



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS (*P²CEM*)

P²CEM

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**O papel do nitrato de cálcio na mineralização precoce de
hidroxiapatita durante a síntese sol-gel de vidros do tipo 58S e
seus efeitos sobre bioatividade e adsorção de proteínas**

JÉSSICA FERNANDA RIBEIRO OLIVEIRA

SÃO CRISTÓVÃO – SE

2024

JÉSSICA FERNANDA RIBEIRO OLIVEIRA

O papel do nitrato de cálcio na mineralização precoce de hidroxapatita durante a síntese sol-gel de vidros do tipo 58S e seus efeitos sobre bioatividade e adsorção de proteínas

Orientador: Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos

SÃO CRISTÓVÃO – SE

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Oliveira, Jéssica Fernanda Ribeiro.

O48p O papel do nitrato de cálcio na mineralização precoce de hidroxiapatita durante a síntese sol-gel de vidros do tipo 58S e seus efeitos sobre bioatividade e adsorção de proteínas / Jéssica Fernanda Ribeiro Oliveira ; orientador Euler Araujo dos Santos . - São Cristóvão, SE, 2024.

91 f.: il.

Dissertação (mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) –
Universidade Federal de Sergipe, 2024.

1. Vidro. 2. Adsorção. 3. Componentes bioativos. I. Santos, Euler Araujo dos, orient. II. Título.

CDU 666.113

O papel do nitrato de cálcio na mineralização precoce de hidroxiapatita durante a síntese sol-gel de vidros do tipo 58S e seus efeitos sobre bioatividade e adsorção de proteínas

JÉSSICA FERNANDA RIBEIRO OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

Aprovada por:

Documento assinado digitalmente
 EULER ARAUJO DOS SANTOS
Data: 19/02/2024 09:20:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Euler Araujo dos Santos

Documento assinado digitalmente
 VICTOR HUGO VITORINO SARMENTO
Data: 19/02/2024 21:25:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Victor Hugo Vitorino Sarmento

Documento assinado digitalmente
 IARA DE FATIMA GIMENEZ
Data: 19/02/2024 12:07:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Iara de Fátima Gimenez

SÃO CRISTÓVÃO, SE - BRASIL

Fevereiro/2024

A gratidão é a memória do coração.

Jean-Baptiste Massieu

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Jesus e aos espíritos de luz pela vida, cuidado e livramentos.

Ao professor Euler que foi muito mais que um orientador, gratidão por estar presente em cada etapa do trabalho, por todos os seus conselhos, cuidados, orientações e por ser um verdadeiro *coach* científico.

Ao Heri que além de companheiro de vida, segurou a minha mão em momentos de perda, conquistas, ansiedade e felicidade, também esteve comigo todos os dias no Lab sempre com muita paciência.

A minha mãe que nunca mediu esforços para que eu tivesse as oportunidades que ela não teve. A minha vó Lindinha que sempre me acolheu com um abraço carinhoso e em suas orações.

Aos meus queridos professores que contribuíram para a minha formação durante e após as disciplinas, em especial a professora Iara pelas contribuições nas atividades de pesquisa, ao professor Luís Eduardo por me acompanhar no UV-Vis e sempre estar curioso com as etapas da pesquisa, a professora Ledjane por tantas conversas e cuidado e ao professor Tentardini por me auxiliar com o DRX.

Aos meus irmãos científicos: Ulisses e Ana Júlia por me acompanharem em parte desse trabalho.

Ao Jander por me ensinar a usar o *Adobe Illustrator*, por me ajudar com o inglês, por seu carinho, cuidado e por ser um dos melhores *Master Chefs* que já recebi aqui em casa.

Aos meus lindões do BioCeraFinos (Manu, Douglas, Iago, Jander, Ana, João, Ronaldo, Gabi) com quem almocei quase todos os dias e compartilhei medos, conquistas, risadas e abraços. Vocês são incríveis!

A Deidyane que me ajudou muito com os ensaios de bioatividade e também compartilhou abraço.

A Yslaine que se tornou uma amiga depois de compartilharmos uma saga com o BET.

Ao Jeff, que me ajudou muito no DTA e me apresentou a pessoas maravilhosas.

A Roberta e Candice do CLQM que sempre estiveram disponíveis para me auxiliar no UV-Vis e por terem disponibilizado as células do BET.

A Isis por me mostrar o mapa de frutas da UFS e por trazer mangas pra mim.

A Shirlei que foi um anjo em minha vida, que me deu um *help* em muitos momentos e que me colocou em suas orações.

Ao Sr. Nilson que sempre sentia a minha falta no dia que eu não ia e que sempre me oferecia um cafezinho.

Ao Ednaldo da secretaria e em especial a Anne por todo carinho.

Ao Lapene, em especial a Giulia e a Ivone que cuidaram com muito carinho das minhas crises de enxaqueca e também contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

A Gegeo que me adotou como filha e as meninas do Projeto Mulheres Ajudando Mulheres, que são inspirações para o meu crescimento pessoal, ainda vamos ajudar muitas mulheres.

A todos aqueles que me ajudaram direta ou indiretamente para que esse sonho se tornasse realidade.

Resumo da Dissertação apresentada ao P²CEM/UFS como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais (M.Sc.)

O papel do nitrato de cálcio na mineralização precoce de hidroxiapatita durante a síntese sol-gel de vidros do tipo 58S e seus efeitos sobre bioatividade e adsorção de proteínas

Jéssica Fernanda Ribeiro Oliveira

Fevereiro de 2024

A mineralização precoce da hidroxiapatita (HAp) durante a síntese de vidros bioativos derivados da síntese sol-gel tem sido frequentemente relatada na literatura. Até o momento, não há consenso sobre como essa mineralização precoce ocorre e se ela é capaz de afetar o comportamento biológico subsequente do vidro. Neste trabalho, explorou-se como o momento de adição do precursor nitrato de cálcio na síntese sol-gel, em relação à hidrólise dos precursores alcóxidos, afetam essa mineralização e suas consequências sobre a bioatividade e capacidade de adsorção de proteínas de um vidro 58S (58SiO₂-33CaO-9P₂O₅, % mássica). Foi demonstrado que a adição do nitrato de cálcio após a hidrólise dos alcóxidos produziu uma microestrutura heterogênea na qual regiões ricas em Ca²⁺ promoveram a formação de domínios de HAp nanocristalina na rede vítrea durante o tratamento térmico, num processo semelhante à desvitrificação. Essa microestrutura resultou também no aumento da capacidade de adsorção de albumina pelo vidro. Apesar disso, a bioatividade não foi significativamente afetada por este processo de mineralização precoce. Assim, conclui-se que, apesar da bioatividade não ser afetada pela mineralização precoce de HAp, a microestrutura do vidro e sua capacidade de adsorção de proteína pode ser modulada pela escolha do momento em que o nitrato de cálcio é adicionado à síntese sol-gel em relação à hidrólise dos alcóxidos.

Palavras-chave: Vidro bioativo, adsorção de proteínas, síntese sol-gel, bioatividade, nano hidroxiapatita.

Abstract of Dissertation presented to P²CEM/UFS as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Materials Science and Engineering (M.Sc.)

The role of calcium nitrate on the early mineralization of hydroxyapatite in the sol-gel synthesis of 58S glasses and its effect on bioactivity and protein adsorption

Jéssica Fernanda Ribeiro Oliveira

February 2024

The early mineralization of hydroxyapatite during the synthesis of bioactive glasses derived from sol-gel synthesis has been frequently reported in the literature. To date, there is no consensus on how this early mineralization occurs and whether it can affect the subsequent biological behavior of the glass. In this work, we explored the time effect of the calcium precursor addition and alkoxide hydrolysis on this early mineralization process, and the consequent bioactivity and protein adsorption capacity of a 58S glass (58SiO₂-33CaO-9P₂O₅, wt. %). It was demonstrated that the addition of calcium nitrate after the alkoxide hydrolyses produced a heterogeneous microstructure in which Ca²⁺-rich regions promoted the formation of nanocrystalline hydroxyapatite domains during heat treatment in a devitrification-like process. This microstructure resulted in an increased albumin adsorption capacity. Conversely, bioactivity was not significantly affected by this early mineralization process. Thus, it is concluded that, although bioactivity cannot be affected by this early hydroxyapatite mineralization, the microstructure of the glass and its protein adsorption capacity can be modulated by the moment at which calcium nitrate is added to the sol-gel synthesis.

Keywords: Bioactive glass, protein adsorption, sol-gel synthesis, bioactivity, nanohydroxyapatite.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABELAS.....	X
ÍNDICE DE ABREVIACÕES	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral.....	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1. Vidros.....	5
3.2. Vidros bioativos	10
3.2.1. Biomineralização de apatitas	11
3.3. Métodos de Síntese de Vidros Bioativos	13
3.3.1. Fusão e sol-gel	13
3.3.2. Rota sol-gel em meio básico e ácido	15
3.4. Efeito dos precursores sobre a microestrutura de vidros por sol-gel.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Síntese dos vidros bioativos: efeito da sequência de adição de reagentes.....	20
4.1.1. Síntese A: [TEOS] → [TEP] → [Ca(NO ₃) ₂]	20
4.1.2. Síntese B: [TEOS + TEP] → [Ca(NO ₃) ₂].....	21

4.1.3. Síntese C: [TEOS + TEP + [Ca(NO ₃) ₂]	21
4.1.4. Tratamento térmico do xerogel	22
4.2. Caracterização microestrutural dos vidros	22
4.2.1. Composição	22
4.2.2. Comportamento térmico	23
4.2.3. Caracterização estrutural	23
4.2.4. Proporção relativa de pontes de oxigênio nos grupos de silicato	23
4.2.5. Áreas de superfície e volumes de poros	24
4.3. Caracterização biológica	24
4.3.1. Bioatividade	24
4.3.2. Adsorção de proteínas	26
4.3.2.1. Solução de Albumina Sérica Bovina (BSA)	26
4.3.2.2. Preparo do reagente de Biureto (complexante)	26
4.3.2.3. Curva de calibração	27
4.3.2.4. Teste de adsorção de BSA na superfície dos vidros bioativos	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Adição simultânea de Ca(NO ₃) ₂ com TEOS e TEP e o efeito na microestrutura do vidro	30
5.2. Efeitos da adição simultânea de Ca(NO ₃) ₂ e alcóxidos na bioatividade e adsorção de proteínas	46
6. CONCLUSÃO	61
7. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	62

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
----------------------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 (a) Vista em duas dimensões das ligações atômicas em um monocristal de SiO ₂ . (b) Ligações em SiO ₂ amorfo. Fonte: Adaptado de Riano [20].	6
Figura 3.2 Volume específico <i>versus</i> temperatura em vidros e cristais. Fonte: Próprio autor. Δt_1 e Δt_2 = variação do tempo.	7
Figura 3.3 Estruturas Q ⁿ do SiO ₄ . Fonte: Próprio autor.	9
Figura 3.4 Representação da inclusão de cátions como modificadores do tetraedro de Si. Fonte: Lázaro [27].	9
Figura 3.5 Estágios relacionados a formação de HAp induzida pelas reações superficiais de vidros bioativos imersos em soluções biológicas. Fonte: Siqueira e Zanotto [31].	10
Figura 3.6 Caminho termodinâmico e cinético para a formação de cristais de HAp (HAp). Fonte: Adaptado de Cölfen e Mann [37]. *Produtos intermediários: amorfo (fosfatos de cálcio amorfos) e mineral final (HAp).	12
Figura 3.7 Diagrama ternário do sistema SiO ₂ -Na ₂ O-CaO-P ₂ O ₅ proposto por Hench. Fonte: Siqueira e Zanotto [31].	14
Figura 3.8 Diagrama ternário da dependência composicional do vidro bioativo CaO-SiO ₂ -P ₂ O ₅ por sol-gel. Legenda: Δ = HAp, \bullet = sem formação de HAp, \star = dissolução. Fonte: Li e Qiu [48].	15
Figura 3.9 Mecanismos para a hidrólise e condensação catalisadas por via a) ácida e b) básica. Fonte: Pedrosa [50].	16
Figura 3.10 Comportamento de polimerização da hidrólise de sílica. Na solução básica (B) as partículas aumentam de tamanho com diminuição em número. Em soluções ácidas	

ou na presença de sais flocculantes (A) as partículas agregam-se em redes tridimensionais e formam géis. Fonte: Brinker e Scherer [52]. 17

Figura 4.1 Ilustração esquemática das três sínteses para obtenção das amostras de vidro.

Fonte: Próprio autor. 22

Figura 5.1 Curvas de TG e DTG para as amostras de vidro tratadas a 120 °C. 31

Figura 5.2 Curvas de DSC para as amostras de vidro tratadas a 120 °C. 33

Figura 5.3 Padrões de difração de raios X das amostras de vidro tratadas a 120, 300, 400, 600 e 700°C. Fases identificadas: nitrato de cálcio (\square), α -cristobalita (\blacksquare), fosfato de silício (\bullet), calcita (\diamond) e HAp (\ast) 34

Figura 5.4 Refinamento de Rietveld dos padrões de difração de raios X obtidos a partir das amostras de vidro tratadas a 700 °C. A quantidade de HAp (% em massa) em relação à fase amorfa é fornecida no gráfico, assim como os principais planos de difração da HAp ($2\ 1\ 1$) e da calcita ($1\ 0\ 4$). Dados experimentais (I_{obs}), calculados (I_{cal}), diferença ($I_{\text{obs}} - I_{\text{cal}}$) e dados do padrão são mostrados em todos os espectros de 10 a 60°, assim como o GoF e R_{wp} 37

Figura 5.5 Espectros Raman de vidros bioativos calcinados a 700°C na faixa das bandas vibracionais do silicato. As bandas Q^0 , Q^1 , Q^2 e Q^3 referem-se a vibrações de estiramento em unidades de silicato tetraédricas com zero, um, dois e três pontes de oxigênio, respectivamente. O CO_3 simétrico ν_1 que se estende da calcita também foi representado na curva. O gráfico de barras mostra a área relativa sob as deconvoluções Q^0 , Q^1 , Q^2 e Q^3 que são proporcionais à quantidade de cada amostra Q^n na estrutura de vidro. 38

Figura 5.6 Curvas isotérmicas de adsorção/dessorção de nitrogênio obtidas para as três sínteses. 41

Figura 5.7 Gráficos de distribuição de tamanho de poros e área de superfície por raio de poros das amostras de vidro bioativo tratadas a 700 °C.	43
Figura 5.8 Microestrutura dos vidros bioativos sintetizados com tratamentos térmicos a 120 e 700 °C.	46
Figura 5.9 Padrões de difração de raios X das amostras de vidro bioativo tratadas a 700 °C em contato com SBF por 0, 1, 4 e 7 dias.	47
Figura 5.10 Refinamento Rietveld do padrão de difração de raios X obtido das amostras de vidro tratadas a 700°C e após imersão em SBF por 7 dias. A quantidade de HAp (% em massa) relativa à fase amorfa é informada no gráfico. Dados experimentais (Y_{obs}), calculados (Y_{cal}), diferença ($Y_{obs} - Y_{cal}$), fundo e padrão são mostrados em todos os gráficos de 10 a 60°, assim como o GoF.	49
Figura 5.11 Imagens de MEV obtidas da superfície do vidro bioativo produzido via síntese A ([TEOS] → [TEP] → [Ca(NO ₃) ₂]) antes (controle) e após imersão por 7 dias em SBF. As setas apontam os precipitados na forma de couve-flor recobrimento a superfície do vidro.	50
Figura 5.12 Imagens de MEV obtidas da superfície do vidro bioativo produzido via síntese B ([TEOS + TEP] → [Ca(NO ₃) ₂]) antes (controle) e após imersão por 7 dias em SBF. As setas apontam os precipitados na forma de couve-flor recobrimento a superfície do vidro.	51
Figura 5.13 Imagens de MEV obtidas da superfície do vidro bioativo produzido via síntese C ([TEOS + TEP + Ca(NO ₃) ₂]) antes (controle) e após imersão por 7 dias em SBF. As setas apontam os precipitados na forma de couve-flor recobrimento a superfície do vidro.	52

- Figura 5.14** Imagens de MET obtidas das amostras após imersão na solução SBF por 7 dias e padrões de difração de elétrons obtidos das regiões observadas. Os anéis de difração referentes aos planos (2 1 1) e (0 0 2) da HAp são mostrados nas imagens juntamente com suas respectivas distâncias interplanares d_{hkl} 54
- Figura 5.15** Evolução de composição das amostras obtidas via EDS ao longo do tempo de imersão em SBF. Os teores relativos de Ca, Mg e P em relação ao Si são mostrados nas curvas: a) Ca/Si, b) Mg/Si e c) P/Si. 55
- Figura 5.16** Análises de EDS da razão Ca/P para os vidros bioativos sintetizados. Amostras em contato com SBF a 37 °C nos tempos 0, 1, 4 e 7 dias. 57
- Figura 5.17** Quantidade de albumina bovina adsorvida por grama de biovidro. *Diferença significativa ($n= 3$; $p \leq 0,05$). 58
- Figura 5.18** Quantidade de albumina bovina adsorvida por área superficial dos vidros. *Diferença significativa ($n= 3$; $p \leq 0,05$). 59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 5.1 Composições dos vidros bioativos determinadas por espectroscopia de fluorescência de raios X (FRX). Os valores nominais (calculados) para cada óxido estão expressos em negrito.	30
Tabela 5.2 Perdas de massa das amostras de vidros bioativos tratadas a 120 °C.	31
Tabela 5.3 Valores de área de superfície (BET) e porosidade (BJH) obtidos a partir de análises de adsorção de nitrogênio.	42

