

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA – PIBIC

Vidro bioativo como modelo *in vitro* para estudo da ação inibidora do SNF472 em processos de biomineralização ectópica de fosfatos de cálcio.

Efeito de inibidores conhecidos sobre a biomineralização de vidros bioativos.

Área do conhecimento: Engenharia
Subárea do conhecimento: Biomateriais
Especialidade do conhecimento: Vidros Bioativos

Relatório Final
Período da bolsa: de Setembro de 2022 a Agosto de 2023
Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica

PIBIC/CNPq

Autor: Ulisses Aparecido de Oliveira Filho

Orientador: Euler Araujo dos Santos

SUMÁRIO

- 1. Introdução**
- 2. Objetivos**
- 3. Metodologia**
- 4. Resultado e discussões**
- 5. Conclusões**
- 6. Perspectivas de futuros trabalhos**
- 7. Referências bibliográficas**
- 8. Outras atividades**

1. Introdução

No Brasil, as doenças não transmissíveis que mais causam óbito são, as doenças cardiovasculares, câncer, respiratórias crônicas e diabetes [1]. Dentro do escopo das doenças cardíacas existem aquelas que afetam as válvulas mitrais e artéria coronária. Em alguns casos, a solução viável para reverter os problemas decorrentes dessas enfermidades cardíacas é a sua substituição por válvulas biocompatíveis de origem animal, como as válvulas mitrais de suínos ou de bovinos, ou implantes sintéticos [2]. Implantes sintéticos como os de válvula de folha dupla, válvulas de gaiola e as válvulas biológicas são bons exemplos dos tipos de implantes usados para o combate de doenças cardíacas. Grande parte das válvulas biológicas, as quais são as mais utilizadas atualmente, contém em sua composição uma grande quantidade de colágeno [3,4].

O colágeno do nosso organismo age como uma grande matriz polimérica quelante de íons metálicos presentes nos fluidos corporais, principalmente o cálcio, que em associação ao fosfato presente no ambiente sanguíneo, tendem a precipitar hidroxiapatita, espécie química constituinte da principal fase mineral dos ossos. Quando a hidroxiapatita é formada no processo natural da calcificação dos tecidos duros do corpo humano, diz-se que esse processo é um processo não patológico de biomineralização [5]. Essa característica do colágeno faz com que os implantes que o contém estejam sempre propensos a induzirem um processo de mineralização em sua superfície. Portanto, embora o uso desses implantes de origem natural seja uma solução viável para o problema, muitos pacientes voltam a ter problemas por conta do surgimento de nova calcificação sobre suas superfícies [6]. Nesses casos em que hidroxiapatita é formada num ambiente fora dos tecidos duros do corpo humano, tem-se um processo patológico de mineralização e que precisa ser combatido.

O combate ao processo de mineralização patológica vem sendo foco de pesquisas no mundo inteiro. As duas frentes mais importantes de combate são: a)

o desenvolvimento e uso de diferentes tipos de materiais para implantes que sejam biocompatíveis e que por si só evitem a mineralização [7] e b) o teste de diferentes tipos de inibidores de calcificação [8]. Estes inibidores, quando em contato com a corrente sanguínea, agem como quelante de íons Ca^{2+} , competindo com o colágeno nesse aspecto, diminuindo assim esse processo de calcificação [9].

O estudo desses inibidores é comumente feito *in vivo*, em espécies animais como ratos, coelhos e ovelhas [8–10]. Uma nova abordagem para este tipo de estudo também tem sido aplicada, como o uso de inibidores diretamente em contato com os materiais promotores da biomineralização, quando em ambiente contendo cálcio e fosfato iônicos. Isso possibilita o estudo do mecanismo de inibição dessas substâncias sobre o crescimento dos cristais de hidroxiapatita [5], sendo muito eficaz como uma rota de estudo *in vitro* para possíveis agentes inibidores.

Com a descoberta dos vidros bioativos por Hench em 1968, foram abertas portas para tratamento de patologias ósseas em geral, devido a sua biocompatibilidade e grande capacidade de atrair íons de cálcio induzindo as formações dos fosfatos de cálcio na sua estrutura, facilitando assim a regeneração da matriz óssea. A bioatividade desses vidros advém da dissolução de íons tais como cálcio e fosfato, em ambientes supersaturados, promovendo a precipitação de hidroxiapatita no mesmo [11]. Essa eficácia no auxílio do crescimento de hidroxiapatita em ambientes ricos em íons cálcio e fosfato torna os vidros bioativos promotores natos da biomineralização, podendo assim agir como potenciais modelos *in vitro* para o estudo de substâncias capazes de inibir esse processo. No entanto, para validar a eficácia do uso de vidros bioativos como modelos para estudos de inibidores, seria preciso utilizar inibidores já conhecidos de forma a se estudar os mecanismos de bloqueio sobre o vidro.

Existem várias substâncias conhecidas de eficácia comprovada no combate da biomineralização em implantes, como a heparina, com testes extensos realizados em animais [8], bem como o magnésio se mostrando também eficaz quando se tratando de inibir a calcificação em válvulas aórticas [12]. Uma vez que estes inibidores acima citados tiveram suas eficácias comprovadas, eles podem ser utilizados para testar os seus mecanismos de bloqueio sobre a bioatividade de superfície desses vidros, definindo uma potencial plataforma *in vitro* para o estudo

da mineralização.

