



**Marinélia de Neto  
Capela**

**Vidros e vitrocerâmicos bioativos e antibacterianos  
dopados com prata**





**Marinéia de Neto  
Capela**

**Vidros e vitrocerâmicos bioativos e antibacterianos  
dopados com prata**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes, Professora Associada no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria Paula da Silva Seabra, Equiparada a Investigadora Auxiliar no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro.



## **o júri**

presidente

**Professor Doutor José Maria da Fonte Ferreira**

Professor Associado com Agregação no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro.

**Doutora Bárbara Joana Martins Leite Ferreira**

Bolseira de Pós-Doutoramento no Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

**Professora Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes**

Professora Associada no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro. (Orientadora)



## **agradecimentos**

Às minhas orientadoras, a Professora Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes e a Doutora Maria Paula da Silva Seabra por todos os conhecimentos transmitidos, disponibilidade, orientação e acompanhamento durante a elaboração deste trabalho.

À Professora Doutora Sílvia Denofre de Campos, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasil, pela disponibilidade e partilha de conhecimentos.

Ao Professor Doutor António Carlos Matias Correia e à Doutora Cláudia Sofia Soares de Oliveira, do CESAM, Universidade de Aveiro, pela realização dos ensaios de avaliação da atividade antibacteriana e pelo apoio na interpretação dos resultados obtidos.

Aos meus colegas de laboratório pela incansável ajuda e discussão de ideias.

Às técnicas Ana Sofia Marques Ribeiro, Célia Cristina Moreira Pereira Miranda e Maria João de Pinho Bastos, do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica, Universidade de Aveiro, pela realização das análises de DRX, BET, Dilatometria e Coulter.

Às técnicas Maria Celeste Coimbra Azevedo e Marta Ascensão Carmona Ferro, do CICECO, Universidade de Aveiro, pela realização das análises de FTIR e de SEM/EDS respetivamente.

Ao Professor Manuel Joaquim Peixoto Marques Ribeiro, do Instituto Politécnico de Viana do Castelo, pela realização das ATD.

Ao Professor Alessandro Gualtieri, do Departamento de Scienze Chimiche e Geologiche, Università di Modena e Reggio Emilia, e ao David Maria Tobaldi, bolseiro de pós-doutoramento, do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica, Universidade de Aveiro, pela quantificação das fases presentes nas amostras vitrocerâmicas pelo método de Rietveld.



## palavras-chave

Vidro, Vitrocerâmico, Bioativo, Antibacteriano, Prata

## resumo

O perigo de infecção após cirurgia de implante tem estimulado investigações sobre as potenciais propriedades antimicrobianas de vidros bioativos. O presente trabalho teve como objetivo produzir vidros e vitrocerâmicos bioativos, que, para além de promoverem a regeneração do tecido ósseo, possam destruir localmente de uma forma eficaz invasores patogénicos por libertação de um agente antibacteriano de uma forma controlada e contínua.

Um vidro de composição molar 25,43% SiO<sub>2</sub> : 32,68% CaO : 10,89% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : 31,00% MgO e o mesmo vidro dopado com 1 e 2 mol% Ag<sub>2</sub>O, escolhido como agente antibacteriano, foram preparados pelo método de fusão e vazamento sob a forma de frita e de blocos monolíticos. As amostras foram caracterizadas por DRX, SEM/EDS, FTIR/ATR, ATD e AD.

Para obtenção de vidros cerâmicos com diferentes percentagens de fase cristalina, algumas amostras foram sujeitas a tratamentos térmicos adicionais a 785, 800, 815 e 830 °C, temperaturas escolhidas de acordo com os resultados obtidos por ATD. Estas amostras foram caracterizadas por SEM/EDS, FTIR/ATR, DRX e a quantificação das fases presente foi determinada pelo método de Rietveld.

Quer os materiais vítreos quer os vitrocerâmicos foram caracterizados em termos da sua taxa de dissolução, bioatividade em meio fisiológico sintético acelular e atividade antibacteriana contra a *Escherichia coli* (*E. coli*).

Nos testes de dissolução em água destilada todas as amostras apresentaram um aumento da percentagem de perda de peso com o tempo de imersão, até 168 horas para as fritas e 504 horas para os monolíticos, sem que tenham ocorrido alterações significativas de pH. A introdução de prata e a presença de fase cristalina favoreceram a degradação das amostras nos intervalos de tempo estudados.

Nos ensaios de mineralização em SBF, até 168 horas para as fritas e 504 horas para os monolíticos, todos os vidros e vidros cerâmicos desenvolvidos revelaram ser potencialmente bioativos, tendo-se verificado que o desencadear dos processos que levam à formação da camada apatítica ocorreu mais cedo nas amostras vitrocerâmicas. Para estudar as transformações ocorridas na superfície das amostras foram utilizadas as técnicas SEM/EDS, DRX e em algumas amostras FTIR/DRIFT. Durante os intervalos de tempo estudados não ocorreram alterações significativas do pH do SBF. As alterações da concentração iónica do SBF foram monitorizadas por ICP, tendo-se verificado que até às 168 horas de imersão todas as amostras de frita com prata na sua composição libertam esse elemento para o SBF em concentrações iónicas abaixo do limite de toxicidade.

A atividade antibacteriana das amostras vítreas e vitrocerâmicas de frita contra a *E. Coli* foi avaliada de acordo com a norma ASTM E 2149. Verificou-se que para a mesma concentração, a diminuição da granulometria ou o aumento da % de Ag<sub>2</sub>O adicionado melhoraram as propriedades antibacterianas das amostras vítreas. As amostras vitrocerâmicas estudadas não apresentaram comportamento antibacteriano para a concentração e granulometria utilizadas. Os resultados experimentais obtidos demonstram que os vidros e vitrocerâmicos bioativos dopados com prata estudados são uma abordagem eficaz para minimizar o risco de infecção nos locais de implantação, podendo a sua atividade antibacteriana ser controlada por alteração da composição, da granulometria ou pelo controlo da percentagem das fases presentes.



## keywords

Glass, Glass Ceramic, Bioactive, Antibacterial, Silver

## abstract

The danger of infection after implant surgery has stimulated the study of the potential antimicrobial properties of bioactive glasses. This study aimed to produce bioactive glasses, which, in addition to promoting the regeneration of bone tissue, can locally destroy pathogenic invaders by release of an antibacterial agent in a controlled and continuous manner.

A bioactive glass composition (mol%) 25,43 % SiO<sub>2</sub> % : 32,68 % CaO : 10,89 % P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : 31,00 % MgO and the same glass modified with 1 and 2 mol % Ag<sub>2</sub>O, chosen as antibacterial agent, were prepared by the melting quenching technique under the form of monolithic and frit samples. The samples were characterized by XRD, SEM/EDS, FTIR/ATR, DTA and dilatometric analysis.

Some samples were submitted to additional heat treatment at 785, 800, 815 and 830 °C, temperatures chosen in accordance with the DTA results, to obtain glass ceramics with different percentages of crystalline phase. These samples were characterized by SEM/EDS, FTIR/ATR, XRD and the quantification of phases was obtained using the Rietveld method.

Glassy and glass ceramic materials were characterized in terms of its dissolution rate, bioactivity in a acellular simulated body fluid environment and antibacterial activity against *Escherichia coli* (*E. coli*).

During the studied time intervals, up to 168 hours to frit and 504 hours for monolithic, all samples showed an increase of the weight loss percentage with the immersion time in distilled water, without the occurrence of significant changes in pH. Weight losses were higher in vitreous silver doped samples and glass ceramic samples.

After soaking in SBF, up to 168 hours to frit and 504 hours for monolithic, glasses and glass ceramic samples have proven to be potentially bioactive, starting the formation of the apatite layer early on the glass ceramic samples. SEM/EDS, XRD and, in some samples FTIR/DRIFT, were used to study the surface transformation of the samples. During the studied time intervals there were no significant changes in SBF pH. Changes in ionic concentration of the SBF were monitored by ICP, and it was found that up to 168 hours of soaking all frit samples with silver on their composition release this element to the SBF in ionic concentrations below toxicity values.

The antibacterial activity of the glass and glass ceramic frit samples against *E. coli* was evaluated according to ASTM E 2149 method. It was found that for the same concentration, decreasing the particle size or increasing the % of Ag<sub>2</sub>O improved the antibacterial properties of the glassy samples. The studied glass ceramic samples at the used concentration and particle size showed no antibacterial behavior.

The experimental results show that the studied bioactive glasses and glass ceramics doped with silver are an effective approach to minimizing the risk of infection on implantation sites, and their antibacterial activity may be controlled by changing the composition, the particle size or for controlling the percentage of present phases.



# Índice

Índice de Figuras .....	iii
Índice de Tabelas .....	vi
Abreviaturas .....	vii
Capítulo 1 .....	1
1. Introdução e Objetivos .....	3
1.1. Introdução .....	3
1.2. Objetivos .....	4
1.3. Estrutura da tese .....	4
Capítulo 2 .....	5
2. Revisão da Literatura .....	7
2.1. Vidros bioativos .....	7
2.2. Produtos disponíveis de vidros bioativos .....	8
2.2.1. Blocos monolíticos de vidros bioativos .....	9
2.2.2. Particulados de vidros bioativos para regeneração óssea .....	9
2.2.3. Tratamento da hipersensibilidade dentária .....	10
2.2.4. Revestimentos de vidros bioativos .....	11
2.3. Processos de produção de vidros bioativos .....	11
2.4. Vidros cerâmicos bioativos .....	12
2.5. Bioatividade .....	13
2.6. Propriedades antibacterianas .....	16
Capítulo 3 .....	21
3. Procedimento e Técnicas Experimentais .....	23
3.1. Procedimento Experimental .....	23
3.1.1. Preparação de amostras vítreas .....	23
3.1.2. Preparação de amostras vitrocerâmicas .....	24
3.1.3. Ensaio de dissolução em água destilada .....	25
3.1.4. Ensaio de mineralização em fluido fisiológico sintético .....	27
3.1.5. Ensaio de avaliação da ação antibacteriana <i>in vitro</i> .....	29
3.1.6. Esquema resumo do procedimento e técnicas experimentais utilizadas .....	30

3.2. Técnicas Experimentais.....	32
3.2.1. Análise térmica diferencial (ATD) .....	32
3.2.2. Análise dilatométrica (AD) .....	32
3.2.3. Difração de raios-X (DRX).....	32
3.2.4. Análise granulométrica .....	33
3.2.5. Análise da área superficial específica (ASE) .....	33
3.2.6. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) e Espectroscopia de dispersão de energia (EDS).....	34
3.2.7. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	34
3.2.8. Espectrofotometria por plasma com acoplamento indutivo (ICP).....	35
3.2.9. Medição de pH .....	35
Capítulo 4.....	37
4. Apresentação e Discussão de Resultados .....	39
4.1. Caracterização das amostras vítreas.....	39
4.1.1. Amostras de frita .....	39
4.1.2. Amostras monolíticas .....	43
4.2. Caracterização das amostras vitrocerâmicas.....	45
4.2.1. Amostras de frita cristalizada.....	45
4.2.2. Amostras monolíticas cristalizadas .....	50
4.2.3. Quantificação das fases presentes.....	58
4.3. Ensaio de dissolução em água destilada .....	59
4.3.1. Amostras de frita .....	59
4.3.2. Amostras monolíticas .....	61
4.4. Ensaio de mineralização em fluido fisiológico sintético .....	63
4.4.1. Amostras de frita .....	63
4.4.2. Amostras monolíticas .....	72
4.5. Ensaio de avaliação da ação antibacteriana <i>in vitro</i> das amostras de frita .....	79
Capítulo 5.....	83
5. Conclusões e Trabalho Futuro .....	85
5.1. Conclusões.....	85
5.2. Trabalho futuro .....	87
Referências.....	89

## Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema resumo do procedimento e técnicas experimentais utilizadas.....	31
Figura 2 - Difractogramas de raios-X das amostras em pó de G0F, G1F e G2F.....	39
Figura 3 - Imagens por SEM das fritas G0F (a), G1F (b) e G2F (c) depois de moídas e peneiradas em tela de 20 µm.....	40
Figura 4 - Curvas de ATD obtidas para as fritas G0F, G1F e G2F.....	41
Figura 5 - Espectros FTIR/ATR das amostras G0F, G1F e G2F.....	42
Figura 6 - Difractogramas de raios-X das amostras monolíticas G0M, G1M e G2M moídas. ....	43
Figura 7 - Curvas dilatométricas das amostras G0M, G1M e G2M. ....	44
Figura 8 - Difractogramas de raios-X dos pós de frita G0F, antes e após tratamento térmico de 1 hora, às temperaturas indicadas. A inserção mostra a ATD da G0F na gama de 650-1050 °C.....	46
Figura 9 - Difractogramas de raios-X dos pós de frita G1F, antes e após tratamento térmico de 1 hora, às temperaturas indicadas. A inserção mostra a ATD da G1F na gama de 650-1050 °C.....	46
Figura 10 - Difractogramas de raios-X dos pós de frita G2F, antes e após tratamento térmico de 1 hora, às temperaturas indicadas. A inserção mostra a ATD da G2F na gama de 650-1050 °C.....	47
Figura 11 - Espectros FTIR/ATR das amostras G1F, G1F 800 e G1F 830. ....	48
Figura 12 - Distribuição granulométrica dos pós de frita moídos. ....	49
Figura 13 - Imagem em SEM da superfície de uma partícula de G2F após tratamento térmico a 815 °C. ....	50
Figura 14 - Difractogramas de raios-X dos pós de G0M antes e após tratamento térmico de 1 hora às temperaturas indicadas. A inserção mostra a ATD da G0F na gama de 650-1050 °C.....	51
Figura 15 - Difractogramas de raios-X dos pós de G1M antes e após tratamento térmico de 1 hora às temperaturas indicadas. A inserção mostra a ATD da G1F na gama de 650-1050 °C.....	51
Figura 16 - Difractogramas de raios-X dos pós de G2M antes e após tratamento térmico de 1 hora às temperaturas indicadas. A inserção mostra a ATD da G2F na gama de 650-1050 °C.....	52
Figura 17 - Micrografias em SEM das amostras monolíticas, sem e com tratamento térmico, atacadas durante 60 segundos com HNO <sub>3</sub> 1M (a,b,c) e com HCl 1M (d-o). ....	54
Figura 18 - Micrografias em SEM dos monolíticos G0M, G1M e G2M, após tratamento térmico às temperaturas indicadas e ataque químico com HNO <sub>3</sub> 1M (b,c) durante 60 segundos e os restantes com HCl 1M durante 60 segundos. ....	57
Figura 19 - Micrografias obtidas por SEM da amostra G2M tratada termicamente a 785 °C durante uma hora atacada com HCl 1M (a) e com HNO <sub>3</sub> 1M (b).....	58
Figura 20 - Evolução do pH da suspensão com o tempo de imersão das amostras de frita. ....	59

Figura 21 - Evolução da % $\Delta$ P das amostras de frita com o tempo de imersão em água destilada.....	60
Figura 22 - Evolução da variação do valor de pH da suspensão com o tempo de imersão das amostras monolíticas.....	61
Figura 23 - Evolução da % $\Delta$ P das amostras monolíticas com o tempo de imersão em água destilada.....	62
Figura 24 - Evolução do pH do SBF com o tempo de imersão das amostras de frita. ....	64
Figura 25 - Variação das concentrações iónicas de Mg e Si com o tempo de imersão das amostras de frita.....	64
Figura 26 - Variação das concentrações iónicas de Ca e P com o tempo de imersão das amostras de frita.....	65
Figura 27 - Variação da concentração iónica de Ag com o tempo de imersão das amostras de frita.....	66
Figura 28 - Imagens por SEM das amostras de frita após imersão em SBF durante os tempos indicados. ....	67
Figura 29 - Resultados obtidos por EDS para a evolução da razão Ca/P nos precipitados formados sobre as fritas imersas em SBF por vários tempos, em função da % de Ag <sub>2</sub> O adicionada à composição original.....	69
Figura 30 - Resultados obtidos por EDS para a evolução da razão Ca/P nos precipitados formados sobre as fritas imersas em SBF por vários tempos, em função da % de fase cristalina presente na amostra.....	69
Figura 31 - Difractogramas das amostras de G0F após imersão em SBF durante os tempos indicados. ....	70
Figura 32 - Difractogramas das amostras de G1F após imersão em SBF durante os tempos indicados. ....	70
Figura 33 - Difractogramas das amostras de G1F tratadas termicamente (1 hora a 800 °C) após imersão em SBF durante os tempos indicados.....	71
Figura 34 - Difractogramas das amostras de G1F tratadas termicamente (1 hora a 830 °C) após imersão em SBF durante os tempos indicados.....	71
Figura 35 - Difractogramas das amostras de G2F após imersão em SBF durante os tempos indicados. ....	72
Figura 36 - Evolução do pH do SBF com o tempo de imersão das amostras monolíticas. ....	73
Figura 37 - Imagens em SEM das amostras monolíticas após imersão em SBF durante os tempos indicados. ....	74
Figura 38 - Pormenor da superfície da amostra G1M 830 °C após 16 horas de imersão.	75
Figura 39 - Imagens por SEM das amostras monolíticas após imersão em SBF durante os tempos indicados; onde: c), f), i), l) e o) são pormenores da superfície das amostras imersas durante 504 horas.....	76
Figura 40 - Resultados obtidos por EDS para a evolução da razão Ca/P nos precipitados formados sobre os monolíticos imersos em SBF por vários tempos, em função da % de Ag <sub>2</sub> O adicionada à composição original. ....	77
Figura 41 - Resultados obtidos por EDS para a evolução da razão Ca/P nos precipitados formados sobre os monolíticos imersos em SBF por vários tempos, em função da % de fase cristalina presente na amostra.....	78
Figura 42 - Espectros FTIR /DRIFT das amostras imersas durante 504 horas.....	78

Figura 43 - Evolução da percentagem de redução das UFCs com a concentração em pó das fritas (1; 0,1; 0,025 e 0,010 mg mL <sup>-1</sup> ), percentagem de Ag <sub>2</sub> O na frita e granulometria das amostras. ....	80
Figura 44 - Percentagem de redução das UFCs a uma concentração de 0,025 mg mL <sup>-1</sup> em função da percentagem de fase cristalina presente nas amostras. ....	81

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição molar dos três vidros utilizados neste estudo.....	23
Tabela 2 - Matérias-primas utilizadas.....	23
Tabela 3 - Concentração iônica do plasma humano e do SBF.....	27
Tabela 4 - Ordem de adição, reagente, quantidade, fornecedor e grau de pureza dos reagentes utilizados na preparação de 1 litro de SBF.....	28
Tabela 5 - Composição atômica das fritas em estudo determinada por EDS.....	40
Tabela 6 - Temperaturas relevantes obtidas por ATD.....	41
Tabela 7 - Atribuição das principais bandas de vibração da amostra G0F.....	42
Tabela 8 - Composição atômica das amostras monolíticas determinada por EDS.....	43
Tabela 9 - Temperaturas de amolecimento dilatométrico ( $T_R$ ) e coeficientes de expansão térmica linear ( $\alpha_{200-400}$ ).....	44
Tabela 10 - Resumo das leituras das Figuras 8, 9 e 10.....	47
Tabela 11 - Diâmetro médio das partículas obtido por difração de raios laser.....	49
Tabela 12 - ASE determinada por BET.....	50
Tabela 13 - Resumo das leituras das Figuras 14, 15 e 16.....	52
Tabela 14 - Composição atômica determinada por EDS das amostras monolíticas antes e após tratamento térmico.....	55
Tabela 15 - Fatores de acordo do método Rietveld e composição das amostras vitrocerâmicas.....	58

## Abreviaturas

**VB** - vidros bioativos

**HA** - Hidroxiapatite

**HCA** - Camada de apatite carbonatada

**MEC** - Matriz extracelular

**VEGF** - Fator de crescimento vascular endotelial

**ASE** - Área superficial específica

***E. coli*** - *Escherichia coli*

**ADN** - Ácido desoxirribonucleico

**rpm** - Rotações por minuto

**NIST** - The National Institute of Standards and Technology

**SBF** - Fluido fisiológico simulado acelular

**ASTM** - American Society for Testing and Materials

**UFC** - Número de unidades formadoras de colónias

**ATD** - Análise térmica diferencial

**AD** - Análise dilatométrica

**DRX** - Difração de Raios-X

**BET** - Modelo de Brunauer, Emmet e Teller

**SEM** - Microscopia eletrônica de varrimento

**EDS** - Espectroscopia de dispersão de energia

**FTIR** - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

**ICP** - Espectrofotometria de emissão por plasma com acoplamento indutivo

**T<sub>g</sub>** - Temperatura de transição vítrea

**T<sub>c</sub>** - Temperatura de início do pico de cristalização

**T<sub>p1</sub>** - Temperatura do pico de cristalização

**T<sub>R</sub>** - Temperatura de amolecimento dilatométrico

**%ΔP** - Percentagem de perda de peso



# Capítulo 1

---

## Introdução e Objetivos



# 1. Introdução e Objetivos

## 1.1. Introdução

Os materiais sintéticos ou naturais utilizados para substituir ou complementar as funções dos tecidos vivos são conhecidos como biomateriais, geralmente encontrados nas classes dos polímeros naturais ou sintéticos, metais, compósitos e cerâmicos [1]. O presente trabalho centra-se numa subclasse dos biomateriais cerâmicos, os vidros bioativos (VB).

Desde a introdução por Hench na década de 1970 do Bioglass<sup>®</sup> que os VB têm sido amplamente investigados [2] para diversas aplicações biomédicas, por exemplo como material de enchimento ósseo, em tratamentos de superfície de implantes metálicos ou no fabrico de estruturas porosas temporárias ou *scaffolds* para regeneração óssea. O seu comportamento bioativo vem da sua capacidade de reação com os fluidos fisiológicos e o estabelecimento de uma forte ligação com o tecido ósseo, através da formação de uma camada de hidroxiapatite carbonatada semelhante à do osso [3]. Tipicamente, são utilizados na formulação destes vidros elementos como silício, sódio, potássio, magnésio, oxigénio, cálcio e fósforo, a maioria dos quais produtos fisiológicos presentes na fase mineral do osso, devendo no entanto a concentração destes elementos durante a degradação, ligação e formação de novo osso nunca alcançar concentrações que possam prejudicar os tecidos adjacentes [4].

Com controlo da esterilidade dentro das salas de cirurgia e os adequados protocolos de profilaxia antibiótica, a incidência de infeções associadas aos implantes ortopédicos tem diminuído significativamente. No entanto, a infeção ainda representa uma das complicações mais graves e devastadoras que podem envolver dispositivos biomédicos, podendo ser necessários complexos procedimentos de revisão ou, muitas vezes, a falha do implante e a necessidade da sua total remoção [5]. Devido ao aumento da resistência das bactérias patogénicas aos antibióticos se estar a tornar um grave problema de saúde pública [6], a introdução nos VB de iões de prata, conhecidos por terem propriedades antibacterianas e que podem ser libertados durante a dissolução do vidro, pode ser encarada como uma estratégia alternativa na prevenção de infeções pós-operatórias.

## 1.2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi a obtenção e caracterização de vidros e vidros cerâmicos potencialmente bioativos com propriedades antibacterianas, preparados pelo método convencional de fusão e vazamento. Para tal foi selecionado um vidro, que em trabalhos anteriores do grupo, demonstrou possuir características bioativas em fluidos fisiológicos sintéticos e cuja composição molar é 25,43% SiO<sub>2</sub> : 32,68% CaO : 10,89% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : 31,00% MgO. O agente antibacteriano escolhido foi o óxido de prata tendo o vidro sido dopado com 1 e 2 mol% de Ag<sub>2</sub>O. O estudo centrou-se na influência da adição de diferentes percentagens de óxido de prata e da presença de várias percentagens de fase cristalina, na estrutura, dissolução, potencial bioativo e propriedades antibacterianas das amostras vítreas e vitrocerâmicas obtidas a partir das composições amorfas por vários tratamentos térmicos.

## 1.3. Estrutura da tese

A presente dissertação está dividida em cinco capítulos. No capítulo 1 é feita uma breve introdução ao tema e são apresentados os objetivos e a estrutura da tese. No capítulo 2 é feita uma revisão da literatura. No capítulo 3 são enumeradas as técnicas experimentais utilizadas na caracterização dos materiais em estudo e é descrito detalhadamente todo o procedimento experimental. No capítulo 4 são apresentados, analisados e discutidos os resultados experimentais obtidos. No capítulo 5 são apresentadas as conclusões retiradas da interpretação dos resultados experimentais e são feitas algumas sugestões para trabalho futuro.

# Capítulo 2

---

Revisão da Literatura



## 2. Revisão da Literatura

### 2.1. Vidros bioativos

Atualmente, milhões de próteses, implantes e enxertos ósseos são utilizados para manter a qualidade de vida da população [4], o que torna a reparação e a reconstrução óssea temas de investigação muito importantes [7]. Cientistas e engenheiros de materiais enfrentam, há décadas, o desafio de desenvolver biomateriais avançados para reparar defeitos ou para substituir partes danificadas do corpo humano [4].

Entre os vários materiais utilizados em regeneração óssea, os VB têm atraído grande atenção desde o primeiro relatório dos trabalhos de Hench *et al.* [7] publicado em 1971. Estes autores, verificaram que um vidro com a composição molar: 46,1% SiO<sub>2</sub> : 24,4% Na<sub>2</sub>O : 26,9% CaO : 2,6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, mais tarde chamado de 45S5 e registado pela Universidade da Flórida como Bioglass<sup>®</sup>, ao ser implantado formava um vínculo tão forte com o osso que apenas podia ser removido pela quebra do mesmo [8]. O comportamento bioativo destes vidros é definido como a capacidade de se ligarem aos tecidos moles e duros por meio de uma série de reações químicas, que produzem uma interface forte e compatível entre o vidro e o tecido [4,9-11]. Quando implantados no tecido ósseo promovem a reparação óssea de forma rápida e eficaz [7,8,12], devido à sua excelente biocompatibilidade e adequada degradação [7].

A descoberta de Hench impulsionou o desenvolvimento de biocerâmicos, tendo sido desenvolvidos novos materiais e produtos obtidos a partir de VB, vidros cerâmicos e cerâmicos, tais como hidroxiapatite (HA) sintética e outros fosfatos de cálcio [8]. Apesar de todos eles terem a capacidade de formar uma ligação interfacial forte com o tecido vivo adjacente, existem diferenças ao nível do mecanismo de ligação, do tempo que esta demora a processar-se, da espessura da camada de ligação, etc [13,14].

Nos VB, a dissolução da rede vítrea, o desenvolvimento de uma camada de gel rica em sílica e a deposição de uma camada de apatite carbonatada (HCA) biologicamente ativa (semelhante à apatite fisiológica) sobre a superfície do vidro [8,9,12,15,16], quando implantado ou em contacto com fluidos fisiológicos [9], são tidos como passos essenciais para a ligação destes biomateriais com os tecidos *in vivo* [12],

Testes *in vitro*, que envolvem a imersão dos VB em fluidos fisiológicos simulados, têm demonstrado mecanismos semelhantes para a formação da camada de apatite, aos observados *in vivo* [12]. Pensa-se que a HCA interage com as fibrilas de colagénio para se integrar com o osso hospedeiro e que os produtos da dissolução do vidro estimulam as células osteogénicas a produzir matriz óssea [8]. Tem também sido demonstrado que os VB proporcionam um ambiente ideal para a colonização, proliferação e diferenciação de osteoblastos humanos [9,15]. Os osteoblastos que estejam na fase adequada do seu ciclo de vida amadurecem, proliferam e regeneram novo tecido ósseo. Os que não estão na fase adequada do seu ciclo de vida sofrem apoptose. Estes resultados mostram que um certo nível de citotoxicidade seletiva (relativamente aos osteoblastos) poderá não inviabilizar a regeneração do tecido ósseo [15].

## 2.2. Produtos disponíveis de vidros bioativos

A mais importante aplicação para os cerâmicos bioativos são o tratamento de defeitos ósseos, que podem ocorrer como consequência de trauma, malformações congénitas ou doenças, por exemplo a osteoporose ou a remoção de tumores, sendo utilizados como uma alternativa sintética ao transplante autólogo. O osso, depois do sangue, é o tecido mais vulgarmente transplantado. O transplante autólogo envolve o transplante de osso de uma outra parte do corpo do paciente, geralmente da pélvis, para o local do defeito. As principais desvantagens dos transplantes autólogos são o fornecimento limitado de osso e o facto de uma grande parte dos pacientes sofrerem de dor intensa no local doador. Estudos clínicos e *in vivo* sobre particulados de VB disponíveis comercialmente, demonstraram que estes podem ter um melhor desempenho do que outras partículas biocerâmicas, mas não tão bom como o transplante ósseo autólogo [8].

Devido à elevada qualidade na integração e regeneração dos tecidos, os VB têm sido utilizados clinicamente em ortopedia e medicina dentária [8-10,16], sob a forma de blocos monolíticos, particulados ou grânulos [8], e como *scaffolds* na engenharia de tecidos [1,3,8,9,16-19]. Granulados de vidro bioativo estão disponíveis comercialmente para a cirurgia do ouvido, enchimento de cavidades ósseas periodontais [8-10,12,15], enchimento ósseo após a extração de tumores, reparação de defeitos calvários nos ossos do crânio e cirurgia maxilo-facial [8-10,15].