ÍNDICE DE ABREVIACÕES

58S	58SiO ₂ .33CaO.9P ₂ O ₅ (% mássica); 60SiO ₂ .36CaO.4P ₂ O ₅ (% molar)
ANOVA	Análise de variância
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Barrett-Joyner-Halenda
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i>)
Ca(NO₃)₂	Nitrato de cálcio
CaCO₃	Carbonato de cálcio
CaO	Óxido de cálcio
DFT	Teoria do funcional da densidade (do inglês: <i>Density Functional Theory</i>)
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria de varredura diferencial (do inglês: <i>Differential scanning calorimetry</i>)
DTG	Termogravimetria derivada (do inglês: <i>Differential Thermogravimetric Analysis</i>)
EDS	Espectroscopia de raios X por energia dispersiva (do inglês: <i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i>)
FRX	Espectroscopia de fluorescência de raios X
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês: <i>Fourier Transform Infrared</i>)
GoF	Qualidade de ajuste (do inglês: <i>Goodness Of Fit</i>)
HAp	Hidroxiapatita
ICDD	Centro Internacional de Dados de Difração (do inglês: <i>International Centre for Diffraction Data</i>)
ICSD	Banco de dados de estrutura cristalina inorgânica (do inglês: <i>Inorganic Crystal Structure Database</i>)
KI	Iodeto de potássio
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

Na₂O	Óxido de sódio
OCP	Fosfato octacálcico
P₂O₅	Pentóxido de fósforo
Q⁰	Silicato com zero oxigênio ligante
Q¹	Silicato com um oxigênio ligante
Q²	Silicato com dois oxigênios ligantes
Q³	Silicato com três oxigênios ligantes
Qⁿ	Estruturas de silicato com n oxigênios ligantes
Raman	Espectroscopia Raman
RMN	Ressonância magnética nuclear
Rpm	Rotações por minuto
SBF	Fluido corporal simulado (do inglês: <i>Simulated Body Fluid</i>)
SiO₂	Dióxido de silício
SiO₄⁴⁻	Íon silicato
T_c	Temperatura de cristalização
TEOS	Tetraetil ortossilicato (Si(OC ₂ H ₅) ₄)
TEP	Trietil fosfato (OP(OC ₂ H ₅) ₃)
T_g	Temperatura de transição vítrea
TG	Análise termogravimétrica (do inglês: <i>Thermogravimetric Analysis</i>)
UV-Vis	Espectroscopia na região do ultravioleta e visível
WD	Distância de trabalho (do inglês: <i>Working Distance</i>)

1. INTRODUÇÃO

Diversos vidros bioativos sintetizados via sol-gel possuem silicato (SiO_4^{4-}) e fosfato (PO_4^{3-}) em sua composição [1, 2]. O sistema terciário $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO}$ está entre as composições de vidros bioativos mais conhecidos atualmente [1, 3, 4]. Nestes vidros, os principais precursores de silicato e fosfato são o tetraetil ortossilicato (TEOS) e o trietil fosfato (TEP), respectivamente [1, 5]. Redes vítreas de silicato são formadas a partir da hidrólise do TEOS e posterior policondensação de grupos SiO_4^{4-} . Embora óxidos de fósforo e silício sejam considerados bons formadores de redes vítreas em vidros derivados de fusão, a natureza química dos seus precursores no processo sol-gel faz com que o fósforo (na forma de fosfato) exiba comportamento diferenciado.

Recentemente, Bueno *et al.* [6] demonstraram, usando a teoria do funcional da densidade (DFT) e ressonância magnética nuclear (RMN), que as moléculas de TEP permanecem não hidrolisadas em uma síntese sol-gel típica de obtenção de vidro bioativo. Os autores observaram que o TEP não hidrolisado foi eliminado da estrutura somente após o tratamento térmico em torno de 230 °C. Durante o tratamento térmico, o fósforo remanescente da decomposição reagiu com os íons Ca^{2+} livres formando domínios nanocristalinos de ortofosfatos e pirofosfatos de cálcio na microestrutura do vidro. Em um estudo anterior, Santos *et al.* [7] também evidenciaram a formação de domínios de fosfato de cálcio nanocristalino (CaP) (apatita e ortofosfato de cálcio) em vidros bioativos sintetizados por sol-gel. Este processo precoce de formação de apatita (mineralização) foi atribuído à formação de regiões ricas em CaP na microestrutura do vidro devido ao acúmulo de TEP não hidrolisado e nitrato de cálcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ durante a formação do gel e a secagem.

Durante muito tempo, esta mineralização precoce de ortofosfatos de cálcio em vidros bioativos durante as sínteses sol-gel passou quase despercebida pela comunidade científica. Provavelmente porque esses minerais são compostos por fases pouco cristalinas e em escala nanométrica, as quais produzem picos muito pequenos e alargados nas análises de difratometria de raios X, tornando-os quase imperceptíveis. Em inúmeros casos, esses picos eram considerados como ruído ou parte dos halos amorfos típicos das estruturas vítreas [8–10]. Atualmente, esses picos têm sido corretamente atribuídos a fases nanocristalinas ricas em CaP, mineralizadas durante a síntese sol-gel [6, 7, 11]. Apesar de identificarem a presença desses nanocristais, nenhum trabalho respondeu adequadamente até o momento como esta mineralização precoce e inerente ao processo de síntese afeta o desempenho biológico dos vidros, nem foram indicados possíveis meios para controlá-la.

Existem relatos na literatura de que o precursor $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ tende a produzir heterogeneidades na microestrutura dos vidros derivados de sol-gel quando comparado aos alcóxidos de cálcio precursores [12, 13]. Porém, a forte reação entre os alcóxidos de cálcio e a água [5, 13] restringe seu uso. Já o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ é totalmente solúvel em meio aquoso e o íon nitrato é facilmente decomposto termicamente e eliminado do vidro sob a forma de NO_2 e O_2 , o que o torna o precursor de cálcio mais utilizado na síntese sol-gel [5, 13, 14]. Relata-se que o cálcio proveniente dos alcóxidos é prontamente mesclado com os demais produtos da hidrólise dos alcóxidos, permitindo uma incorporação homogênea dos íons cálcio na rede vítrea, os quais atuam rompendo as cadeias covalentes de silicato [12, 13]. Por outro lado, o cálcio proveniente da dissolução do sal nitrato de cálcio em meio aquoso tem uma baixa difusividade nos aglomerados de silicato, acumulando-se na borda destas nanopartículas amorfas.

Na literatura, a grande maioria dos procedimentos experimentais para síntese de vidros bioativos por sol-gel requer a hidrólise prévia de alcóxidos (TEOS e TEP) com

posterior dissolução de nitrato de cálcio [15]. Pode-se supor que a adição do nitrato de cálcio simultaneamente à hidrólise do TEOS poderia facilitar a difusão do cálcio nas nanopartículas amorfas de silicato, melhorando a distribuição do cálcio na microestrutura do vidro e, conseqüentemente, evitando ou diminuindo o processo de mineralização precoce. Para testar esta hipótese, um vidro bioativo terciário conhecido como 58S [16], composto por SiO_2 , P_2O_5 e CaO , foi produzido neste trabalho adicionando-se o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ simultaneamente e após a hidrólise de TEOS e TEP, sob três sínteses distintas. Estas sínteses permitiram esclarecer não somente como a adição de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ atua na mineralização precoce da apatita durante o processo de síntese, mas também o seu papel no desempenho dos vidros, particularmente na sua bioatividade e na adsorção de proteínas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar como a adição do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ antes e após a hidrólise dos alcóxidos afeta a microestrutura do vidro obtido por sol-gel e suas consequências sobre bioatividade e adsorção de proteínas.

2.2. Objetivos Específicos

- Compreender como a adição do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ antes e após a hidrólise dos alcóxidos determina a microestrutura do vidro.
- Determinar como a adição do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ em momentos diferentes da síntese sol-gel pode afetar a mineralização precoce de fosfatos de cálcio.
- Avaliar se as modificações estruturais e a formação precoce de nanocristais de fosfatos de cálcio interferem na bioatividade dos vidros.
- Avaliar se as modificações estruturais e a formação precoce de nanocristais de fosfatos de cálcio interferem na adsorção de proteínas.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Vidros

O conceito de vidro possui divergências ao longo dos anos. De acordo com Alves *et al.* [17], o primeiro relato de fabricação de vidros se deu pelos fenícios em 8000 a.C.; naquela época, pouco se sabia sobre aquele material e só em 1830 foram realizados os primeiros estudos por Faraday, os quais definiram o vidro como um material semelhante a uma solução de diferentes substâncias e não um composto em si.

Em 1921, Lebedev propôs que o vidro era “um fundido comum consistindo de cristais altamente dispersos” [18]. Ao considerar o vidro como um líquido aquecido que apresenta um aumento de viscosidade à medida que é resfriado, Alves *et al.* [17] o definem como “um produto inorgânico fundido que atinge por resfriamento uma condição rígida sem que ocorra cristalização”.

Segundo Acosta [19], “o vidro é um material ou sistema físico fora do equilíbrio termodinâmico que carece de uma estrutura cristalina de longo alcance”. Assim, os vidros apresentam uma estrutura reticular polimerizada com ordem em curtas distâncias, ou seja, próximo às esferas de coordenação [20].

A Figura 3.1 representa a definição de vidros por Zachariasen [21], em que os vidros (Figura 3.1,b) se distinguem dos cristais (Figura 3.1,a) por apresentarem uma rede tridimensional sem simetria e/ou periodicidade [22].

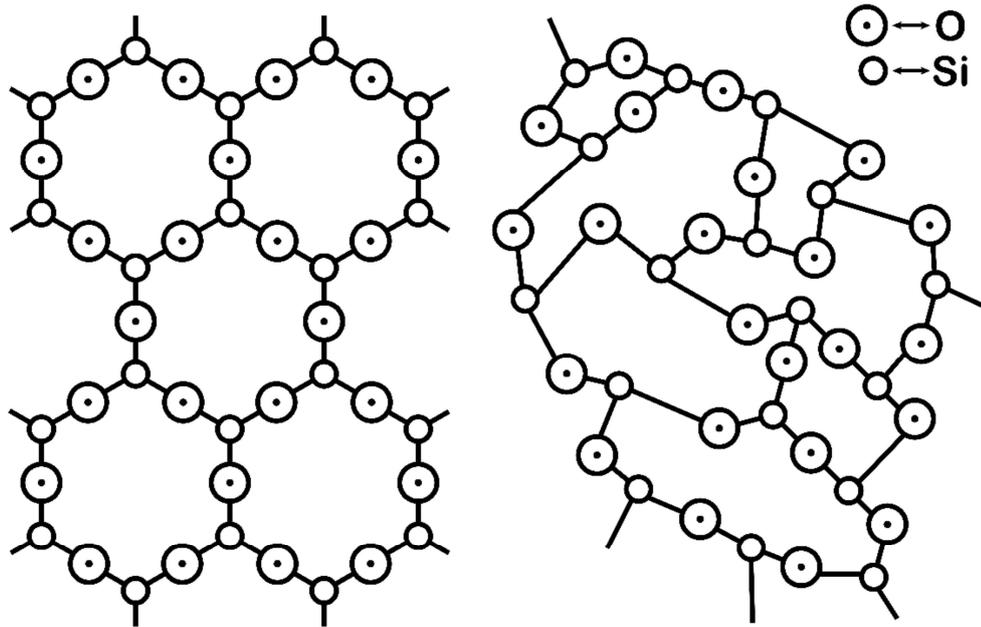


Figura 3.1 (a) Vista em duas dimensões das ligações atômicas em um monocristal de SiO₂. (b) Ligações em SiO₂ amorfo. Fonte: Adaptado de Riano [20].

Os vidros são materiais sólidos que apresentam uma estrutura amorfa, ou seja, não possuem uma ordem cristalina definida em sua estrutura molecular. Eles podem ser obtidos a partir do resfriamento rápido de um líquido viscoso (via método de fusão, Figura 3.2), que impede que as moléculas tenham o tempo necessário para se organizar em uma estrutura cristalina durante o processo de solidificação. Isso resulta em uma disposição desordenada e aleatória dos átomos no material sólido [23], criando uma estrutura mais aberta (menos densa ou de volume específico maior) se comparada a seu análogo cristalino.

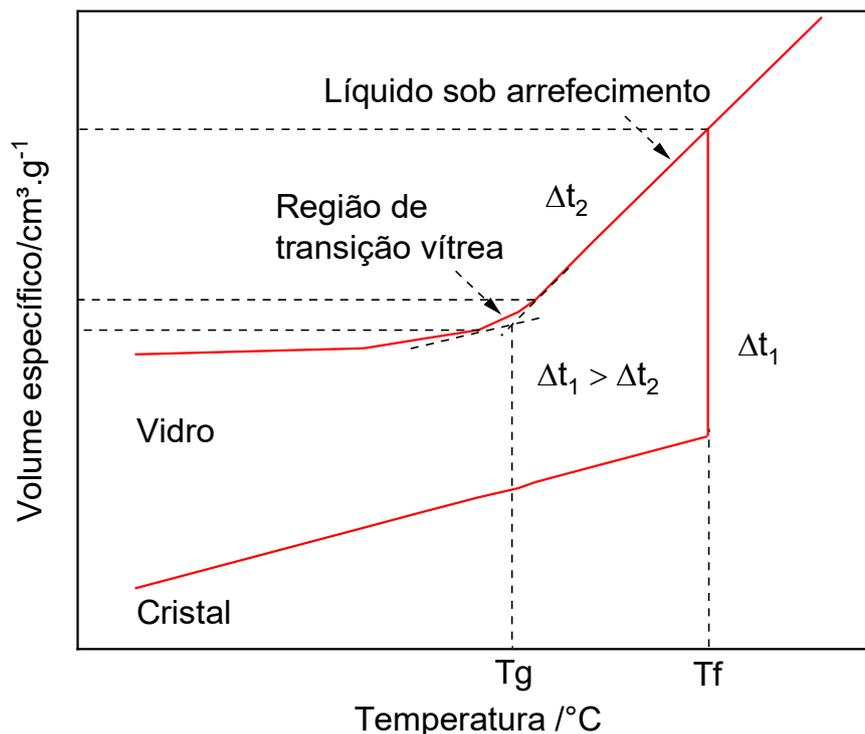


Figura 3.2 Volume específico *versus* temperatura em vidros e cristais. Fonte: Próprio autor. Δt_1 e Δt_2 = variação do tempo e T_f = temperatura de fusão.

Ao resfriar um líquido até a temperatura de fusão (T_f) há duas possibilidades, I) resfriamento lento e contração acentuada do volume específico ou II) resfriamento rápido e pequena variação de volume até a temperatura de transição vítrea (T_g) [24]. O vidro é formado quando se atinge a T_g durante um resfriamento rápido.

A T_g que é o ponto em que o vidro passa de líquido viscoso para um estado rígido (sólido), durante o resfriamento e pode variar de acordo com a taxa de resfriamento, quanto maior a taxa, maior será o volume específico do material formado. O gráfico da Figura 3.2 relaciona contração de volume específico e redução da temperatura. Quando o líquido é resfriado lentamente (Δt_1), há uma melhor organização dos grupos SiO_4^{4-} e, conseqüentemente, a nucleação e crescimento de estruturas com ordenamento tridimensional de longo alcance, conhecidas como cristais [19, 25]. Quando o tempo de resfriamento é menor (Δt_2), não há tempo suficiente para um ordenamento estrutural de

longo alcance, formando uma estrutura amorfa, ou vítrea. A transição vítrea pode ser entendida como a temperatura em que ocorre o aumento abrupto de viscosidade, representado na Figura 3.2 como o ponto de inflexão da curva de resfriamento rápido, a partir do qual o sistema passa a ter uma diminuição negligenciável de volume específico (ou seja, para de se densificar), devido ao comprometimento da mobilidade/difusão dos átomos [23, 26]. Isso evita o alcance de um estado de menor energia (maior organização estrutural, como observado nos cristais), o que faz com que o vidro seja considerado um sistema metaestável [23, 26]. Abaixo da T_g , os vidros tendem a ter um coeficiente de dilatação térmica menor devido a sua desordem estrutural e diferem dos cristais, já que estes possuem um melhor ordenamento e, conseqüentemente, um coeficiente de dilatação maior [27].