2. Objetivos

Geral

Utilização de um vidro bioativo como modelo *in vitro* para se estudar o efeito inibidor da heparina e de íons magnésio no processo de formação de hidroxiapatita em ambiente indutor de mineralização baseado no vidro bioativo 58S e, posteriormente a esses estudos, comparar os resultados dessa ação inibitória com aqueles observados em estudos *in vivo* na literatura.

Específico

- Explorar o efeito de inibidores conhecidos sobre a mineralização de hidroxiapatita, como a heparina e íons Mg^{2+} numa plataforma *in vitro* de vidro bioativo;
- Observar através dos resultados obtidos a viabilidade do uso do vidro bioativo como plataforma *in vitro* para o estudo de inibidores de biomineralização.

3. Metodologia

3.1 Síntese do vidro bioativo

Um vidro bioativo do tipo 58S de composição $60\%SiO_2 \cdot 36\%CaO \cdot 4\%P_2O_5$ (% em mol), com mecanismos de biomineralização amplamente estudados na literatura [12], foi usado como modelo para se estudar o efeito inibidor do Mg^{2+} e da heparina. O vidro foi obtido via rota sol-gel e consistiu na adição de 22,7 mL do tetraetilortosilicato (TEOS, $Si(OC_2H_5)_4$) em 4,5 mL do trietilfosfato (TEP, $OP(OC_2H_5)_3$), e de 13,3100 g do nitrato de cálcio tetra-hidratado ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) juntos a 48,7 mL de ácido nítrico (HNO_3 , $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$). A solução resultante foi colocada em agitação por 2 h e 45 minutos em temperatura ambiente. Ao fim da agitação, a solução (sol) foi armazenada em placas de Petri por 9 dias em temperatura ambiente para permitir a formação do gel. Posterior ao processo de gelificação, as amostras foram colocadas em estufa para secagem na seguinte ordem: $60^\circ C$ por 48 h e $120^\circ C$ por 72 h. Após o período de secagem, as amostras foram moídas em um almofariz e peneiradas malha 80 mesh (0,177 mm) para a obtenção do pó. O pó resultante foi calcinado a $700^\circ C$ em forno 7013 JUNG 1300C por 60 min sob uma taxa de aquecimento de $10^\circ C/min$. Após calcinação, as amostras foram armazenadas em ambiente seco para posteriores caracterizações. Para que fosse possível um estudo de reprodutibilidade da obtenção do biovidro, a síntese foi realizada em triplicata no Laboratório de Biomateriais do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS.

3.2. Preparação da solução indutora de mineralização

A solução indutora de mineralização foi constituída de duas soluções diferentes as quais identificamos como solução A (fonte de cálcio) e solução B (fonte de fosfato).

3.2.1 Solução A (Fonte de Cálcio)

Uma solução rica em cálcio contendo 0,3301 g de $CaCl_2$, 7.3048 g de NaCl, e 6.0568 g de Tris foi preparada dissolvendo os reagentes citados em água ultrapura. Posteriormente, a solução teve seu pH ajustado para 7,4 pela adição de HCl ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$), sendo em seguida armazenada em frasco vedado a $8^\circ C$.

3.2.2 Solução B (Fonte de Fosfato)

Uma solução rica em fosfato contendo 1,3488 g de Na_2HPO_4 , 7,3048 g de NaCl , e 6,0568g de Tris foi preparada dissolvendo os reagentes citados em água ultrapura. Posteriormente, a solução teve seu pH ajustado para 7,4 pela adição de HCl ($1,0 \text{ mol.L}^{-1}$), sendo em seguida armazenada em frasco vedado a 8°C .

3.3 Caracterizações dos vidros obtidos

3.3.1 Fluorescência de raios-X por Dispersão de Comprimento de Onda

A composição do material sintetizado foi analisada por meio de fluorescência de raios X em um equipamento Shimadzu XRF-1800 (tubo Rh - 4,0 kW) do Laboratório de Fluorescência de Raios X do CLGeo/UFS, sob uma tensão de 30 kV e corrente de 60 mA equipado com um detector de frequência proporcional e os seguintes cristais de análise: CaO (LIF), P_2O_5 (Ge) e SiO_2 (PET).

3.3.2 Análises térmicas

As propriedades térmicas da amostra foram analisadas por meio de análise termogravimétrica (TGA) usando um equipamento STA 449 F3 Jupiter (Netsch), as análises foram realizadas no material pós síntese com aproximadamente 60 mg de amostra em forma de pó numa atmosfera de N_2 com a taxa de fluxo de 50 mL/min. As amostras foram aquecidas em um cadinho de platina a uma taxa de aquecimento de 10°C.min partindo da temperatura ambiente até 1100°C .