### **2.2.1. Blocos monolíticos de vidros bioativos**

O primeiro produto a ficar disponível no mercado foi uma prótese, sob a forma de cones (disponível em três tamanhos), para o ouvido médio, MEP® [8,15], fabricada por fusão e moldagem de Bioglass®. Esta prótese que foi desenhada para substituir os ossos do ouvido médio e transmitir o som do tímpano para a cóclea, permitiu restaurar a audição de pacientes com surdez devido à degradação dos ossos causada por infecção [8,19].

O segundo implante fabricado em Bioglass® monolítico, também sob a forma de um simples cone, a ficar disponível comercialmente foi o ERMI®. Este é utilizado no preenchimento dos alvéolos resultantes da extração de dentes [8,15] proporcionando uma fixação para as próteses dentárias [8].

Nenhum dos dois produtos referidos anteriormente é utilizado amplamente devido ao facto de possuírem um tamanho fixo. Os cirurgiões preferem dispositivos que possam moldar e cortar em função do caso cirúrgico. O Bioglass® monolítico é mais adequado para implantes feitos por medida para colmatar as necessidades de cada paciente [8]. O recente desenvolvimento de novas técnicas de prototipagem rápida pode favorecer o fabrico de moldes para este tipo de aplicação.

### **2.2.2. Particulados de vidros bioativos para regeneração óssea**

Médicos dentistas e cirurgiões ortopédicos preferem utilizar partículas ou grânulos para preencher um defeito dada a facilidade com que podem ser pressionados/moldados. O primeiro produto particulado de Bioglass® 45S5 foi o PerioGlas® (agora vendido pela NovaBone Products LLC, Alachua, FL) [8,19]. Este apareceu no mercado em 1993 como enxerto ósseo sintético para a reparação de defeitos na mandíbula, resultantes de doença periodontal. Pode ser utilizado para regenerar osso danificado, em torno da raiz de um dente saudável para salvar o dente, ou na reparação óssea da maxila, de modo a que esta esteja apta para a fixação de implantes de titânio. Sob a forma de pasta, este produto pode também ser utilizado para esterilização do canal radicular antes da inserção de implantes. Convencionalmente, é utilizado o hidróxido de cálcio para elevar o pH a níveis bactericidas, mas uma pasta de Bioglass® 45S5 é uma alternativa possível pois

partículas finas, em concentração elevada, podem igualmente provocar um aumento de pH [8].

Para aplicação como enxerto ósseo ortopédico foi lançado em 1999 outro particulado à base de 45S5, o NovaBone® (Nova-Bone Products LLC) [8,19]. Os cirurgiões normalmente misturam o particulado com sangue do local do defeito e, quando este começa a coagular, preenchem o defeito com a mistura. O sangue melhora a manipulação do material e os fatores de crescimento e as células presentes poderão ajudar a reparação óssea [8]. Outros produtos estão atualmente disponíveis no mercado como o Biogran® (BIOMET 3i, Palm Beach Gardens, FL) e o BonAlive® (BonAlive Biomaterials, Turku, Finland) [8].

Uma desvantagem do Bioglass® e do BonAlive® sobre outros materiais biocerâmicos é cristalizarem durante a sinterização, o que não permite a produção de *scaffolds* amorfos para enxertos ósseos sintéticos regenerativos. O conceito de regeneração óssea baseia-se na utilização de um *scaffold* que pode agir como um suporte tridimensional temporário para guiar a reparação óssea. Idealmente, o *scaffold* deve estimular os mecanismos de regeneração natural do corpo humano. Os vasos sanguíneos também devem penetrar para que o novo osso possa sobreviver. Com o tempo, o *scaffold* deve-se degradar, deixando o osso remodelar naturalmente [3,8,19]. Após compreensão de como a estrutura atômica e a conectividade da rede se relacionam com a sinterização e a bioatividade dos vidros, novas composições, que podem ser sinterizadas sem cristalização, têm sido desenvolvidas. O uso de novas técnicas de conformação, como o *gel-cast foaming*, o *sol-gel foaming* e o *solid freeform fabrication*, permitem a produção de estruturas que imitam o osso poroso. A regeneração óssea é favorecida se o *scaffold* puder ser sujeito a cargas, mas os *scaffolds* porosos só podem ser utilizados em locais sujeitos a cargas reduzidas ou apenas compressivas. Estes *scaffolds* deverão ainda ser facilmente modelados pelos cirurgiões e partilhar cargas cíclicas com o osso hospedeiro [8].

### 2.2.3. Tratamento da hipersensibilidade dentária

Um particulado muito fino de Bioglass® 45S5 chamado NovaMin® (NovaMin Technology, FL; actualmente propriedade da GlaxoSmithKline, UK), tem sido utilizado, desde 2004, num dentífrico para o tratamento da hipersensibilidade dentária. Os

dentífricos tradicionais para tratamento da hipersensibilidade dentária contêm substâncias químicas, como o nitrato de potássio, que temporariamente anestesia os nervos e evitam a dor. Estudos clínicos mostram que as partículas de Bioglass® 45S5 aderem à dentina e formam uma camada de HCA com composição semelhante ao esmalte dos dentes, aliviando a dor por períodos mais longos [8].

#### 2.2.4. Revestimentos de vidros bioativos

Revestimentos bioativos são importantes para implantes metálicos, tais como as próteses de anca e os implantes dentários, porque os metais, sendo bioinertes, são encapsulados com tecido fibroso após implantação. Os revestimentos bioativos têm a capacidade de melhorar a estabilidade dos implantes ligando-os ao tecido ósseo hospedeiro [8]. Este tipo de ligação é vantajosa, dado que evita possíveis deslocamentos do implante e pode, eventualmente, tornar dispensáveis os cimentos e os dispositivos mecânicos de fixação geralmente associados aos implantes bioinertes [15]. No entanto, os VB, dado que são biodegradáveis, podem causar a instabilidade do implante metálico a longo prazo [8].

Suturas cirúrgicas revestidas por partículas de vidro bioativo dopado com prata, com propriedades antimicrobianas e bactericidas, obtidas por *slurry dipping*, encontram-se disponíveis no mercado com as designações Vicryl® e Mersilk® [4].

### 2.3. Processos de produção de vidros bioativos

Os VB podem ser produzidos por fusão tradicional ou pelo método sol-gel [8,9,11,12]. Originalmente foram preparados por fusão da mistura das matérias-primas precursoras a temperaturas relativamente altas [8,12,20] (> 1300 °C), em cadinhos de platina e vertidos para um molde de grafite (para a obtenção de blocos monolíticos) ou para água (para obtenção de frita) [8]. No entanto, os avanços na tecnologia do processo sol-gel têm permitido o fabrico de uma nova geração de VB, a temperaturas significativamente mais baixas [8,11,20]. Os resultados de estudos *in vitro*, em fluido fisiológico simulado, e *in vivo*, em animais, demonstraram que os vidros sintetizados por sol-gel são mais bioativos e biodegradáveis [20]. Os níveis de bioatividade, isto é, a taxa

de formação da camada de apatite e a sua espessura, dependem da composição química do vidro e de parâmetros morfológicos, tais como a área superficial específica (ASE) o tamanho e volume dos poros [12,16]. Muitos estudos *in vivo*, utilizando materiais bioativos para enchimento de defeitos ósseos, demonstraram que a taxa de formação da camada de apatite na superfície destes materiais controla as taxas de crescimento e de formação de osso novo. Portanto, a possibilidade de controlar as reações envolvidas na formação da camada de apatite é muito importante para otimizar o processo de cicatrização [12].

Comparativamente com os vidros obtidos por sol-gel, os vidros de fusão originam, geralmente, partículas com menor ASE, devido sobretudo à natureza altamente porosa do material obtido, o que tem consequências diretas na respetiva taxa de degradação. A alteração do tamanho médio de partícula pode conseguir-se variando o tempo de moagem, um método que parece eficiente para controlar as taxas de dissolução dos vidros obtidos por fusão. A cristalização parcial de vidros preparados por fusão, de que resultam vidros cerâmicos, e a produção de estruturas altamente porosas (como os *scaffolds* para a engenharia de tecidos) têm sido relatados como alternativas para controlar as taxas de dissolução e a bioatividade [12].

## 2.4. Vidros cerâmicos bioativos

Os vidros cerâmicos formam-se por cristalização controlada de um vidro base e são compostos por uma ou mais fases cristalinas que precipitam no seio de uma matriz vítrea residual. Estes vidros são produzidos em pelo menos duas etapas, a fusão e formação do vidro e a ceramização [13]. O desenvolvimento de cristais no vidro base ocorre por formação de núcleos (nucleação) e posterior crescimento para originar estruturas com identidade cristalina (crescimento cristalino).

Os materiais vitrocerâmicos são geralmente caracterizados por apresentarem dureza e resistência mecânica elevadas, excelente resistência ao desgaste e facilidade de conformação por moldagem do vidro fundido, sendo pequenas as alterações dimensionais sofridas durante a cristalização [15]. Uma vantagem relevante no campo das aplicações biomédicas é o facto de a sua bioatividade poder ser manipulada através do controlo da percentagem e natureza das fases cristalinas presentes [21]. Em geral os

VB ceramizados são estáveis durante um período de tempo considerável, devido a um decréscimo de solubilidade quando comparados com os respectivos vidros-base [15].

No desenvolvimento de vidros cerâmicos para aplicações biomédicas devem ser referidos dois tipos de materiais, que diferem na aplicação e, como consequência, nas propriedades pretendidas: materiais para utilização em ortopedia e materiais usados em medicina dentária [13]. A ortopedia requer biocompatibilidade e, na maior parte dos casos, bioatividade. Dependendo da sua aplicação, se vai ou não ser sujeito a cargas elevadas, os vidros cerâmicos podem necessitar de cumprir certos requisitos no que diz respeito à dureza, módulo de Young e resistência à fratura [13]. Nos vidros cerâmicos para aplicações dentárias restaurativas os requisitos são diferentes uma vez que estes materiais têm de ser compatíveis com o ambiente oral, mas não deve ocorrer bioatividade na superfície do dente restaurado. Neste caso é importante que propriedades como a cor, a dureza e o desgaste sejam idênticas às do dente natural. Tendo em conta os requisitos, são utilizados sistemas químicos distintos e o desenvolvimento do vidro cerâmico é centrado em diferentes fases cristalinas que apresentam propriedades distintas [13].

Na área da ortopedia existem no mercado alguns vitrocerâmicos para aplicações biomédicas como, por exemplo, o Ceravital®, o Biogran®, o Bioverit® e o Cerabone®. Estes biomateriais têm sido utilizados como particulados para regeneração óssea, vértebras artificiais, scaffolds em engenharia de tecidos, espaçadores ilíacos, espaçadores intervertebrais, implantes do ouvido médio e como substitutos de pequenos ossos [22].

Estão disponíveis vidros cerâmicos que podem ser utilizados no tratamento e restauração de dentes, ou em coroas e facetas graças a possuírem translucidez, opalescência, brilho, e coloração, semelhantes à dos dentes naturais [15,22], por exemplo o IPS e.max® ou o Dicor®. Outro vitrocerâmico, o Biosilicate®, é utilizado no tratamento da sensibilidade dentária [22,23].

## **2.5. Bioatividade**

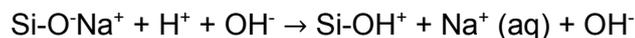
A resposta biológica aos materiais artificiais depende de vários parâmetros, tais como a composição química, topografia, porosidade e tamanho de grão [24]. A ligação dos VB ao tecido ósseo é atribuída à formação de uma camada de HCA quando entram

em contacto com os fluidos fisiológicos, a qual interage com as fibrilas de colagénio do osso danificado formando uma ligação. A formação da camada de HCA é bem compreendida, mas as interações biológicas na interface osso hospedeiro-HCA ainda não. Pensa-se que a ligação do tecido ósseo à camada de HCA envolve a adsorção de proteínas, a incorporação das fibrilas de colagénio, a ligação de células progenitoras do osso, a diferenciação celular e a produção de matriz extracelular (MEC) óssea, seguindo-se a sua mineralização. No entanto, são escassas as evidências para cada uma destas etapas [8].

A formação da camada de HCA é mediada e seguida pela dissolução do vidro, com um mecanismo muito semelhante à sua corrosão convencional. A acumulação dos produtos da dissolução provoca alteração da composição química e do pH da solução, proporcionando locais na superfície do vidro e condições de pH favoráveis à nucleação da HCA. A osteogénese está relacionada com a ação dos produtos da dissolução dos VB nas células osteoprogenitoras, estimulando o crescimento de osso novo. No entanto, a camada de HCA também proporciona uma superfície adequada para fixação e proliferação de células osteoprogenitoras. As condições ideais em termos de topografia da superfície e composição química ainda não foram identificadas [8].

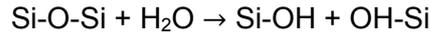
Hench e os seus colaboradores propuseram um mecanismo para a mineralização da HCA estabelecido com base nos estudos realizados com VB da série Bioglass® [15]. Foram propostas cinco etapas (referentes às reações de carácter inorgânico) para a formação de HCA em fluido fisiológico *in vivo* ou em fluido fisiológico simulado *in vitro* [8,13,15,21]:

i) Ataque protónico rápido à rede vítrea, envolvendo permuta entre iões alcalinos ( $\text{Na}^+$ ) e/ou alcalino terrosos ( $\text{Ca}^{2+}$ ) do vidro por  $\text{H}^+$  ou  $\text{H}_3\text{O}^+$  da solução, criando ligações silanol ( $\text{Si-OH}$ ) na superfície do vidro:



O pH da solução aumenta e forma-se uma região rica em sílica junto à superfície do vidro. Se presente na composição o fosfato também é perdido pelo vidro.

ii) O aumento local de pH leva ao ataque da rede de sílica do vidro por  $\text{OH}^-$ , quebrando as ligações Si-O-Si. A sílica solúvel é perdida sob a forma de  $\text{Si}(\text{OH})_4$  para a solução, deixando mais Si-OH (silanóis) na interface solução-vidro:



iii) Condensação e repolimerização de grupos Si-OH perto da superfície do vidro, formando-se deste modo uma camada de sílica gel com redução do teor em íões alcalinos e alcalino terrosos. Esta etapa pode ser ligeiramente acelerada pela presença de íões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  em solução.

iv) Migração de íões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , presentes na rede vítrea, para a superfície da camada de sílica gel, através da estrutura bastante aberta do gel. Segue-se o crescimento de um filme amorfo de  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  na camada rica em sílica por incorporação de íões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  provenientes da solução.

v) Incorporação de  $\text{OH}^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$  (e eventualmente  $\text{F}^-$ ) da solução e cristalização do filme amorfo  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  em HCA. Esta etapa ocorre com maior rapidez caso se encontrem presentes em solução íões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ .

A composição do vidro é a variável que possui a maior influência na taxa de formação da camada de HCA e de ligação ao tecido ósseo. Essencialmente, numa rede de sílica menos interligada, é maior a propensão para a dissolução e, portanto, as etapas acima listadas podem acontecer mais rapidamente. Foi demonstrado que a bioatividade está diretamente relacionada com a energia de ativação da dissolução da sílica no vidro [8]. O mecanismo inicialmente proposto por Hench e seus colaboradores foi posteriormente desenvolvido e expandido por diversos autores que o aplicaram a novos tipos de vidros e vitrocerâmicos bioativos, que não os inicialmente considerados [15].

Após a formação da camada de HCA, ocorre a adsorção das proteínas na sua superfície, as células ligam-se, diferenciam-se e produzem matriz óssea. Os osteoblastos humanos cultivados em VB produzem uma MEC com colagénio que mineraliza formando nódulos de osso mesmo sem os suplementos habituais de hormonas presentes no meio de cultura e sem a existência de fosfato na composição do vidro. Outros biocerâmicos precisam da adição de suplementos osteogénicos ao meio para ocorrer a formação de nódulos ósseos. A dissolução de íões de cálcio e de sílica a partir de VB parece estimular a divisão celular de osteoblastos, a produção de fatores de crescimento e de proteínas da MEC [8]. O efeito dos produtos de dissolução de VB de silicato e de vitrocerâmicos em relação a osteogênese e angiogênese têm sido amplamente investigados. A vascularização é determinante na regeneração de grandes defeitos. Vasos sanguíneos devem desenvolver-se dentro do defeito, caso contrário, qualquer novo osso formado vai

morrer, pois não terá acesso a nutrientes. A angiogénese, associada ao desenvolvimento de novos vasos sanguíneos num tecido vivo, pode ser estimulada através do fornecimento de fatores de crescimento, como, por exemplo, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Estudos *in vitro* sugerem que os produtos de dissolução de VB podem estimular os fibroblastos a secretar VEGF e a proliferação das células endoteliais [8].

As propriedades do vidro, por exemplo a sua velocidade de dissolução e, por conseguinte, a taxa de formação da camada de HCA, dependem da sua estrutura atómica. Compreender o papel dos iões individualmente é também importante para a conceção de novos biomateriais [8]. Os vidros de silicato são constituídos por tetraedros de sílica ligados por pontes de oxigénio. O silício é, por conseguinte, o átomo formador de rede. O tetraedro de sílica e as suas ligações podem ser descritos pela notação  $Q^n$ , onde  $n$  é o número de ligações por pontes de oxigénio. O sódio e o cálcio são modificadores de rede partilhando os oxigénios de tetraedros adjacentes e dando origem a oxigénios não ligantes [8,20]. Um alto teor de sílica corresponde, geralmente, a um vidro com uma rede altamente interligada que contém uma grande proporção de pontes de oxigénio ligantes e, conseqüentemente, baixa dissolução e bioatividade. Em regra, vidros obtidos por fusão com conteúdos de  $SiO_2$  superiores a 60 mol% são bioinertes [8,25]. Vidros preparados por sol-gel podem, no entanto, ser bioativos com percentagens de  $SiO_2$  até 90 mol% [8]. O papel do MgO na bioatividade de vidros é ainda controverso [21,26]. Está reportado na literatura que a adição de MgO diminui a bioatividade de vidros contendo CaO- $SiO_2$  [21,27]. Este facto foi atribuído ao efeito do MgO na supressão da dissolução do cálcio, o que inibe a formação da camada de sílica gel [21,27]. Posteriormente, outros autores mostraram que é possível desenvolver vidros com elevado teor em MgO (~18%) sem perda da sua bioatividade [21,28].

## 2.6. Propriedades antibacterianas

A adesão bacteriana aos biomateriais é um processo extremamente complexo que levanta grande preocupação médica dada a sua influência sobre a morbidade dos pacientes que fazem uso de próteses, envolver avultados gastos [29] e limitar a utilização de muitos dispositivos em aplicações clínicas [16]. Atualmente, o aumento da resistência das bactérias aos antibióticos, causada pelo seu excessivo uso, coloca problemas sérios

no tratamento de doenças infecciosas, bem como na prática epidemiológica. A administração sistêmica de antibióticos é a profilaxia normalmente utilizada contra a infecção bacteriana após cirurgia de implante. No entanto, a depleção indesejável da flora microbiana benigna normalmente presente no corpo está associada à administração parentérica e oral de antibióticos [16]. Além disso, a administração sistêmica de medicamentos, em tal condição clínica, não é suficientemente eficaz devido à deficiente circulação sanguínea no local do ferimento e à baixa concentração local do medicamento [30].

A maioria dos casos de contaminação bacteriana dos biomateriais ocorre durante a sua colocação, por contato direto com o meio externo ou com tecidos colonizados como a pele [29]. Uma situação mais grave é a formação de biofilmes bacterianos [29-32]. Os biofilmes são comunidades sésseis caracterizadas por células ligadas a um substrato, à interface ou umas às outras, embebidas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares por elas produzidas, e que exibem um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e à transcrição de genes. A formação de biofilmes ocorre como resultado de uma sequência de eventos: adesão microbiana superficial, proliferação celular, produção da matriz e desprendimento. As bactérias associadas ao biofilme apresentam diminuição da suscetibilidade aos antibióticos, desinfetantes e às defesas do hospedeiro [29,31,33].

O perigo de infecção após cirurgia de implante tem estimulado investigações sobre as potenciais propriedades antimicrobianas de VB. Estudos tem demonstrado que estes biomateriais obtidos quer por fusão quer por sol-gel, em meio aquoso ou na presença de humidade [34], apresentam atividade antibacterianas contra diversas estirpes, sendo esse comportamento muito dependente da composição, concentração, tamanho de partícula e microrganismo testado [17]. Este efeito é devido à lixiviação de íões a partir da superfície do vidro a qual provoca alterações do valor de pH, da força iônica, e da pressão osmótica, o que contribui para a diminuição da viabilidade dos microrganismos [2,8,15,16,34-40]. Infelizmente, a cultura de outros tipos de células não foi realizada nestes estudos para se verificar se essas condições de pH seriam tóxicas para outras linhagens celulares [8]. A adição de prata baixa as concentrações a que os VB apresentam comportamento antibacteriano. Os íões de prata são incorporados na estrutura do vidro, por adição de um precursor desse elemento às matérias-primas, não formando uma fase separada, assim, a sua taxa de libertação é definida pela taxa global de degradação do vidro [31], permitindo uma libertação controlada deste agente

antibacteriano no local da infecção óssea [20]. Entre os agentes antibacterianos inorgânicos conhecidos, a prata tem sido empregue para combater infecções [9,16,41,42] desde os primórdios das culturas mediterrânea e asiática, encontrando-se bem documentado o uso de folhas de prata no tratamento cirúrgico de feridas e fraturas ósseas [9,16]. O tratamento com prata parece reduzir as fases de granulação e inflamação na cicatrização dos tecidos e induzir a reparação da epiderme [9]. A sua capacidade terapêutica foi comprovada contra uma ampla gama de microrganismos causadores de doenças, mais de 650, mesmo a baixas concentrações [43]. A prata apresenta um efeito bactericida sem toxicidade para as células humanas [30,42,43], para concentrações muito baixas, 0,1 a 1,6 ppm [33,44]. No entanto, em trabalhos recentes, foi referido que o efeito antimicrobiano não está diretamente relacionado com o teor em prata mas sim com o seu estado de oxidação (o estado de oxidação +1 é mais eficaz do que os outros estados de oxidação, +2 e +3), com a coordenação local em torno da prata no vidro e, mais geralmente, com alterações na estrutura do vidro [31].

Os VB são, para além da prata, utilizados como veículo para a entrega localizada e controlada de outros iões metálicos [3]. Deste modo, consegue-se a manutenção da concentração dos iões a níveis terapêuticamente desejáveis no local de reparação, a minimização dos efeitos secundários devido à entrega direcionada do fármaco para um tipo particular de célula ou tecido e a administração potencialmente reduzida ou ótima do fármaco [45,46]. Este tipo de entrega terapêutica é vantajosa pois quando um fármaco é administrado sistemicamente, a um ser humano ou animal, apenas uma pequena fração da dose atinge o tecido alvo, sendo que a maior parte é desperdiçada, devido à sua distribuição por outros tecidos e à sua metabolização ou excreção antes de atingir o local de ação [47]. Os estados de oxidação de alguns iões metálicos serem instáveis e poderem ter efeitos tóxicos quando ingeridos [18] também deve ser tido em consideração, pois impedem a sua administração sistémica. Estudos baseados nos efeitos de iões metálicos numa gama ampla de patologias [48,49] e das suas funções e efeitos biológicos [18,19] são revistos na literatura.

A *Escherichia coli* (*E. coli*) foi escolhida nesta investigação preliminar como exemplo de bactéria gram-negativa porque é encontrada, em concentrações muito elevadas, em sítios de infecção relacionadas com biomateriais [9,10]. As bactérias gram-positivas são menos suscetíveis ao catião  $\text{Ag}^+$  do que as gram-negativas. Existem duas explicações para este facto. O primeiro envolve a carga das moléculas de peptidoglicano na parede celular bacteriana. As bactérias gram-positivas possuem maior quantidade de

peptidoglicano do que as gram-negativas dado que as suas paredes celulares são mais espessas. Como o peptidoglicano é carregado negativamente e os iões de prata são carregados positivamente, mais prata pode ficar ligada ao peptidoglicano em bactérias gram-positivas do que em bactérias gram-negativas. A diminuição da sensibilidade das bactérias gram-positivas também pode simplesmente ser explicada pelo facto da sua parede celular ser mais espessa do que a das bactérias gram-negativas [33,50].

Embora a eficácia da prata como um agente antibacteriano seja um facto estabelecido, o mecanismo responsável pela sua atividade antimicrobiana ainda não é bem conhecido [9,16,34,41] e pode ser diferente dependendo da bactéria [34]. As bactérias tem mais dificuldade em desenvolver resistência à prata do que aos antibióticos convencionais, porque o metal ataca uma ampla gama de alvos nos microrganismos, o que significa que estes teriam que desenvolver, simultaneamente, uma série de mutações para se protegerem [42]. O ião  $\text{Ag}^+$  é transportado através da membrana celular mesmo na ausência de transportadores específicos de prata. É possível que os iões de prata tenham acesso ao interior das células através de proteínas transmembranares que normalmente funcionam para transportar outros iões. É reportado na literatura que a prata, para entrar na célula, compete com o cobre num mecanismo associado ao transporte deste elemento [10]. Embora ainda não tenha sido provado [33], admite-se que os iões de prata, depois de entrarem na célula se associam ao ácido desoxirribonucleico (ADN) bacterial [4,9,30,33,42,43,50]. Foi proposto que o  $\text{Ag}^+$  entra na célula e intercala entre os pares de bases de purina e pirimidina interrompendo a ligação de hidrogénio entre as duas cadeias antiparalelas, desnaturando a molécula de ADN [33]. Como consequência a bactéria perde a sua capacidade de replicação [30,42] e de expressão das proteínas da subunidade ribossomal [42]. Na literatura são referidos três mecanismos que podem levar à morte das células bacterianas quando em contacto com o  $\text{Ag}^+$ . Num é sugerido que o catião  $\text{Ag}^+$  pode ligar-se fortemente a grupos doadores de eletrões em biomoléculas que contenham enxofre, oxigénio ou azoto, o que pode resultar em defeitos na membrana celular das bactérias [9,16,43,50]. A formação de complexos entre proteínas e os catiões  $\text{Ag}^+$  é o outro mecanismo apontado como causador da morte das bactérias por perturbar o seu metabolismo, permeabilidade e respiração [9,16,20,30,33,42,43,50]. Por último é também referido que os iões metálicos catalisam a produção de radicais livres de oxigénio que podem oxidar as estruturas moleculares das bactérias [43].



# Capítulo 3

---

## Procedimento e Técnicas Experimentais



### 3. Procedimento e Técnicas Experimentais

#### 3.1. Procedimento Experimental

##### 3.1.1. Preparação de amostras vítreas

Foi selecionado um vidro de referência, que em trabalhos anteriores demonstrou ter características bioativas em fluidos fisiológicos sintéticos, cuja composição molar é 25,43% SiO<sub>2</sub>: 32,68% CaO : 10,89% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 31,00% MgO, doravante referido como G0.

Procedeu-se à adição de 1 e 2 mol% de Ag<sub>2</sub>O ao G0 (denominados doravante como G1 e G2 respetivamente) com o intuito de se avaliar a influência da presença de iões de prata nas propriedades dos vidros e, em particular, na inibição do crescimento bacteriano. Foi mantida uma razão molar entre o CaO e o P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> de 3:1 a qual é equivalente à existente no osso natural [51]. A composição molar dos três vidros é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1** - Composição molar dos três vidros utilizados neste estudo.

Amostras	Composição (mol%)				
	MgO	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	SiO <sub>2</sub>	Ag <sub>2</sub> O
G0	31,00	32,68	10,89	25,43	-
G1	30,69	32,36	10,78	25,18	0,99
G2	30,39	32,04	10,68	24,93	1,96

Foram utilizadas as matérias-primas, sob a forma de pó, com grau de pureza e fornecedor indicados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Matérias-primas utilizadas.

Matéria-prima	Grau de pureza (%)	Fornecedor
SiO <sub>2</sub>	100,00	Merck
CaCO <sub>3</sub>	99,95	Sigma-Aldrich
MgO	97,00	Sigma-Aldrich
CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	98,00	Fluka
AgNO <sub>3</sub>	99,99	ABC

As matérias-primas necessárias para a preparação de 30 g de cada vidro foram pesadas e homogeneizadas em 30 ml de álcool etílico comercial. Para tal recorreu-se a cubas de ágata e a um moinho planetário. As misturas foram agitadas durante 45 minutos a 250 rpm e, em seguida, foram secas durante 48 horas a 50 °C. A fusão foi realizada em cadinhos de platina-ródio num forno elétrico, em ar, a 1500 °C durante 90 minutos.

Para a produção de fritas, doravante designadas por G0F, G1F e G2F, os fundidos foram vertidos para água à temperatura ambiente. As fritas foram decantadas e secas durante 48 horas a 50 °C. Após a secagem, foram moídas a seco num moinho de ágata e peneiradas com uma tela de 20 µm.

Apenas com o intuito de se realizar um estudo exploratório sobre a influência da distribuição granulométrica nas propriedades antibacterianas das fritas, foram preparadas amostras de granulometria superior (entre 20 e 63 µm).