Termos como sólido não-cristalino e sólido amorfo são comumente apresentados em literatura, no entanto, Gupta [28] diferencia esses dois termos como: “sólidos amorfos não mostram relaxação estrutural para o estado líquido e, conseqüentemente, não apresentam T_g ”, já para os sólidos não cristalinos, sua “condição termodinâmica instável, apresentam uma variação espontânea e contínua no tempo das suas propriedades físicas em direção ao estado metaestável” do líquido super resfriado, para formar o vidro [28, 29]. Logo, o vidro pode ser entendido como um caso particular de sólido não-cristalino ou de sistema amorfo. Nem todo o sólido não-cristalino ou amorfo é um vidro.

Dentre esses conceitos, também é comum a descrição de rede vítrea, a qual diz respeito às unidades tetraédricas de SiO_4 e a forma com que se unem formando estruturas curtas ou de longas cadeias, definidas pelas estruturas Q^n (Figura 3.3), onde n refere-se ao número de oxigênios ligados ao Si do tetraedro adjacente [30].

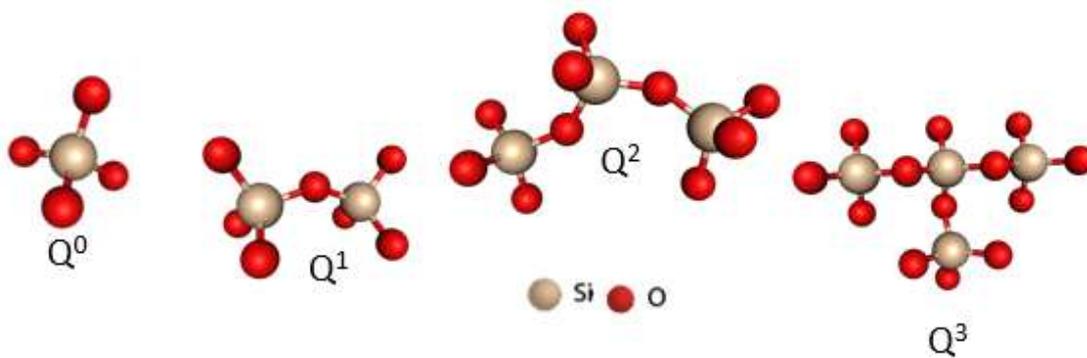


Figura 3.3 Estruturas Q^n do SiO_4 . Fonte: Próprio autor.

As estruturas do tipo Q^n são formadas no processo de solidificação do material. Quando quatro oxigênios ligantes estão ligados a rede de Si, o tetraedro é designado como Q^4 e quando todos os oxigênios são não ligantes, tem-se o tetraedro do tipo Q^0 [31]. Os oxigênios não ligantes são, geralmente, estabilizados por cátions de metais alcalinos e alcalinos terrosos, representados por “M” na Figura 3.4, via interações iônicas.

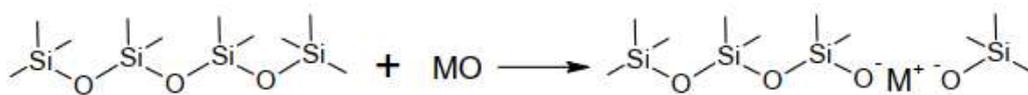


Figura 3.4 Representação da inclusão de cátions como modificadores do tetraedro de Si. Fonte: Lázaro [31].

Os cátions como Ca^{2+} e Na^+ entram na rede vítrea rompendo a ligação covalente Si-O-Si e, por isso, são denominados modificadores de rede, gerando uma descontinuidade da rede de silicato [22, 31]. Quanto maior for o valor de n , maior será a polimerização da rede e, conseqüentemente, haverá menos oxigênios disponíveis para ligação, ou seja, uma menor reatividade.

3.2. Vidros bioativos

Larry Hench foi pioneiro nos estudos de vidros de composições baseadas no sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$, os quais detinham propriedades biológicas que permitiam o seu uso como biomaterial reparador do tecido ósseo [32]. A principal característica dos vidros baseados nesse sistema é que eles possuem uma alta reatividade de superfície quando imersos em fluídos biológicos, diferentemente dos vidros comuns [33].

As reações que ocorrem na superfície desses vidros quando imersos em soluções contendo Ca^{2+} e PO_4^{3-} , tais como as chamadas soluções simuladoras de fluidos corpóreos (SBFs, do inglês *simulated body fluid*) [34], envolvem várias etapas, esquematizadas na Figura 3.5.

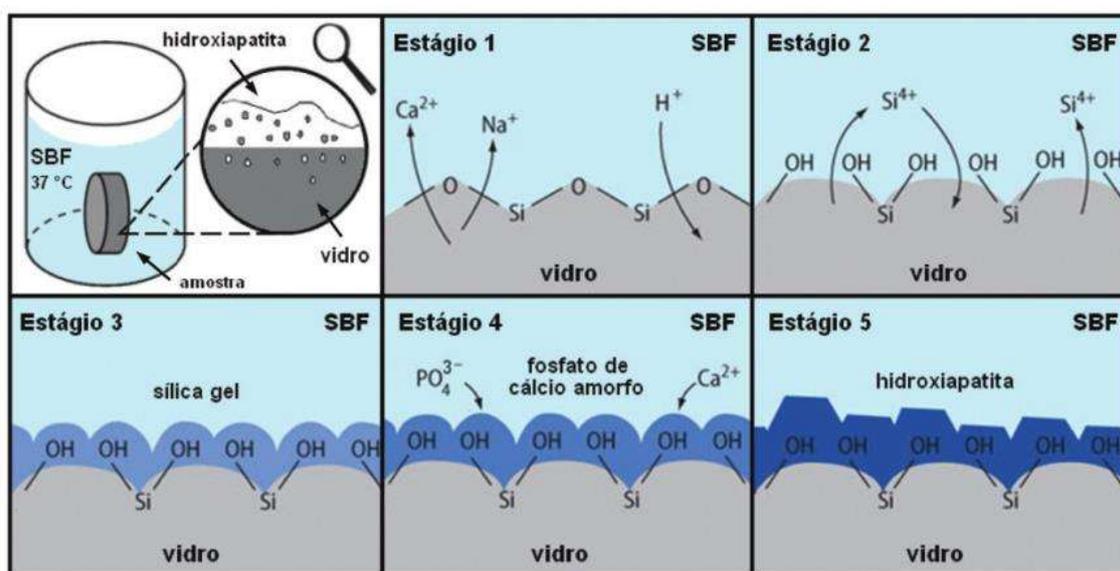


Figura 3.5 Estágios relacionados a formação de HAp induzida pelas reações superficiais de vidros bioativos imersos em soluções biológicas. Fonte: Siqueira e Zanotto [35].

No estágio inicial, ocorre a protonação dos oxigênios ligados ao Si seguida de uma saída de cátions como Na^+ e Ca^{2+} do vidro bioativo com aumento do pH do meio e ordenamento dos grupos silanois ($-\text{Si-OH}$) na superfície do vidro para posterior formação da sílica gel hidratada.

Os grupos -OH ordenados geram uma superfície com densidade de carga negativa que atrai cátions da solução, tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} , até a formação de uma superfície carregada positivamente que, por sua vez, atrai ânions PO_4^{3-} . Essas etapas caracterizam o processo de nucleação e crescimento de fosfato de cálcio amorfo na superfície. Com o tempo, o fosfato amorfo evolui para a forma cristalina HAp.

Portanto, os vidros bioativos são indutores natos de biomineralização quando inseridos no corpo humano. O fato da precipitação da HAp acontecer no ambiente corpóreo (rico em diversos íons e moléculas orgânicas de enorme importância para o funcionamento do corpo humano) faz com que a HAp formada contenha diversos desses íons em substituição ao Ca^{2+} e/ou ao PO_4^{3-} , além de moléculas orgânicas adsorvidas, gerando um ambiente químico bastante parecido com aquele alcançado num processo natural de biomineralização da matriz extracelular óssea ou de formação dos ossos [36].

3.2.1. Biomineralização de apatitas

A biomineralização pode ser definida como a precipitação de minerais por organismos vivos através de matrizes orgânicas. Arnold *et al.* [37] e Chen *et al.* [38] indicam que “a biomineralização é um processo fisiológico normal que inclui nucleação, crescimento de cristais e transformações de fases”. Esses biominerais são comumente formados por apatitas, ocorrendo em ambiente heterogêneo e em condições de temperatura relativamente baixa (37 °C) e pH próximo de 7 [39].

As condições biológicas são determinantes no que se refere ao número e ao tipo de minerais que são depositados a partir de soluções aquosas. Assim, o controle cinético é baseado predominantemente na modificação das barreiras de energia de ativação de nucleação, crescimento e transformação de fase [40]. De acordo com a Figura 3.6,

observa-se que a cristalização geralmente ocorre por um processo sequencial de modificações estruturais.

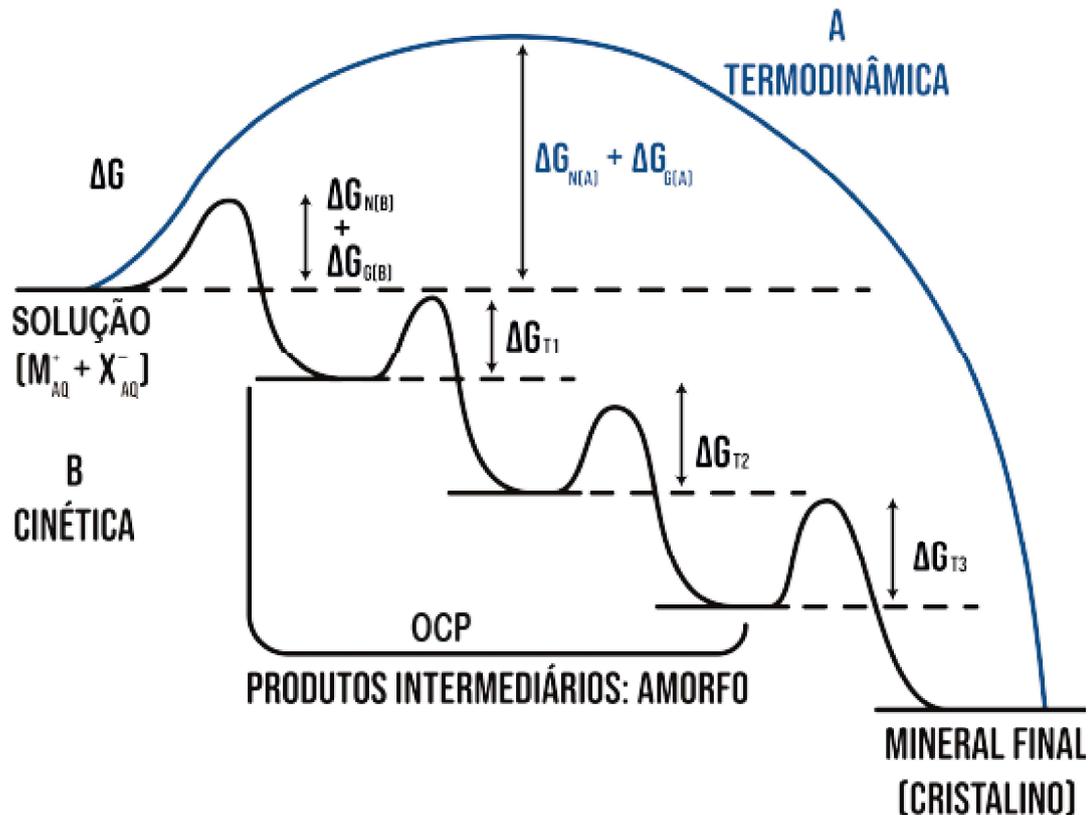


Figura 3.6 Caminho termodinâmico e cinético para a formação de cristais de HAp (HAp). Fonte: Adaptado de Cölfen e Mann [41]. *Produtos intermediários: amorfo (fosfatos de cálcio amorfos) e mineral final (HAp).

A Figura 3.6 descreve o caminho termodinâmico e cinético para a formação de cristais de HAp a partir de uma solução saturada contendo íons de Ca^{2+} e PO_4^{3-} , os quais tendem a formar inicialmente fosfatos de cálcio amorfo ($\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$), mesmo em temperaturas baixas como a do corpo humano (37°C) [42]. Essa fase amorfa evolui para fosfatos mais cristalinos, como o fosfato octacálcico (OCP), o qual se constitui em outro intermediário em meio aquoso, anterior a formação da HAp (HAp). O OCP, em condições de pH 7,0 e 37°C , possui uma taxa de cristalização que supera a da HAp, fazendo com que ele seja formado antes. Ao longo do tempo, a partir da perda gradual de moléculas de H_2O estrutural do OCP e do seu reordenamento cristalino, a HAp é formada [22, 43].

A HAp pertence ao grupo das apatitas e possui fórmula química: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. As apatitas são minerais que possuem fórmula química genérica $\text{M}_{10}(\text{XO}_4)_6(\text{Y})_2$, em que M se refere aos cátions (Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , dentre outros), o XO_4 , representa os ânions como: PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , SiO_4^{4-} e o Y os ânions F^- (fluorapatita), Cl^- (clorapatita) ou OH^- (HAp) [44].

A HAp é um dos principais constituintes da matriz extracelular do tecido ósseo juntamente com o colágeno. Sua ampla possibilidade de substituição iônica é uma característica que confere ao tecido ósseo o título de grande reservatório de oligoelementos no organismo.

3.3. Métodos de Síntese de Vidros Bioativos

3.3.1. Fusão e sol-gel

Hench foi o pioneiro na síntese de vidros bioativos por fusão. Esse método de síntese baseia-se na mistura de óxidos submetidos a elevadas temperaturas (acima de $1400\text{ }^\circ\text{C}$), a depender da composição do vidro bioativo [18, 45]. Este método necessita de muita energia para fundir todos os óxidos e possui limitações relacionadas à quantidade máxima de óxido de silício, além de gerarem vidros de baixa área de superfície [46].

De acordo com a Figura 3.7, pode se inferir uma relação direta entre a composição e a bioatividade. As composições compreendidas pela região “A” formam ligação com o tecido ósseo, a região “S” forma ligação com o tecido conjuntivo e a região marcada com a letra “E” corresponde ao *Bioglass*[®] 45S5 desenvolvido por Hench [35, 47, 48]. A região “B” apresenta teor de SiO_2 superior a 60 %, não sendo possível a ligação com o tecido ósseo devido à baixa reatividade, ou seja, formação de um material bioinerte.

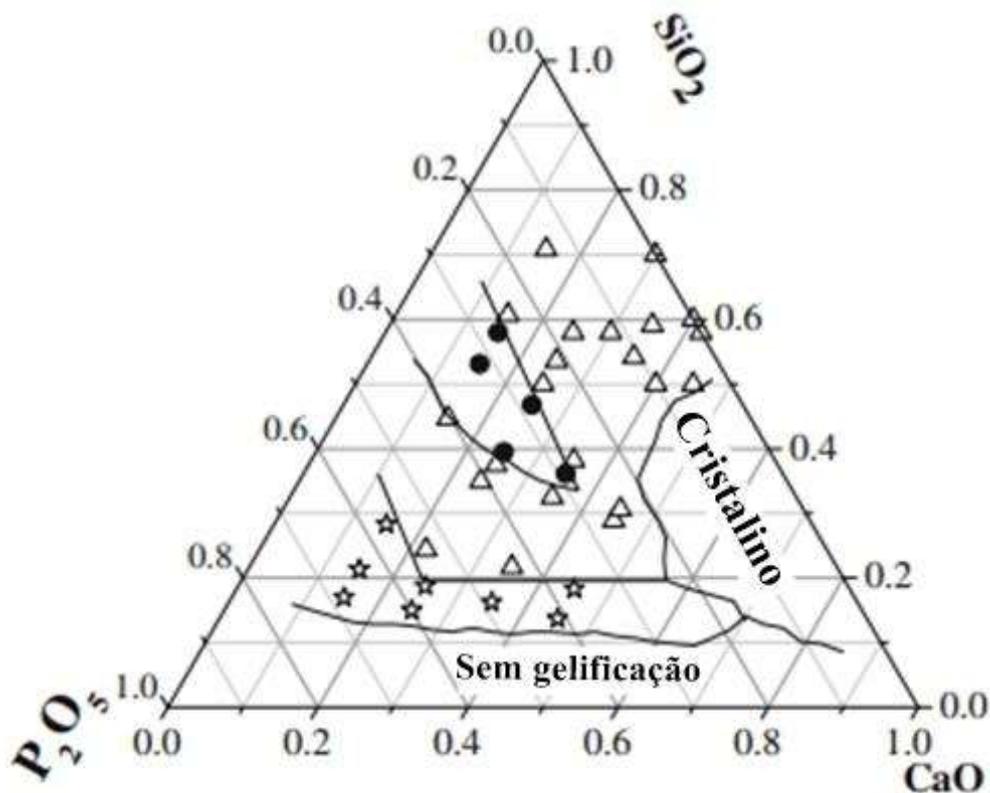


Figura 3.8 Diagrama ternário da dependência composicional do vidro bioativo $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ por sol-gel. Legenda: Δ = HAp, \bullet = sem formação de HAp, \star = dissolução. Fonte: Li e Qiu [52].