As amostras foram analisadas por meio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) usando um equipamento NETZSCH DSC 404, no Laboratório de Materiais Vítreos da UFSCar, as análises foram realizadas no material pós síntese com aproximadamente 12 mg de amostra em forma de pó. As amostras foram aquecidas em um cadinho de platina a uma taxa de aquecimento de 10°C/min partindo da temperatura ambiente até 1200°C .

3.3.3 Difractometria de Raios X (DRX)

O pó da amostra foi por DRX sob corrente de 40 kV e 30 mA, respectivamente na faixa de $10^\circ < 2\theta < 60^\circ$ em intervalo de 2 s e passo de $0,02^\circ$, as difrações foram obtidas em um difratômetro Shimadzu (XRD 6000) do Laboratório de Técnicas de Raios X do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS.

3.3.4 Área de superfície

Com o objetivo de identificar a área de superfície e o volume dos poros da amostra e, conseqüentemente, a sua capacidade de adsorção e reatividade com as substâncias, o ensaio de porosimetria gasosa foi realizado. Cerca de 0,500 g de uma amostra de vidro bioativo sintetizado foi pré-tratada a 150°C sob vácuo por 1 h e 30 min. As análises foram através da adsorção e desorção de N_2 a 77K em um equipamento Quantachrome modelo NOVA-2000 realizadas no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Materiais Cerâmicos do departamento de Ciências e Engenharia de materiais da universidade federal de Sergipe. As isotermas de adsorção e dessorção de N_2 foram obtidas na faixa de P/P_0 variando de 0,05 a 0,99 com 30 pontos. A área superficial foi calculada pelo Método Brunauer-Emmett-Teller (BET). O volume de poros foi calculado pelo método Barrett-Joyner-Halenda (BJH). Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Tecnologias Cerâmicas do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS.

3.4 Ensaio de biomineralização

200 mL da solução A (fonte de Ca^{2+}) e 200 mL da solução B (fonte de PO_4^{3-}) foram misturadas imediatamente antes da adição de 400 mg do vidro bioativo. O sistema foi mantido em agitação a 2500 rpm durante 2 h e 24 h. Após esse período, a solução foi lavada duas vezes com água ultrapura, duas vezes com álcool isopropílico e centrifugada para interromper a biomineralização. Posteriormente, o vidro bioativo foi armazenado para posterior caracterização.

3.4.1 Ensaios de biomineralização na presença da heparina

Os ensaios de biomineralização da presença da heparina se seguiu a partir do mesmo procedimento registrado no tópico 3.4. No momento da adição do vidro bioativo foi adicionado também a heparina em três concentrações sendo elas $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $115 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $230 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

3.4.2 Ensaios de biomineralização na presença Mg^{2+}

Os ensaios de biomineralização na presença do magnésio seguiu o mesmo procedimento registrado no tópico 3.4 onde junto a adição do vidro bioativo foi adicionado também duas concentrações distintas para o magnésio, sendo elas respectivamente $0,425 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $0,85 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

3.5 Difractometria de Raios X (DRX)

O pó da amostra após o ensaio de indução foi analisado por DRX sob corrente de 40 kV e 30 mA, respectivamente na faixa de $10^\circ < 2\theta < 60^\circ$ em intervalo de 2 s para cada amostra e passo de $0,02^\circ$, as difrações foram obtidas em um difratômetro Shimadzu (XRD 6000) do Laboratório de Técnicas de Raios X do Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais da UFS.

4. Resultados e Discussões

4.1 Composição

A composição do material produzido foi analisada através da técnica de fluorescência de raios X a qual determina a presença dos elementos constituintes na forma dos seus óxidos principais contidos na amostra. Como pode ser observado na Tabela 1, os valores experimentais obtidos pela síntese em laboratório se aproximam dos valores teóricos de composição, resultados esses que se assemelha a amostras de vidro bioativo previamente observadas na literatura [12].

| Amostra | Composição (mol%) | | |
|-------------------|-------------------|-------------------------------|-----------|
| | SiO ₂ | P ₂ O ₅ | CaO |
| Composição | 60 | 4 | 36 |
| | 57,56 | 2,97 | 39,47 |

Tabela 1: Representação da composição da amostra produzida.

4.2 Análises térmicas

As análises térmicas a partir de TGA mostraram que existem dois eventos significativas de perda de massa. O primeiro ocorre entre 70°C e 200°C, o que equivale à aproximadamente 10% de perda da massa total do material. Essa perda refere-se à evaporação de água fisicamente adsorvida e álcool na estrutura do gel. Que após as análises de DSC no mesmo período de temperatura é possível observar um processo endotérmico típico. O segundo evento de perda significativa de massa ocorre entre 200°C e 400°C. Esse evento caracteriza a decomposição de nitratos presentes no vidro até então. Bem como a perda de água estrutural pela policondensação de grupos silanóis ocasionando assim numa perda de aproximadamente 30% de massa [13].