Para a obtenção de amostras monolíticas das composições G0, G1 e G2, doravante designadas por G0M, G1M e G2M, o fundido foi vertido para um molde de latão pré-aquecido e de forma paralelepípedica. Os blocos monolíticos obtidos foram retirados do molde e imediatamente colocados numa mufla de recozimento durante 1 hora à temperatura de 750 °C (conforme sugerido pelos resultados da ATD) para relaxamento das tensões. Para o arrefecimento até à temperatura ambiente a mufla foi desligada. Os blocos monolíticos de forma paralelepípedica foram cortados em fatias, numa máquina de corte com disco diamantado e, em seguida, as fatias foram polidas, com lixas de granulometria sucessivamente mais fina. O acabamento final foi efetuado com um pano de veludo molhado com uma suspensão de diamante (2 µm) utilizando uma polidora [52]. Após o polimento as amostras foram limpas com água destilada em ultrassons.

### **3.1.2. Preparação de amostras vitrocerâmicas**

Para a obtenção de materiais vitrocerâmicos com diferentes fases cristalinas e percentagens de fases foram realizados vários tratamentos térmicos, em ar, a amostras de frita moída e de monolíticos polidos, das três composições em estudo.

Utilizando um forno tubular de pequenas dimensões (diâmetro=5,6 cm e comprimento=50,0 cm) as amostras foram sujeitas a um aquecimento a 10 °C min<sup>-1</sup>,

seguindo-se um patamar a temperaturas pré-selecionadas com base nos resultados obtidos por ATD durante 1 hora e, por fim, um arrefecimento a  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até à temperatura ambiente. Foram utilizadas quatro temperaturas de patamar: 785, 800, 815 e 830  $^{\circ}\text{C}$ . As amostras de frita cristalizada foram moídas e peneiradas numa tela de 20  $\mu\text{m}$  por forma a garantir um tamanho máximo de partícula idêntico ao das amostras G0F, G1F e G2F.

Foram selecionadas para os ensaios de quantificação de fases as amostras com 1 mol% de  $\text{Ag}_2\text{O}$ , de frita e de monolíticos, tratadas termicamente a 800 e 830  $^{\circ}\text{C}$  durante uma hora, doravante designadas por G1F 800, G1F 830, G1M 800 e G1M 830. As percentagens das fases (amorfa e cristalina) presentes nas amostras vitrocerâmicas selecionadas foram determinadas utilizando o método de Rietveld, descrito por A. Gualtieri [53] e A. Gualtieri e G. Brignoli [54]. Para a realização das análises de DRX as amostras foram previamente misturadas com 10% em peso de corindo *The National Institute of Standards and Technology* - (NIST) 676, utilizado como padrão e tratado nos refinamentos como uma fase adicional [55]. O refinamento de Rietveld foi efetuado com o auxílio do programa GSAS (General structure analysis system) [56] e com a sua interface gráfica EXPGUI [57].

### 3.1.3. Ensaios de dissolução em água destilada

O estudo da dissolução de todas as amostras foi efetuado em água destilada (pH=6,0) a 37  $^{\circ}\text{C}$  e em condições estáticas, tendo-se avaliado a percentagem de perda de peso das amostras e a variação do pH da solução com o tempo de imersão. Para as amostras de frita foram utilizados os tempos de imersão: 2, 4, 8 e 16 horas e para as amostras monolíticas: 16, 72, 168, 336 e 504 horas, tendo todas as medições sido feitas em triplicado.

Para a determinação da percentagem de perda de peso das amostras (% $\Delta\text{P}$ ) foi utilizada a seguinte equação:

$$\% \Delta\text{P} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

onde:  $P_i$  – peso inicial da amostra e  $P_f$  – peso da amostra após imersão.

Entender detalhadamente o comportamento da dissolução é de extrema importância quando novos vidros são projetados para diferentes aplicações clínicas [58], na medida em que, os produtos da degradação libertados e as alterações de pH induzidas no meio envolvente não podem comprometer a viabilidade dos tecidos. A reação entre um vidro e uma solução aquosa é afetada por fatores como a composição do vidro, o pH da solução, a relação entre a área da superficial do vidro e o volume da solução, a temperatura e o tempo de reação [59]. Os fluidos circundantes desempenham um papel importante nas reações superficiais e na ligação dos biomateriais ao osso vivo, sendo a água destilada e a água desionizada as soluções fisiológicas mais simples utilizadas em testes de imersão *in vitro* [60].

Na literatura é indicado que nos ensaios de mineralização de amostras monolíticas deverá ser mantida uma relação de 10 ml de fluido fisiológico simulado por cada cm<sup>2</sup> de área exposta do material [9,13,16,21,52,61]. A mesma relação foi adotada no presente estudo para as amostras monolíticas tanto nos ensaios de mineralização em fluido fisiológico simulado como nos ensaios de dissolução em água destilada. Na impossibilidade experimental de manter a mesma relação para as amostras de frita, devido aos seus elevados valores de ASE, para a realização dos referidos ensaios foram adicionados 10 ml de líquido por cada 0.0250 g de material em pó.

Para os ensaios de dissolução das amostras de frita, foram colocados 0,0250 g de cada amostra dentro de recipientes de polipropileno tendo os conjuntos sido pesados. Foram adicionados 10 ml de água destilada a cada recipiente que, depois de devidamente fechados, foram colocados numa estufa a 37 °C durante os intervalos de tempo pré-determinados (2, 4, 8 e 16 horas). Findo o tempo de imersão, as amostras foram retiradas da estufa, medido o pH da solução e removido o líquido sobrenadante. Os recipientes foram colocados destapados na estufa a 50 °C durante 48 horas para secagem e, findo esse tempo, foram novamente pesados.

No caso das amostras monolíticas estas foram medidas para se determinar a sua área superficial (cm<sup>2</sup>). O volume de água destilada adicionado a cada amostra foi calculado de modo a manter uma razão de 10 ml de água destilada por cada cm<sup>2</sup> de área exposta da amostra como referido anteriormente. As amostras foram imersas em água destilada (pH=6,0) dentro de recipientes estanques de polipropileno os quais foram mantidos a 37 °C numa estufa em condições estáticas. Depois de imersas durante os

intervalos de tempo pré-determinados (16, 72, 168, 336 e 504 horas) as amostras foram retiradas, lavadas com água destilada, secas a 50 °C durante 48 horas e pesadas.

### 3.1.4. Ensaios de mineralização em fluido fisiológico sintético

Os ensaios de mineralização em fluido fisiológico sintético permitem avaliar, *in vitro*, o potencial bioativo dos materiais, ou seja, a capacidade de precipitarem na sua superfície fosfatos de cálcio.

Nestes ensaios as amostras foram imersas em fluido fisiológico simulado acelular (SBF), de composição iónica semelhante à do plasma sanguíneo humano, preparado de acordo com o protocolo apresentado por T. Kokubo *et al.* [62,63]. A composição iónica do plasma sanguíneo humano e do SBF são apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3** - Concentração iónica do plasma humano e do SBF.

	Concentração iónica (mMol L <sup>-1</sup> )							
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Plasma	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5

O SBF foi preparado, tendo todo o material de laboratório utilizado sido previamente esterilizado por exposição a radiação ultravioleta durante 15 minutos. A um litro de água destilada, foram adicionadas, sob agitação constante, as quantidades referidas de cada reagente seguindo a ordem indicada na Tabela 4. O SBF foi mantido a 5 °C no frigorífico em garrafas de polipropileno por não mais de 30 dias.

**Tabela 4** - Ordem de adição, reagente, quantidade, fornecedor e grau de pureza dos reagentes utilizados na preparação de 1 litro de SBF [62,63].

Ordem de adição	Reagente	Quantidade	Fornecedor	Grau de pureza (%)
1	NaCl	7,996 g	Panreac	99,5
2	NaHCO <sub>3</sub>	0,350 g	Sigma-Aldrich	99,7
3	KCl	0,224 g	Sigma-Aldrich	99,5
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,228 g	Calbiochem	100,0
5	HCl (1M)	~90% de 40 ml (*)	Panreac	37,0
6	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,305 g	Sigma-Aldrich	99,0
7	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,548 g	Fluka	99,0
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,071 g	Panreac	99,0
9	NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	6,057 g	Merck	99,8

(\*) O volume total de HCl não foi usado, para que no final, o restante, fosse utilizado para acertar o valor de pH para valores próximos do plasma sanguíneo humano (entre 7,2 a 7,4).

Todo o material de laboratório utilizado no decorrer dos ensaios de mineralização foi esterilizado através de exposição a radiação ultravioleta durante 15 minutos e todas as medições realizadas em duplicado.

O SBF foi retirado do frigorífico e foram colocados 0,0250 g de cada amostra de frita e 10 ml de SBF, dentro de recipientes estanques de polipropileno. Estes foram mantidos numa estufa a 37 °C, em condições estáticas, durante três intervalos de tempo: 16, 72 e 168 horas. No final de cada tempo de imersão, após se verificar por observação macroscópica de que não existiam sinais de contaminação biológica, foi medido o pH e o sobrenadante foi retirado, filtrado e colocado em recipientes estanques de polipropileno no frigorífico a 5 °C até se proceder à sua análise por ICP. Os pós foram lavados com água destilada, para remoção total do SBF e cessação das reações superficiais [11], filtrados e colocados em estufa a 50 °C durante 48 horas para secagem.

Todas as amostras monolíticas foram medidas para se determinar a sua área (cm<sup>2</sup>). Foi calculado o volume de SBF a adicionar a cada amostra mantendo uma razão de 10 ml SBF por cada cm<sup>2</sup> de área exposta da amostra. As amostras e o SBF foram colocados em recipientes estanques de polipropileno. Os recipientes, devidamente fechados, foram mantidos em estufa a 37 °C durante cinco diferentes intervalos de tempo: 16, 72, 168, 336 e 504 horas, em condições estáticas. No final de cada tempo de imersão foi verificado por observação macroscópica de que não existiam sinais de contaminação biológica e o pH foi medido. O sobrenadante foi retirado, filtrado e

colocado em recipientes estanques de polipropileno no frigorífico a 5 °C. As amostras monolíticas foram lavadas com água destilada, para remover totalmente o SBF e garantir a cessação das reações superficiais [11], e colocadas em estufa a 50 °C durante 48 horas.

### 3.1.5. Ensaio de avaliação da ação antibacteriana *in vitro*

A avaliação da ação antibacteriana *in vitro* dos materiais desenvolvidos foi realizada no laboratório do Professor Doutor António Correia, Microlab, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. O teste é baseado na norma da *American Society for Testing and Materials* - (ASTM) E2149 para a determinação de atividades antimicrobianas de agentes antimicrobianos imobilizados (*Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents*). Foi ensaiada uma estirpe bacteriana de referência pertencente a coleções de cultura e que é normalmente utilizada como indicadora da suscetibilidade a agentes antimicrobianos: a gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC25922.

A atividade antibacteriana foi avaliada pela percentagem de redução do número de unidades formadoras de colónias (UFC mL<sup>-1</sup>) numa suspensão após incubação com as amostras. A redução (*R*) foi quantificada pela seguinte equação:

$$R = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde:  $C_0$  – número de UFC observadas na amostra de controlo e  $C$  - número de UFC obtidas após incubação na presença do material em teste.

Os ensaios foram realizados sob agitação constante num volume final de suspensão de 1,1 mL tendo cada teste sido realizado em triplicado. As células bacterianas foram enumeradas através do método convencional de contagem em placa. O material de laboratório e as soluções foram previamente esterilizadas por calor húmido, numa autoclave (a 120 °C durante 20 minutos). As fritas foram esterilizadas numa estufa a 160 °C durante 2 horas.

Cada amostra de frita foi pesada e de seguida incubada na ausência de luz, com uma quantidade definida de células de *E. coli* ATCC25922. As células foram obtidas a

partir de um crescimento de cerca de 16 horas, a 37 °C em meio de cultura Luria-Bertani, Merck. Para eliminação de restos de meio de cultura as células foram centrifugadas a 4000 G, durante 5 minutos duas vezes. As células sedimentadas foram novamente colocadas em suspensão em volumes definidos da solução tampão  $K_2HPO_4$  a pH=7 (obtendo densidades celulares entre  $10^9$  a  $10^{10}$  UFC mL<sup>-1</sup>) e incubadas com as amostras de frita durante 1 hora, a 20 °C com agitação. Após a incubação, diluições seriadas de alíquotas da suspensão de células foram semeadas em placas de *petri* contendo meio de cultura Luria Agar, Merck. Após incubação (37 °C, 24 horas), as UFC foram determinadas, permitindo o cálculo de  $R$  [64]. As amostras de frita sem adição de  $Ag_2O$  à sua composição, GOF com duas granulometrias, foram utilizadas como controlo bem como uma amostra contendo somente as células indicadoras (sem frita).

### **3.1.6. Esquema resumo do procedimento e técnicas experimentais utilizadas**

O esquema resumo do procedimento e técnicas experimentais utilizadas no decorrer do presente trabalho é ilustrado na Figura 1.

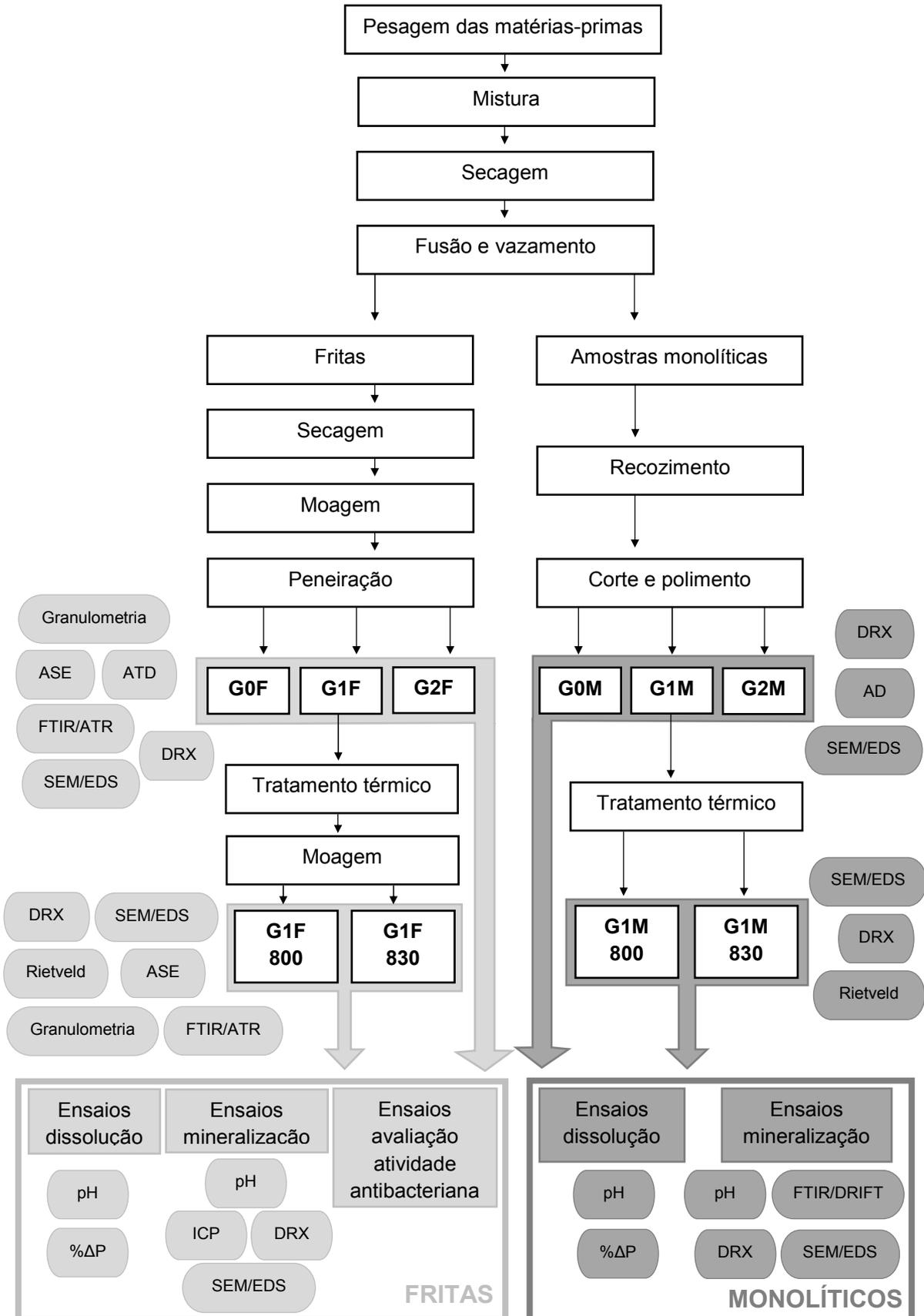


Figura 1 - Esquema resumo do procedimento e técnicas experimentais utilizadas.

## **3.2. Técnicas Experimentais**

Para a caracterização dos materiais obtidos foram utilizadas diversas técnicas experimentais.

### **3.2.1. Análise térmica diferencial (ATD)**

Esta técnica permitiu determinar as temperaturas a que ocorrem as transformações mais relevantes durante o aquecimento das composições em estudo. Esta análise foi realizada num equipamento Netzsch STA 409 EP.

### **3.2.2. Análise dilatométrica (AD)**

A variação dimensional das amostras monolíticas com o aumento da temperatura foi caracterizada utilizando um dilatómetro Bahr Thermo Analyse DIL 801 L.

### **3.2.3. Difração de raios-X (DRX)**

Esta técnica experimental foi utilizada para se confirmar o carácter amorfo dos vidros e identificar as fases cristalinas presentes nos vitrocerâmicos e nos precipitados formados nos ensaios de mineralização em fluido fisiológico sintético. Esta análise foi realizada à temperatura ambiente num difractómetro Rigaku Geigerflex Dmax-sérieC, equipado com monocromador curvo de grafite, utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$  (40 Kv e 30 mA). As condições utilizadas foram  $2\theta = 10\text{-}80^\circ$ , uma velocidade de  $3^\circ/\text{min}$ . As fichas utilizadas na identificação de fases foram fornecidas pelo Joint Committee on Powder Diffraction Standards/International Center for Diffraction Data; Swarthmore, Pensilvânia, EUA.

Foram realizadas análises de DRX de ângulo rasante a algumas amostras monolíticas para identificar os compostos depositados sobre a sua superfície depois de terem sido imersas em fluido fisiológico sintético e em ácido clorídrico 1M. Para tal utilizou-se um difractómetro XPert Pro (NL) com monocromador de grafite e radiação

CuK $\alpha$  (45 kV e 40 mA). As condições utilizadas foram  $2\theta = 10-80^\circ$ , uma velocidade de  $0,0260^\circ$  e 98,39 s por ponto.

Para a quantificação, utilizando o método de Rietveld, das fases cristalina e amorfa presentes em algumas das amostras vitrocerâmicas recorreu-se a um difractor  $\Theta/\Theta$  Panalytical X'Pert Pro (NL) equipado com um detetor rápido RTMS e com um monocromador de grafite utilizando radiação CuK $\alpha$  (40 kV e 40 mA). As condições utilizadas foram  $2\theta = 20-80^\circ$ , uma velocidade de  $0,0167^\circ$  e 50 s. No percurso do feixe incidente foram montadas fendas anti-dispersão e anti-divergência ambas com  $0,125^\circ$ . No percurso do feixe difratado foram colocados um filtro de Ni, uma fenda Soller ( $0,01$  rad) e uma lâmina anti-dispersão (5 mm).

#### **3.2.4. Análise granulométrica**

Esta técnica foi utilizada para as amostras de frita moídas após peneiração a  $20\mu\text{m}$ .

A distribuição granulométrica foi realizada utilizando o equipamento Coulter LS 230 (Particle Size Analyzer) com um sistema ótico secundário (PIDS), cujo princípio de funcionamento se baseia no método de difração de raios laser e que permite avaliar o tamanho das partículas em suspensão, numa gama de tamanhos entre  $0,4$  a  $2000\mu\text{m}$ . Os ensaios foram realizados usando como meio suspensor a água e após agitação em ultrassons durante cinco minutos.

#### **3.2.5. Análise da área superficial específica (ASE)**

A área superficial específica (ASE) das amostras de frita moídas e peneiradas foi determinada num equipamento Micromeritis Gemini 2370 V5.00, por adsorção física de azoto, usando a isotérmica de adsorção Brunauer, Emmett e Teller (BET).

### **3.2.6. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) e Espectroscopia de dispersão de energia (EDS)**

A observação das superfícies das amostras foi realizada por microscopia eletrônica de varrimento (SEM) num microscópio HITACHI, modelo S4100, equipado com um sistema de microanálise química por espectroscopia de dispersão de energia (EDS).

Para observação no microscópio, as amostras foram fixadas em porta amostras de alumínio com cola de carbono, no caso dos monolíticos, e com fita-cola de carbono de dupla face no caso das fritas moídas. Foi posteriormente depositado um filme fino de carbono sobre todas as amostras utilizando o equipamento EMITECH K950. Em alguns casos foi necessário depositar um filme fino de ouro utilizando um equipamento Polaron E5000.

### **3.2.7. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

Esta técnica permite identificar grupos, arranjos químicos e estruturas de materiais, com base na frequência das vibrações das ligações químicas presentes nas amostras.

Foram obtidos espectros de FTIR utilizando a técnica de reflexão total atenuada (ATR) utilizando um espectrómetro FTIR Bruker tensor 27 com um acessório de ATR da marca Specac. Esta técnica foi utilizada para verificar possíveis alterações químicas no material decorrentes da introdução da prata e da realização de tratamentos térmicos.

Para caracterizar os precipitados formados na superfície das amostras monolíticas após os ensaios de mineralização em fluido fisiológico sintético recorreu-se à técnica de reflexão difusa no infravermelho com transformada de Fourier (DRIFT), utilizando um espectrómetro FTIR Mattson 7000 com um acessório de DRIFT da marca Specac.

### **3.2.8. Espectrofotometria por plasma com acoplamento indutivo (ICP)**

A quantificação dos elementos presentes na solução fisiológica sintética, após imersão das amostras, foi determinada por espectroscopia de emissão por plasma com acoplamento indutivo num espectómetro Jobin Yvon 70 Plus.

### **3.2.9. Medição de pH**

Durante os ensaios de dissolução em água destilada e de mineralização em fluido fisiológico sintético, a variação do pH das soluções foi monitorizada utilizando um medidor de pH HI98103 Checker<sup>®</sup>. O eléctrodo de pH foi calibrado utilizando soluções standard Hamilton Duracal Buffer.



# Capítulo 4

---

## Apresentação e Discussão de Resultados



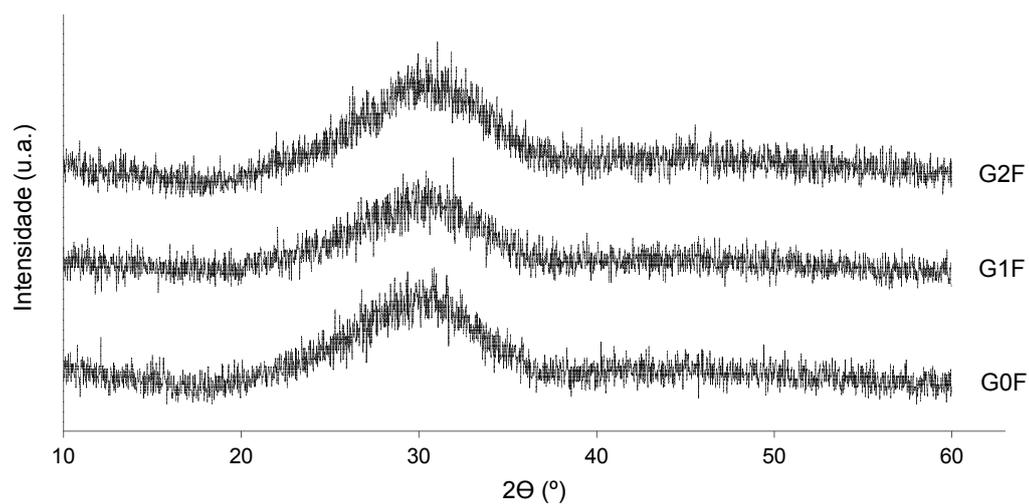
## 4. Apresentação e Discussão de Resultados

### 4.1. Caracterização das amostras vítreas

#### 4.1.1. Amostras de frita

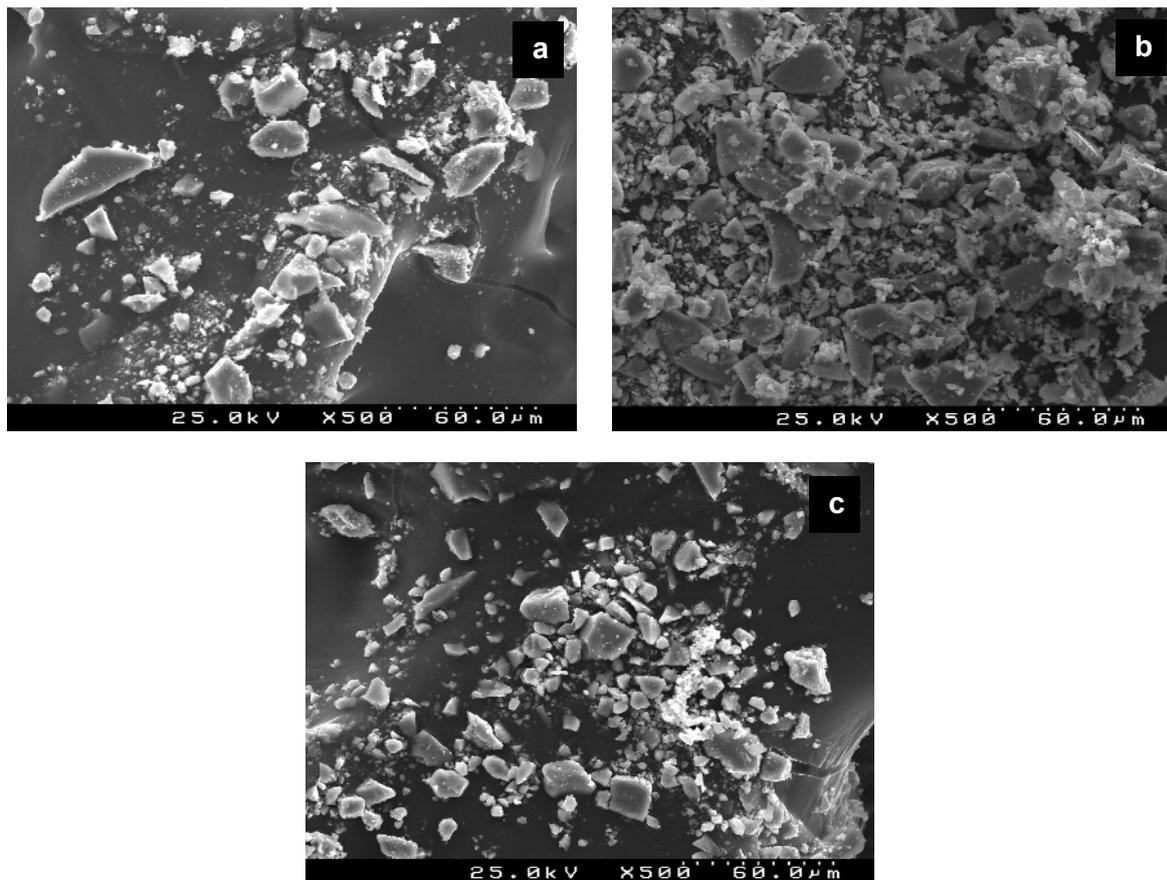
Por observação macroscópica, as amostras de frita G0F, G1F e G2F revelaram-se homogêneas, livres de inclusões, transparentes e sem cor.

A natureza amorfa das fritas foi confirmada por DRX como verificado nos difratogramas apresentados na Figura 2.



**Figura 2** - Difratogramas de raios-X das amostras em pó de G0F, G1F e G2F.

Na Figura 3 são apresentadas as micrografias obtidas por SEM das três amostras de frita em pó depois de moídas e peneiradas em tela de 20  $\mu\text{m}$ . As partículas possuem forma irregular e uma distribuição larga de tamanhos, apresentando algumas partículas de forma acicular e com um comprimento superior a 20  $\mu\text{m}$ .



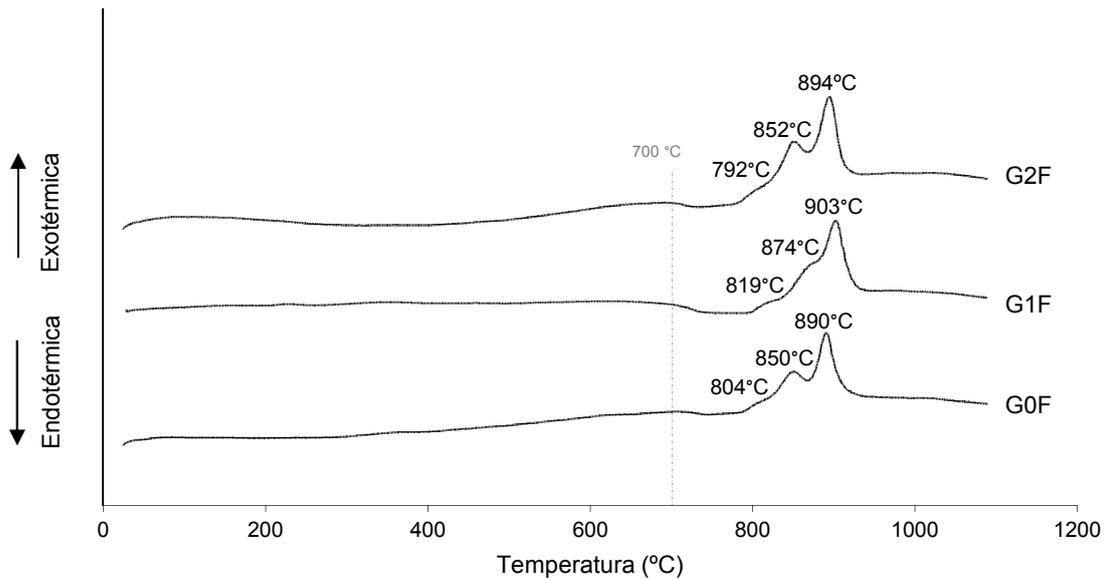
**Figura 3** - Imagens por SEM das fritas G0F (a), G1F (b) e G2F (c) depois de moídas e peneiradas em tela de 20 µm.