O diagrama ternário evidencia que o método sol-gel para vidros bioativos vão em direção a um maior teor de SiO_2 , mas ainda não mostrando nenhuma mudança na dependência do conteúdo de P_2O_5 [52].

3.3.2. Rota sol-gel em meio básico e ácido

O processo sol-gel pode ocorrer por via ácida ou básica. Na rota ácida as partículas são muito pequenas (menores que 3 nm) já que esta rota favorece a nucleação e posterior formação de uma rede de sílica. A rota básica favorece o crescimento, produzindo nanopartículas maiores de silicato [53]. A Figura 3.9 descreve o mecanismo de formação das redes vítreas de silicato envolvidas nas duas vias de síntese.

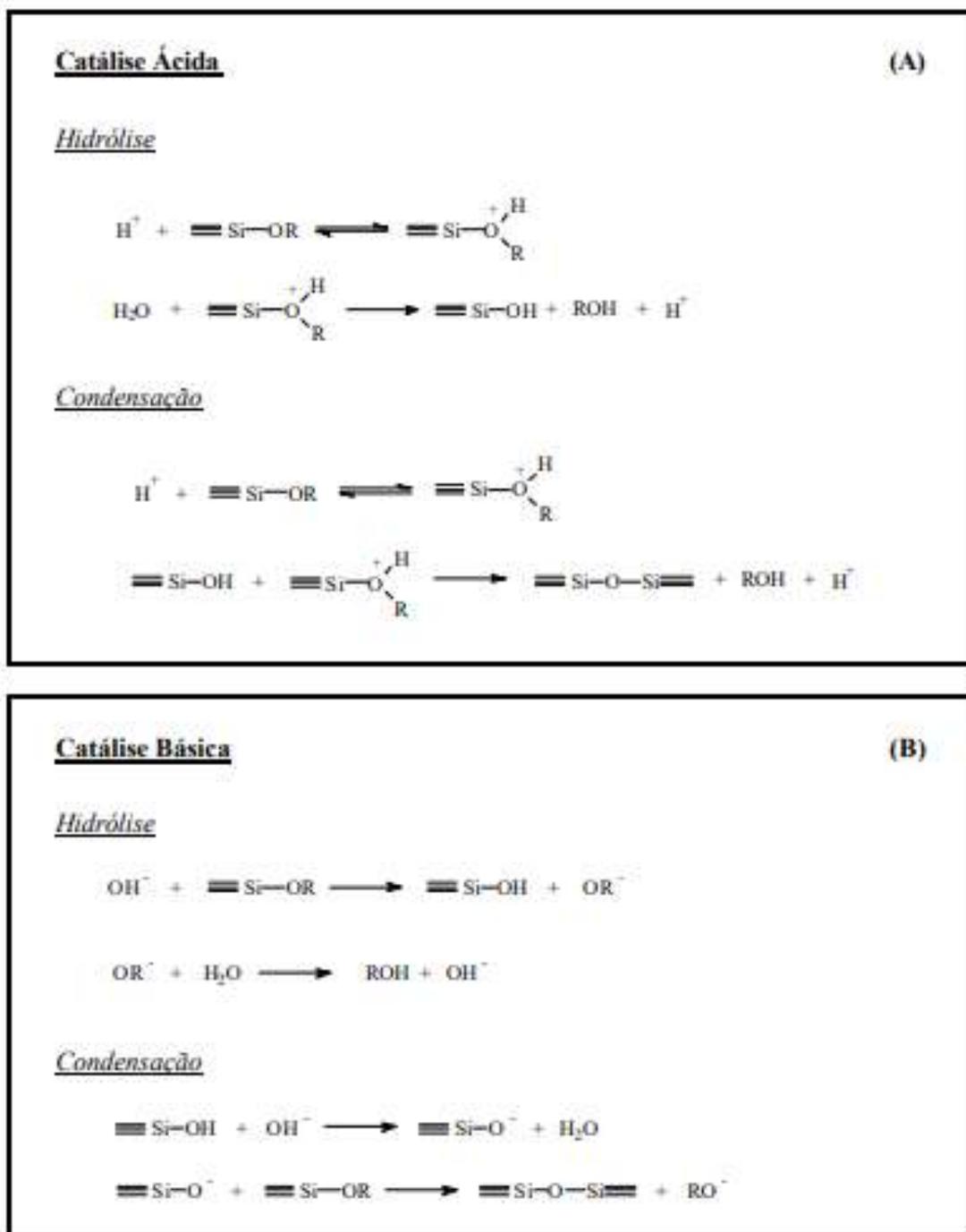


Figura 3.9 Mecanismos para a hidrólise e condensação catalisadas por via a) ácida e b) básica. Fonte: Pedrosa [54].

Na síntese catalisada por ácido, o grupo OR (do TEOS) é protonado e a velocidade da hidrólise é maior que a condensação, à medida que o valor de “n” aumenta nas estruturas do tipo Qⁿ, cadeias mais longas são formadas, ou seja, há a formação de uma

rede de Si com formação prévia de pequenos *clusters* [55], dando origem a nanopartículas de 1-2 nm.

Na catálise básica, a hidroxila atua como nucleófilo no processo de hidrólise ao mesmo tempo que o grupo silanol desprotonado, Si-O⁻, aumenta a velocidade de condensação com formação de nanopartículas de sílica esféricas maiores que aquelas produzidas pela via ácida, podendo ir de 30 a 100 nm [54] (Figura 3.10).

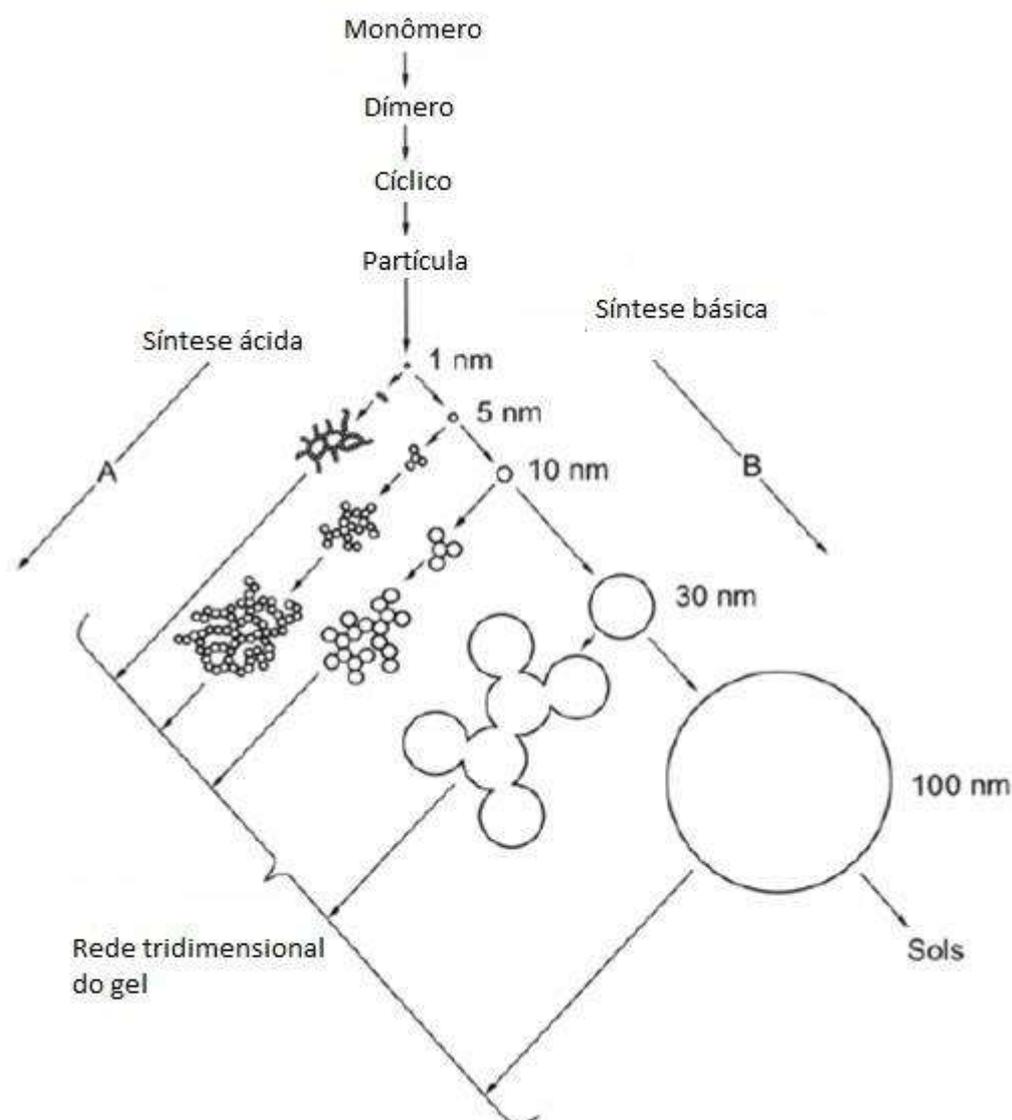


Figura 3.10 Comportamento de polimerização da hidrólise de sílica. Na solução básica (B) as partículas aumentam de tamanho com diminuição em número. Em soluções ácidas ou na presença de sais flocculantes (A) as partículas agregam-se em redes tridimensionais e formam géis. Fonte: Brinker e Scherer [56].

Assim, as nanopartículas menores de sílica por via ácida coalescem e formam o gel enquanto que as nano partículas por via básica crescem e formam esferas.

3.4. Efeito dos precursores sobre a microestrutura de vidros por sol-gel

A inserção de fósforo P na matriz de Si é descrita por Tilocca *et al.* [57] como uma formação de grupos Si-P-Si que são facilmente hidrolisadas e que tendem a aumentar a bioatividade do vidro, no entanto, recentemente Bueno *et al.* [6] indicaram que a inserção/hidrólise do TEP durante a síntese não é efetiva e que parte permanece sem reagir mesmo após tratamentos térmicos a 270 °C.

O fósforo do TEP que não é hidrolisado tende a reagir com o Ca^{2+} para formar nanodomínios de fosfato de cálcio que cristalizam em nano-HAp na superfície do vidro bioativo e geram pontos de nucleação que tendem a aumentar a bioatividade do material [22, 57]. Dessa forma, a adição de um modificador de rede como o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ pode aumentar a hidrólise do TEP e favorecer a inclusão do P devido à quebra de ligação covalente Si-O e formação de uma ligação iônica do oxigênio com o cálcio [58].

Diversos autores usam sistemas de síntese com TEOS, TEP e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ adicionados com intervalos de tempo entre si [38, 59, 60]. No entanto, modificações no momento de adição do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ podem perturbar o sistema de forma que a hidrólise do TEP seja mais efetiva. Os modificadores de rede tendem a incluir defeitos na rede de Si.

A incorporação cátions em uma estrutura de vítrea causa a despolimerização da rede Si-O-Si, ao quebrar as ligações covalentes e formação da ligação iônica entre o O- e o Ca^{2+} com aumento da bioatividade [61, 62]. Em estudos recentes, uma combinação de

Sr^{2+} e Cu^{2+} foi utilizada para melhorar aspectos de bioatividade de vidros e inibir a proliferação de bactérias após implante do material [61, 63].

Os íons modificadores são usados tanto na rota básica quanto na rota ácida. O Mn^{2+} , por exemplo, quando usado durante a síntese básica leva a formação de nanopartículas irregulares que afetam diretamente a sua ação com as células. No entanto, se usado como dopante pós síntese, pode favorecer a adesão e diferenciação celular [64]. Já na rota ácida, o Mn^{2+} junto ao Ca^{2+} favorecem a bioatividade dos vidros bioativos [65].

Em literatura, diversos íons são estudados com o objetivo de modificar a microestrutura dos vidros e conseqüentemente aumentar suas propriedades biológicas como adesão e diferenciação celular. Dentre os modificadores citados em literatura estão o Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ag^+ , Co^{2+} e Ce^{3+} [66–70].

Pajares *et al.* [14] abordam dois métodos de síntese com a introdução de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ antes e depois da adição do catalisador (uma mistura de etanol e amônia, via síntese básica). Os pesquisadores observaram que, quando o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ é adicionado após a hidrólise de TEOS/TEP/catalisador, os íons Ca^{2+} tendem a se aglomerar na parte externa da estrutura. Por outro lado, ao ser adicionado antes do catalisador, os íons Ca^{2+} não são incorporados à estrutura interna.

O aumento na concentração de íons Ca^{2+} em vidros bioativos pode influenciar tanto na fase de formação da rede vítrea, ao romper as ligações covalentes Si-O-Si, quanto na redução da adsorção de proteínas, incluindo albumina bovina (BSA) [71].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese dos vidros bioativos: efeito da sequência de adição de reagentes

Um vidro de composição nominal de 58% de SiO₂, 33% de CaO e 9% de P₂O₅ (% massica) ou 60% de SiO₂, 36% de CaO e 4% de P₂O₅ (% molar) foi preparada pelo método sol-gel [16] e utilizada para compreender como a adição de Ca(NO₃)₂ simultaneamente e após a hidrólise do alcóxido afetou a mineralização de apatita durante a síntese, bem como as propriedades do vidro. Três sínteses diferentes foram exploradas neste trabalho (Figura 4.1).

Síntese A – [TEOS] → [TEP] → [Ca(NO₃)₂]: Hidrólise de TEOS seguida de hidrólise de TEP com posterior adição de nitrato de cálcio.

Síntese B – [TEOS + TEP] → [Ca(NO₃)₂]: Hidrólise simultânea de TEOS e TEP com posterior adição de nitrato de cálcio.

Síntese C – [TEOS + TEP+ Ca(NO₃)₂]: Hidrólise simultânea de TEOS e TEP na presença de nitrato de cálcio.

4.1.1. Síntese A: [TEOS] → [TEP] → [Ca(NO₃)₂]

A síntese dos vidros bioativos foi baseada em um trabalho anterior de Santos *et al.* [22]. Inicialmente, 48,7 mL de ácido nítrico (HNO₃ - Anidrol - 70,0%) foram adicionados a 22,7 mL de tetraetil ortossilicato (Si(OC₂H₅)₄, TEOS – Sigma Aldrich – 99,0%) e agitados (300 rpm) por 60 min em temperatura ambiente até a completa hidrólise e policondensação (Figura 4.1). Em seguida, 4,5 mL de trietilfosfato (OP(OC₂H₅)₃, TEP - Sigma Aldrich – 99,8%) foram adicionados à solução e agitados por 45 min. Por fim,

13,31 g de nitrato de cálcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - Dinâmica - 99,7%) foram adicionados à solução e agitados por 60 min para completar as reações. O procedimento durou 165 minutos e a solução obtida (sol) foi mantida em recipientes fechados em temperatura ambiente (23 °C) por 9 dias para permitir a formação do gel. O gel resultante foi seco a 60 °C e 120 °C por 72 e 48 h, respectivamente. Após a secagem, o material poroso (xerogel) foi moído, peneirado para obtenção de partículas $\leq 177 \mu\text{m}$ (80 mesh) e armazenado em ambiente seco. A síntese foi realizada em triplicata.

4.1.2. Síntese B: [TEOS + TEP] \rightarrow [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]

TEOS e TEP foram adicionados simultaneamente a 48,7 mL de ácido nítrico nas mesmas proporções descritas na Seção 4.1.1 (Figura 4.1). Foram agitados à temperatura ambiente durante 105 min. Em seguida, 13,31 g de nitrato de cálcio tetrahidratado foram adicionados à solução e agitados por 60 min para completar as reações. Todos os processos seguintes foram semelhantes ao item 4.1.1.

4.1.3. Síntese C: [TEOS + TEP + [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]

Todos os reagentes (TEOS, TEP e nitrato de cálcio tetrahidratado) foram adicionados simultaneamente a 48,7 mL de ácido nítrico com as mesmas proporções descritas na Seção 4.1.1 (Figura 4.1). A solução foi agitada à temperatura ambiente durante 165 min. Todos os processos seguintes foram semelhantes ao item 4.1.1.