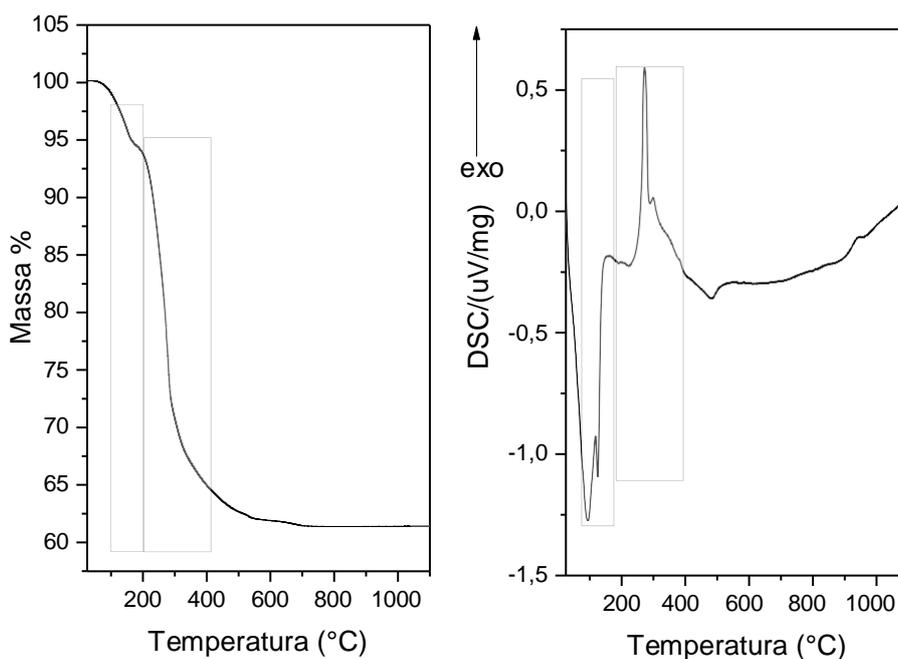


Figura 1: Análises de TGA e DSC apresentando as regiões de perda de massa do material sintetizado. Indicação das áreas de perda de massa: □

4.3 Estrutura do vidro bioativo

A estrutura do vidro produzido foi analisada por meio de difração de raios X para confirmar a inexistência de fases cristalinas [12], ou seja, a preservação do caráter amorfo das amostras. De fato, a difração do material sintetizado mostra um material com uma fase amorfa relevante, atendendo assim as características primárias de um material vítreo.

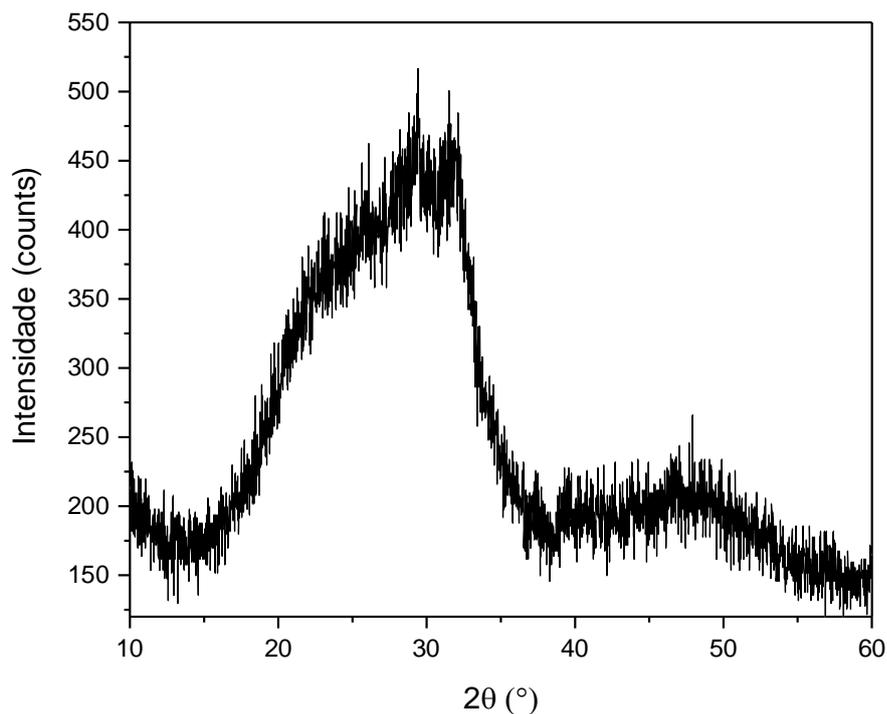


Figura 2: Padrão de raios X da amostra sintetizada.

4.4 Área de superfície

Os resultados de área de superfície e volume de poros foram obtidos através do método de BJH, o qual é eficaz para gerar uma estimativa da estrutura dos poros quando os mesmos se encontram com raios relativamente maiores que 1 nm [14], o que é o caso no material sintetizado.

Através da observação das curvas de adsorção e dessorção é possível observar a presença de uma curva de histerese, bem como a mesma apresenta características de matérias que contem mesoporos, indicando também uma distribuição irregular de poros [15].