O EDS realizado a estes pós confirmou a presença de prata nas amostras G1F e G2F e a ausência de segregação ou de formação de uma fase com prata. Na Tabela 5 são apresentados os resultados da composição atômica determinada por EDS.

**Tabela 5** - Composição atômica das fritas em estudo determinada por EDS.

Amostras	Mg	Si	P	Ag	Ca	Ca/P
G0F	19,14	22,28	21,07	-	37,51	1,78
G1F	21,58	23,23	21,57	1,57	32,06	1,48
G2F	17,94	19,59	18,45	2,37	41,66	2,25

Na Figura 4 estão patentes os resultados obtidos na ATD na qual se utilizou uma taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> desde a temperatura ambiente até aos 1090 °C.



**Figura 4** - Curvas de ATD obtidas para as fritas G0F, G1F e G2F.

Por observação da Figura 4 verifica-se que a deflexão endotérmica correspondente ao intervalo de temperaturas onde se situa a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) tem início, para todas as composições, por volta dos 700 °C e termina por volta dos 730 °C. Para as três composições observa-se ainda um ombro e dois picos exotérmicos associados à formação de fases cristalinas. As temperaturas relevantes retiradas da Figura 4 encontram-se resumidas na Tabela 6.

**Tabela 6** - Temperaturas relevantes obtidas por ATD (\*).

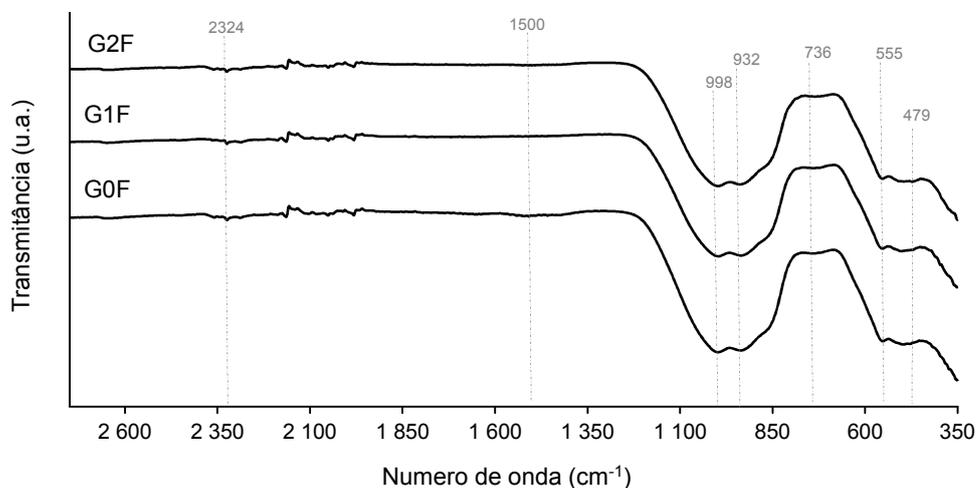
Amostras	$T_g$ (°C)	$T_{c1}$ (°C)	$T_{p1}$ (°C)	$T_{p2}$ (°C)	$T_{p3}$ (°C)
G0F	~ 710	782	804	850	890
G1F	~ 705	795	819	874	903
G2F	~ 704	776	792	852	894

(\*) onde:  $T_g$  - temperatura de transição vítrea;  $T_{c1}$  - início 1º pico de cristalização;  $T_{p1}$ ,  $T_{p2}$  e  $T_{p3}$  - 1º, 2º e 3º picos de cristalização, respetivamente.

A adição de 1 mol% de prata aumenta ligeiramente as temperaturas a que ocorrem os picos exotérmicos de cristalização ( $T_{p1}$ ,  $T_{p2}$  e  $T_{p3}$ ), em relação à amostra sem prata, o que já não se verifica para a adição de 2 mol% de prata. A adição de prata reduz ligeiramente (cerca de 5 °C) a  $T_g$ .

Com base nestes resultados a temperatura de recozimento utilizada na preparação das amostras monolíticas foi 750 °C.

Para verificar possíveis alterações químicas decorrentes da introdução da prata foram realizadas análises FTIR/ATR às três amostras de frita.



**Figura 5** - Espectros FTIR/ATR das amostras G0F, G1F e G2F.

Por observação dos espectros da Figura 5, a introdução de 1 e 2% molar de  $\text{Ag}_2\text{O}$  não induz alterações químicas detetáveis por FTIR/ATR, verificando-se apenas um pequeno desvio do comprimento de onda a que ocorrem as principais bandas de vibração. As atribuições das principais bandas de vibração detetadas nas amostras com a composição G0F encontram-se na Tabela 7. Não foram encontradas bandas associadas à presença de prata nas amostras.

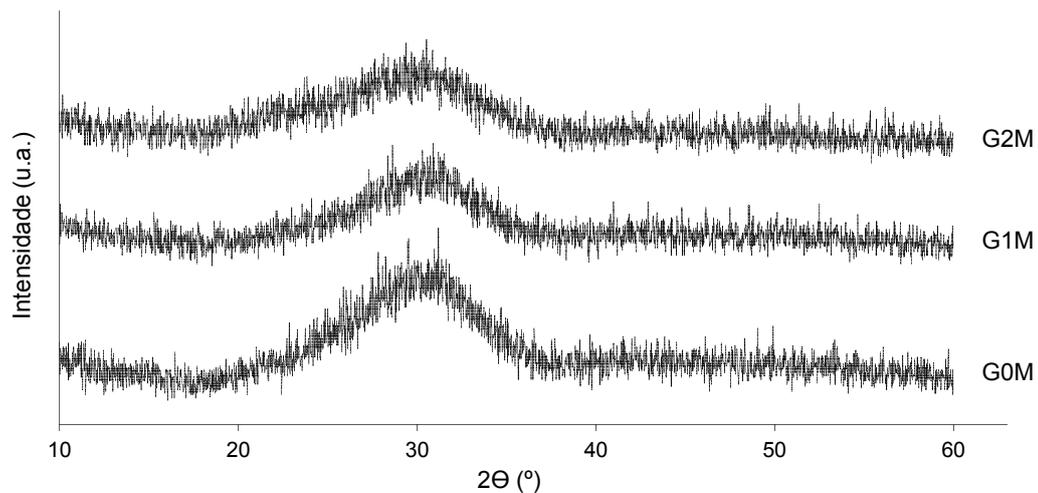
**Tabela 7** - Atribuição das principais bandas de vibração da amostra G0F.

Banda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
450-480	Flexão da ligação Si-O-Si [7,16,20,34,60,65].
518-570	Flexão da ligação P-O [21,60,34].
725-815	Estiramento simétrico da ligação Si-O-Si [7,20,34].
920-940	Oxigénios não ligantes, $\text{Si-O}^-$ , formados devido à presença de iões alcalinos e/ou alcalino terrosos na rede vítrea [21,65].
950-1050	Estiramento assimétrico da ligação Si-O-Si [20,21,30,60,65].
1350-1600	Presença de carbonatos de cálcio, resultantes da reação do $\text{CO}_2$ atmosférico com o cálcio presente na superfície do vidro [21,30,66].
2320-2360	Presença de $\text{CO}_2$ atmosférico no interior do aparelho [21,30,66].

### 4.1.2. Amostras monolíticas

As amostras G0M, G1M e G2M depois de recozidas são homogêneas, sem inclusões, transparentes e sem cor (observação macroscópica).

Os resultados da DRX das amostras após moagem e peneiração numa tela de 20  $\mu\text{m}$  (condições idênticas às das fritas) estão representados na Figura 6 e confirmam a natureza amorfa das amostras.



**Figura 6** - Difratogramas de raios-X das amostras monolíticas G0M, G1M e G2M moídas.

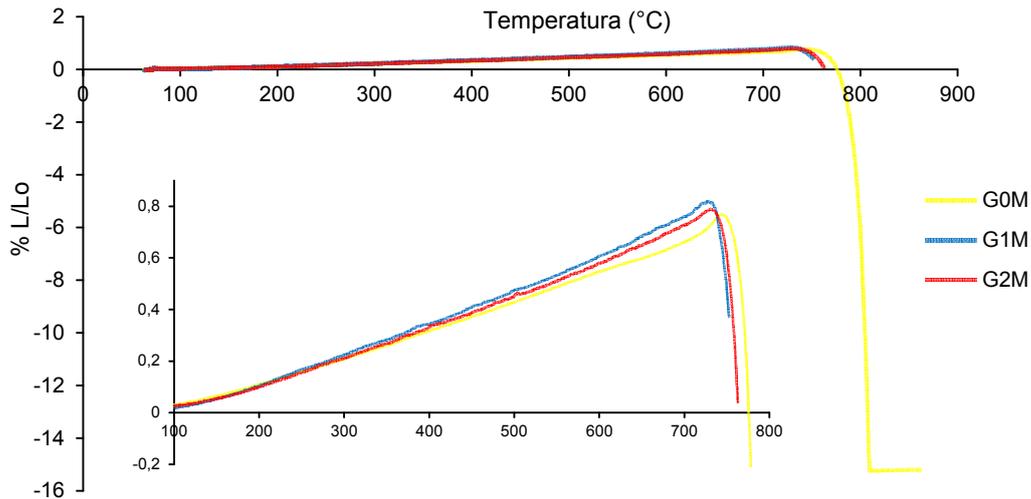
As amostras monolíticas foram analisadas por SEM e, tal como observado macroscopicamente, revelaram-se homogêneas e sem inclusões, o que indica que os íons de prata foram incorporados uniformemente na estrutura do vidro. Na tabela 8 são apresentados os resultados da composição atômica das amostras determinada por EDS a qual confirmou a presença de prata nas amostras G1M e G2M.

**Tabela 8** - Composição atômica das amostras monolíticas determinada por EDS.

Amostras	Mg	Si	P	Ag	Ca	Ca/P
G0M	25,15	24,40	20,94	-	29,53	1,41
G1M	27,58	23,82	19,94	1,46	27,20	1,36
G2M	27,88	23,28	19,51	1,65	27,70	1,42

Os resultados de EDS não revelaram grandes diferenças em termos de composição atômica entre as três amostras monolíticas, o mesmo não acontecendo para as três amostras de fritas, Tabela 5.

Na Figura 7 são apresentadas as curvas da variação dimensional das amostras monolíticas (G0M, G1M e G2M) com o aumento da temperatura, obtidas por análise dilatométrica (AD). Estas análises foram realizadas com uma taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>, desde a temperatura ambiente até o operador as ter interrompido para salvaguarda do aparelho.



**Figura 7** - Curvas dilatométricas das amostras G0M, G1M e G2M.

As curvas dilatométricas obtidas não permitiram o cálculo de  $T_g$ . As temperaturas de amolecimento dilatométrico ( $T_R$ ) e os coeficientes de expansão térmica linear no intervalo entre 200 e 400 °C ( $\alpha_{200-400}$ ) foram determinados, estando os resultados obtidos patentados na Tabela 9.

**Tabela 9** - Temperaturas de amolecimento dilatométrico ( $T_R$ ) e coeficientes de expansão térmica linear ( $\alpha_{200-400}$ ).

Amostras	$T_R$ (°C)	$\alpha_{200-400}$ (°C <sup>-1</sup> )
G0M	~ 745	10,4 E-6
G1M	~ 728	12,0 E-6
G2M	~ 732	11,8 E-6

O comportamento dilatométrico dos vidros depende fundamentalmente da sua composição e história térmica [67]. Uma vez que estas amostras têm a mesma história térmica, as diferenças resultam da introdução de 1 e 2% molar de Ag<sub>2</sub>O.

Os vidros com Ag<sub>2</sub>O na sua composição apresentam um coeficiente de expansão térmica linear no intervalo entre 200 e 400 °C ligeiramente superior ao do vidro sem

prata. O  $\text{Ag}_2\text{O}$  é um óxido modificador, criando geralmente numa estrutura vítrea pontos de descontinuidade reticular e, conseqüentemente, uma diminuição da coesão. No entanto, nos casos em estudo, a introdução de 1 e 2 mol% de  $\text{Ag}_2\text{O}$  não parece ter sido significativa para que esse efeito fosse notório.

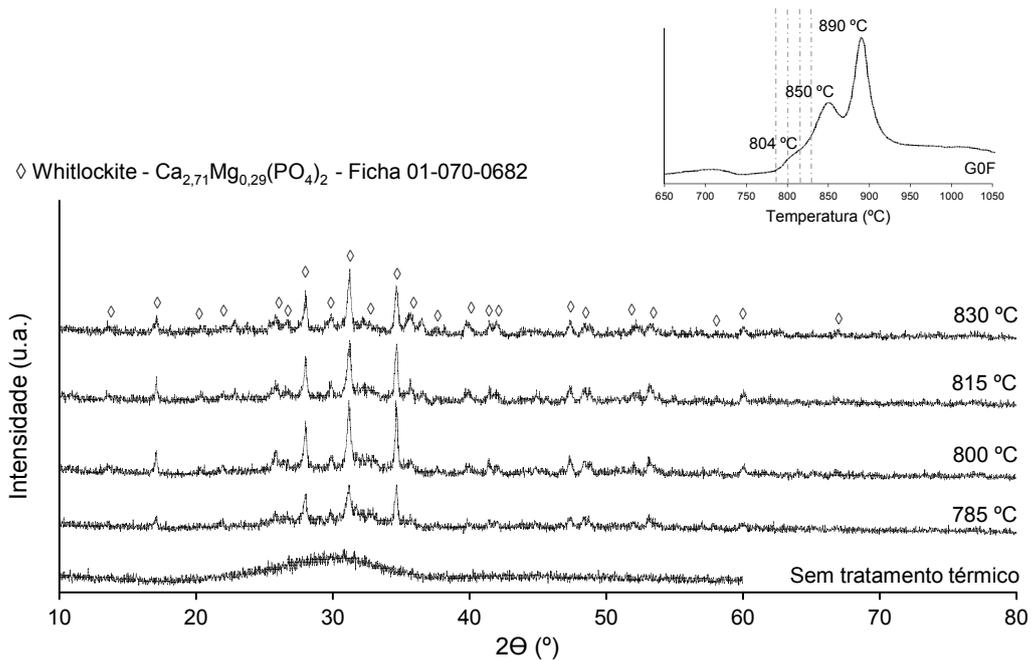
A retração dos monolíticos começou a ocorrer a temperaturas ligeiramente inferiores para as composições com prata. A introdução de  $\text{Ag}_2\text{O}$  na composição parece ter diminuído a temperatura a que começa a ocorrer o amolecimento dilatométrico, o que, de certa forma, indicia uma maior mobilidade estrutural nos vidros com prata.

## **4.2. Caracterização das amostras vitrocerâmicas**

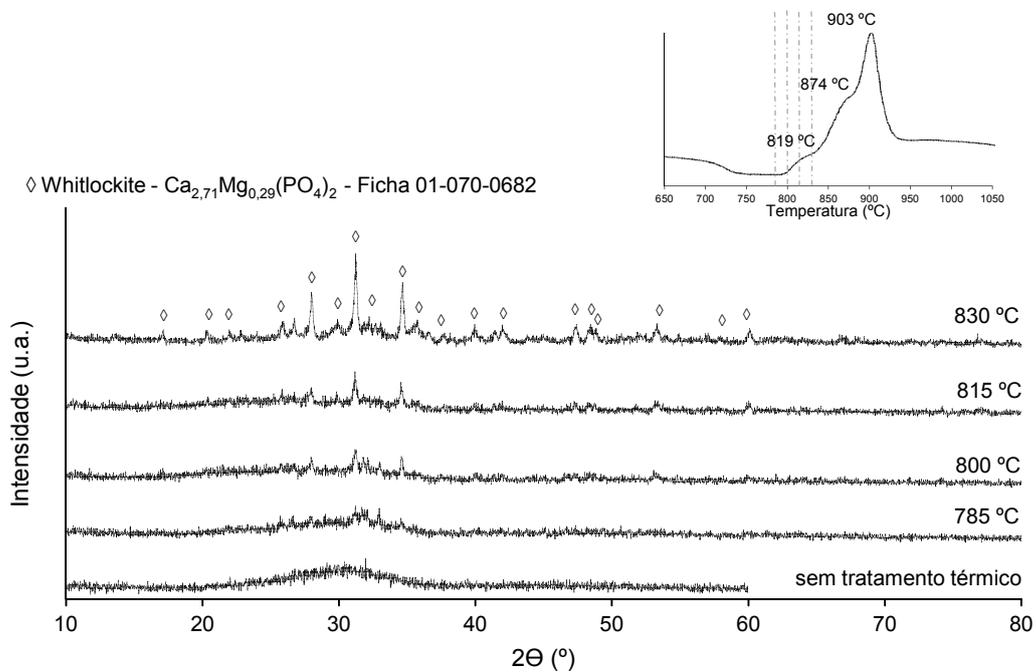
As amostras de frita e de monolíticos das três composições em estudo foram sujeitas a tratamentos térmicos a quatro temperaturas, com o intuito de se obterem amostras vitrocerâmicas, como descrito no Capítulo 3.

### **4.2.1. Amostras de frita cristalizada**

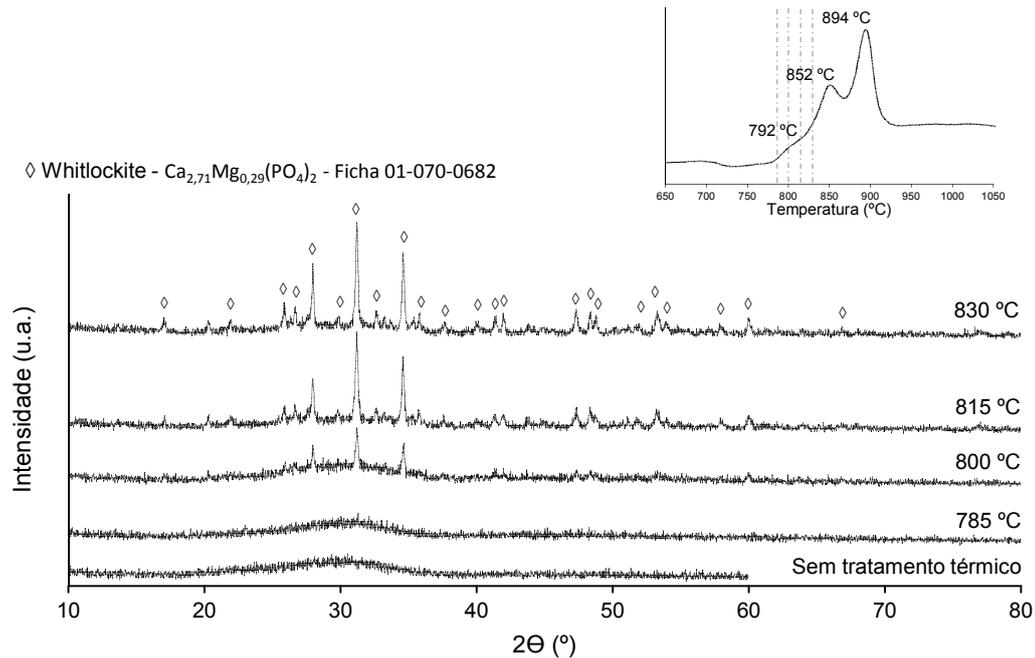
Nas figuras 8, 9 e 10 estão representados os difratogramas dos pós de frita antes e após tratamento térmico, durante 1 hora às temperaturas indicadas. Antes das análises as amostras de frita cristalizada foram moídas num almofariz de ágata e peneiradas numa tela de 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 8** - Difratomogramas de raios-X dos pós de frita G0F, antes e após tratamento térmico de 1 hora, às temperaturas indicadas. A inserção mostra a ATD da G0F na gama de 650-1050 °C.



**Figura 9** - Difratomogramas de raios-X dos pós de frita G1F, antes e após tratamento térmico de 1 hora, às temperaturas indicadas. A inserção mostra a ATD da G1F na gama de 650-1050 °C.



**Figura 10** - Difratogramas de raios-X dos pós de fritas G2F, antes e após tratamento térmico de 1 hora, às temperaturas indicadas. A inserção mostra a ATD da G2F na gama de 650-1050 °C.

O resumo das leituras das Figuras 8, 9 e 10 é apresentado na Tabela 10.

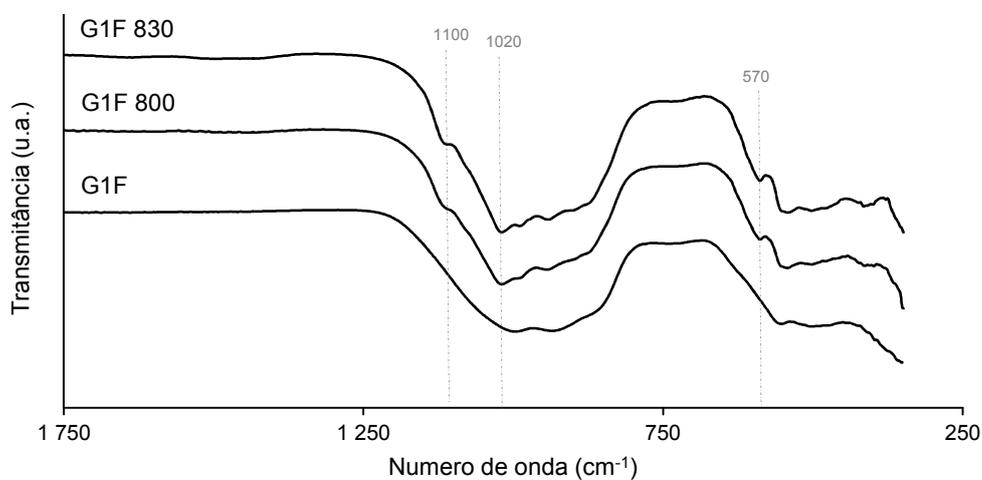
**Tabela 10** - Resumo das leituras das Figuras 8, 9 e 10.

Amostras	Sem tratamento térmico	1 hora 785 °C	1 hora 800 °C	1 hora 815 °C	1 hora 830°C
G0F	Amorfa	Whitlockite (incipiente)	Whitlockite	Whitlockite	Whitlockite
G1F	Amorfa	Whitlockite (incipiente)	Whitlockite	Whitlockite	Whitlockite
G2F	Amorfa	Amorfa	Whitlockite	Whitlockite	Whitlockite

As amostras G0F e G1F após tratamento térmico de uma hora a 785 °C apresentam uma fase cristalina (whitlockite -  $\text{Ca}_{2,71}\text{Mg}_{0,29}(\text{PO}_4)_2$ ), o que não acontece na amostra G2F que permanece amorfa. Este resultado não está de acordo com o sugerido pela ATD (imagem inserida e Tabela 6) onde  $T_{c1}$  e  $T_{p1}$  ocorrem a temperaturas inferiores para G2F. Esta diferença pode ser devida à utilização de termopares com sensibilidades diferentes nos dois equipamentos (forno da ATD e forno de tratamentos térmicos). O tratamento térmico de uma hora a 800 °C promoveu a cristalização de whitlockite em todas as amostras. Os tratamentos térmicos a 815 e 830 °C intensificaram os picos obtidos nos difratogramas o que permite antever um aumento da cristalinidade das amostras tratadas a essas temperaturas.

Das amostras de frita cristalizada foram escolhidas as amostras G1F tratadas termicamente a 800 e 830 °C, doravante designadas como G1F 800 e G1F 830 respetivamente, para integrar o leque de amostras a serem avaliadas nos testes de dissolução, de potencial bioativo e propriedades antibacterianas.

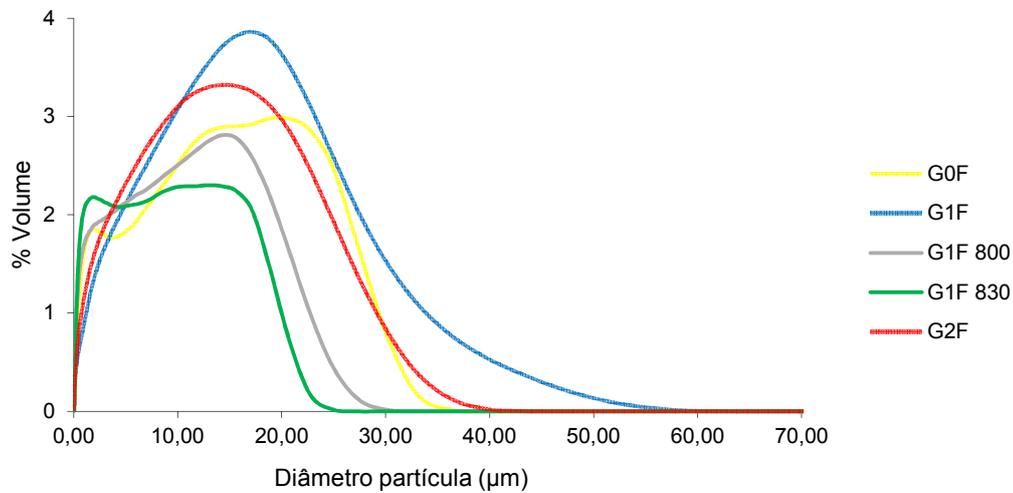
Foi realizado FTIR/ATR às amostras G1F, G1F 800 e G1F 830, para verificar possíveis alterações químicas decorrentes da realização dos tratamentos térmicos, Figura 11.



**Figura 11** - Espectros FTIR/ATR das amostras G1F, G1F 800 e G1F 830.

Por observação da Figura 11 é notória uma ligeira alteração dos espectros, ocorrendo o aparecimento de novas bandas, após os tratamentos térmicos efetuados às amostras. A cristalização da whitlockite provocou o aparecimento de bandas a (i) 570  $\text{cm}^{-1}$ , relativa à flexão das ligações P-O [16,60,69]; (ii) 1020  $\text{cm}^{-1}$  relacionada com o estiramento simétrico das ligações P-O [34] e (iii) 1100  $\text{cm}^{-1}$ , associada ao estiramento das ligações P-O [30,69].

As distribuições de tamanho de partícula obtidas pelo método de difração de raios laser para as cinco amostras de frita são apresentadas na Figura 12.



**Figura 12** - Distribuição granulométrica dos pós de frita moídos.

O formato das distribuições é revelador da presença de aglomerados pois existem partículas de diâmetros superiores a 20 µm e o pó foi peneirado com uma tela de 20 µm. A existência de partícula de forma acicular de comprimento superior a 20 µm, identificadas por SEM (Figura 3), também podem estar a afetar estes resultados. No entanto, as amostras vitrocerâmicas apresentam uma distribuição granulométrica bastante mais estreita. Assim, os resultados obtidos para o diâmetro de partícula, apresentados na Tabela 11, estão condicionados pela presença de aglomerados, não correspondendo ao das partículas individualizadas.

**Tabela 11** - Diâmetro médio das partículas obtido por difração de raios laser.

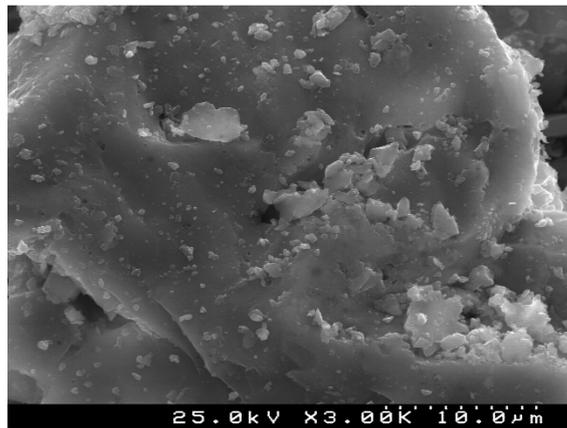
Amostras	Diâmetro médio das partículas (µm)
G0F	8,02
G1F	10,69
G1F 800	5,91
G1F 830	4,83
G2F	8,56

Pela técnica de adsorção física de azoto, usando a isotérmica de adsorção e o método BET, obtiveram-se os valores apresentados na Tabela 12 para a ASE das cinco amostras.