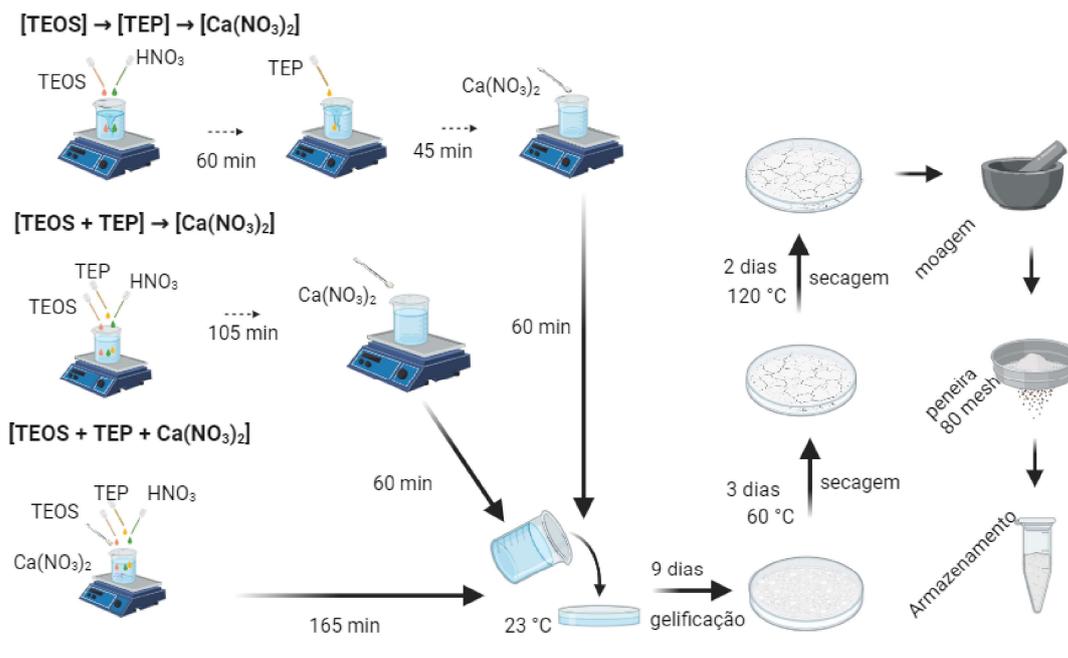


Figura 4.1 Ilustração esquemática das três sínteses para obtenção das amostras de vidro. Fonte: Próprio autor.

4.1.4. Tratamento térmico do xerogel

Os pós peneirados obtidos das sínteses A, B e C foram tratados termicamente à 120, 300, 400, 600 e 700 °C por 60 min a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em um forno sob atmosfera de ar. Após os tratamentos térmicos, as amostras foram armazenadas em dessecador para análises posteriores.

4.2. Caracterização microestrutural dos vidros

4.2.1. Composição

As composições elementares dos vidros bioativos tratados a 700 °C obtidos nas três sínteses foram determinadas por espectroscopia de fluorescência de raios X (FRX) num equipamento Shimadzu FRX-1800 (tubo Rh - 4,0 kW) em tensão de 30 kV e corrente de 60 mA. O instrumento estava equipado com detector FPC (*Proportional Frequency Counter*) e os seguintes cristais analisadores: CaO (LIF), P₂O₅ (Ge) e SiO₂ (PET). As linhas de emissão K α foram usadas para calcular a concentração dos óxidos.

4.2.2. Comportamento térmico

O comportamento térmico dos vidros bioativos (secos a 120 °C) foi estudado via análise termogravimétrica (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) utilizando equipamentos STA 449 F3 Jupiter (Netsch) e DSC 404 (Netsch), respectivamente. As análises de TG foram realizadas com aproximadamente 60 mg do pó de vidro bioativo em atmosfera de N₂ com vazão de 50 mL/min. As análises de DSC foram realizadas com aproximadamente 12 mg do pó de vidro bioativo. As amostras foram aquecidas em um cadinho de Pt a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min desde a temperatura ambiente até 1100 °C.

4.2.3. Caracterização estrutural

As microestruturas dos vidros foram analisadas por difração de raios X (DRX) após aquecimento a 120, 300, 400, 600 e 700 °C. As análises foram realizadas com difratômetro Shimadzu DRX 6000 ($\lambda_{\text{CuK}\alpha} = 1,5405 \text{ \AA}$, 40 kV, 30 mA, filtro de Ni, detector de cintilação). Os difratogramas foram obtidos na faixa 2θ de 10° a 60° com varredura contínua (2°/min). Para as amostras tratadas a 700 °C, as análises foram repetidas no modo de varredura por passo (*Step Scan*), com passo de 0.02° e tempo de aquisição de 2 s/ponto, para posterior refinamento pelo método de Rietveld.

4.2.4. Proporção relativa de pontes de oxigênio nos grupos de silicato

A espectroscopia Raman foi utilizada para acompanhar as alterações nos grupos silicato dos vidros sintetizados e calcinados a 700 °C. Os espectros foram registrados com um espectrômetro de microscópio Jobin-Yvon Raman com emissão de laser a 785 nm (40/50 mW). Os espectros foram coletados por 30 s na faixa espectral de 300 a 1300 cm⁻¹ (resolução de 3 cm⁻¹). Para análises do comportamento dos oxigênios ligantes e não

ligantes dos tetraedros de silicato (SiO_4^{4-}), a quantidade relativa de espécies Q^n foi obtida ajustando os espectros Raman. A deconvolução foi realizada na curva que representa a média das dez análises de cada amostra e os ajustes foram realizados com uma abordagem baseada em função gaussiana. As atribuições de pico assumidas para as espécies Q^n foram baseadas no trabalho de Sharma *et al.* [72].

4.2.5. Áreas de superfície e volumes de poros

As áreas superficiais dos vidros bioativos obtidos nas três sínteses e tratados a 700 °C foram determinadas pelo método Brunauer-Emmett-Teller (BET), os volumes de poros pelo método Barrett-Joyner-Halenda (BJH), a distribuição de tamanho de poros e área de superfície por raio foram determinadas pela Teoria do Funcional da Densidade (DFT). As análises de adsorção/dessorção de nitrogênio foram realizadas com equipamento Quantachrome (NOVA-1200e) a 77 K na faixa P/P_0 de 0,05 a 0,99 (30 pontos). Aproximadamente 500 mg de cada pó de vidro bioativo sintetizado passou pelo processo de degasagem a 150 °C sob vácuo durante 90 min antes das análises.

4.3. Caracterização biológica

4.3.1. Bioatividade

A bioatividade dos vidros foi estudada pelo teste de bioatividade proposto por Kokubo [73] e de acordo com a ISO 23317:2014. Aproximadamente 50 mg do pó de vidro tratado termicamente a 700 °C (e com tamanho de partícula $\leq 177 \mu\text{m}$) foram imersos em 50 mL de solução de fluido corporal simulado (SBF) a 37 °C por 0, 1, 4 e 7 dias, após esse tempo as amostras foram lavadas duas vezes com água destilada e duas vezes com álcool isopropílico, centrifugadas e secas a 60 °C por 24 h. [34, 73].

As alterações estruturais na superfície do vidro foram determinadas por difração de raios X (XRD) em um difratômetro Shimadzu XRD 6000. Os difratogramas foram obtidos na faixa 2θ de 10° a 60° com tamanhos de passo de $0,02^\circ$ e tempos de aquisição de 2 s por ponto. A fase cristalina precipitada após 7 dias foi quantificada com o método de refinamento Rietveld [20,21], implementado no software *HighScore Plus*. Os refinamentos foram conduzidos a partir de modelos estruturais previamente conhecidos obtidos do *Inorganic Crystal Structure Database* (ICSD), incluindo hidroxiapatita de cálcio $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ICSD no. 151414) e α -tridimita (ICSD no. 1109). Os picos de α -tridimita foram ampliados para modelar a contribuição da difração da fase vítrea para os dados experimentais [22,23]. O fundo, o fator de escala, o deslocamento da amostra, os parâmetros da unidade celular (a e c), o perfil do pico (parâmetros de Caglioti) e a orientação preferencial foram refinados. Esta abordagem permitiu estimar a quantidade (% em peso) de hidroxiapatita cristalina precipitada nas amostras em relação à fase vítrea.

As transformações morfológicas e composicionais que ocorreram na superfície do vidro ao longo do tempo no ensaio de bioatividade para 0 (controle), 1, 4 e 7 dias foram monitoradas por MEV a 5 kV, WD de 10 mm e aumentos de 10000x e por EDS a 15 kV, WD de 10 mm e aumentos de 100x, ambos em um microscópio eletrônico JEOL 5700. Por se tratar de um material de baixa condutividade elétrica, para as análises de MEV/EDS foi necessário depositar uma camada condutora na superfície das amostras através de um sistema de pulverização *Denton Vacuum (Desk V)*. Para o MEV foi utilizado um recobrimento de ouro (aproximadamente 30 nm de espessura), o qual permitiu obter imagens com melhor qualidade, já para o EDS, as amostras foram revestidas com carbono para evitar a sobreposição típica entre as linhas de emissão de raios X de Au e P. Os elementos de interesse avaliados foram Ca, Mg, P e Si. Os teores

(em percentual atômico) desses elementos foram obtidos para seis regiões de área aproximada de 1,3 mm² de cada amostra.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram obtidas para as amostras aos 0 e 7 dias em SBF em um equipamento JEOL (JEM-1400 plus) e a difração de elétrons foi empregada para identificar as fases nanocristalinas que apareceram nas amostras após 7 dias em SBF. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão da JEOL (JEM-1400 plus) operando em 120 kV.

4.3.2. Adsorção de proteínas

O teste de adsorção de albumina bovina seguiu a seguinte ordem experimental: I) preparo de uma solução estoque, II) preparo do complexante, III) teste de adsorção por 24 h e IV) tratamento de dados obtidos.

4.3.2.1. Solução de Albumina Sérica Bovina (BSA) de 1000 µg·mL⁻¹

A solução estoque de 1000 µg·mL⁻¹ foi preparada com 0,25 g de BSA (Sigma Aldrich - 98%) dissolvida em 250 mL de solução de NaCl 0,85%. As concentrações de 250, 500, 750 µg·mL⁻¹ foram preparadas através da diluição de alíquotas da solução estoque. Essa metodologia foi baseada no trabalho de Doumas *et al.* [74].

4.3.2.2. Preparo do reagente de Biureto (complexante)

Em um béquer de 600 mL foram dissolvidos de 1,5 g de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄·5H₂O), 4,5 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado (KNaC₄H₄O₆·4H₂O) e 2,5 g de iodeto de potássio (KI) em 250 mL de água destilada sob agitação a 500 rpm. Após a completa solubilização foram adicionados 50 mL de uma solução 0,6 mol·L⁻¹ de NaOH. A mistura foi transferida para um balão volumétrico de 500

mL e avolumada, logo em seguida foi transferida para um frasco de polietileno coberto com papel alumínio e armazenado com ausência de luz Dumas *et al.*[74].

4.3.2.3. Teste de adsorção de BSA na superfície dos vidros bioativos

Cem miligramas (100 mg) de cada vidro bioativo (tratado a 700 °C) foi adicionado a 10 mL de uma solução de BSA 1.000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e mantidos em temperatura ambiente por 24 horas, cada amostra foi pesada em triplicata. Após este tempo, 5 mL do sobrenadante foi colocado em contato com 5 mL da solução de biureto para complexação, as amostras permaneceram em repouso por 10 min antes de cada medida a 555 nm com a espectroscopia UV-Vis, cada ensaio foi medido em triplicata com um total de 9 medidas para cada vidro sintetizado. Uma curva de calibração foi construída a partir das concentrações de 0, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [74].

As quantidades de proteínas adsorvidas por grama e por área superficial foram calculadas e os valores foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$). A significância estatística destes resultados foi avaliada com ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Diferenças em $p \geq 0,05$ foram consideradas estatisticamente não significativas.

4.3.2.4. Curva de calibração

A curva de calibração foi construída com base no comprimento de onda de maior absorção para a albumina com leitura a 555 nm das soluções de BSA 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ determinadas por UV-Vis de acordo com a Equação 1.

$$C_S = \frac{(Abs-0,1697)}{0,0001} \quad r^2 = 0,998 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde,

C_s = Concentração do sobrenadante ($\mu\text{g.L}^{-1}$).

Abs. = Absorbância.

A concentração de albumina adsorvida na superfície dos vidros bioativos foi determinada de acordo com a diferença da concentração inicial de albumina em solução (C_i) pela quantidade de albumina presente no sobrenadante (C_s) e relacionada com o volume de solução utilizado e a massa dos vidros bioativos de acordo com a Equação 2.

$$Q_{ad} = \frac{(C_i - C_s)}{m_{BV}} \cdot V \quad \text{Eq. 2}$$

Onde,

Q_{ad} = Quantidade adsorvida ($\mu\text{g.g}^{-1}$).

C_i = Concentração inicial ($\mu\text{g.L}^{-1}$).

C_s = Concentração do sobrenadante ($\mu\text{g.L}^{-1}$).

V = Volume (L).

m_{BV} = massa de biovidro (g).

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados são expressos na Figura 5.18 juntamente com os parâmetros estatísticos. Para melhor compreensão da quantidade de BSA adsorvida por área de superfície ($Q_{\text{área}}$), foram calculadas as razões Q_{ad}/A de acordo com a equação 3.

$$Q_{\text{área}} = \frac{Q_{ad}}{A} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde,

$Q_{\text{área}}$ = Quantidade adsorvida por área ($\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$).

Q_{ad} = Quantidade de albumina adsorvida ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

A = área calculada pelo método BET ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Adição simultânea de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ com TEOS e TEP e o efeito na microestrutura do vidro

As composições dos vidros obtidos nas três diferentes sínteses foram avaliadas por FRX utilizando-se as amostras tratadas a 700 °C. Os resultados confirmaram a presença de SiO_2 , P_2O_5 e CaO (Tabela 5.1). Suas concentrações (% molar) foram ligeiramente diferentes dos valores teóricos. Porém, não foi observada correlação direta entre as composições finais dos vidros e o momento em que o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ foi adicionado nas sínteses, indicando que a ordem de adição do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ não produziu efeito significativo direto sobre a composição *bulk* das amostras.

Tabela 5.1 Composições dos vidros bioativos determinadas por espectroscopia de fluorescência de raios X (FRX). Os valores nominais (calculados) para cada óxido estão expressos em negrito.

Amostras	Composição (% molar)		
	SiO_2	P_2O_5	CaO
	60	4	36
[TEOS] → [TEP] → [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]	57,05	3,05	39,90
[TEOS + TEP] → [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]	55,62	2,78	41,60
[TEOS + TEP + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]	57,56	2,97	39,47

As curvas TG/DTG obtidas para as amostras secas a 120 °C mostraram duas zonas distintas de perda de massa (I e II) (Figura 5.1a e 5.1b), em que a zona I) de 70 °C a 180 °C é composta pela sobreposição parcial de dois eventos que podem ser atribuídas a perda de água fisicamente adsorvida e a evaporação do etanol proveniente da hidrólise de TEOS e TEP [75, 76] e a zona II) de 180 °C a 380 °C refere-se a perda de água quimicamente adsorvida [7, 77] e decomposição de nitrato [77].

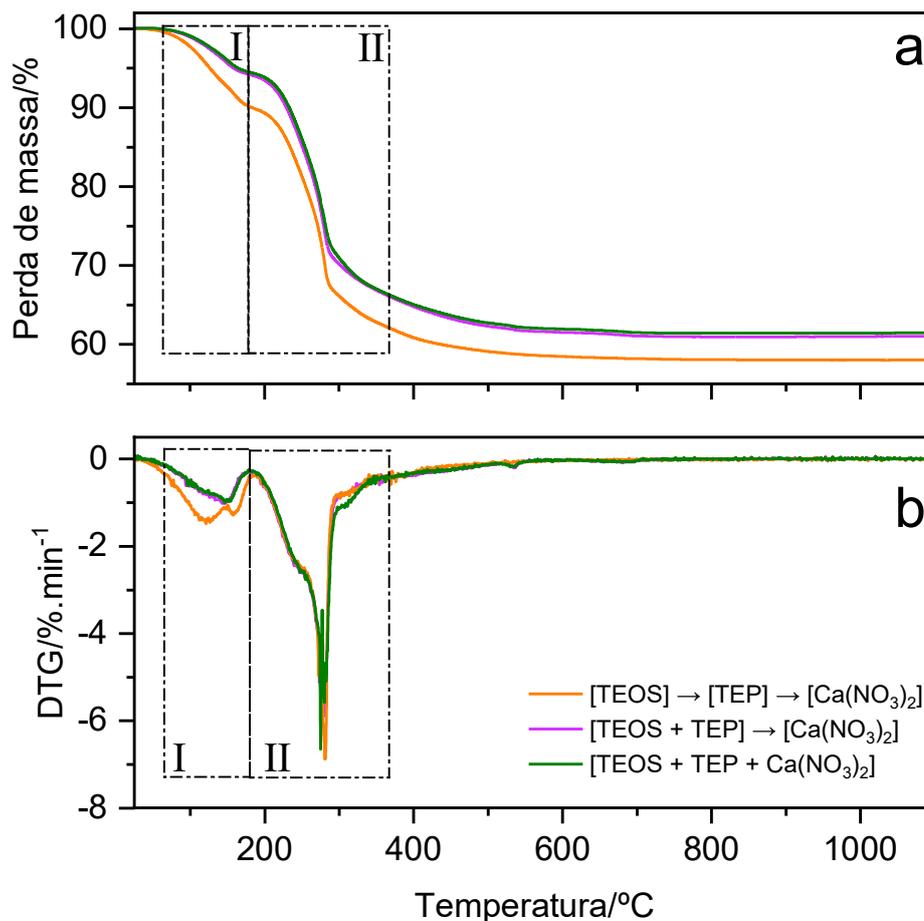


Figura 5.1 Curvas de TG e DTG para as amostras de vidro tratadas a 120 °C.