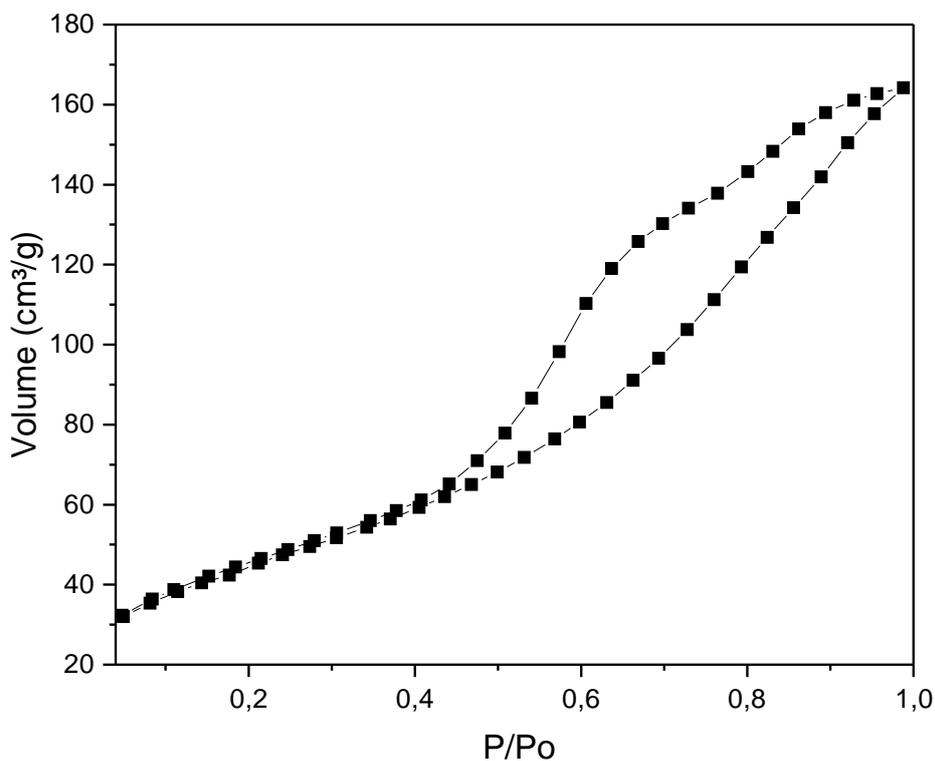


Figura 3: Isoterma de adsorção e dessorção do material sintetizado.

| Amostra | BJH | | |
|-----------------------|---|--------------------------------------|-------------------|
| | Área de superfície m ² /g | Volume de poro cm ³ /g | Raio de poro Å |
| Vidro bioativo | 47,6 ± 2,1 | 0,224 ± 0,001 | 23,1 ± 2,7 |

Tabela 2: Tabela de área de superfície, volume e raio de poros do material sintetizado.

4.5 Testes de inibição com a heparina

Após 2 h de imersão na solução indutora, um pico de baixa intensidade que corresponde ao plano (2 1 1) da HA foi observado em todas as amostras. Indicando que até duas horas a inibição não parece acontecer de maneira significativa conforme a concentração de heparina é aumentada em solução. No entanto, após 24 h de imersão a amostra imersa em solução indutora sem a presença de heparina apresentou picos bastante intensos relativos à HA tanto no plano (0 0 2) quanto no plano (2 1 1). Podendo indicar que o aumento da quantidade de heparina na solução levou a uma diminuição gradual da intensidade dos picos referentes à HA.