**Tabela 12** - ASE determinada por BET.

Amostras	ASE (m <sup>2</sup> /g)
G0F	2,11
G1F	2,93
G1F 800	3,63
G1F 830	5,47
G2F	2,37

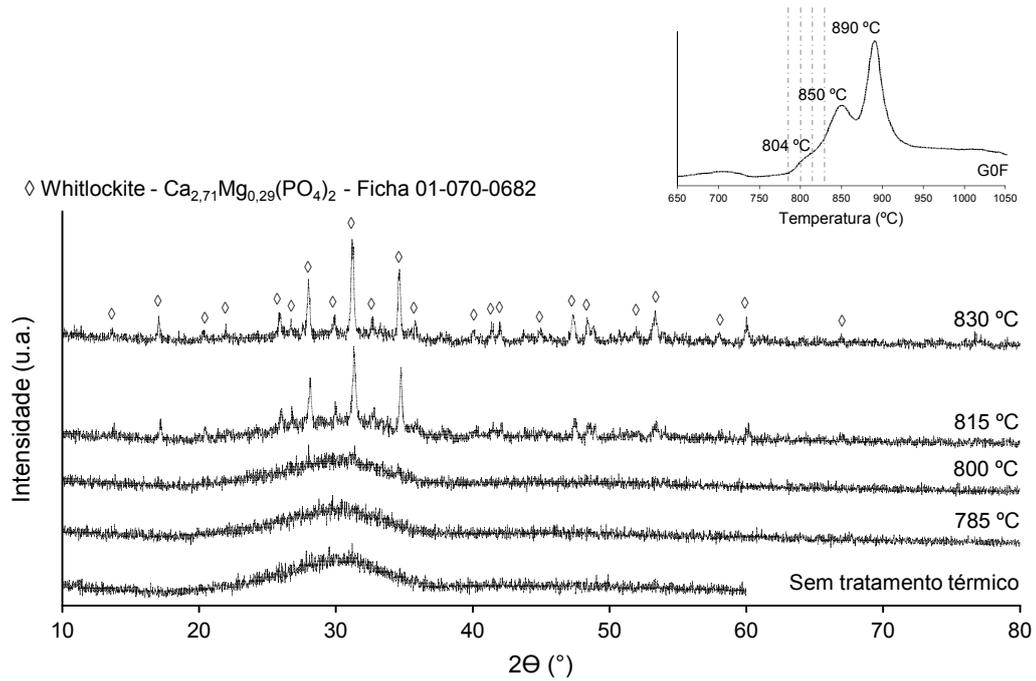
As amostras vitrocerâmicas são as que revelam a maior ASE o que está de acordo com os resultados obtidos para a distribuição granulométrica, possivelmente devido à presença de menor quantidade de aglomerados nestas amostras. O tratamento térmico poderá também ter aumentado a rugosidade superficial das partículas, Figura 13.



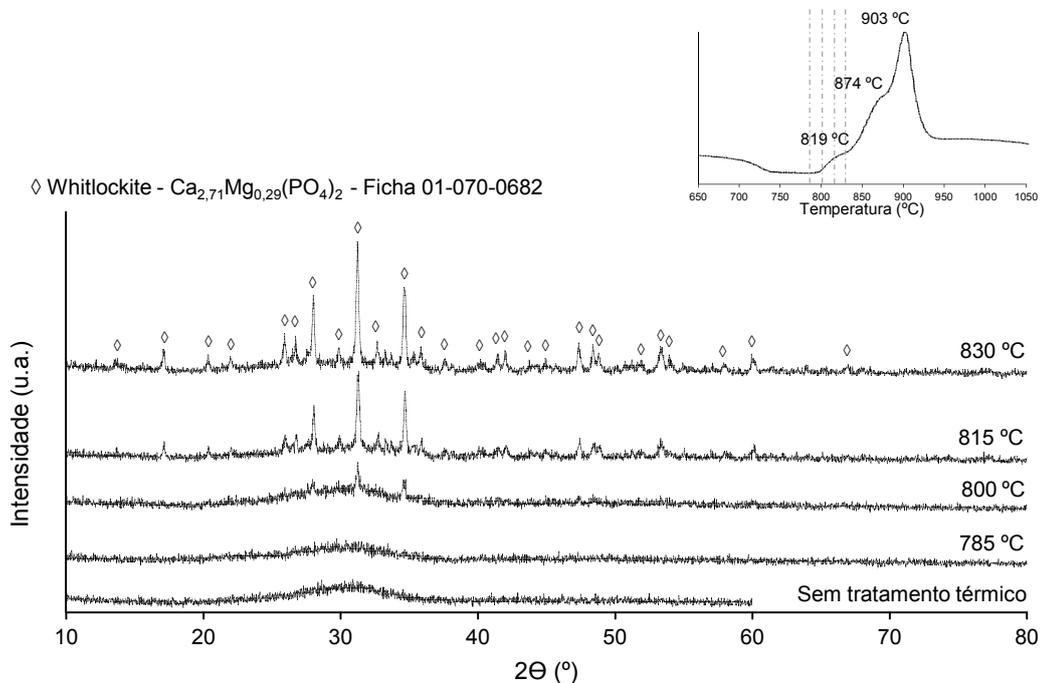
**Figura 13** - Imagem em SEM da superfície de uma partícula de G2F após tratamento térmico a 815 °C.

#### 4.2.2. Amostras monolíticas cristalizadas

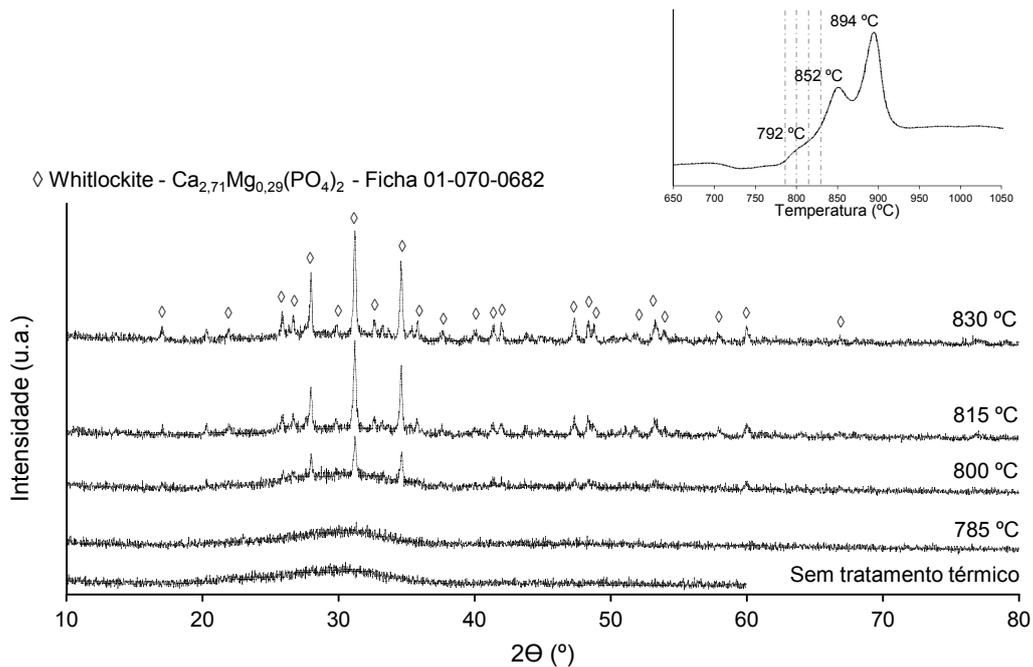
Nas figuras 14, 15 e 16 estão representados os difratogramas de raios-X efetuados às amostras monolíticas moídas, antes e após tratamento térmico, para as três composições em estudo.



**Figura 14** - Difratogramas de raios-X dos pós de GOF antes e após tratamento térmico de 1 hora às temperaturas indicadas. A inserção mostra a ATD da GOF na gama de 650-1050 °C.



**Figura 15** - Difratogramas de raios-X dos pós de G1M antes e após tratamento térmico de 1 hora às temperaturas indicadas. A inserção mostra a ATD da G1F na gama de 650-1050 °C.



**Figura 16** - Difratogramas de raios-X dos pós de G2M antes e após tratamento térmico de 1 hora às temperaturas indicadas. A inserção mostra a ATD da G2F na gama de 650-1050 °C.

O resumo dos resultados relevantes retirados das Figuras 14, 15 e 16 são apresentados na Tabela 13.

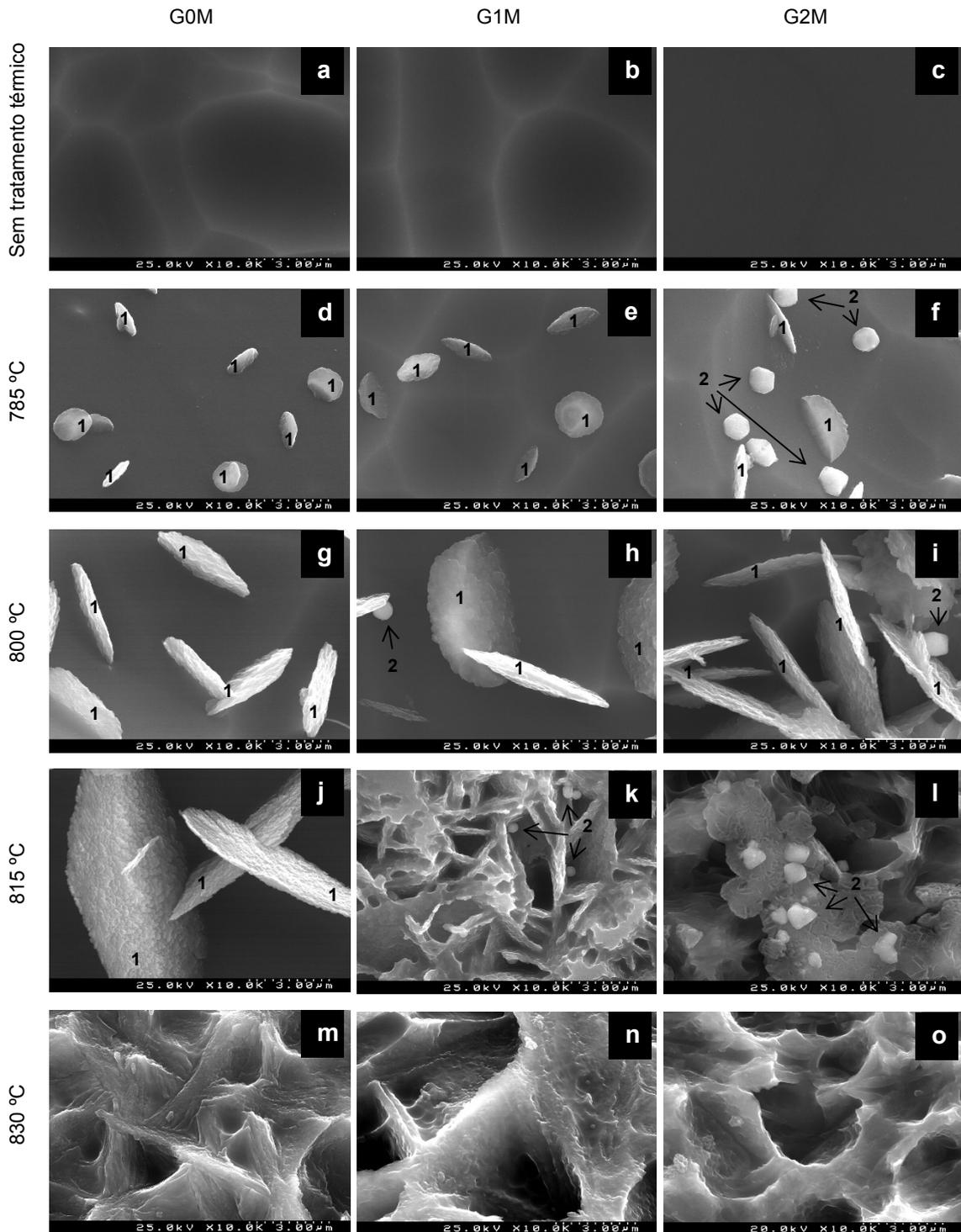
**Tabela 13** - Resumo das leituras das Figuras 14, 15 e 16.

Amostras	Sem tratamento térmico	1 hora 785 °C	1 hora 800 °C	1 hora 815 °C	1 hora 830°C
G0M	Amorfa	Amorfa	Whitlockite (incipiente)	Whitlockite	Whitlockite
G1M	Amorfa	Amorfa	Whitlockite	Whitlockite	Whitlockite
G2M	Amorfa	Amorfa	Whitlockite	Whitlockite	Whitlockite

Após tratamento térmico a 800 °C durante 1 hora, deu-se a formação da mesma fase cristalina, a whitlockite  $[\text{Ca}_{2,71}\text{Mg}_{0,29}(\text{PO}_4)_2]$ , para as composições com prata enquanto que para G0F, a essa temperatura, a presença dessa fase é ainda incipiente. Verifica-se que o tratamento térmico de uma hora a 815 °C promoveu a cristalização de whitlockite em todas as amostras, tendo os tratamentos térmicos a 830 °C intensificado os picos obtidos, o que permite antever um aumento da cristalinidade das amostras tratadas a essa temperatura.

Comparando os resultados nas Tabelas 10 e 13, verifica-se que, para as mesmas composições, a formação de fase cristalina ocorre a temperaturas mais baixas nas amostras de frita do que nas amostras monolíticas. Isto significa que a cristalização é afetada pela área superficial das amostras, a qual é muito superior na frita do que nas amostras monolíticas. A relação entre Ca e P na composição dos vidros é próxima da da fase que cristaliza, a whitlockite. Por isso, a ceramização destes vidros processa-se facilmente em volume [51]. Se este fosse o principal contributo para a cristalização não deveriam detetar-se diferenças entre amostras com diferentes áreas superficiais. O favorecimento da cristalização nas fritas significa que é também importante a componente de cristalização superficial.

Foram obtidas imagens em SEM das amostras de monolíticas, antes e após tratamento térmico (Figura 17), depois de serem atacadas quimicamente por forma a dissolver alguma fase amorfa superficial e revelar as possíveis fases cristalinas presentes. Os ataques químicos foram realizados inicialmente com HCl 1M durante 60 segundos. Posteriormente, devido à formação, na superfície das amostras, de compostos com cloro e prata, proveniente da composição dos vidros, optou-se por usar na preparação das restantes amostras HNO<sub>3</sub> 1M durante o mesmo intervalo de tempo.



**Figura 17** - Micrografias em SEM das amostras monolíticas, sem e com tratamento térmico, atacadas durante 60 segundos com  $\text{HNO}_3$  1M (a,b,c) e com  $\text{HCl}$  1M (d-o).

Na Figura 17 pode observar-se o efeito do tratamento térmico na microestrutura das amostras. Antes dos tratamentos térmicos as amostras revelam uma fase amorfa e homogênea; após tratamento térmico, é observada a ocorrência de formações de seção circular com pouca espessura, assinaladas com (1) na Figura 17, que correspondem à fase cristalina whitlockite identificada por DRX. Em algumas micrografias das composições com prata, verifica-se ainda a deposição, sobre a superfície das amostras, de umas formações de menor dimensão, brilhantes e de cor branca assinaladas com (2) na Figura 17.

Para as 3 composições apresentadas na Figura 17 parece claro que o aumento da temperatura de tratamento térmico favorece o crescimento dos cristais formados no seio da matriz vítrea.

Por forma a avaliar possíveis diferenças ou semelhanças composicionais, foi realizada uma análise por EDS à zona da matriz amorfa, às formações de seção circular indicadas nas imagens (e) e (h) e à estrutura referenciada na imagem (n). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 14, juntamente com os resultados referentes à composição G1M.

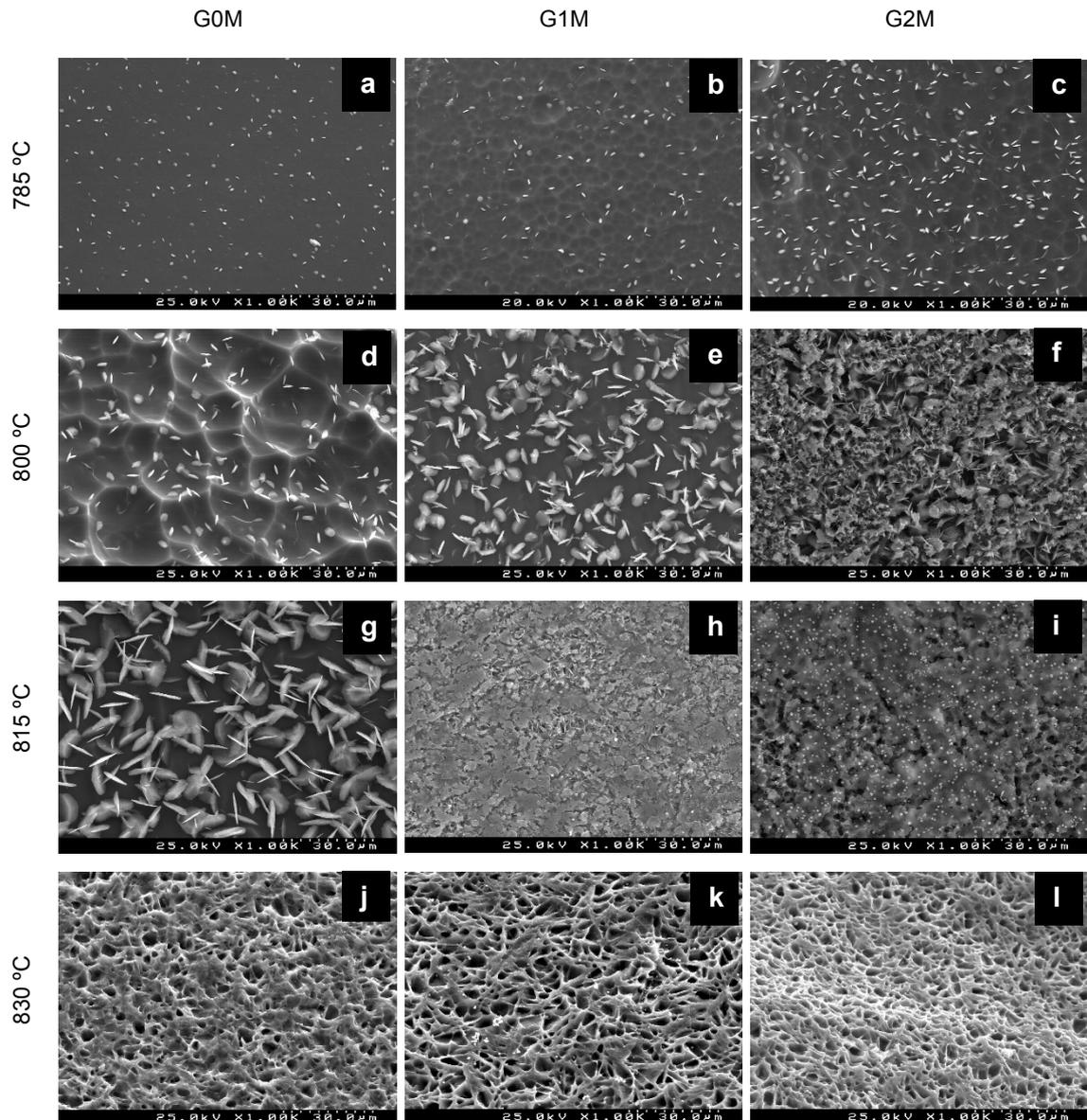
**Tabela 14** - Composição atômica determinada por EDS das amostras monolíticas antes e após tratamento térmico.

Amostras	Zona Imagem	O	Mg	Si	P	Ca	Ag	Ca/P
G1M	Matriz	54,71	12,49	10,79	9,03	12,32	0,66	1,36
G1M 785	Matriz	55,09	13,9	11,05	9,05	10,28	0,63	1,14
	Formação de seção circular (1)	66,92	7,85	7,93	6,45	10,41	0,44	1,61
G1M 800	Matriz	56,61	10,63	9,8	7,94	14,43	0,58	1,82
	Formação de seção circular (1)	65,67	7,06	8,07	6,77	11,65	0,77	1,72
G1M 830	Estrutura	69,13	7,78	7,11	6,48	9,01	0,49	1,39

A composição atômica da estrutura da amostra G1M tratada a 830 °C (Figura 17 (n)) é bastante mais próxima da apresentada pelas formações de seção circular do que pelas zonas da matriz das amostras G1M 785 e G1M 800 (Figura 17 (e) e (h)) as quais exibem uma composição próxima da composição da amostra G1M, toda ela amorfa. Assim, pode concluir-se que a amostra G1M 830 possui uma composição química idêntica à das formações de seção circular, atribuídas à fase de whitlockite. Com efeito, a avaliar pelo difratograma de raios-X na Figura 15, esta é a fase que precipita maioritariamente no seio da matriz vítrea quando se faz o seu tratamento térmico a 830 °C.

A presença de prata revelada por EDS nos precipitados de seção circular é um indicador de que este elemento tenha funcionado como agente nucleante, num processo de nucleação heterogénea [67,70], tendo ficado retida dentro da estrutura da whitlockite. Por observação dos DRX apresentados nas Figuras 15 e 16 verifica-se que a presença de prata proporcionou de facto o aparecimento de whitlockite a 800 °C para G1M e G2M, cristalização essa apenas revelada a 815 °C para a composição sem prata, G0M. De igual modo, em relação às fritas, as temperaturas  $T_{c1}$  e  $T_{p1}$  são mais baixas para as composições G2F do que para G0F, sem prata (Figura 14 e Tabela 6). Nas imagens das amostras tratadas a 785 e 800 °C (Figura 18), é evidente que a nucleação na presença de prata provocou o aparecimento de um maior número de cristais em relação à composição sem prata.

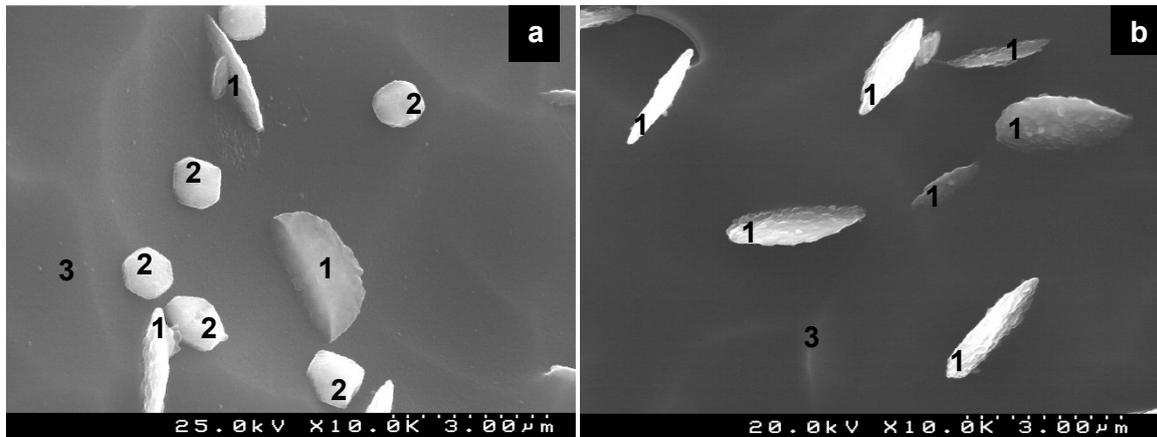
Na Figura 18, com imagens de menor ampliação relativamente às apresentadas na Figura 17, pode observar-se a evolução, em tamanho e em quantidade, das formações cristalinas precipitadas na matriz vítrea, sendo claro, que no tratamento térmico a 830 °C é significativa a percentagem de fase cristalina presente.



**Figura 18** - Micrografias em SEM dos monolíticos G0M, G1M e G2M, após tratamento térmico às temperaturas indicadas e ataque químico com HNO<sub>3</sub> 1M (b,c) durante 60 segundos e os restantes com HCl 1M durante 60 segundos.

As formações de menor dimensão, brilhantes e de cor branca presentes em algumas imagens da Figura 17, identificadas como (2), estão também patentes em algumas das imagens da Figura 18 correspondentes a amostras com prata atacadas quimicamente com HCl. Por EDS verificou-se que estas formações são constituídas maioritariamente por Cl e Ag. Provavelmente durante o ataque ácido, o ião cloro, proveniente do HCl, reagiu com o ião de prata presente nos vidros. Esta hipótese é

reforçada ao observar-se a Figura 19 na qual se apresentam as micrografias da amostra G2M, tratada a 785 °C, atacada com HCl e com HNO<sub>3</sub>.



**Figura 19** - Micrografias obtidas por SEM da amostra G2M tratada termicamente a 785 °C durante uma hora atacada com HCl 1M (a) e com HNO<sub>3</sub> 1M (b).

Foram escolhidas as amostras monolíticas cristalizadas G1M tratadas termicamente a 800 e 830 °C, doravante designadas por G1M 800 e G1M 830, respetivamente, para serem avaliadas nos testes de dissolução, de potencial bioativo e de atividade antibacteriana.

### 4.2.3. Quantificação das fases presentes

As percentagens de fases amorfa e cristalina presentes nas amostras vitrocerâmicas selecionadas foram determinadas com recurso ao método de Rietveld, estando os resultados apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15** - Fatores de acordo do método Rietveld e composição das amostras vitrocerâmicas.

Amostras	Nº de variáveis	Fatores de acordo <sup>(*)</sup>			Fases (%pp)		
		R(F <sup>2</sup> ) (%)	R <sub>WP</sub> (%)	χ <sup>2</sup>	Whitlockite	Amorfa	
Frita	G1F 800	26	7,26	5,97	2,10	25,5	74,5
	G1F 830	27	9,09	5,90	2,46	27,5	72,5
Monolíticas	G1M 800	28	20,89	5,26	0,95	2,8	97,2
	G1M 830	25	11,93	6,22	2,43	21,4	78,6

<sup>(\*)</sup>R(F<sup>2</sup>) - Fator de estrutura; R<sub>wp</sub> - Resíduo ponderado do difratograma; χ<sup>2</sup> - Precisão do ajuste.

Por observação da Tabela 15 verifica-se, para a mesma composição, um aumento da percentagem de fase cristalina com o incremento da temperatura do tratamento térmico. Pode ainda concluir-se que, para a mesma temperatura de tratamento térmico,

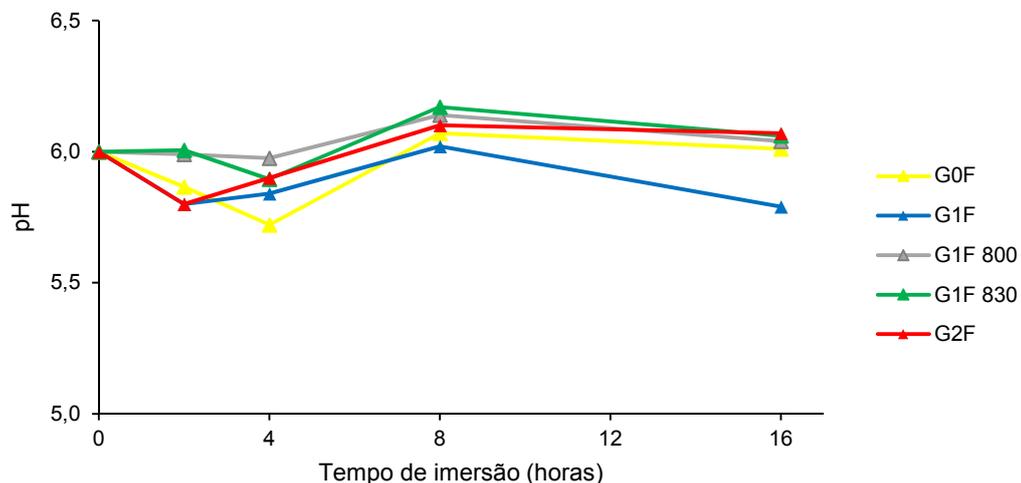
as amostras monolíticas apresentam uma menor percentagem de fase cristalina do que as amostras de frita. Estes resultados evidenciam o contributo de uma cristalização superficial para o processo global de cristalização e estão de acordo com os obtidos por SEM e DRX (seções 4.2.1 e 4.2.2).

### 4.3. Ensaio de dissolução em água destilada

#### 4.3.1. Amostras de frita

A variação do pH da água destilada e % $\Delta$ P das amostras de frita foram determinadas às 2, 4, 8 e 16 horas de imersão. Todas as medições foram feitas em triplicado.

Os resultados da evolução do valor do pH com o tempo de imersão das amostras de frita estão representados graficamente na Figura 20.

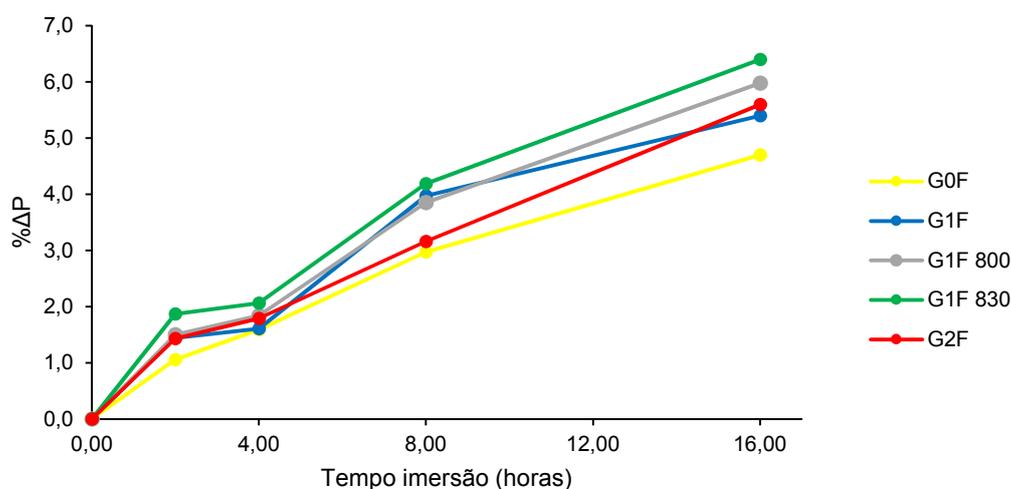


**Figura 20** - Evolução do pH da suspensão com o tempo de imersão das amostras de frita.

Os valores de pH variam, ao longo do ensaio, entre 5,72 e 6,17. Nas primeiras horas de imersão ocorre uma pequena redução do valor de pH para a maioria das amostras. No entanto, ao fim das 16 horas de imersão todos os valores voltam a estar próximos do valor inicial (pH= 6,0), à exceção do valor obtido para a amostra G1F.