A amostra obtida da síntese A ([TEOS] → [TEP] → [Ca(NO₃)₂]) perdeu mais massa do que as demais amostras, particularmente na zona I com perda de 9,32%, enquanto que as sínteses B e C perderam 5,64 e 5,40 % respectivamente (Tabela 5.2). Uma vez que todas as amostras foram secas e submetidas ao mesmo tratamento térmico, esse resultado sugere que essa amostra se encontrava mais hidratada que as demais.

Tabela 5.2 Perdas de massa das amostras de vidros bioativos tratadas a 120 °C.

Amostras	I/70-180 °C	II/180-380 °C	Acima de 540 °C
[TEOS] → [TEP] → [Ca(NO ₃) ₂]	9,32	28,53	0,74
[TEOS + TEP] → [Ca(NO ₃) ₂]	5,64	28,62	0,79
[TEOS + TEP + Ca(NO ₃) ₂]	5,40	28,73	0,74

*Valores em % correspondentes as perdas de massa de cada zona.

Acima de 540 °C, a perda de massa tornou-se insignificante (valores menores que 0,8 %), indicando a completa eliminação dos subprodutos da reação (água, etanol e nitratos) e formação da estrutura final do xerogel [7, 77].

As curvas de DSC (Figura 5.2) confirmam que a zona de perda de massa I é constituída de eventos endotérmicos (evaporação de água e etanol), enquanto na zona II são observados eventos exotérmicos (decomposição de precursores e subprodutos). Não foi possível confirmar as temperaturas de transição vítrea T_g das amostras pelas curvas de DSC obtidas (Figura 5.2). No entanto, as temperaturas de cristalização T_c foram de 857°C para as amostras obtidas das sínteses A ([TEOS] → [TEP] → [Ca(NO₃)₂]) e B ([TEOS + TEP] → [Ca(NO₃)₂]), e de 940°C para a amostra obtida de síntese C ([TEOS + TEP + Ca(NO₃)₂]). Ou seja, a adição de Ca(NO₃)₂ simultaneamente com TEOS e TEP (Síntese C), em comparação com as demais sínteses, levou a um aumento significativo da T_c (quase 100 °C).

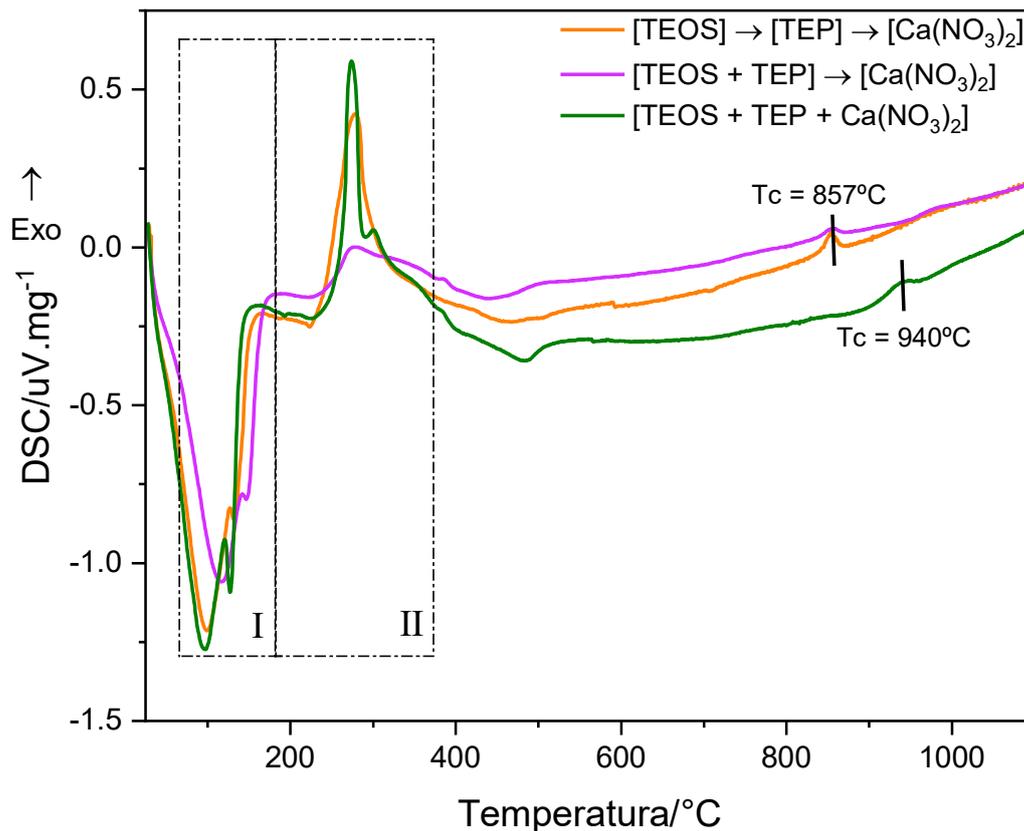


Figura 5.2 Curvas de DSC para as amostras de vidro tratadas a 120 °C.

Uma vez que a T_g não pode ser observada nos vidros, as análises de difração de raios X (DRX) permitiram verificar se as estruturas obtidas preservavam a sua estrutura não cristalina, mesmo após o tratamento térmico a 700 °C estabelecido como padrão, com base no que a literatura reporta para amostras de composição semelhantes produzidas por sol-gel [26, 78].

Os padrões de DRX obtidos das amostras secas a 120 °C apresentaram picos de difração bem definidos sobre o halo amorfo, típicos de materiais vítreos (Figura 5.3). Para as três diferentes sínteses, foram observados picos de difração correspondentes a α -cristobalita (1-082-1556 ICDD) e fosfato de silício (39-0189 ICDD). Picos de difração adicionais relacionados ao $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (7-0204 ICDD) foram observados nas amostras, exceto na síntese em que o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ foi adicionado simultaneamente aos demais precursores (Síntese C: [TEOS + TEP + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]).

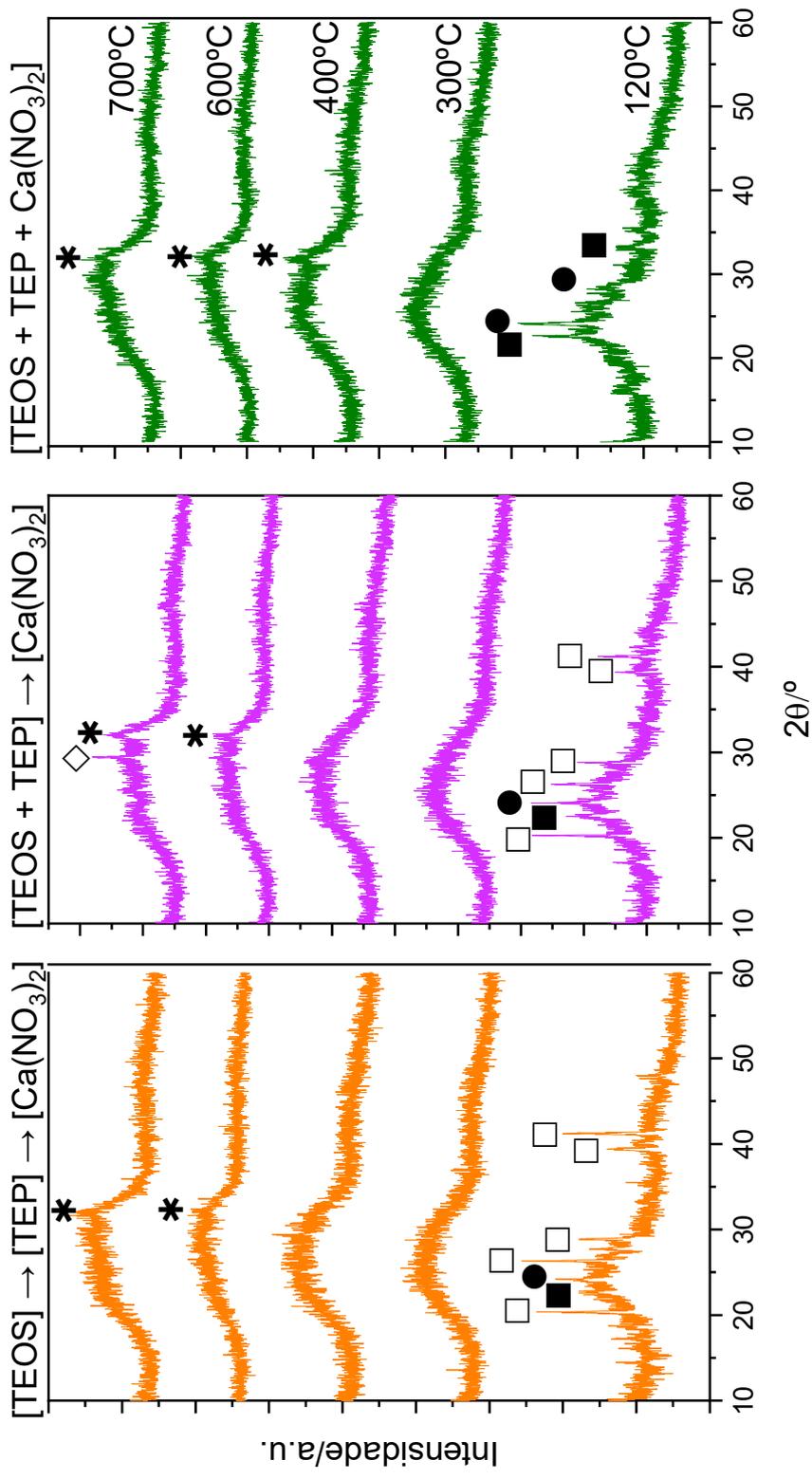


Figura 5.3 Padrões de difração de raios X das amostras de vidro tratadas a 120, 300, 400, 600 e 700°C. Fases identificadas: nitrato de cálcio (\square), α -cristobalita (\blacksquare), fosfato de silício (\bullet), calcita (\diamond) e HAp ($*$)

A adição tardia de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, ou seja, após a hidrólise de TEOS e TEP (Síntese A e B), parece ter impedido a difusão do cálcio na rede vítrea. Uma vez que todos os nitratos são solúveis em meio aquoso, uma forma de se explicar a presença de nitrato de cálcio nas amostras após secagem é que os íons Ca^{2+} e NO_3^- tenham sido impedidos de se distribuir homogênea e, conseqüentemente, mantiveram-se confinados em espaços específicos da microestrutura do vidro. O mais provável é que os íons Ca^{2+} e NO_3^- tenham se acumulado nas bordas das nanopartículas de silicato amorfo previamente formadas pela hidrólise do TEOS envolvidas no líquido reacional, causando a precipitação de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ após evaporação da água na secagem a 120 °C. Ou seja, um efeito de limitação de difusão na microestrutura.

Após aquecimento a 300 °C, todas as fases cristalinas observadas nas amostras desapareceram, formando-se uma única fase amorfa, independente do momento em que o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ foi adicionado. Uma vez que carbonato e nitratos começam a ser decompostos a 180 °C (zona II observada no DTA e DSC), a 300 °C é de se esperar que as fases antes observadas estejam ausentes, restando apenas os íons Ca^{2+} estabilizados pelos oxigênios na rede vítrea. A 400 °C, somente a amostra que não precipitou $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ cristalino a 120 °C apresentou um pequeno pico de difração para HAp (09-0432) ICDD [7, 11]. O alargamento do pico indica se tratar de uma fase nanocristalina de HAp. As demais amostras preservaram seus estados amorfos nesta temperatura. A partir de 600 °C, os picos de difração típicos de HAp foram observados em todas as amostras. Esses resultados sugerem que a precipitação de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ na estrutura do vidro a 120 °C evitou, de alguma forma, a formação da HAp a 400 °C .

A 700 °C, apesar de todas as amostras apresentaram picos característicos de HAp, eles foram menos intensos naquelas produzidas pela adição simultânea $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e os demais precursores (Síntese C: [TEOS + TEP + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]) (Figura 5.3). Para explorar

melhor se essa diminuição dos picos de difração representavam uma diminuição na quantidade de HAp formada na amostra, os padrões de difração foram refinados pelo método Rietveld. O refinamento permitiu estimar a quantidade de HAp em relação à fase amorfa restante. De fato, a quantidade relativa de HAp calculada demonstrou que a amostra obtida pela síntese C foi a menor entre as demais amostras. Vale ressaltar que calcita (05-0586 ICDD) também foi encontrada nessas amostras em que o TEOS e o TEP foram adicionados simultaneamente (Síntese B: $[\text{TEOS} + \text{TEP}] \rightarrow [\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$) a 700 °C (Figuras 5.3 e 5.4).