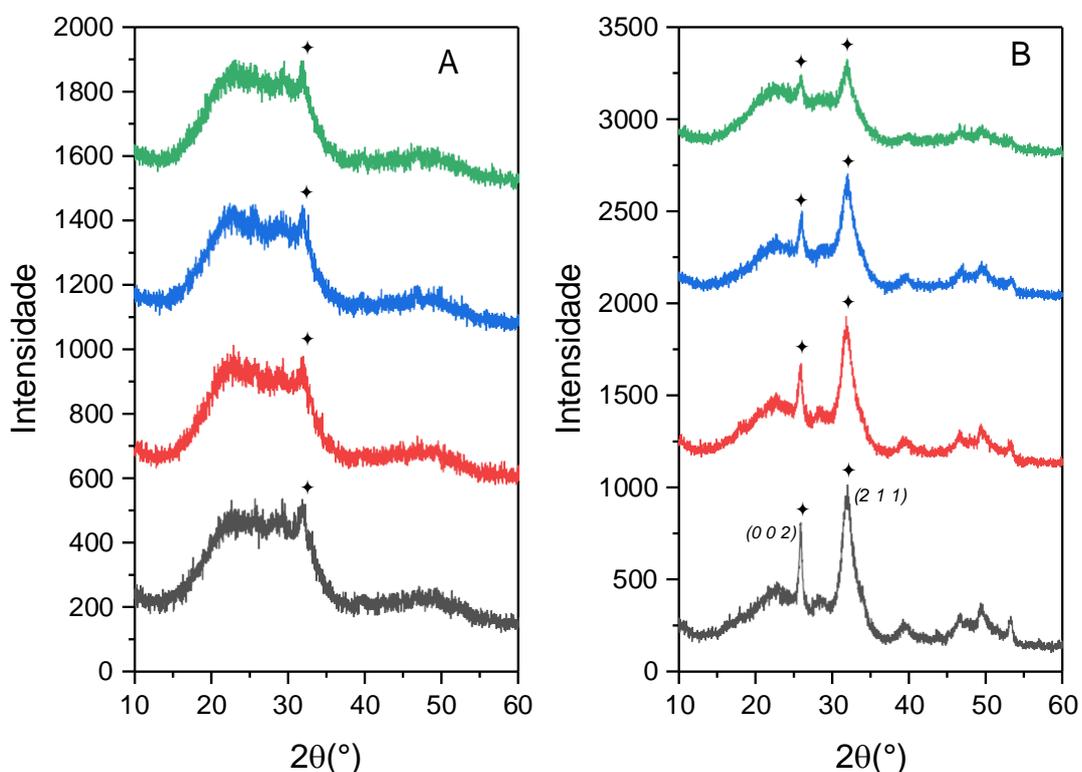


Figura 4: Padrões de difração dos vidros bioativos após imersão por 2 h (A) e 24 h (B) na solução indutora de biomineralização contendo 0, 5, 115 e 230 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Identificação dos picos: Hidroxiapatita (\blacklozenge)

Para que fosse possível uma melhor análise de como o inibidor atua, foram

realizados para as diferentes concentrações cálculos com base na intensidade relativa dos picos através da seguinte função $Ir = \frac{I_0 - I_f}{I_1} \times 100\%$ sendo I_0 a intensidade da base, I_f a intensidade do pico e I_1 a intensidade dos picos das amostras que não foram expostas ao inibidor. Tendo seus resultados apresentados na figura 5.

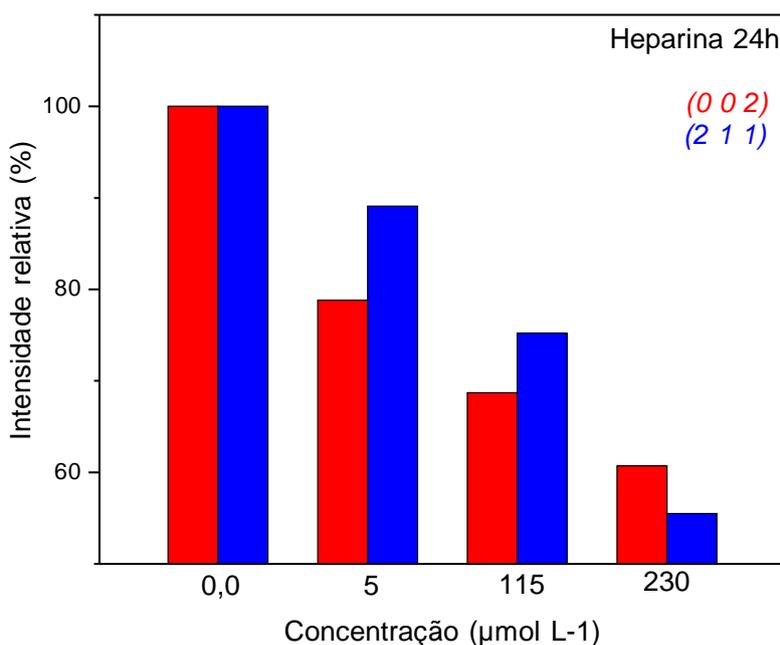


Figura 5: Razões percentuais entre as intensidades dos planos (0 0 2) e (2 1 1) das diferentes concentrações de heparina, relativas à mesma razão obtida da amostra controle (0,0).

Com base nos cálculos realizados é possível identificar para as amostras com 24h de exposição é possível observar valores de inibição maiores para ambos os planos e concentrações. Quando observados o valores obtidos para o plano (2 1 1) para a concentração de 5 µmol.L⁻¹ observa-se uma inibição de 10,9%, para a amostra de 115 µmol.L⁻¹ uma inibição de 24,8% e para a amostra de 230 µmol.L⁻¹ é possível observar uma inibição de 44,5%. Já no plano (0 0 2) para o mesmo período é possível observar para a concentração de 5 µmol.L⁻¹ uma inibição de 21,2%, para a concentração de 115 µmol.L⁻¹ uma inibição de 31,3% e para a concentração de 230 µmol.L⁻¹ é possível observar uma inibição de 39,3% de inibição.

4.6 Testes de inibição com o Mg^{2+}

Após 2 h de imersão na solução indutora, um pico de baixa intensidade que corresponde ao plano (2 1 1) da HA foi observado em todas as amostras. Indicando que até duas horas a inibição não parece acontecer de maneira significativa conforme a concentração de Mg^{2+} é aumentada em solução. No entanto, após 24 h de imersão a amostra imersa em solução indutora sem a presença de Mg^{2+} apresentou picos bastante intensos relativos à HA tanto no plano (0 0 2) quanto no plano (2 1 1). Podendo indicar que o aumento da quantidade de Mg^{2+} na solução levou a uma diminuição gradual da intensidade dos picos referentes à HA.