A adição de 1 e 2 mol% de  $\text{Ag}_2\text{O}$  à composição original e o aumento da percentagem de fase cristalina nas amostras não influenciam significativamente o valor do pH da suspensão para os tempos de imersão estudados (Figura 20).

Os resultados da  $\% \Delta P$  das amostras de frita com o tempo de imersão estão representados na Figura 21.



**Figura 21** - Evolução da  $\% \Delta P$  das amostras de frita com o tempo de imersão em água destilada.

Verifica-se um aumento de  $\% \Delta P$  com o incremento do tempo de imersão para todas as amostras de frita até às 16 horas de imersão.

Anteriormente (seção 4.1.2) foi sugerido que o  $\text{Ag}_2\text{O}$ , apesar de presente em pequena percentagem, deve entrar na composição como óxido modificador, criando pontos de descontinuidade reticular e, conseqüentemente, uma diminuição da coesão. A adição de 1 e 2% de prata à composição original aumentou a sua taxa de dissolução e causou um aumento da  $\% \Delta P$ , o que está de acordo com os dados reportados na literatura [71].

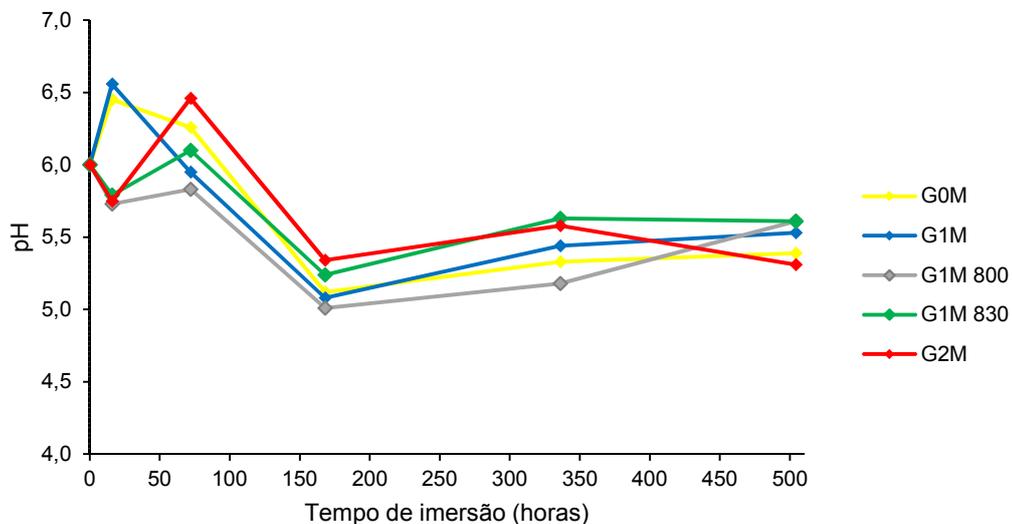
As duas amostras vitrocerâmicas G1F 800 e G1F 830 possuem percentagens de fase cristalina idênticas (25,5 e 27,5%, conforme Tabela 15), apresentando valores de  $\% \Delta P$  próximos mas ligeiramente superiores ao de G1F, com exceção do valor obtido para 8 horas de imersão. Duas situações podem estar a contribuir para estes resultados (i) as amostras vitrocerâmicas apresentam uma maior ASE (Tabela 12) o que facilita a dissolução das partículas ou (ii) a fase cristalina precipitada é mais solúvel que a matriz

vítrea residual. Com efeito, o facto de a fase precipitada ser um fosfato de cálcio, empobrece progressivamente a matriz vítrea nestes elementos à medida que se processa a cristalização, tornando o vidro remanescente cada vez mais rico em sílica e provavelmente menos solúvel. Esta situação foi encontrada por outros autores [13] que verificaram que a fase vítrea é mais estável nas matrizes residuais dos vidros cerâmicos obtidos a temperaturas de cristalização mais elevadas.

### 4.3.2. Amostras monolíticas

A variação do pH da água destilada e da % $\Delta$ P das amostras monolíticas foram determinadas após 16, 72, 168, 336 e 504 horas de imersão, tendo todas as medições sido feitas em triplicado.

Os resultados da variação do pH da água destilada com o tempo de imersão das amostras monolíticas estão representados na Figura 22.



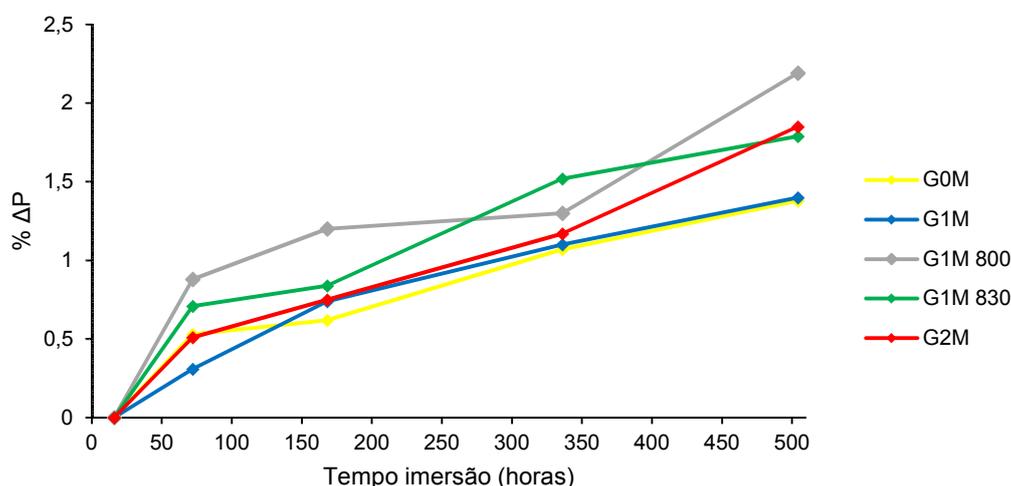
**Figura 22** - Evolução da variação do valor de pH da suspensão com o tempo de imersão das amostras monolíticas.

O valor mínimo de pH foi 5,08 e o máximo 6,56. À excepção da amostra G2M, ao fim de 168 horas de imersão, o pH da solução atinge os valores mínimos e, passadas 504 horas de imersão, o pH das soluções é ligeiramente inferior ao pH inicial da água destilada.

A adição de 1 e 2 mol% de prata não afeta significativamente a variação do valor do pH da solução com o tempo de imersão. Para as composições sem e com 1 mol% de  $\text{Ag}_2\text{O}$ , o valor máximo de pH ocorre às 16 horas e, para 2 mol% de adição de prata, o valor máximo de pH ocorre às 72 horas.

A presença da fase cristalina nas amostras não influencia significativamente a variação do pH da solução para os tempos de imersão estudados. No entanto, as amostras cristalizadas apresentam uma redução do valor de pH às 16 horas de imersão; G1M, para esse tempo de imersão, apresenta o valor máximo.

Os resultados da variação da  $\% \Delta P$  de todas as amostras monolíticas estão patentes na Figura 23.



**Figura 23** - Evolução da  $\% \Delta P$  das amostras monolíticas com o tempo de imersão em água destilada.

Para tempos de imersão inferiores a 16 horas nenhuma das amostras monolíticas apresentou perdas de peso detetáveis na balança utilizada, ao contrário das amostras de frita que, devido à sua maior ASE, apresentaram perda de peso para 2 horas de imersão. Ao fim de 504 horas (21 dias) todas as amostras monolíticas apresentam valores de  $\% \Delta P$  baixos (entre 1,38 e 2,19) inferiores aos das amostras de frita ao fim de 16 horas de imersão, para as quais as perdas variaram entre 4,70 e 6,40%.

A partir das 72 horas de imersão todas as amostras monolíticas revelaram um aumento da  $\% \Delta P$  com o incremento do tempo de imersão.

A partir das 168 horas verifica-se que a adição de prata favorece a dissolução das amostras, provavelmente pelo mesmo motivo apontado para as amostras de frita, ou

seja, a introdução da prata poderá ter provocado uma diminuição da coesão reticular, por se tratar de um ião modificador de rede.

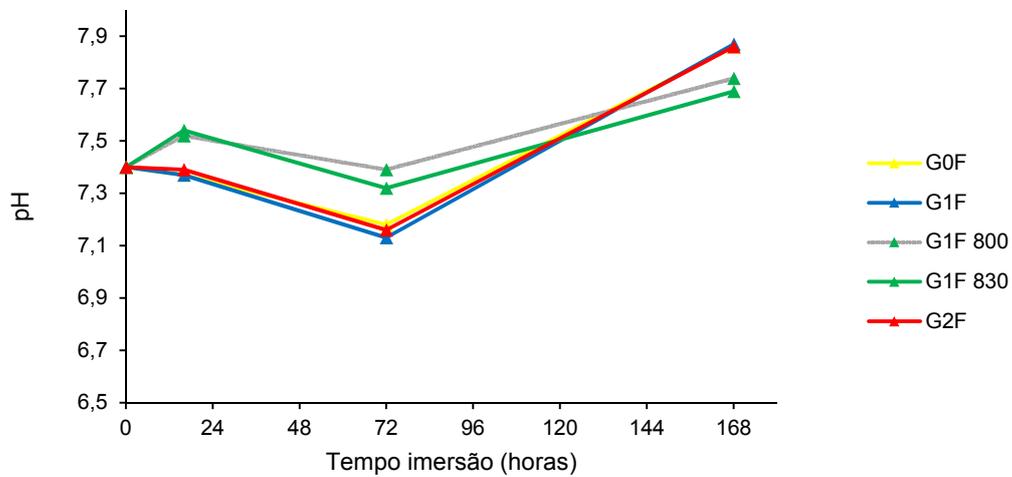
As amostras cristalizadas foram as que apresentaram os maiores valores de  $\% \Delta P$  para todos os tempos de amostragem. Como referido anteriormente para as amostras de frita, é de admitir que a whitlockite seja a fase mais solúvel no vidro cerâmico, comparativamente com a matriz vítrea residual, que fica progressivamente mais rica em  $\text{SiO}_2$  pelo facto de o Ca e o P estarem a ser utilizados na formação dos cristais de whitlockite.

#### **4.4. Ensaio de mineralização em fluido fisiológico sintético**

##### **4.4.1. Amostras de frita**

Após imersão em SBF acelular, onde foram mantidas a 37 °C durante os intervalos de tempo definidos (16, 72 e 168 horas), as amostras foram analisadas por SEM, EDS e DRX para se verificar se ocorreu deposição de fosfatos de cálcio nas suas superfícies e, desta forma, avaliar o seu potencial bioativo. A variação do pH do SBF foi monitorizada e o SBF foi analisado por ICP para se efetuar o estudo da variação nas concentrações dos iões lixiviados das amostras para a suspensão com o decorrer do tempo de imersão.

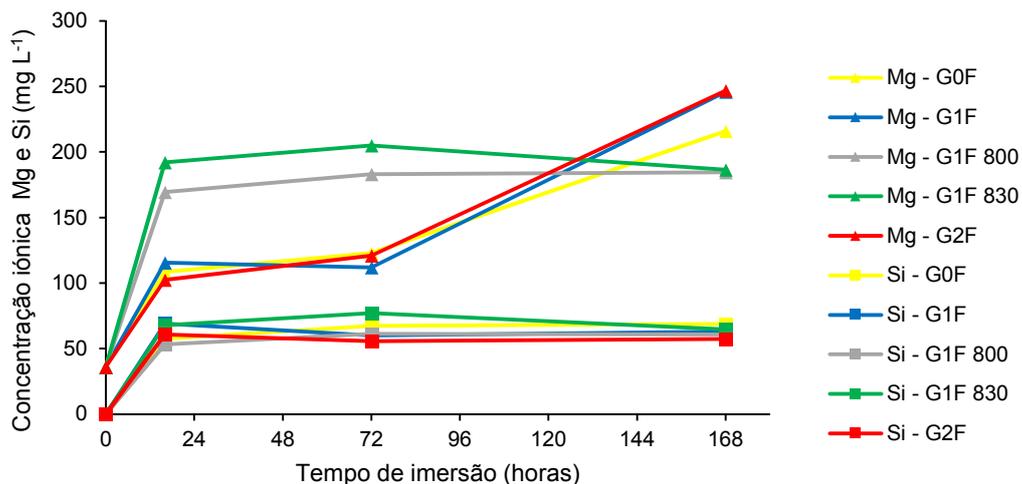
Por observação da Figura 24 verifica-se que não ocorreram variações acentuadas dos valores de pH do SBF durante a imersão das amostras de frita. O valor mínimo de pH medido foi de 7,13 e o máximo foi de 7,89. Passadas 168 horas de imersão o pH do SBF é apenas ligeiramente superior ao inicial.



**Figura 24** - Evolução do pH do SBF com o tempo de imersão das amostras de frita.

Para os tempos de imersão estudados, a adição de 1 e 2 mol% de prata e a variação da percentagem de fase cristalina presente nas amostras não influenciou a variação do valor de pH do SBF.

A variação, com o tempo de imersão, da concentração dos íons relevantes presentes no SBF após imersão das amostras de frita foi avaliada por ICP, estando os resultados obtidos apresentados nas Figuras 25, 26 e 27.

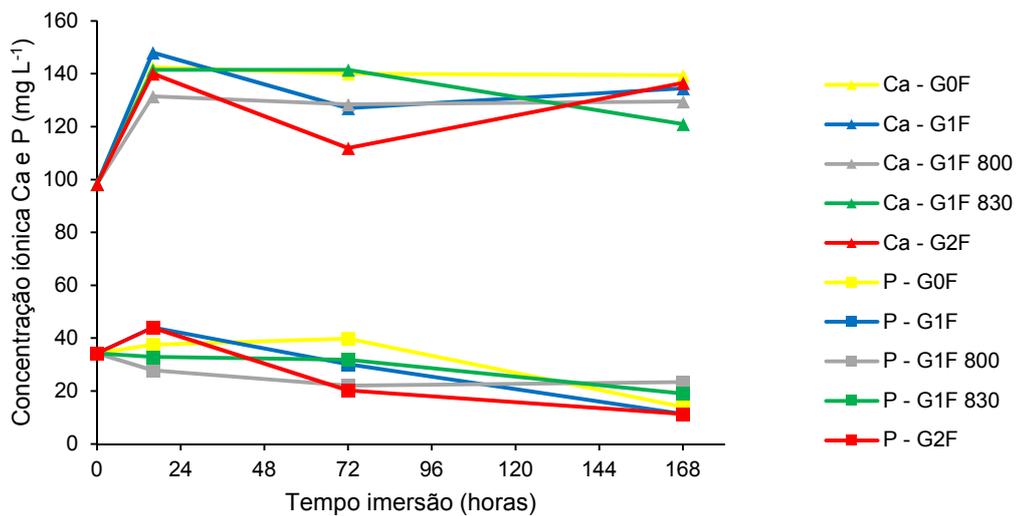


**Figura 25** - Variação das concentrações iônicas de Mg e Si com o tempo de imersão das amostras de frita.

A imersão das amostras de frita moída dá origem à lixiviação de Si e Mg para o SBF.

Como não existe Si no SBF, todo o silício quantificado em solução é proveniente da dissolução das amostras de frita. Após o aumento inicial até às 16 horas a concentração de Si no SBF mantém-se praticamente constante até às 168 horas de imersão para todas as amostras.

A libertação de Mg é superior nas amostras vitrocerâmicas até às 72 horas de imersão, mas, para tempos superiores, a libertação de Mg parece parar nas amostras vitrocerâmicas mas continuar nas amostras vítreas. A formação da camada superficial de fosfato de cálcio mais cedo nos vitrocerâmicos, como demonstrado posteriormente, poderá ter impedido a progressão da dissolução do Mg nessas amostras, processo esse que continua a ocorrer nas amostras amorfas.

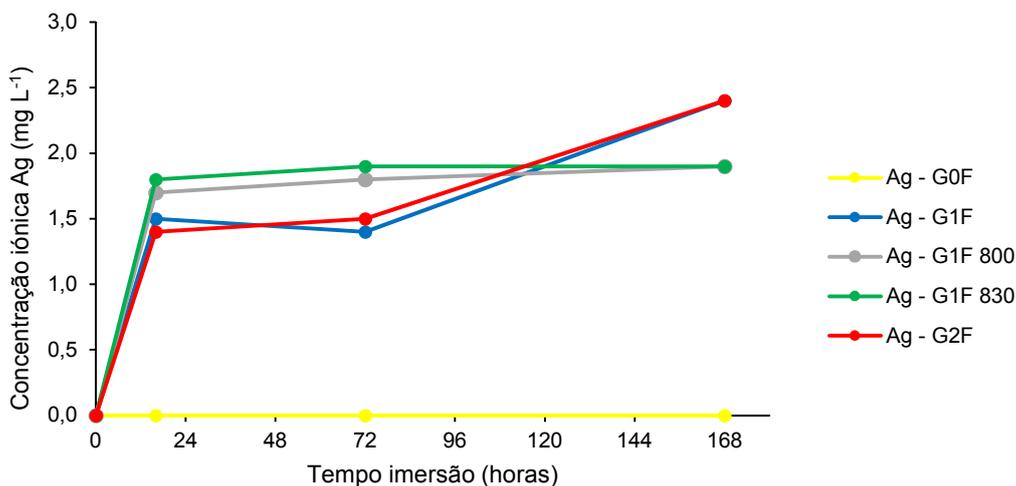


**Figura 26** - Variação das concentrações iônicas de Ca e P com o tempo de imersão das amostras de frita.

Para todas as amostras verifica-se um aumento significativo da concentração iônica de Ca em suspensão desde o início até 16 horas de imersão sugerindo que até esse tempo está a ocorrer dissolução desse íon a partir da frita. Esse valor volta a diminuir ou a manter-se idêntico até às 168 horas, consoante as amostras, o que é indicativo de que poderá ter começado a ocorrer precipitação de compostos com cálcio às 16 horas de imersão para todas as amostras.

A partir das 16 horas de imersão a tendência geral para todas as amostras é a diminuição da concentração do fósforo em solução o que sugere que esteja a ocorrer precipitação desse elemento conjuntamente com o cálcio. No entanto, para as amostras

vitrocerâmicas, essa precipitação poderá ter-se iniciado antes visto que os valores verificados às 16 horas já são inferiores aos originais. A acentuada diminuição da concentração iónica de cálcio e fósforo às 72 horas para a frita G2F é concordante com a precipitação de partículas esféricas típicas de fosfato de cálcio evidentes na Figura 28 n).



**Figura 27** - Variação da concentração iónica de Ag com o tempo de imersão das amostras de frita.

Na Figura 27 verifica-se que às 16 horas de imersão todas as amostras com prata na sua composição libertam esse elemento para o SBF em concentrações iónicas abaixo do limite de toxicidade [33,44,71]. As primeiras 6 horas após a implantação de um dispositivo são consideradas críticas, pelo que uma libertação inicial de iões de prata como a verificada pode considerar-se benéfica para redução da adesão bacteriana [73].

Ao fim de 16 horas a lixiviação dos iões de prata é mais elevada a partir das amostras vitrocerâmicas do que a partir das fritas de vidro não ceramizado, mantendo-se esse valor praticamente constante nas outras duas amostragens realizadas às 72 e 168 horas de imersão. Nestas amostras a libertação de prata deixa de existir a partir das 72 horas de imersão.

Nas amostras vítreas G1F e G2F verifica-se uma ligeira diminuição da concentração de prata em solução às 72 horas de imersão, estando este facto relacionado com o consumo de prata em solução para a formação de cloreto de prata, como adiante será mostrado nas análises de DRX, Figuras 32 e 35. A formação destes compostos pode diminuir a atividade antibacteriana destas amostras, por redução da concentração de iões de prata em solução [73]. Ao fim de 168 horas de imersão as amostras G1F e G2F foram as que libertaram maior quantidade de prata para o SBF.

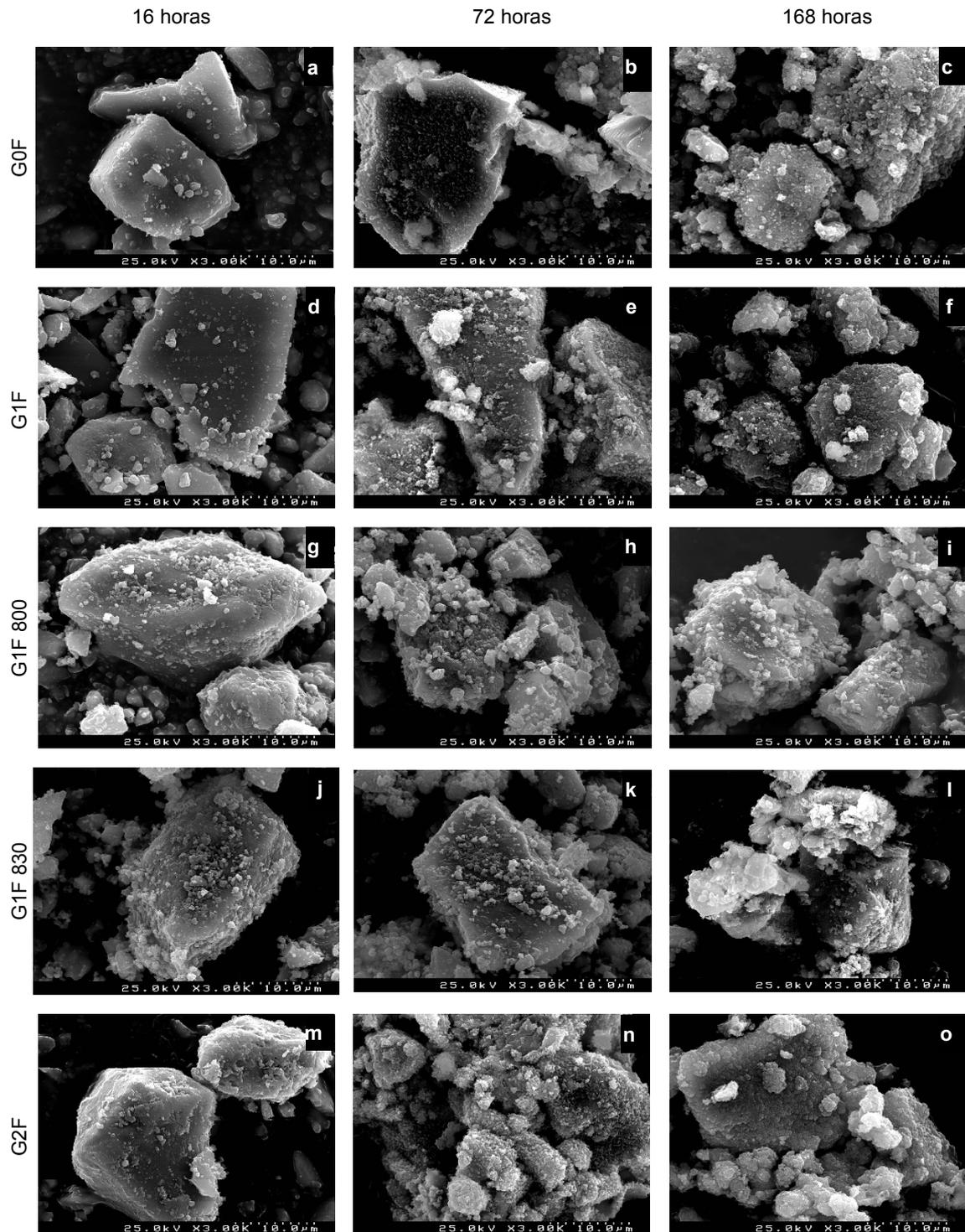
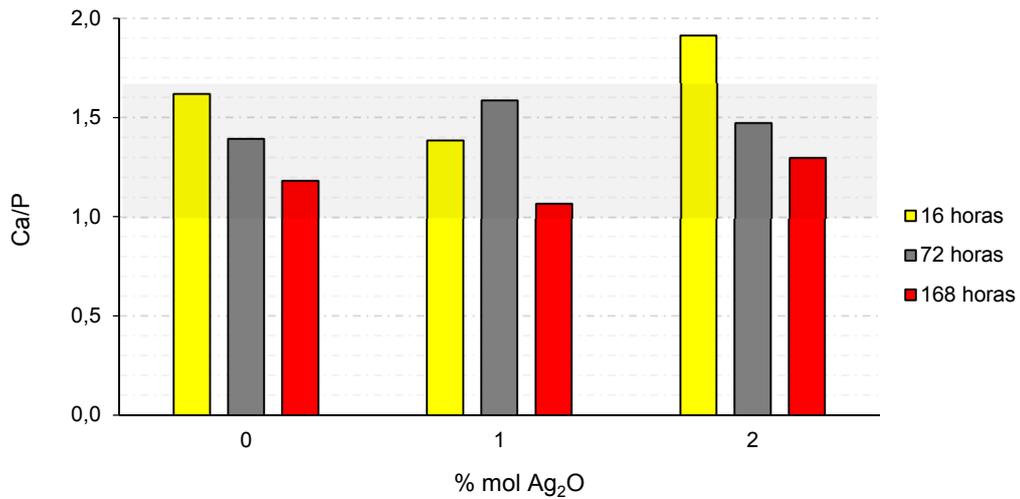


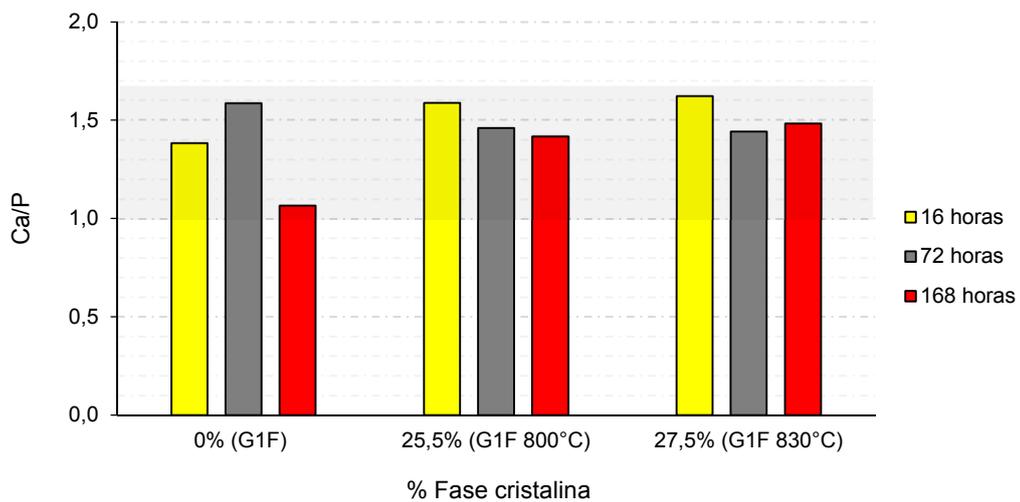
Figura 28 - Imagens por SEM das amostras de frita após imersão em SBF durante os tempos indicados.

As imagens obtidas por SEM, Figura 28, mostram que ocorre uma variação da morfologia da superfície das amostras vítreas entre as 16 e as 72 horas de imersão. As amostras vitrocerâmicas não apresentam uma alteração de morfologia da superfície tão evidente entre esses dois tempos, o que pode significar que nessas amostras as alterações de morfologia terão ocorrido antes das 16 horas. As amostras vitrocerâmicas foram as que apresentaram a maior  $\% \Delta P$  em água destilada até às 16 horas de imersão (Figura 21) resultados que estão de acordo com os obtidos por ICP. Observando as Figuras 25 e 27, pode verificar-se que foram as amostras vitrocerâmicas as que libertaram uma maior quantidade de íões para o SBF até às 16 horas de imersão. Estes resultados evidenciam que as trocas iónicas entre as amostras vitrocerâmicas e o SBF começaram a ocorrer antes das 16 horas. Para além disso, a diminuição da concentração de P em solução, em relação ao valor inicial às 16 horas de imersão (Figura 25), demonstra que já se deve ter iniciado a precipitação de algum composto com esse elemento. No caso do Ca, o fato do valor da sua concentração se manter praticamente constante para todos os tempos de imersão, pode significar que a sua precipitação começou a ocorrer antes das 16 horas, como referido anteriormente, com o contributo de íões de Ca provenientes não só do fluido como também das amostras imersas.