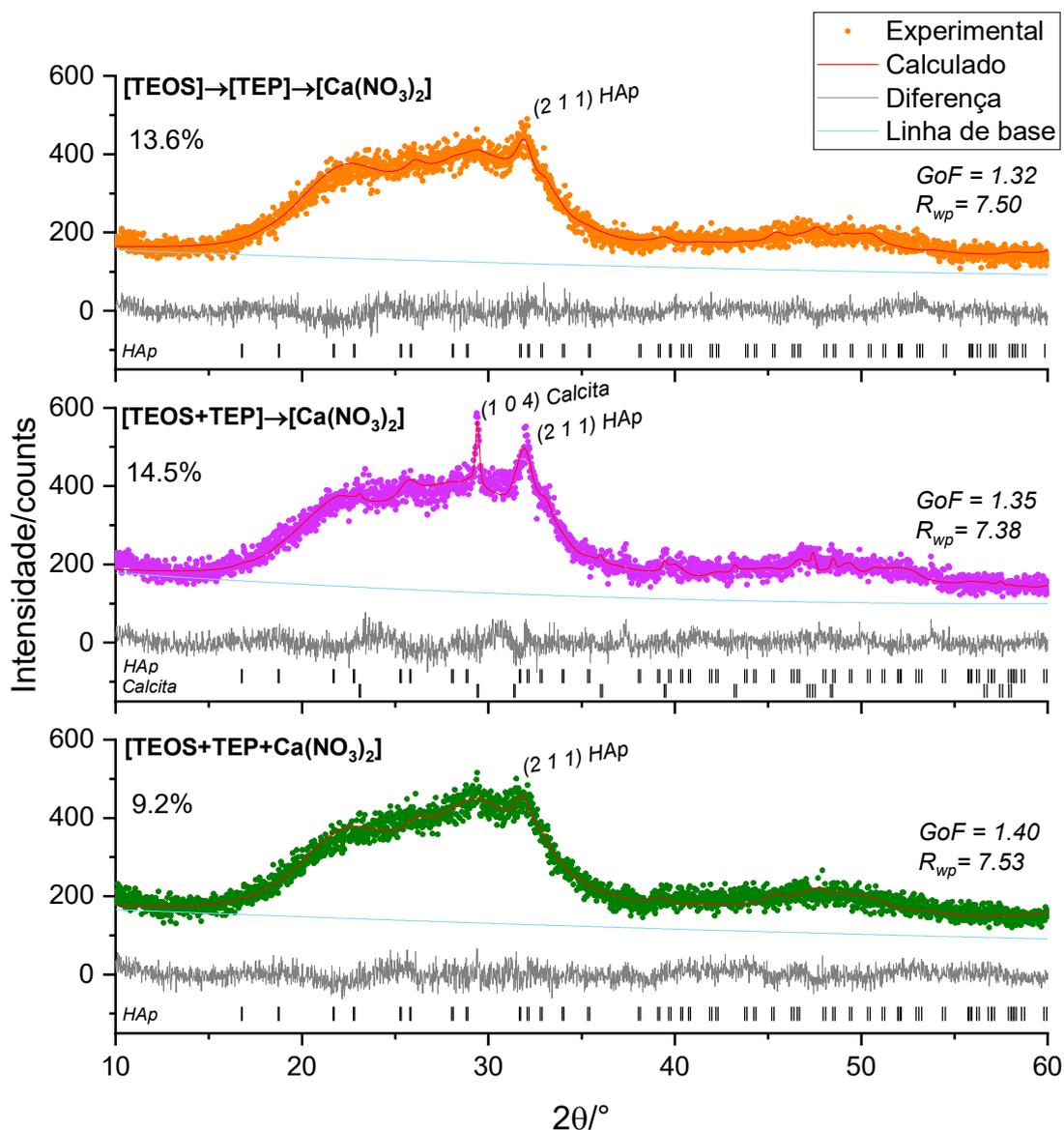
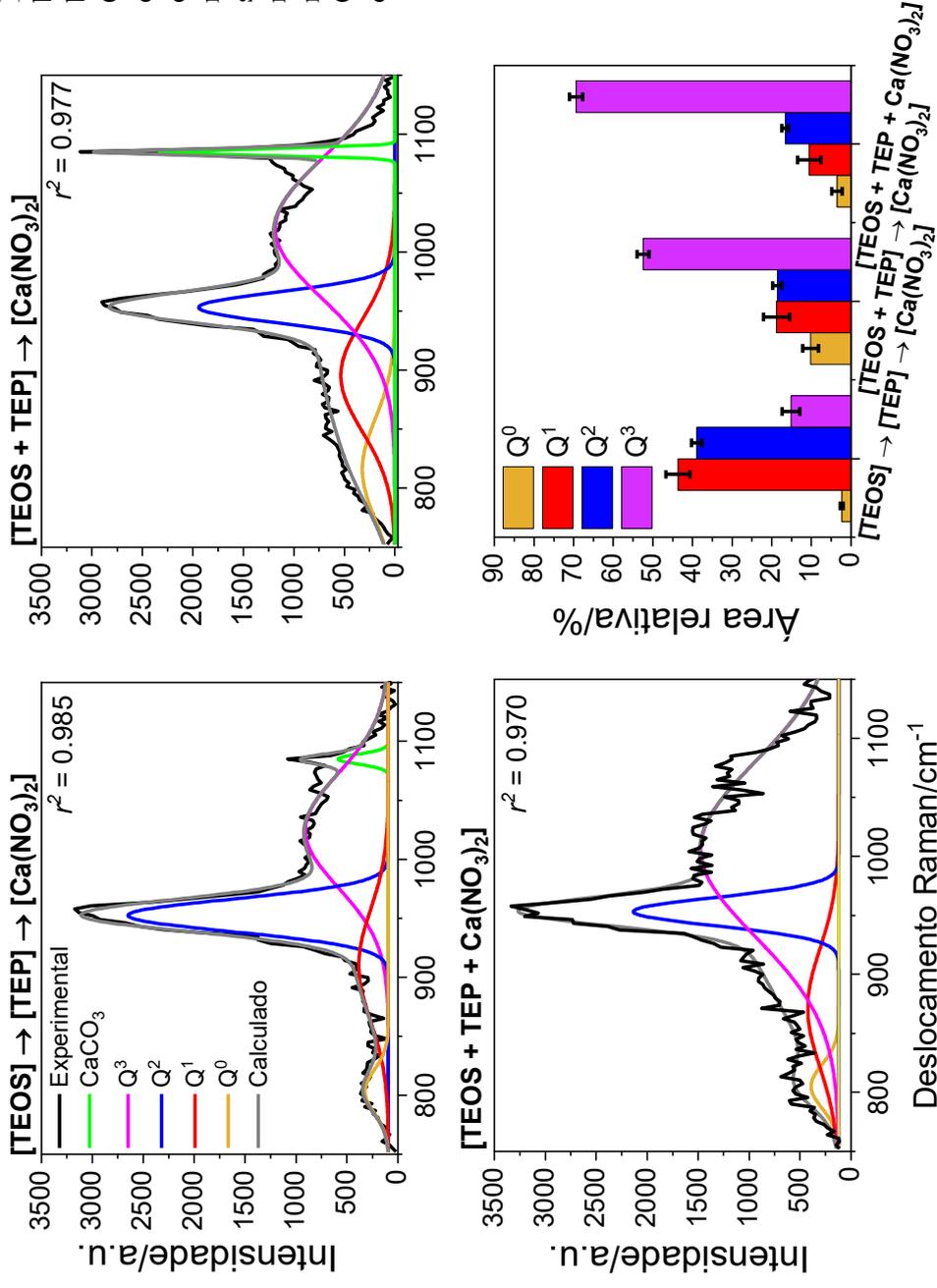


Figura 5.4 Refinamento de Rietveld dos padrões de difração de raios X obtidos a partir das amostras de vidro tratadas a 700°C . A quantidade de HAp (% em massa) em relação à fase amorfa é fornecida no gráfico, assim como os principais planos de difração da HAp (2 1 1) e da calcita (1 0 4). Dados experimentais (I_{obs}), calculados (I_{cal}), diferença ($I_{\text{obs}} - I_{\text{cal}}$) e dados do padrão são mostrados em todos os espectros de 10 a 60° , assim como o GoF e R_{wp} .

Para melhor compreender essas modificações estruturais apontadas pelas análises de DRX, as amostras foram analisadas por espectroscopia Raman (Figura 5.5).

Figura 5.5 Espectros Raman dos vidros bioativos calcinados a 700 °C na faixa das bandas vibracionais do silicato. As bandas Q^0 , Q^1 , Q^2 e Q^3 referem-se a vibrações de estiramento em unidades de silicato tetraédricas com zero, um, dois e três oxigênios ligantes, respectivamente. A banda ν_1 de estiramento simétrico do CO_3 da calcita também foi representado na curva. O gráfico de barras mostra a área relativa sob as deconvoluções Q^0 , Q^1 , Q^2 e Q^3 que são proporcionais à quantidade das unidades Q^n da estrutura do vidro.



O arranjo das unidades tetraédricas de SiO_4^{4-} (Q^n) na estrutura do vidro pode ser fortemente afetado pela presença de elementos modificadores de rede, como Na^+ e Ca^{2+} . Nas unidades Q^n , n refere-se ao número de oxigênios ligantes por tetraedro de silicato, e a quantidade relativa de cada unidade Q^n pode ser estimada com espectroscopia Raman. Bandas na faixa de $800\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídas a vibrações assimétricas do tetraedro SiO_4 [79] (Figura 5.5).

Nessa faixa, bandas específicas em $800\text{--}850$, $900\text{--}950$, $950\text{--}1000$ e $1050\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ podem ser associadas às unidades de silicato Q^0 , Q^1 , Q^2 e Q^3 , respectivamente [80, 81]. Uma banda relativa ao modo δ P-O do fosfato apareceu em 960 cm^{-1} , sobrepondo-se à da unidade Q^2 . Porém, devido às baixas concentrações de PO_4^{3-} nos vidros estudados neste trabalho (menos de 4 % molar), podemos considerar o modo ν Si-O a 950 cm^{-1} predominante.

Após ajuste dos espectros Raman, observou-se que a amostra na qual $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ foi adicionado durante a hidrólise de TEOS e TEP (Síntese C: $[\text{TEOS} + \text{TEP} + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$) continha mais estruturas Q^3 (69,4%). Por outro lado, quando foi adicionado após a hidrólise do TEOS e TEP, a quantidade relativa de unidades Q^3 diminuiu (síntese A: 15,11 % e síntese B: 52,46 %). Novamente, este resultado sugeriu que a inserção de íons Ca^{2+} após o início da formação da cadeia de silicato prejudicou a difusão do Ca^{2+} e concentrou-o em regiões específicas nas bordas das cadeias emaranhadas. Isto pode explicar a precipitação de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ após a secagem, conforme discutido anteriormente com os resultados de DRX (Figura 5.3), bem como a diminuição da proporção de unidades Q^3 e a menor temperatura de cristalização T_c desta amostra.

Além disso, uma forte vibração de estiramento de CO_3 simétrico ν_1 da calcita foi observada no espectro Raman para a Síntese B ($[\text{TEOS} + \text{TEP}] \rightarrow [\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$),

confirmando os resultados de DRX (Figura 5.3 Figura 5.5). A mesma vibração de estiramento simétrico de CO_3 ν_1 foi observada quando o TEOS foi hidrolisado antes do TEP (Síntese A: $[\text{TEOS}] \rightarrow [\text{TEP}] \rightarrow [\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$). Provavelmente, o DRX não teve sensibilidade suficiente para confirmar a presença de calcita nesta amostra. No entanto, este resultado indicou que a adição tardia de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ levou, em maior ou menor grau, à formação de calcita nas estruturas de vidro após calcinação a $700\text{ }^\circ\text{C}$. Assim, de acordo com os dados obtidos pelo Raman, a adição simultânea do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ provocou modificações nas estruturas Q^n do silicato, com a formação de um material mais polimerizado e, conseqüentemente, menos reativo.

Para avaliar como a área de superfície e a natureza dos poros foram modificadas pela adição do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, ensaios de adsorção/dessorção de N_2 foram realizados em triplicata para as amostras tratadas a $700\text{ }^\circ\text{C}$. As isotermas obtidas para as amostras apresentaram histerese e formato convexo em relação à razão P/P_0 (Figura 5.6).

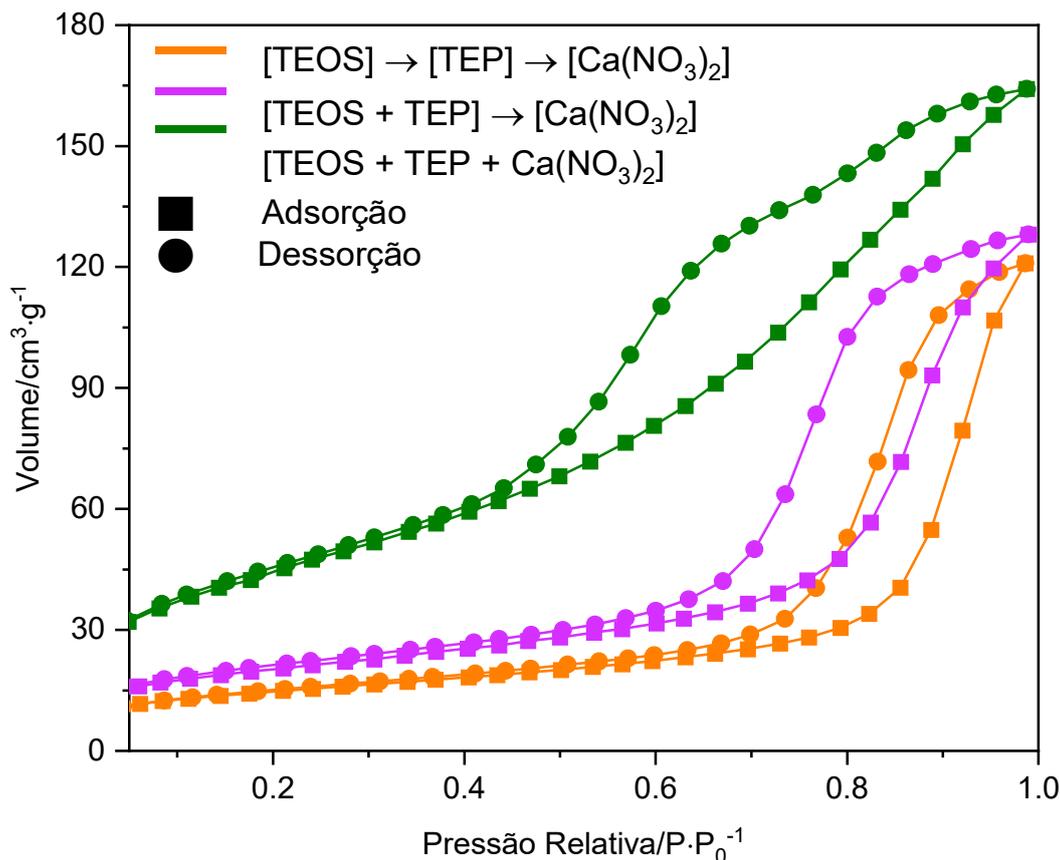


Figura 5.6 Curvas isotérmicas de adsorção/dessorção de nitrogênio obtidas para as três sínteses.

Esses perfis de curva são típicos de materiais mesoporosos com fracas interações adsorvente/adsorbato. O *loop* de histerese foi mais estreito para a amostra à qual foi adicionado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ após a hidrólise de TEOS e TEP (Síntese A: $[\text{TEOS}] \rightarrow [\text{TEP}] \rightarrow [\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$), indicando a formação de poros mais ordenados e cilíndricos ou empacotamento de esferas com tamanhos regulares [82]. Por outro lado, um amplo *loop* de histerese foi observado para a amostra à qual o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ foi adicionado juntamente com o TEOS e o TEP (Síntese C: $[\text{TEOS} + \text{TEP} + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$), sugerindo a formação de poros menores e irregulares. [82].

A área de superfície média e tamanho médio de poros foi determinado pelo método BET e os volumes dos poros calculados através do método BJH (Tabela 5.3). Ficou evidenciado que a adição simultânea do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, TEOS e TEP (Síntese C: $[\text{TEOS} + \text{TEP} + \text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$) levou a formação de uma microestrutura de poros mais estreitos de

aproximadamente 2 nm, contribuindo para a maior área de superfície observada entre todas as amostras.

Tabela 5.3 Valores de área de superfície (BET) e porosidade (BJH) obtidos a partir de análises de adsorção de nitrogênio.

Amostras	Área de superfície/m ² .g ⁻¹	Raio de poros/Å	Volume de poros/cm ³ .g ⁻¹
[TEOS] → [TEP] → [Ca(NO ₃) ₂]	27,0 ± 1,4	83,4 ± 0,5	0,179 ± 0,001
[TEOS + TEP] → [Ca(NO ₃) ₂]	32,1 ± 1,7	66,8 ± 0,2	0,187 ± 0,001
[TEOS + TEP + Ca(NO ₃) ₂]	47,6 ± 2,1	23,1 ± 2,7	0,225 ± 0,001

Os volumes dos poros calculados indicam que a síntese C apresenta maior volume de poros e um raio menor em relação as outras sínteses, o que sugere a formação de poros menores e em maior quantidade, dessa forma, a área de superfície também foi maior. Os histogramas de área de superfície e distribuição de volume de poros foram ajustados pelo método DFT (Figura 5.7). As amostras provenientes das sínteses A e B possuem distribuição de poros acima de 2 nm, enquanto aquelas provenientes da síntese C exibem uma quantidade significativa de poros menores que 2 nm. Isso indica que a adição simultânea do Ca(NO₃)₂ a TEOS e TEP é capaz de gerar um efeito significativo na microestrutura do vidro, particularmente diminuindo a mesoporosidade no limite do que é já considerado microporosidade [82, 83].

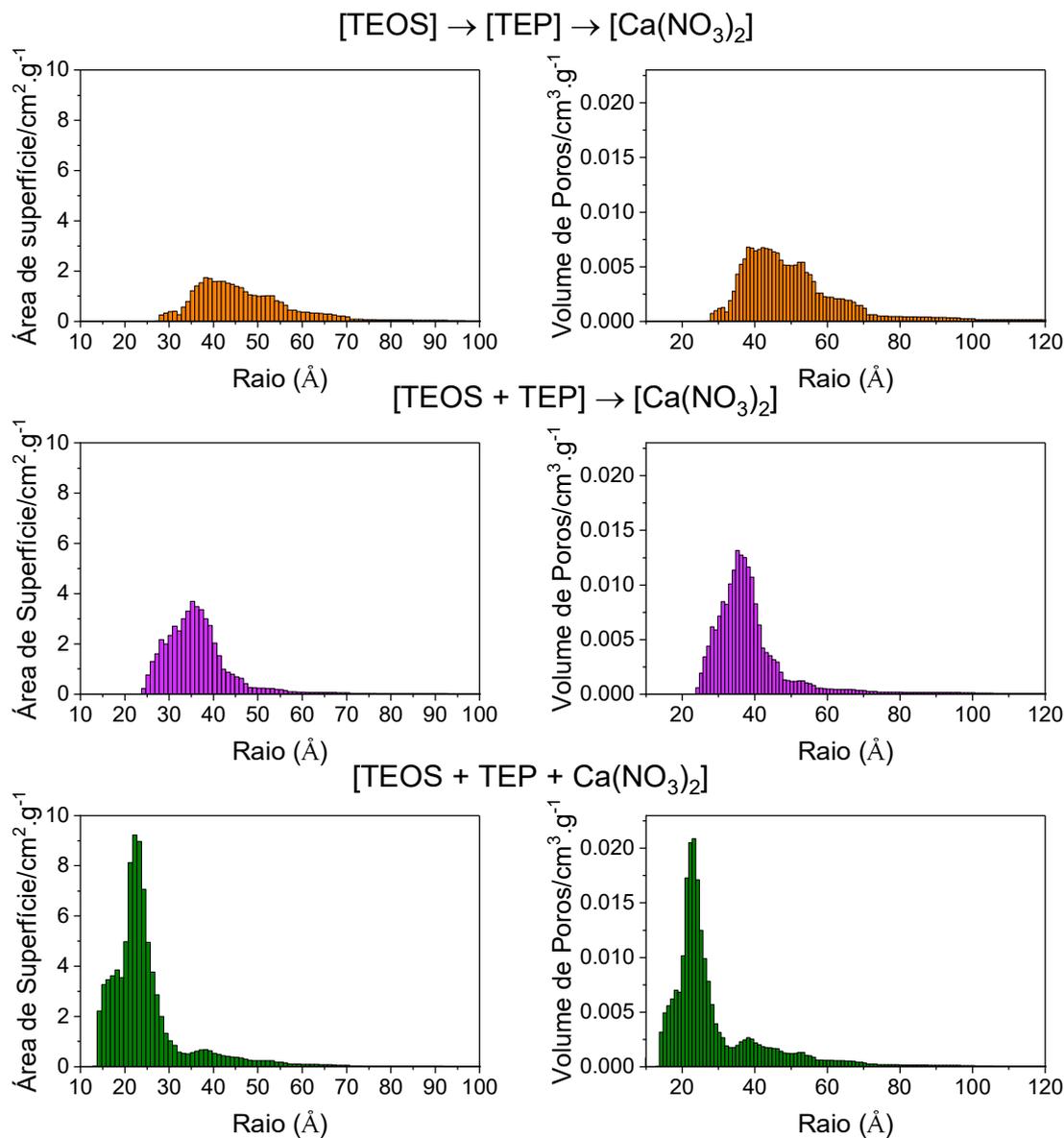


Figura 5.7 Gráficos de distribuição de tamanho de poros e área de superfície por raio de poros das amostras de vidro bioativo tratadas a 700 °C.