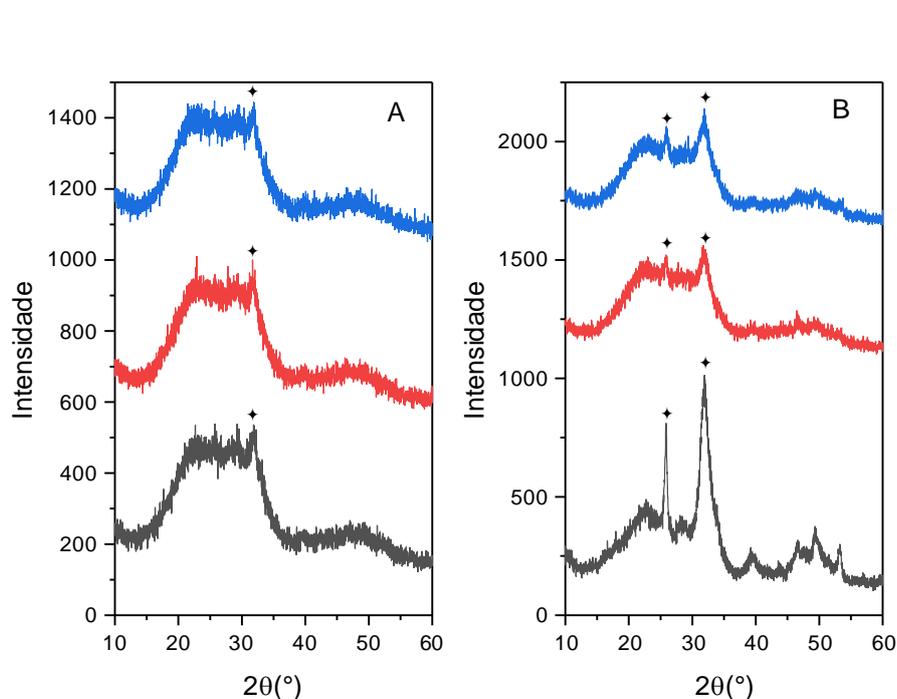


Figura 6: Padrões de difração dos vidros bioativos após imersão por 2 h (A) e 24 h (B) na solução indutora de biomineralização contendo 0, 0.425 e 0.850 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Identificação dos picos: Hidroxiapatita (◆)

Para que fosse possível uma melhor análise de como o inibidor age foram realizados para as diferentes concentrações cálculos com base na intensidade relativa dos picos utilizando-se de dois planos cristalinos da hidroxiapatita, sendo

eles o (0 0 2) e o (2 1 1) como apresentados na figura 7.

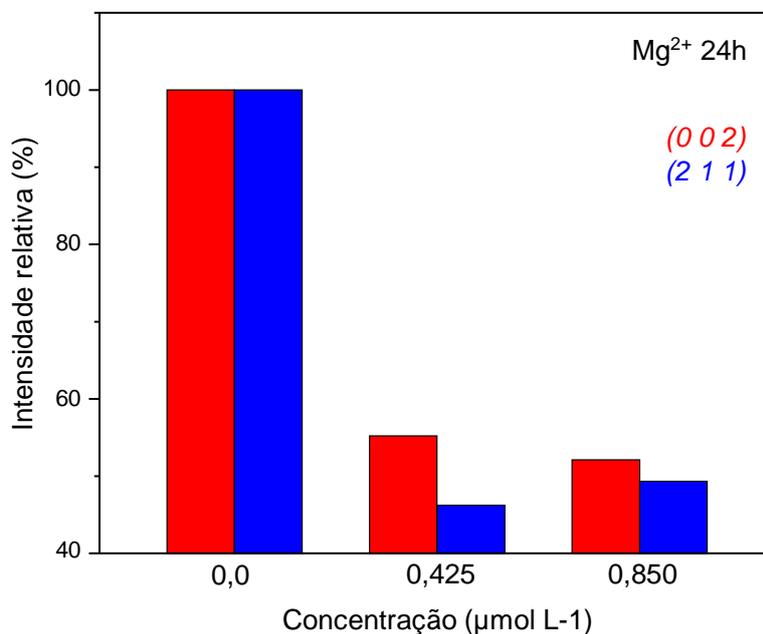


Figura 7: Razões percentuais entre as intensidades dos planos (0 0 2) e (2 1 1) das diferentes concentrações de Mg^{2+} , relativas à mesma razão obtida da amostra controle (0,0).

É possível identificar para as amostras com 24h de exposição no plano (2 1 1) uma inibição de 53,8% para a concentração de $0,425 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e para a concentração de $0,850 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi observada uma inibição de 50,7%. Para o plano (0 0 2) é possível observar uma inibição de 44,8% quando observado a concentração de $0,425 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e para a concentração de $0,850$ é possível observar uma inibição de 47,9% em relação a amostra controle, aquela sem a presença de inibidores.

5. Conclusões

Os resultados mostram que a heparina age na inibição com maior influência no plano cristalino $(0\ 0\ 2)$ bem como apresenta uma maior inibição com maiores concentrações. Já para o Mg^{2+} é possível observar uma maior influência de inibição no plano $(2\ 1\ 1)$ também aumentando conforme a concentração aumenta. Esses resultados mostram que o vidro sintetizado pode ser utilizado como plataforma para estudo de inibidores de mineralização.