Ao fim de 168 horas de imersão verifica-se que ocorreu a nucleação e o crescimento de partículas esféricas, típicas de uma estrutura apatítica na superfície de todas as amostras. Uma análise por EDS revelou que os precipitados são ricos em cálcio e em fósforo e por DRX confirmou-se a sua natureza cristalina. Os resultados obtidos para a evolução da razão Ca/P nos precipitados com o tempo de imersão no SBF, em função da percentagem de  $Ag_2O$  e da percentagem de fase cristalina presente na amostra, encontram-se representados nas Figuras 28 e 29, onde se delimitou os valores de interesse para a razão Ca/P, entre 1 para a bruxite e 1,67 para a HA.



**Figura 29** - Resultados obtidos por EDS para a evolução da razão Ca/P nos precipitados formados sobre as fritas imersas em SBF por vários tempos, em função da % de  $\text{Ag}_2\text{O}$  adicionada à composição original.



**Figura 30** - Resultados obtidos por EDS para a evolução da razão Ca/P nos precipitados formados sobre as fritas imersas em SBF por vários tempos, em função da % de fase cristalina presente na amostra.

As amostras vitrocerâmicas são as que apresentam a menor variação da razão Ca/P nos intervalos de tempo estudados.

Foram realizadas DRX aos pós das cinco amostras de frita em estudo após imersão em SBF encontrando-se os resultados nas Figuras 31 a 35. A formação de uma camada de apatite sobre a superfície das amostras foi confirmada por DRX.

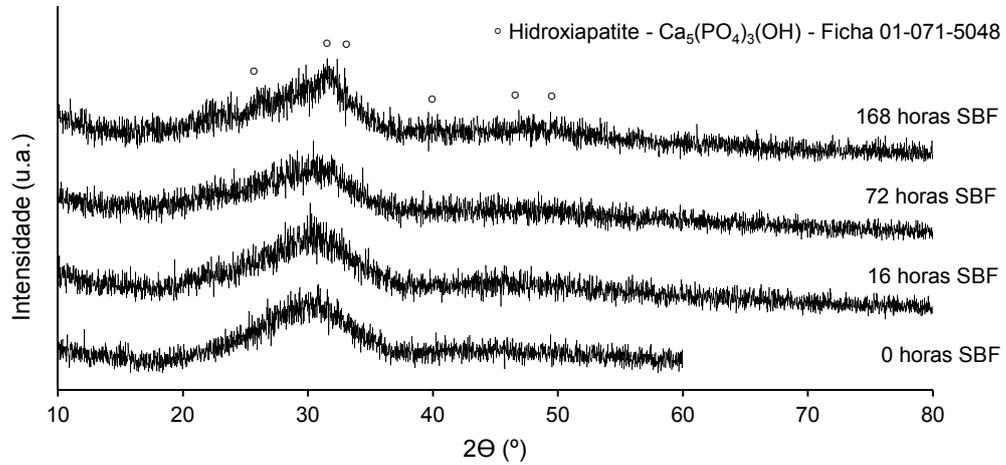


Figura 31 - Difratomogramas das amostras de G0F após imersão em SBF durante os tempos indicados.

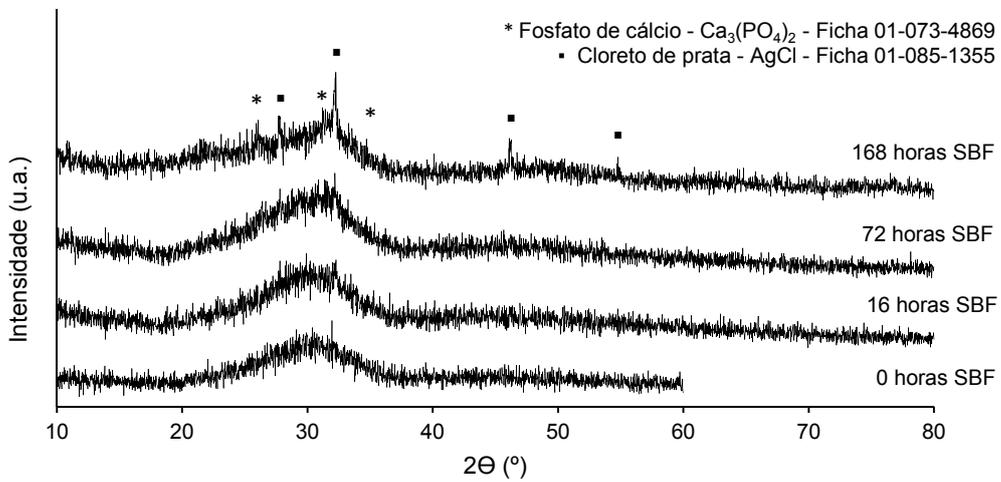
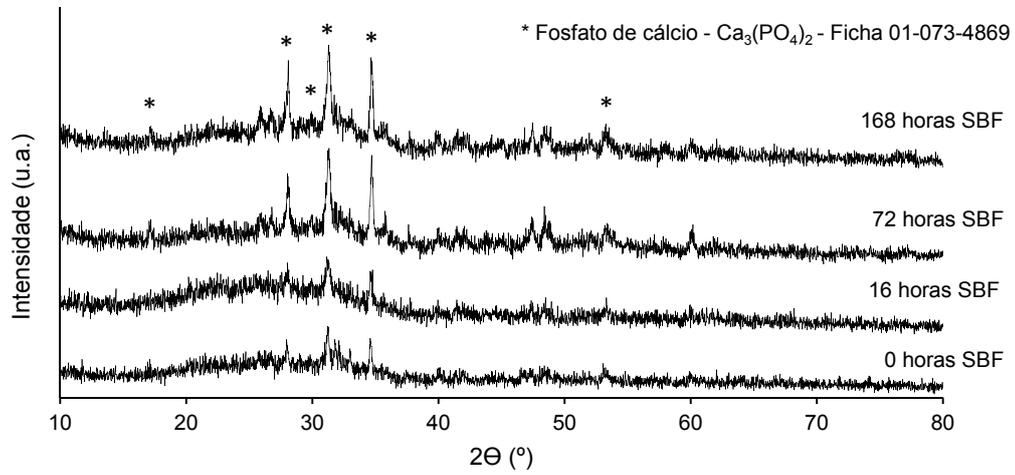
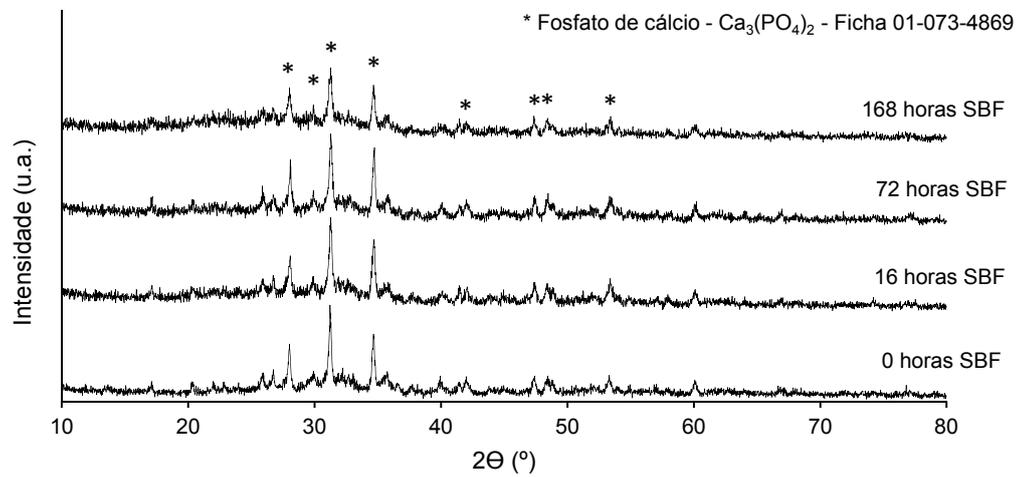


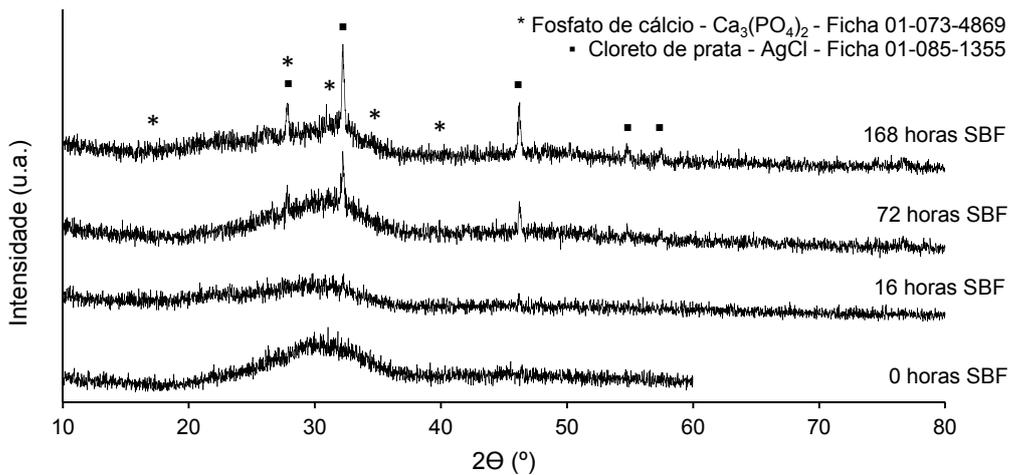
Figura 32 - Difratomogramas das amostras de G1F após imersão em SBF durante os tempos indicados.



**Figura 33** - Difratomogramas das amostras de G1F tratadas termicamente (1 hora a 800 °C) após imersão em SBF durante os tempos indicados.



**Figura 34** - Difratomogramas das amostras de G1F tratadas termicamente (1 hora a 830 °C) após imersão em SBF durante os tempos indicados.



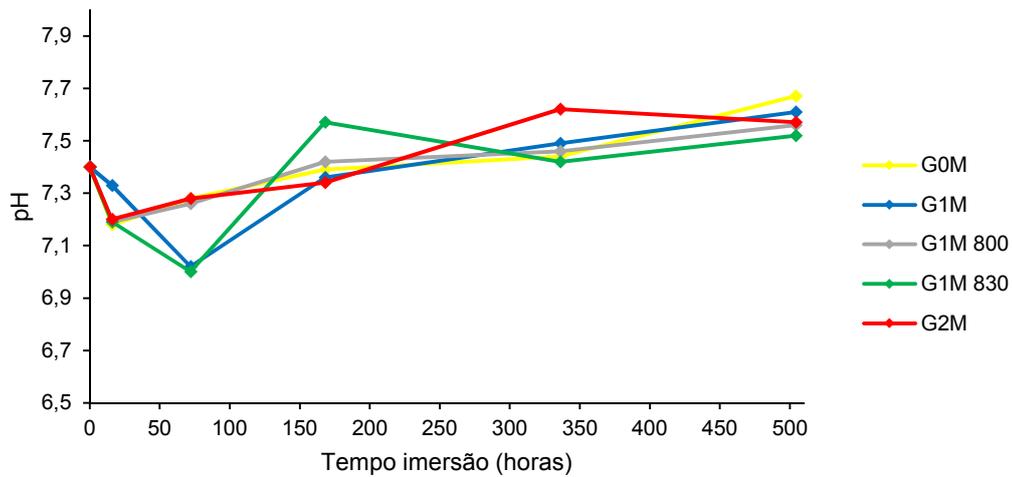
**Figura 35** - Difratogramas das amostras de G2F após imersão em SBF durante os tempos indicados.

Ao fim de 168 horas de imersão ocorre a formação incipiente de HA na superfície da amostra G0F (Figura 31). Para o mesmo tempo de imersão as amostras G1F e G2F (Figuras 32 e 35) apresentam a formação incipiente de fosfato de cálcio e cloreto de prata. A formação de AgCl, na superfície da amostra G2F, verifica-se após 72 horas de imersão. A formação de cloreto de prata na superfície das amostras de vidros bioativos dopados com prata depois de imersos em SBF é referida por diversos autores [10,72-74].

Nos difratogramas das amostras cristalizadas (Figuras 33 e 34), a presença de whitlockite no *bulk* das amostras, torna difícil avaliar uma possível deposição desse composto na superfície das amostras pela técnica de DRX. No entanto, os resultados de ICP, SEM/EDS e  $\% \Delta P$  mostram que as amostras em questão são as primeiras a iniciar a precipitação de compostos de Ca e P.

#### 4.4.2. Amostras monolíticas

A variação do valor do pH do SBF durante a imersão das amostras monolíticas durante os intervalos de tempo 16, 72, 168, 336, e 504 horas foi monitorizada encontrando-se os resultados obtidos na Figura 36.



**Figura 36** - Evolução do pH do SBF com o tempo de imersão das amostras monolíticas.

A variação do valor de pH observada durante os tempos de amostragem é pouco significativa, não permitindo tirar ilações sobre quais as reações que estarão a ocorrer entre a superfície do material e o SBF. O valor mínimo medido foi de 7,00, e o valor máximo foi de 7,67. Para todas as amostras verifica-se uma ligeira diminuição do valor de pH às 16 horas de amostragem, continuando a diminuir até às 72 horas de imersão para as amostras G1M e G1M 830. Com o aumento do tempo de imersão o valor de pH tende a aproximar-se do inicial para todas as amostras. A introdução de 1 e 2 mol% de  $\text{Ag}_2\text{O}$  na composição e a presença de fase cristalina não afetam significativamente estes resultados experimentais.

A superfície de todas as amostras monolíticas após imersão em SBF (16, 72, 168, 336, e 504 horas) foi analisada por SEM e EDS. As imagens obtidas são apresentadas nas Figuras 37, 38 e 39.

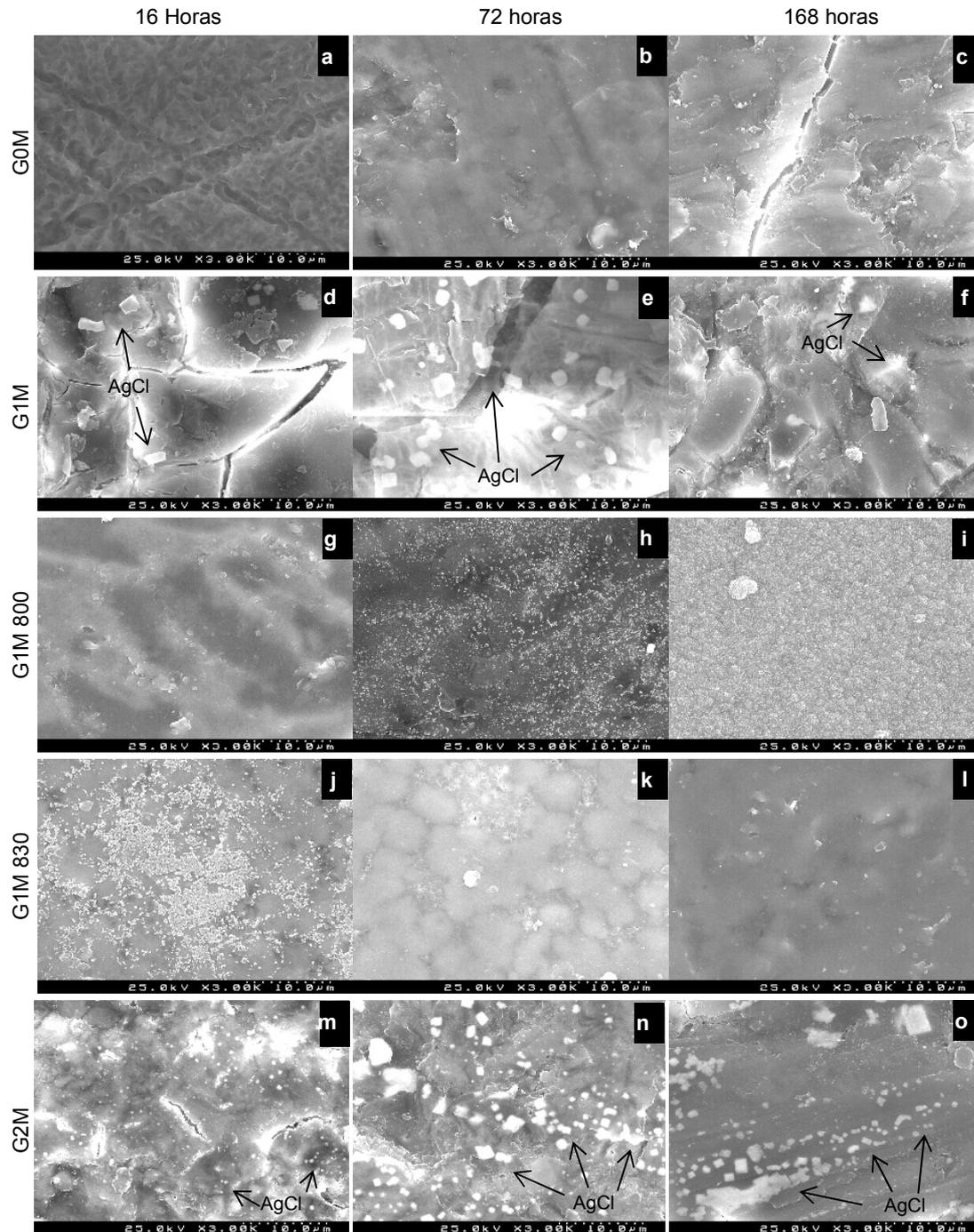
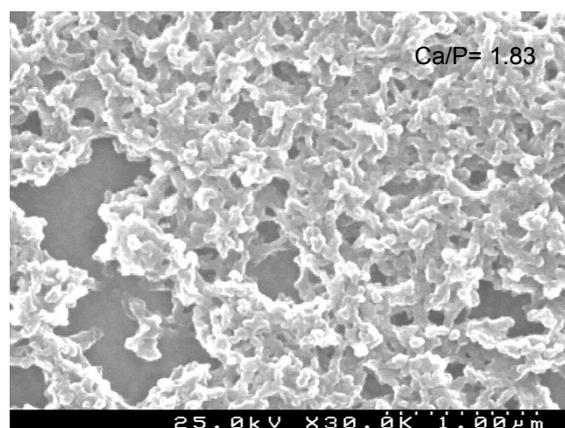


Figura 37 - Imagens em SEM das amostras monolíticas após imersão em SBF durante os tempos indicados.

As imagens das amostras G0M obtidas até às 168 horas de imersão, Figura 37 a), b) e c), revelam alterações da superfície devido à dissolução das amostras.

Tal como verificado nas amostras de frita, na superfície das amostras vítreas monolíticas com  $\text{Ag}_2\text{O}$  na sua composição (G1M e G2M) ocorre a formação de  $\text{AgCl}$ . A sua quantidade é maior na superfície da amostra G2M, possivelmente devido à maior disponibilidade de prata em solução após dissolução. Conclui-se ser  $\text{AgCl}$  o composto formado com base nos resultados obtidos por análises de EDS e de DRX de ângulo rasante efetuadas à superfície das amostras. Por observação da Figura 37 f) e o) as partículas de  $\text{AgCl}$  parecem já não se encontrar sobre a superfície mas, aparentemente, cobertas. O EDS realizado a essa amostra revelou a presença de Ag, mas não de Cl, elemento nunca antes identificado, o que indica que as partículas de  $\text{AgCl}$  se encontram realmente cobertas.

As amostras vitrocerâmicas apresentam um comportamento distinto das amostras vítreas até às 168 horas de imersão. Apesar de o EDS revelar a presença de Ag e de Cl em concentrações atômicas idênticas às das amostras vítreas às 72 horas de imersão, e de os DRX de ângulo rasante revelarem a presença de  $\text{AgCl}$  (Figura 37 h) e K)) da Figura 36 não se verifica a formação de partículas de  $\text{AgCl}$  com as dimensões observadas na superfície das amostras vítreas. A existirem serão muito mais pequenas ou não se encontravam na zona onde foram efetuadas as micrografias. As amostras G1M 800 e G1M 830 apresentam na sua superfície núcleos de uma formação do tipo apatite às 72 e 16 horas de imersão, respetivamente. Na Figura 38 encontra-se um pormenor dessa formação na amostra G1M 830 após 16 horas de imersão.



**Figura 38** - Pormenor da superfície da amostra G1M 830 °C após 16 horas de imersão.

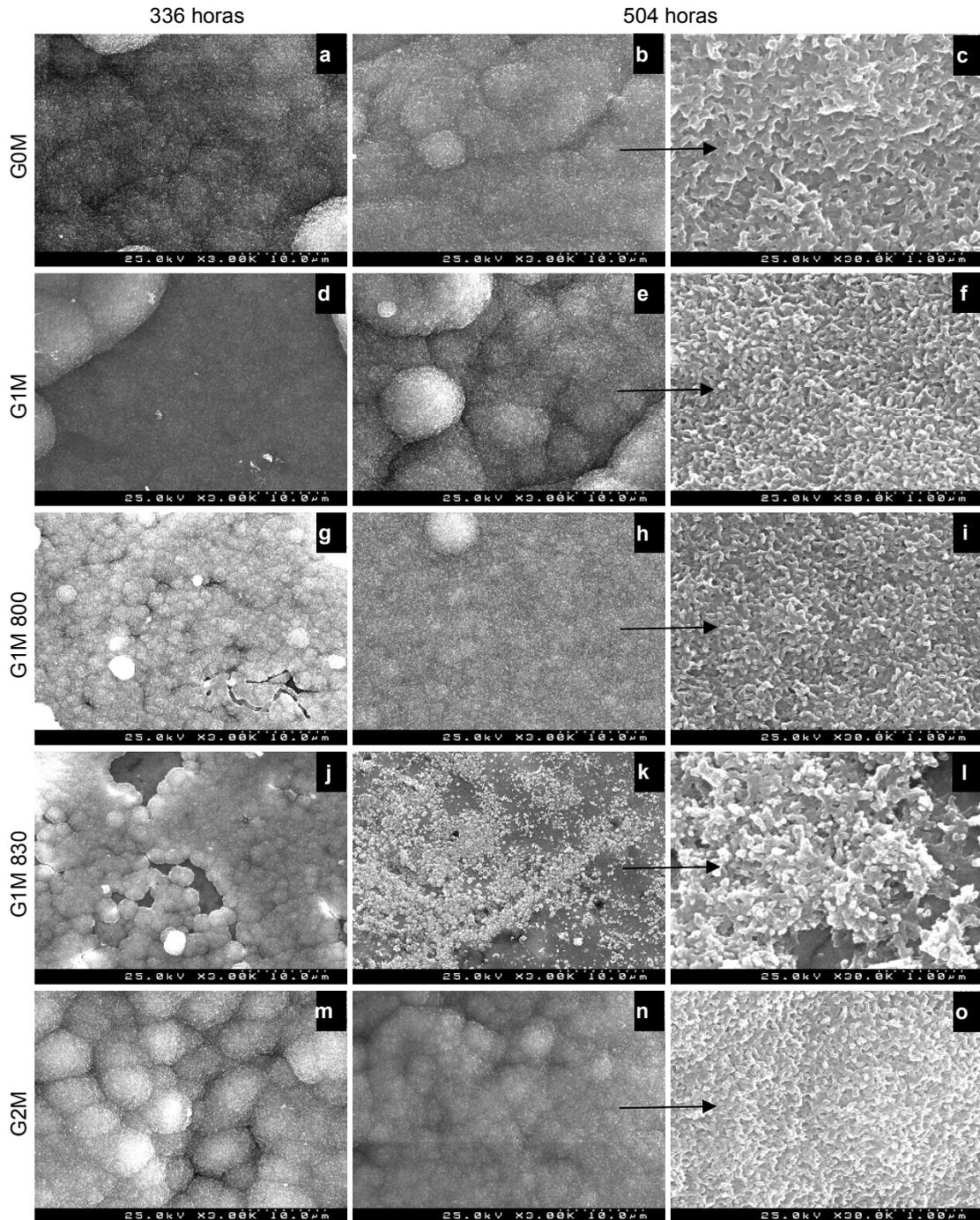
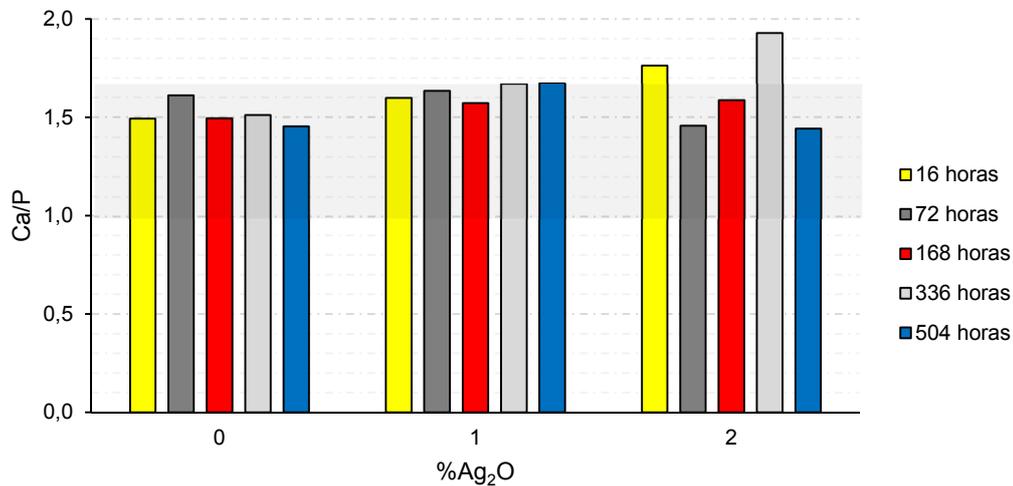


Figura 39 - Imagens por SEM das amostras monolíticas após imersão em SBF durante os tempos indicados; onde: c), f), i), l) e o) são pormenores da superfície das amostras imersas durante 504 horas.

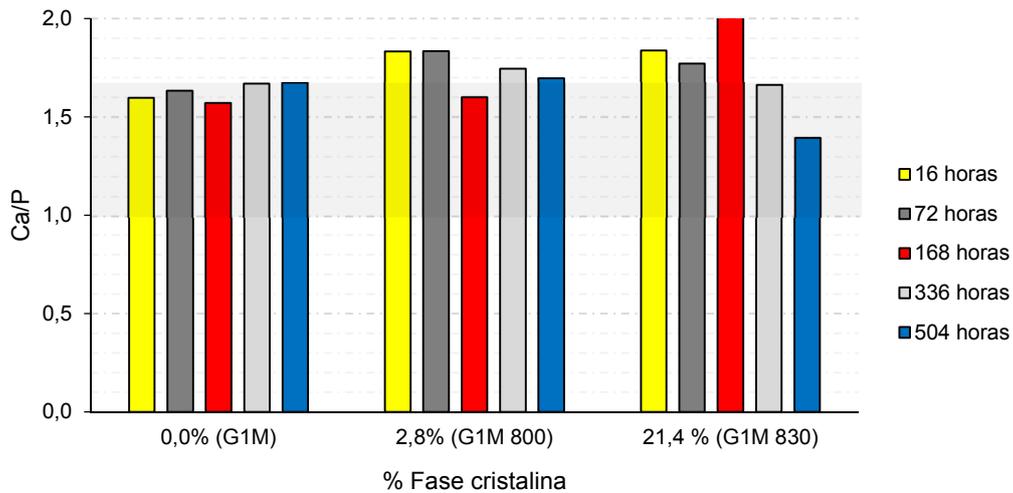
Na Figura 39 pode observar-se que ao fim de 336 horas de imersão em SBF ocorreu a nucleação e o crescimento de partículas esféricas, típicas de uma estrutura apatítica, na superfície de todas as amostras. Ao fim de 504 horas de imersão, a superfície de todas as amostras encontra-se coberta, quase na sua totalidade, por essas formações. As partículas de AgCl identificadas nas Figura 37 foram cobertas pela camada apatítica [72].

Os resultados obtidos para a evolução da razão Ca/P com o tempo de imersão no SBF, em função da percentagem de Ag<sub>2</sub>O adicionada à composição original e em função da percentagem de fase cristalina presente na amostra, encontram-se representados nas Figuras 40 e 41, onde se delimitou os valores de interesse para a razão Ca/P, entre 1 para a bruxite e 1,67 para a HA.



**Figura 40** - Resultados obtidos por EDS para a evolução da razão Ca/P nos precipitados formados sobre os monolíticos imersos em SBF por vários tempos, em função da % de Ag<sub>2</sub>O adicionada à composição original.

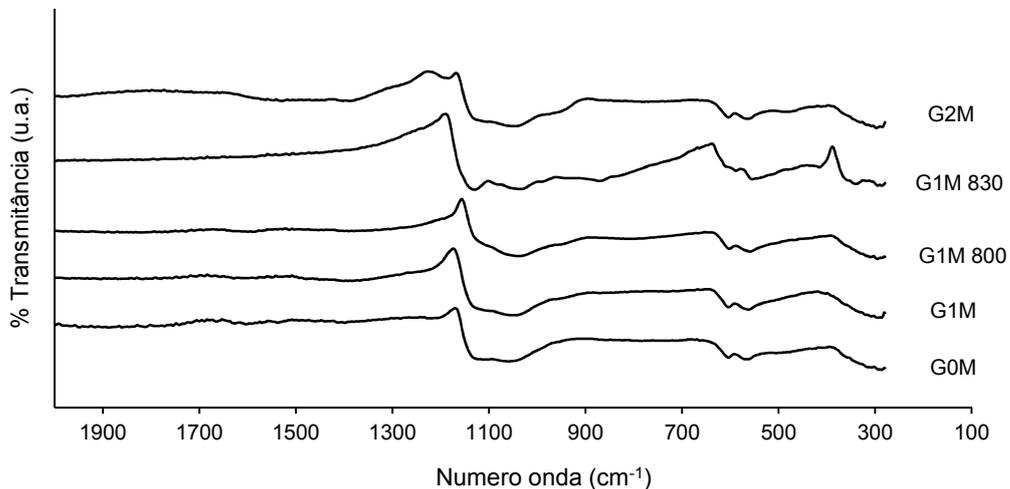
As amostras com adição de 1% de Ag<sub>2</sub>O apresentaram, desde as 16 horas, valores de Ca/P mais próximos de 1,67 do que a composição sem prata.



