P2O5 glasses. **Biomaterials,** v.19, 2277-2284, 1998.

VALLET-REGI, M. Ceramics for medical applications. **Journal of Chemistry Society: Dalton Perspective**, p. 97–108, 2001.

WACLAWSKA, I. SZUMERA, M. Influence Of MgO (CaO) On The Structure Of Silicate-phosphate Glasses TA And NMR Study. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v. 84 (1), p. 185–190, 2006.

WANG, P. et al. Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process. **Powder Technology**, v. 203, p. 315–321, 2010.

WÓJCIK, N. A. et al. Electrical properties of Na_2O-CaO-P_2O_5 glasses doped with $SiO_2$and Si_3N_4. **Solid State Ionics**, v.325, p.157–162, 2018.

XIA, W.; ZHANG, D.; CHANG, J. Fabrication and in vitro biomineralization of bioactive glass (BG) nanofibres. **Nanotechnology**, v. 18, 135601(7 p.), 2007.

ZHANG, Z. -G. et al. Advances in bone repair with nanobiomaterials: mini-review. **Cytotechnology**, v. 63, p. 437-443, 2011.

ZHENG, K. et al. Characteristics and biocompatibility of Na_2O–K_2O–CaO–MgO–SrO–B_2O_3–P_2O_5 borophosphate glass fibers. **Journal of Non-Crystalline Solids,** v. 358, p. 387–391, 2012.

ZIA, R. et al. In-Vitrobioactivity Evaluation of K_2O-Substituted Na_2O-CaO-P_2O_5-SiO_2 Glass Bioceramics. **Surface Review and Letters**, v. 25(5), 7 p., 2018.

ZIELNIOK, D.; CRAMER, C; ECKERT, H. Structure/Property Correlations in Ion-Conducting Mixed-Network Former Glasses: Solid-State NMR Studies of the System Na_2O - B_2O_3 - P_2O_5. **Chemistry of Materials**, v.19, p. 3162-3170, 2007.