6. Perspectivas de futuros trabalhos

- Através de imagens de microscópio de transmissão eletrônica, estudar as características dos cristais formados.
- Realizar o refinamento de dados para aprofundamento no estudo dos mecanismos de inibição nos planos cristalinos da hidroxiapatita.

7. Bibliografia

- [1] D.C. Malta, L. de Moura, R.R. do Prado, J.C. Escalante, M.I. Schmidt, B.B. Duncan, Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011, *Epidemiol. e Serviços Saúde*. 23 (2014) 599–608. <https://doi.org/10.5123/s1679-49742014000400002>.
- [2] T. Yu, X. Chen, W. Zhuang, Y. Tian, Z. Liang, Q. Kong, C. Hu, G. Li, Y. Wang, Nonglutaraldehyde treated porcine pericardium with good biocompatibility, reduced calcification and improved Anti-coagulation for bioprosthetic heart valve applications, *Chem. Eng. J.* 414 (2021) 128900. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2021.128900>.
- [3] S.M. Hergert, A.F. Bolger, Prosthetic Heart Valves, *Cardiol. Secrets*. (2010) 231–235. <https://doi.org/10.1016/B978-032304525-4.00034-4>.
- [4] J. Chanda, R. Kuribayashi, T. Abe, Prevention of Calcification in Glutaraldehyde-Treated Porcine Aortic and Pulmonary Valves, *Ann. Thorac. Surg.* 64 (1997) 1063–1066. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(97\)00819-9](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(97)00819-9).
- [5] A.F. Badria, P. Koutsoukos, C. D'Alessandro, S. Korossis, D. Mavrilas, Anticalcification potential of heparin on hydroxyapatite seeds using a constant composition in vitro model, *J. Cryst. Growth*. 498 (2018) 399–404. <https://doi.org/10.1016/J.JCRYSGRO.2018.07.011>.
- [6] A. Alperi, S. Garcia, J. Rodés-Cabau, Transcatheter valve-in-valve implantation in degenerated surgical aortic and mitral bioprosthesis: Current state and future perspectives, *Prog. Cardiovasc. Dis.* 72 (2022) 54–65. <https://doi.org/10.1016/J.PCAD.2021.10.001>.
- [7] X. Huang, C. Zheng, K. Ding, S. Zhang, Y. Lei, Q. Wei, L. Yang, Y. Wang, Dual-crosslinked bioprosthetic heart valves prepared by glutaraldehyde crosslinked pericardium and poly-2-hydroxyethyl methacrylate exhibited improved antithrombogenicity and anticalcification properties, *Acta Biomater.* 154 (2022) 244–258. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2022.10.036>.
- [8] J. Chanda, R. Kuribayashi, T. Abe, Heparin coupling in inhibition of calcification of vascular bioprostheses, *Biomaterials*. 20 (1999) 1753–1757.

[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00078-7).

- [9] J.N. Clark, M.F. Ogle, P. Ashworth, R.W. Bianco, R.J. Levy, Prevention of Calcification of Bioprosthetic Heart Valve Cusp and Aortic Wall With Ethanol and Aluminum Chloride, *Ann. Thorac. Surg.* 79 (2005) 897–904.
<https://doi.org/10.1016/J.ATHORACSUR.2004.08.084>.
- [10] W.J. Flameng, S. Ozaki, J. Yperman, P. Herijgers, B. Meuris, A. Van Lommel, E. Verbeken, Calcification characteristics of porcine stented valves in a juvenile sheep model, *Ann. Thorac. Surg.* 71 (2001) S401–S405.
[https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(01\)02527-9](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(01)02527-9).
- [11] A. Shearer, M. Montazerian, J.C. Mauro, Modern definition of bioactive glasses and glass-ceramics, *J. Non. Cryst. Solids.* 608 (2023) 122228.
<https://doi.org/10.1016/J.JNONCRY SOL.2023.122228>.
- [12] SILMARA CALDAS SANTOS, BIOCÓMPÓSITOS DE $x\text{SiO}_2 \cdot (y-n)\text{CaO} \cdot z\text{P}_2\text{O}_5 \cdot n\text{CuO}$ /PVA OBTIDOS POR TAPECASTING AQUOSO: PROPRIEDADES OSTEOGÊNICA E ANTIBACTERIANA, n.d.
- [13] I. Grigoraviciute-Puroniene, A. Zarkov, K. Tsuru, K. Ishikawa, A. Kareiva, A novel synthetic approach for the calcium hydroxyapatite from the food products, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 91 (2019) 63–71.
<https://doi.org/10.1007/s10971-019-05020-4>.
- [14] L.D. Gelb, K.E. Gubbins, Pore Size Distributions in Porous Glasses: A Computer Simulation Study, *Langmuir.* 15 (1999) 305–308.
<https://doi.org/10.1021/la9808418>.
- [15] M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J.P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 87 (2015) 1051–1069. <https://doi.org/10.1515/pac-2014-1117>.

8. Outras atividades

- Capacitação em análises de área de superfície.
- Participação na elaboração de um artigo científico junto ao grupo de pesquisa.