**Figura 41** - Resultados obtidos por EDS para a evolução da razão Ca/P nos precipitados formados sobre os monolíticos imersos em SBF por vários tempos, em função da % de fase cristalina presente na amostra.

Comparando com os valores obtidos para G1F, a presença de 2,8 e 24,4% de fase cristalina nas amostras provocou, de um modo geral, um aumento de Ca/P. Para as 504 horas de imersão o valor encontrado para Ca/P na amostra G1M 830 é o mais baixo de todos os tempos de imersão.

Foram também realizadas análises de FTIR/DRIFT, às amostras monolíticas imersas durante 504 horas, Figura 42.



**Figura 42** - Espectros FTIR /DRIFT das amostras imersas durante 504 horas.

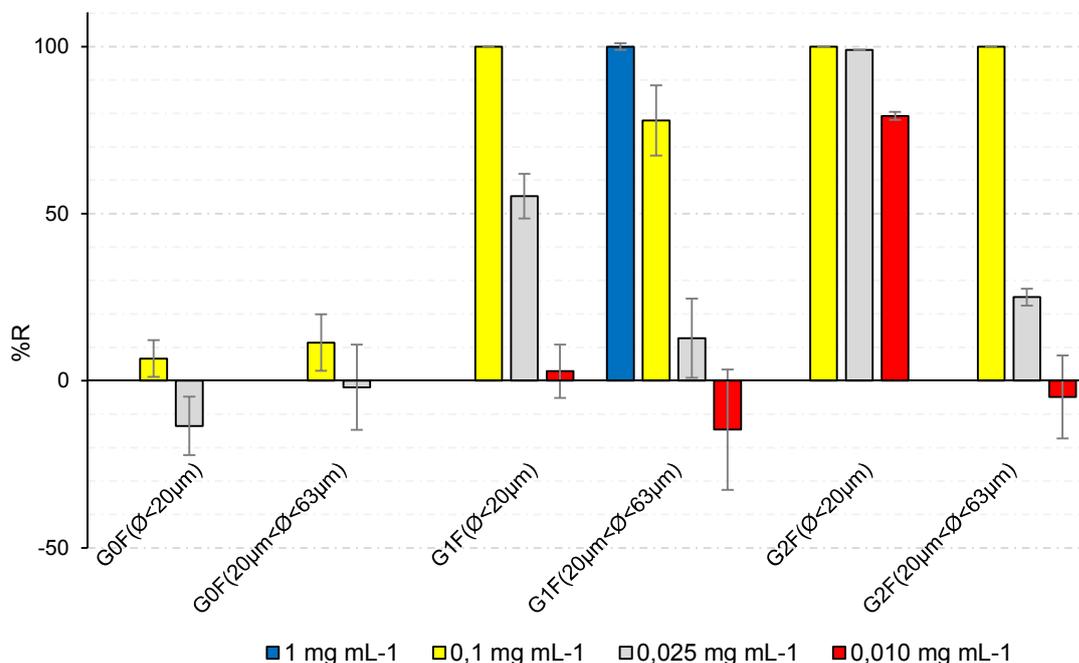
A hidroxiapatite (HA) apresenta duas bandas características, uma entre 960 e 1100  $\text{cm}^{-1}$  atribuída às vibrações características do estiramento das ligações P-O, e outra entre 450 e 660  $\text{cm}^{-1}$  atribuída à vibração de flexão das ligações P-O.

Na Figura 42 podemos verificar que todas as amostras apresentam vales a  $\sim 605$  e  $\sim 567 \text{ cm}^{-1}$ , números de onda característicos da vibração de flexão das ligações P-O da HA cristalina, e um ombro a  $\sim 960$  e um vale a  $\sim 1038 \text{ cm}^{-1}$  atribuídos às vibrações características do estiramento das ligações P-O também na HA [13,16,60,65,69]. A amostra G1M 830 apresenta ainda um vale a  $\sim 871 \text{ cm}^{-1}$  correspondente à vibração das ligações C-O dos grupos carbonato na HCA [16]. Todas as amostras, decorridas 504 horas de imersão em SBF, apresentam as bandas associadas às ligações  $\text{PO}_4^{3-}$  na HA, o que evidencia a deposição desse composto nas suas superfícies.

A dopagem com prata e a presença de fase cristalina não comprometeram o potencial bioativo do material, tendo a presença de maior percentagem de fase cristalina antecipado o desencadear dos processos de formação da HCA. A análise por EDS efetuada às formações esféricas depositadas após 504 horas de imersão revelou razões Ca/P entre 1,44 e 1,69 ou seja próximas da existente na HA (Ca/P=1,67), Figuras 40 e 41, e por FTIR/DRIFT foi confirmada a presença desse composto, Figura 42.

#### **4.5. Ensaio de avaliação da ação antibacteriana *in vitro* das amostras de frita**

Na Figura 43 estão representadas as variações das percentagens de redução das UFCs de *Escherichia coli* (*E. coli*) com a concentração dos pós de frita, a percentagem de  $\text{Ag}_2\text{O}$  na frita e a granulometria das amostras.



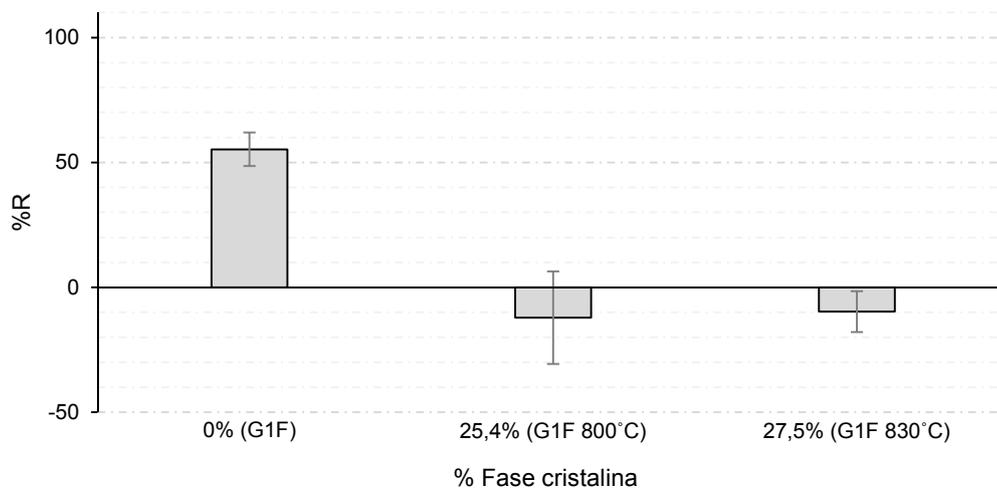
**Figura 43** - Evolução da percentagem de redução das UFCs com a concentração em pó das fritas (1; 0,1; 0,025 e 0,010 mg mL<sup>-1</sup>), percentagem de Ag<sub>2</sub>O na frita e granulometria das amostras.

As duas amostras sem prata, G0F ( $\phi < 20 \mu\text{m}$ ) e G0F ( $20 \mu\text{m} < \phi < 63 \mu\text{m}$ ), não apresentam ou é incipiente a atividade antibacteriana para as concentrações e granulometrias estudadas.

Zhang *et al.* [35] e Munukka *et al.* [36] concluíram que várias composições de VB sem a adição de um agente antibacteriano específico demonstraram um forte efeito bactericida após incubação com diferentes bactérias aeróbicas mas apenas em concentrações elevadas ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ). O efeito bactericida dessas amostras foi atribuído às variações de pH, de pressão osmótica ou de força iônica no meio. No presente estudo algumas das composições apresentam um efeito antibacteriano total para concentrações muito inferiores a esse valor ( $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e em alguns casos até inferiores ( $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ ), efeito esse que se deverá exclusivamente à presença da prata. As amostras vítreas com prata apresentam todas atividade antibacteriana para as concentrações estudadas mas exibem comportamentos distintos. Para ambas as composições é notória a influência da granulometria. Para a mesma concentração, o aumento da granulometria diminui a ação antibacteriana, donde se pode concluir que a dissolução das amostras e a consequente libertação do ião de prata é favorecida pela diminuição do tamanho das partículas. As amostras com 2 mol% de Ag<sub>2</sub>O e com menor granulometria ( $< 20 \mu\text{m}$ ), apresentam uma redução quase total (98,9%) das UFCs para uma concentração de  $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ . A G1F necessita de uma concentração superior,  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ , para atingir

um efeito bactericida total. Dos resultados obtidos pode concluir-se que o aumento da percentagem de  $\text{Ag}_2\text{O}$  adicionado à composição original favorece a atividade antibacteriana das amostras assim como a diminuição das suas granulometrias.

Na Figura 44 estão representadas as percentagens de redução das UFCs em função da percentagem de fase cristalina presente nas amostras, para uma concentração de  $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$  e uma granulometria inferior a  $20 \mu\text{m}$ .



**Figura 44** - Percentagem de redução das UFCs a uma concentração de  $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$  em função da percentagem de fase cristalina presente nas amostras.

Para esta concentração ( $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e granulometria ( $<20 \mu\text{m}$ ) as amostras vitrocerâmicas não apresentam atividade antibacteriana, enquanto que G1F apresenta uma percentagem de redução das UFCs de  $55,26\%$  e G2F de  $98,96\%$  (Figura 43), apesar da concentração iónica da prata no SBF, após 16 horas de imersão detetada por ICP, ser superior nas amostras vitrocerâmicas ( $1,7 \text{ mg L}^{-1}$  para G1F 800 e  $1,8 \text{ mg L}^{-1}$  para G1F 830) relativamente às amostras vítreas ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  para G1F e  $1,4 \text{ mg L}^{-1}$  para G2F) como verificado na Figura 27.

A concentração iónica da prata no SBF após 16 horas de imersão das amostras G1F e G2F, determinada por ICP, é semelhante ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  para G1F e  $1,4 \text{ mg L}^{-1}$  para G2F) no entanto, para a concentração de  $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ , apresentam valores de percentagem de redução das UFCs bastante distintos ( $55,26\%$  para G1F e  $98,96\%$  para G2F), o que nos permite concluir que o teor de prata determinado por ICP não permite antever o comportamento antibacteriano das amostras.



# Capítulo 5

---

## Conclusões e Trabalho Futuro



## 5. Conclusões e Trabalho Futuro

### 5.1. Conclusões

Todas as fritas e monolíticas preparados apresentaram-se homogêneos, sem inclusões, transparentes e sem cor por observação macroscópica. O EDS confirmou a presença de prata nas composições dopadas e o DRX a natureza amorfa de todas as amostras.

Nas amostras vitrocerâmicas obtidas pelo tratamento térmico dos materiais amorfos detetou-se a presença de whitlockite  $[Ca_{2,71}Mg_{0,29}(PO_4)_2]$ . O processo de cristalização é favorecido pela presença da prata. Por comparação dos resultados obtidos nas amostras monolíticas e de frita verificou-se ainda a importância do processo de cristalização superficial, devido ao favorecimento da cristalização nas fritas.

Os resultados obtidos nos ensaios de dissolução em água destilada sugerem que as amostras (frita e monolíticas) se degradam ao longo dos intervalos de tempo estudados sem que ocorram oscilações acentuadas dos valores de pH, o que poderia ser prejudicial para as células em contacto com o material. Tanto nas amostras monolíticas como de frita a presença de prata e de fase cristalina promoveu o aumento da percentagem de perda de peso (% $\Delta P$ ). Com base em trabalhos anteriores sobre o mesmo sistema, admite-se ser provável que a fase cristalina precipitada nos vitrocerâmicos, a whitlockite, seja mais solúvel que a matriz vítrea residual, que vai enriquecendo progressivamente em  $SiO_2$  e empobrecendo em Ca e P à medida que se se processa a cristalização, tornando-se menos degradável que o vidro original.

Nos ensaios de mineralização, a imersão das amostras de frita até 168 horas e de monolíticas até 504 horas, não alterou significativamente os valores de pH do SBF, não se verificando quaisquer alterações resultantes da introdução de mais prata ou do aumento da percentagem de fase cristalina. Nas fritas foi detetada a deposição de fosfatos de cálcio na superfície de todas as amostras após as 16 horas de imersão existindo indícios de que esse processo se tenha iniciado mais cedo nas amostras vitrocerâmicas. Em todas as amostras monolíticas verifica-se a deposição de fosfatos de

cálcio às 336 horas de imersão mas, tal como para as amostras de frita, parece ter-se iniciado mais cedo das amostras vitrocerâmicas. Este resultado é indicador de que a adição de prata e a cristalização das amostras não comprometeram a bioatividade do vidro original. Nas amostras vitrocerâmicas as reações, entre a superfície das amostras e o SBF, que levam à formação da HCA, ocorrem mais cedo, tanto nas amostras de frita como nas monolíticas.

Nas concentrações utilizadas nos ensaios antibacterianos, as amostras de frita sem prata (G0F) não apresentam propriedades antibacterianas para as duas granulometrias estudadas ( $\varnothing < 20 \mu\text{m}$  e  $20 \mu\text{m} < \varnothing < 63 \mu\text{m}$ ). A adição de 1 mol% de  $\text{Ag}_2\text{O}$  à composição original provocou um efeito bactericida total para a concentração de  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  e granulometria  $\varnothing < 20 \mu\text{m}$ . A adição de 2 mol% de  $\text{Ag}_2\text{O}$ , com a mesma granulometria, promoveu um efeito bactericida praticamente total ( $R=98\%$ ) para uma concentração bastante inferior ( $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A adição de uma maior percentagem de prata à composição original aumenta a redução das UFCs para concentrações inferiores. Para a mesma concentração a diminuição da granulometria das amostras provoca um aumento do efeito bactericida devido ao incremento da ASE das partículas. Estes resultados demonstram que as propriedades antibacterianas são devidas à presença e libertação do ião de prata das amostras. As amostras vitrocerâmicas G1F 800 e G1F 830 com granulometria  $\varnothing < 20 \mu\text{m}$  não apresentaram inibição do crescimento bacteriano para a concentração  $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Os resultados obtidos permitem concluir que os vidros e os vitrocerâmicos bioativos dopados com prata preparados neste trabalho são uma abordagem eficaz para minimizar o risco de infeção nos locais de implantação. A sua atividade antibacteriana pode ser controlada através da alteração da composição, da granulometria e da quantidade de fases cristalinas presentes.

## 5.2. Trabalho futuro

Os vidros bioativos desenvolvidos neste trabalho apresentam propriedades que justificam a sua utilização em trabalhos futuros. Deste modo sugere-se:

- Estudar, no caso das amostras monolíticas, as suas propriedades mecânicas e antibacterianas e a influência da vitrificação e da adição de prata nessas propriedades. Avaliar a influência da rugosidade superficial na sua potencial bioatividade pois, no decorrer dos ensaios de imersão destas amostras em SBF, verificou-se que a espessura da camada apatítica formada era superior nas superfícies laterais não polidas do que nas superfícies polidas.

- Testar outras estirpes bacterianas.

- Realizar testes de citocompatibilidade com células adequadas a cada aplicação pretendida.

- Produzir e caracterizar compósitos de matriz polimérica utilizando como enchimento os vidros em pó produzidos neste trabalho.



## Referências

1. G. Kaur, O. Pandey, K. Singh, D. Homa, B. Scott, G. Pickrell. A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication, and apatite formation. *Journal of biomedical Materials Research A* 2014, 102A: 254-274.
2. M. Echezarreta-López, M. Landin. Using machine learning for improving knowledge on antibacterial effect of bioactive glass. *International Journal of Pharmaceutics* 2013, 453: 641-647.
3. L. Gerhardt, A. Boccaccini. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials* 2010, 3: 3867-3910.
4. H. Ylänen. *Bioactive glasses: Materials, properties and applications*. Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Elsevier 2011.
5. D. Campoccia, L. Montanaro, CR. Arciola. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 2006, 27(11): 2331-2339.
6. R. Amin, M. Mohamed, M. Ramadan, T. Verwanger, B. Krammer. Rapid and sensitive microplate assay for screening the effect of silver and gold nanoparticles on bacteria. *Nanomedicine* 2009, 4(6): 637-643.
7. H. Lin, J. Zhang, F. Qu, J. Jiang, P. Jiang. In Vitro hydroxyapatite-forming ability and antimicrobial properties of mesoporous bioactive glasses doped with Ti/Ag. *Journal of Nanomaterials* 2013, Article ID 786420.
8. J. Jones. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia* 2013, 9: 4457-4486.
9. A. Balamurugan, G. Balossier, D. Laurent-Maquin, S. Pina, A. Rebelo, J. Faure, J. Ferreira. An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol-gel derived silver-incorporated bioglass system. *Dental Materials* 2008, 24: 1343-1351.
10. M. Bellantone, H. Williams, L. Hench. Broad-spectrum bactericidal activity of Ag<sub>2</sub>O-doped bioactive glass. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002, 46(6): 1940-1945.
11. R. Siqueira, O. Peitl, E. Zanotto. Gel-derived SiO<sub>2</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioactive powders: Synthesis and in vitro bioactivity. *Materials Science and Engineering C* 2011, 32: 983-991.

12. P. Sepulveda, J. Jones, L. Hench. Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001, 58(6): 734-740.
13. N. Almeida. Efeito da ceramização na reactividade superficial de vidros de Ca-P-Mg-Si. Dissertação de Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais. Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro, 2006.
14. W. Cao, L. Hench. Bioactive Materials. *Ceramics International* 1996, 22: 493-507.
15. C. Queiroz. Cristalização de biomateriais vitrocerâmicos e mineralização em meio fisiológico simulado. Dissertação de Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais. Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro, 2005.
16. M. Bellantone, N. Coleman, L. Hench. Bacteriostatic action of a novel four-component bioactive glass. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000, 51(3): 484-490.
17. M. Gorriti, J. López, A. Boccaccini, C. Audisio, A. Gorustovich. *In vitro* study of the antibacterial activity of bioactive glass-ceramic scaffolds. *Advanced Engineering Materials* 2009, 11(7): 67-70.
18. Mouriño, J. Cattalini, A. Boccaccini. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments. *Journal of the Royal Society Interface*. Publicado online a 7 Dezembro 2011, [rsif.royalsocietypublishing.org](http://rsif.royalsocietypublishing.org).
19. Q. Chen, C. Zhu, G. Thouas. Progress and challenges in biomaterials used for bone tissue engineering: bioactive glasses and elastomeric composites. Publicado online a 26 Setembro 2012, <http://www.progressbiomaterials.com/content/1/1/2>.
20. A. El-Kady, A. Ali, R. Rizk, M. Ahmed. Synthesis, characterization and microbiological response of silver doped bioactive glass nanoparticles. *Ceramics International* 2012, 38: 177-188.
21. E. Davim. Suportes porosos vítreos do sistema Si-Ca-P-Mg para aplicações biomédicas. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica – Ramo Biomateriais. Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro, 2008.
22. E. Zanotto. A bright future for glass-ceramics. *American Ceramic Society Bulletin* 2010, 89(8): 19-27.
23. R. Siqueira, E. Zanotto. Biosilicate®: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. *Química Nova* 2011, 4(7): 1231-1241.

24. A. Hoppe, N. Güldal, A. Boccaccini. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011, 32: 2757-2774.
25. C. Wu, J. Chang. Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application. *Interface Focus* 2012, 2: 292-306.
26. J. Oliveira, R. Correia, M. Fernandes. Effect of Si speciation on the in vitro bioactivity of glasses. *Biomaterials* 2002, 23: 371-379.
27. Y. Ebisawa, T. Kokubo, K. Ohura, T. Yamamuro. Bioactivity of CaO.SiO<sub>2</sub> – based glasses: In vitro evaluation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1990, 1: 239-244.
28. J. Oliveira, R. Correia, M. Fernandes. Surface modification of a glass and a glass-ceramic of the MgO-3CaO.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> system in a simulated body fluid. *Biomaterials* 1994, 16: 849-854.
29. M. Moraes, W. Silveira, L. Teixeira, I. Araújo. Mecanismos de adesão bacteriana aos biomateriais. *Revista Médica de Minas Gerais* 2013, 23(1): 99-104.
30. F. Pishbin, V. Mouriño, J. Gilchrist, D. McComb, S. Kreppel, V. Salih, M. Ryan, A. Boccaccini. Single-step electrochemical deposition of antimicrobial orthopaedic coatings based on a bioactive glass/chitosan/nano-silver composite system. *Acta Biomaterialia* 2013, 9: 7469-7479.
31. S. Valappil, D. Pickup, D. Carroll, C. Hope, J. Pratten, R. Newport, M. Smith, M. Wilson, J. Knowles. Effect of silver content on the structure and antibacterial activity of silver-doped phosphate-based glasses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007, 51(12): 4453-4461.
32. S. Valappil, J. Knowles, M. Wilson. Effect of silver-doped phosphate-based glasses on bacterial biofilm growth. *Applied and Environmental Microbiology* 2008, 74(16): 5228-5230.
33. Página:  
[http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Silver\\_as\\_an\\_Antimicrobial\\_Agent](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Silver_as_an_Antimicrobial_Agent),  
consultada a 17/02/2014.
34. A. Ahmed, A. Ali, D. Mahmoud, A. El-Fiqi. Study on the preparation and properties of silver-doped phosphate antibacterial glasses (Part I). *Solid State Sciences* 2011, 13: 981-992.

35. D. Zhang, O. Leppäranta, E. Munukka, H. Ylänen, M. Viljanen, E. Eerola, M. Hupa, L. Hupa. Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2010, 93A(2): 475-483.
36. E. Munukka, Outi Leppäranta, M. Korkeamäki, M. Vaahtio, T. Peltola, D. Zhang, L. Hupa, H. Ylänen, J. Salonen, M. Viljanen, E. Eerola. Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2008, 19: 27-32.
37. P. Stoor, E. Söderling, J. Salonen. Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms. *Acta Odontologica Scandinavica* 1998, 56: 161-165.
38. O. Leppäranta, M. Vaahtio, T. Peltola, D. Zhang, L. Hupa, M. Hupa, H. Ylänen, J. Salonen, M. Viljanen, E. Eerola. Antibacterial effect of bioactive glasses on clinically important anaerobic bacteria *in vitro*. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 2008, 19(2): 547-551.
39. T. Waltimo, T. Brunner, M. Vollenweider, W. Stark, M. Zehnder. Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5. *Journal of Dental Research* 2007, 86(8): 754-757.
40. I. Allan, H. Newman, M. Wilson. Antibacterial activity of particulate Bioglass® against supra and subgingival bacteria. *Biomaterials* 2001, 22(12): 1683-1687.
41. A. Panáček, L. Kvítek, R. Pucek, M. Kolář, R. Večeřová, N. Pizúrová, V. Sharma, T. Nevěčná, R. Zbořil. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B* 2006, 110: 16248-16253.
42. S. Pal, Y. Tak, J. Song. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 2007, 73: 1712-1720.
43. R. Dastjerdi, M. Montazer. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010, 79: 5-18.
44. P. Saravanapavan, J. Gough, J. Jones, L. Hench. Antimicrobial macroporous gel-glasses: dissolution and cytotoxicity. *Key Engineering Materials Journal* 2004, 254-256: 1087-1090.
45. S. Paital, N. Dahotre. Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies. *Materials Science and Engineering* 2009, R 66: 1-70.
46. R. Langer. Drug delivery and targeting. *Nature* 1998, 392: 5-10.

47. P. Coimbra. Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural. Dissertação de Doutoramento em Engenharia Química. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, 2010.
48. M. Gielen, E. Tiekink. *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine*. Wiley & Sons, 2005.
49. A. Taylor. Therapeutic uses of trace elements. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1985, 14: 703–724.
50. D. Monteiro, L. Gorup, A. Takamiya, A. Filho, E. Camargo, D. Barbosa. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2009, 34: 103-110.
51. E. Davim, A. Senos, M. Fernandes. Non-isothermal crystallization kinetics of a Si–Ca–P–Mg bioactive glass. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2014, 117: 643-651.
52. A. Silva. Reactividade superficial de vidros com TiO<sub>2</sub> em soluções fisiológicas. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica – Ramo Biomateriais. Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro, 2008.
53. A. Gualtieri. Accuracy of XRPD QPA using the combined Rietveld-RIR method. *Journal of Applied Crystallography* 2000, 33: 267-278.
54. A. Gualtieri, G. Brignoli. Rapid and accurate quantitative phase analysis using a fast detector. *Journal of Applied Crystallography* 2004, 37: 8-13.
55. D. Tobaldi, R. Pullar, A. Gualtieri, M. Seabra, J. Labrincha. Phase composition, crystal structure and microstructure of silver and tungsten doped TiO<sub>2</sub> nanopowders with tuneable photochromic behaviour. *Acta Materialia* 2013, 61: 5571-5585.
56. A. Larson, R. Dreele. General structure analysis system (GSAS). Los Alamos National Laboratory Report LAUR, 2004.
57. B. Toby. EXPGUI, a graphical user interface for GSAS. *Journal of Applied Crystallography* 2001, 34(2): 210-213.
58. S. Fagerlund, P. Ek, L. Hupa, M. Hupa. Dissolution kinetics of a bioactive glass by continuous measurement. *Journal of the American Ceramic Society* 2012, 95(10): 3130-3137.

59. A. Ahmed, A. Ali, D. Mahmoud, A. El-Fiqi. Preparation and characterization of antibacterial  $P_2O_5$ -CaO-Na<sub>2</sub>O-Ag<sub>2</sub>O glasses. *Journal of Biomedical Materials Research A* 2011, 98A(1): 132-142.
60. M. Hashmi, S. Shah. Dissolution behavior of bioactive glass ceramics with different CaO/MgO ratios in SBF-K9 and r-SBF. *Progress in Natural Science: Materials International* 2014, 24: 354-363.
61. G. Latorre, L. Hench. Analyses of bioactive glass interfacial reactions using Fourier Transform Infrared Reflection Spectroscopy. *Characterization methods for the solid solution interface in ceramic systems*, Ed ACS, 1993.
62. M. Tanahashi, T. Yao, T. Kokubo, M. Minoda, T. Miyamoto, T. Nakamura, Y. Yamamuro. Apatite coating on organic polymers by a biomimetic process. *Journal of the American Ceramic Society* 1994, 77(11): 2805-2808.
63. M. Tanahashi, T. Yao, T. Kokubo, M. Minoda, T. Miyamoto, T. Nakamura, Y. Yamamuro. Apatite coating on organic polymers by a biomimetic process: improvement in its adhesion to substrate by NaOH treatment. *Journal of Applied Biomaterials* 1994, 5: 339-347.
64. M. Seabra, L. Grave, C. Oliveira, A. Alves, A. Correia, J. Labrincha. Porcelain stoneware tiles with antimicrobial action. *Ceramics International* 2014, 40(4): 6063-6070.
65. D. Clupper, L. Hench. Bioactive response of Ag-doped tape cast Bioglass® 45S5 following heat treatment. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 2001, 12: 917-921.
66. G. Orcel, J. Phalippou, L. Hench. Structural changes on silica xerogels during low temperature dehydration. *Journal of Non-Crystalline Solids* 1986, 88(1): 114-130.
67. J. Navarro. *El vidrio*, 3ª edição. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 2003.
68. M. Rahaman, L. De Jongue, G. Scherer, R. Brook. Creep and densification during sintering of glass powder compacts. *Journal of the American Ceramic Society* 1987, 70(10): 766-774.
69. A. Aminian, M. Solati-Hashjin, A. Samadikuchaksaraei, F. Bakhshi, F. Gorjipour, A. Farzadi, F. Moztaezadeh, M. Schmücker. Synthesis of silicon-substituted hydroxyapatite by a hydrothermal method with two different phosphorous sources. *Ceramics International* 2011, 37(4): 1219-1229.
70. M. Fernandes. *Biomaterials – Glass Ceramics*. Universidade de Aveiro, 2013.

71. M. Mozafari, F. Moztaezadeh. Silver-doped bioactive glasses: what remains unanswered? *Interceram - International Ceramic Review* 2013, 62(6): 423-425.
72. E. Vernè, S. Nunzio, M. Bosetti, P. Appendino, C. Brovarone, G. Maina, M. Cannas. Surface characterization of silver-doped bioactive glass. *Biomaterials* 2005, 26: 5111-5119.
73. D. McCormack, B. Duffy, N. Stobie, J. Colreavy, M. Hidalgo, P. McHale, S. Hinder. Prevention of staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating. *Biomaterials* 2008, 29(8): 963-969.
74. N. Gargiulo, A. Cusano, F. Causa, D. Caputo, P. Netti. Silver-containing mesoporous bioactive glass with improved antibacterial properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2013, 24(9): 2129-2135.