Estes resultados reforçaram aqueles obtidos da espectroscopia Raman. As amostras que apresentaram mesoporos regulares e maiores (Tabela 5.3) também foram as que apresentaram maiores quantidades de unidades de silicato Q¹ e Q² (Figura 5.5). Conforme discutido anteriormente, essas unidades foram produzidas quando íons Ca²⁺ se acumularam em regiões específicas da estrutura do vidro, diminuindo a polimerização em rede e, conseqüentemente, gerando canais e mesoporos maiores. É importante notar

também a formação de calcita nessas amostras com maiores quantidades de unidades de silicato Q¹ e Q², e mesoporos maiores.

Assim, é possível supor que a adição de Ca(NO₃)₂ simultaneamente com TEOS e TEP facilitou a difusão de Ca²⁺ dentro da rede de silicatos. Da mesma forma, pode-se supor que parte do TEP molecular ficou localizada entre a rede de silicatos, por apresentar uma baixa hidrólise, conforme já descrito por Bueno *et al.* [6] e Todan *et al.* [84]. Sabe-se que concentrar íons Ca²⁺ em uma região específica de um vidro de silicato tende a diminuir a proporção de unidades Q³ e favorecer as unidades Q², Q¹ e Q⁰, a depender da concentração de Ca²⁺[85]. Isso ocorre porque os íons Ca²⁺ tendem a romper as cadeias covalentes de silicato. Portanto, a maior quantidade de unidades Q³ observada na amostra em que o Ca(NO₃)₂ foi adicionado simultaneamente com TEOS e TEP (Figura 5.5, síntese C) indica que os íons Ca²⁺ não se concentraram em regiões específicas e foram melhor distribuídos entre as cadeias de silicato. De fato, após secagem a 120 °C, nenhum Ca(NO₃)₂ foi observado por DRX nesta amostra (Figura 5.3). Esta é uma indicação importante de que os íons Ca²⁺ e NO₃⁻ foram, de fato, distribuídos de forma mais homogênea na rede de silicato via síntese C ([TEOS + TEP + Ca(NO₃)₂]).

O ponto de ebulição do TEP é de aproximadamente 215 °C [84]. Sabe-se que imediatamente acima desta temperatura, parte do TEP molecular tende a evaporar, enquanto a outra parte sofre decomposição térmica, conforme já mencionado [6]. A decomposição térmica do TEP molecular gera subprodutos contendo P (preferencialmente ortofosfatos, PO₄³⁻), que acabam reagindo com cátions do vidro (Ca²⁺). Isso aconteceu a 400 °C para a amostra obtida de síntese C ([TEOS + TEP + Ca(NO₃)₂]) (Figura 5.3), a qual apresentou formação de HAp nessa temperatura. De fato, nessa temperatura espera-se uma maior difusão dos elementos presentes no vidro, criando condições para a nucleação e crescimento de nanocristais de HAp. Uma vez formados,

esses nanocristais persistiram até 700 °C (Figura 5.3). Conforme mostrado por DRX (Figuras 5.3 e 5.4), uma quantidade menor de nanocristais de HAp se formou a 700 °C na síntese C [TEOS + TEP + Ca(NO₃)₂]. Isso é totalmente consistente com o fato de que a síntese C permitiu que o Ca²⁺ fosse melhor distribuído na rede vítrea, prejudicando a precipitação de Ca(NO₃)₂ a 120 °C, reduzindo o tamanho dos mesoporos e, conseqüentemente, diminuindo a formação de HAp a 700 °C.

Esses resultados possibilitaram se propor uma ilustração explicativa para a microestrutura do vidro no momento da síntese e após tratamento térmico a 700 °C (Figura 5.8). Para a síntese A, a adição de Ca(NO₃)₂ e TEP após a hidrólise do TEOS deixou Ca²⁺, NO₃⁻ e TEP confinados em regiões específicas próximas aos clusters de silicato (gerando mesoporos). A 700 °C, ou seja, após a decomposição de NO₃⁻ e TEP e evaporação da água, essas regiões ricas em Ca²⁺/PO₄³⁻ produziram muitas nanopartículas de HAp. Para a síntese B (e de forma similar ao que foi descrito para a síntese A), Ca²⁺, NO₃⁻ e TEP também foram confinados em regiões específicas próximas às cadeias de silicato. A única diferença foi que parte do TEP ficou inserida nas cadeias de silicato, já que TEOS e TEP foram adicionados juntos na reação. Como parte do TEP não foi confinada perto dos íons Ca²⁺, o excesso de Ca²⁺ não teve PO₄³⁻ suficiente para reagir, produzindo CaCO₃ pela presença de CO₃²⁻ produzidos pela decomposição térmica dos subprodutos de vidro a 700 °C. Para a síntese C, a adição de Ca(NO₃)₂, TEP e TEOS simultaneamente levou a uma melhor distribuição de Ca²⁺, NO₃⁻ e TEP entre as cadeias de silicatos, e produziu mesoporos menores, evitando a precipitação de Ca(NO₃)₂ a 120°C. Nesse caso, menos nanopartículas de HAp foram produzidas, assim como não se proporcional a formação de CaCO₃.

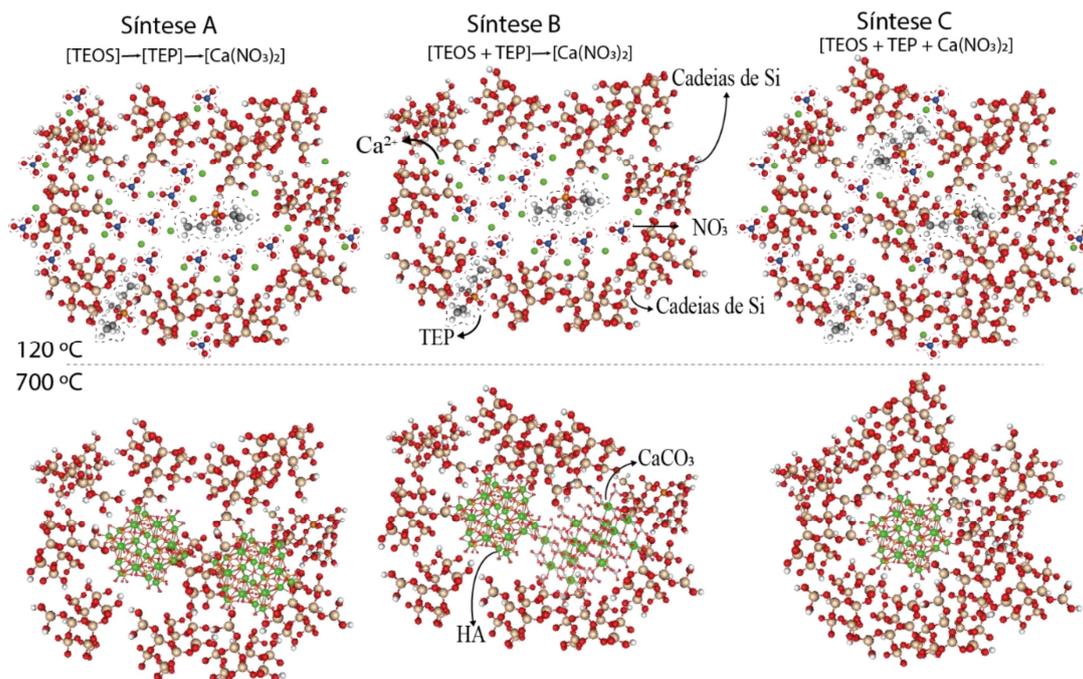


Figura 5.8 Microestrutura dos vidros bioativos sintetizados com tratamentos térmicos a 120 e 700 °C.

A Figura 5.8 representa as microestruturas dos vidros bioativos com tratamento térmico a 120 °C e 700 °C evidenciando que a adição de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ após a hidrólise de TEOS e TEP nas sínteses A e B causaram uma distribuição mais heterogênea do cálcio, já que parte do TEP já havia sido hidrolisado, essa heterogeneidade ocorreu principalmente na síntese B, já que houve uma competição entre TEOS e TEP durante a hidrólise que levou a precipitação de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ após secagem a 120 °C. Esse nitrato residual é decomposto após tratamento térmico e o excesso de Ca^{2+} presente nessas regiões reagem com TEP residual e CO_2 do ambiente, formando nano-HAP e CaCO_3 .

5.2. Efeitos da adição simultânea de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e alcóxidos na bioatividade e adsorção de proteínas

Independentemente do momento em que o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ foi adicionado na síntese, todos os vidros formaram HAP em sua superfície já no primeiro dia de imersão em SBF

(Figura 5.9). De um modo geral, as amostras apresentaram uma evolução gradual no teor de HAp de acordo com o aumento do tempo de imersão em SBF, uma vez que os picos de difração relativos aos planos (2 1 1) e (0 0 2) da HAp tornam-se mais intensos ao longo do tempo para todas as amostras. Através do refinamento Rietveld foi possível determinar o teor cristalino correspondente a fase de HAp de cada amostra (Figura 5.10), conforme já descrito.

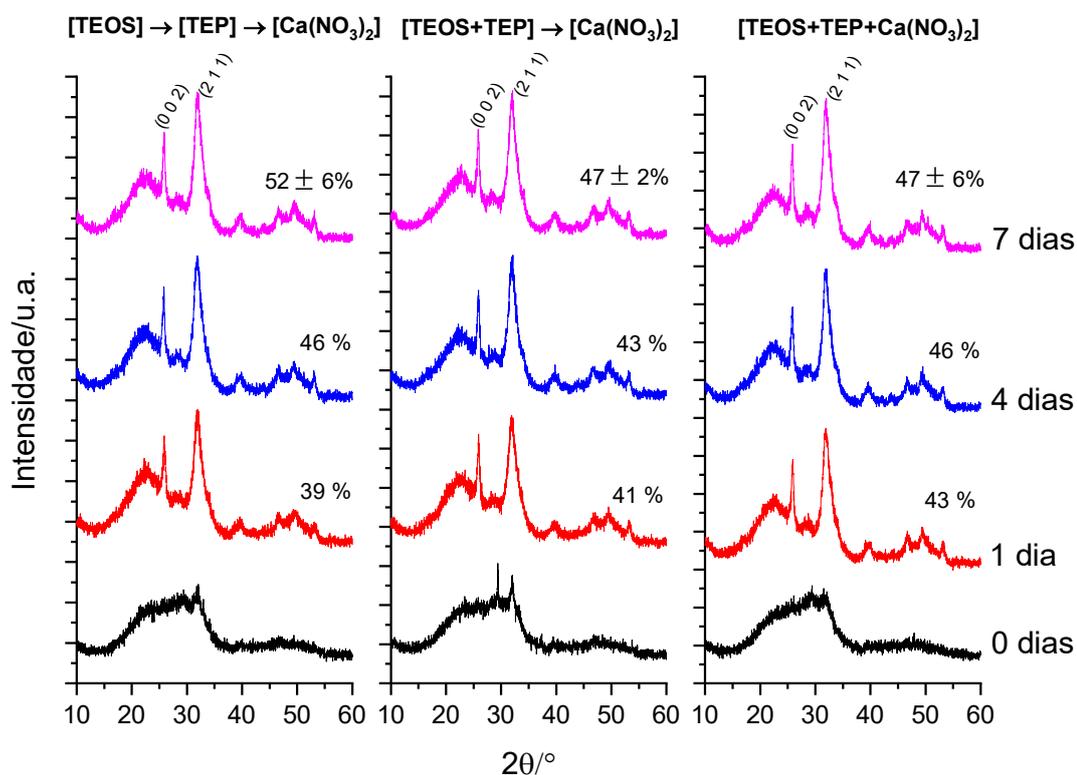


Figura 5.9 Padrões de difração de raios X das amostras de vidro bioativo tratadas a 700 °C em contato com SBF por 0, 1, 4 e 7 dias.

Após 7 dias, a quantidade relativa de HAp calculada por Rietveld foi de aproximadamente 50% (molar), sem diferenças significativas entre as sínteses. Portanto, pode-se concluir que as diferenças microestruturais produzidas nas três sínteses não foram capazes de promover qualquer alteração na quantidade de HAp precipitada nas amostras após 7 dias em SBF.

A adição simultânea de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a TEOS e TEP (síntese C) provocou um aumento na mineralização de HAp na superfície do vidro em 1 dia (43 %) em contrapartida as síntese A (39 %) e B (41 %). Em 4 dias, a amostra da síntese B, que apresenta calcita em sua composição final parece ter um retardo na formação de HAp (43 %), enquanto que A e C apresentam 46 % de HAp. No entanto, em 7 dias, todas as amostras apresentam teores similares confirmados por Refinamento Rietveld (Figura 5.10).

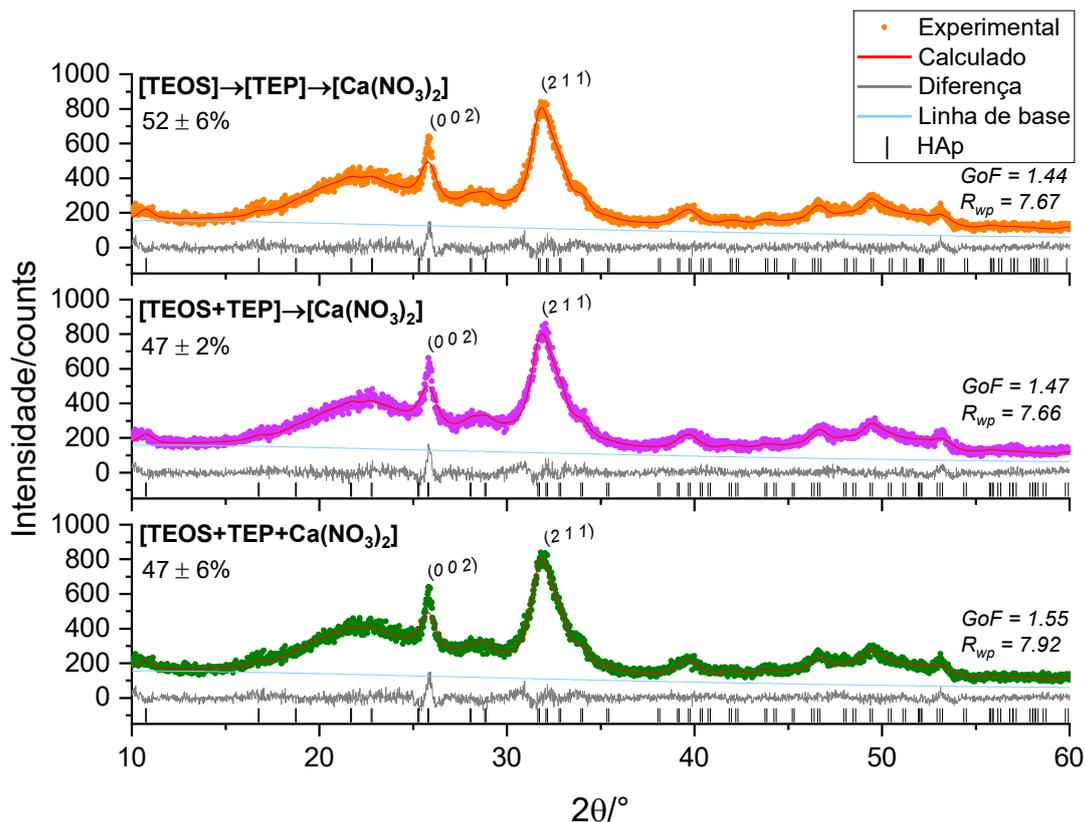


Figura 5.10 Refinamento Rietveld do padrão de difração de raios X obtido das amostras de vidro tratadas a 700°C e após imersão em SBF por 7 dias. A quantidade de HAp (% em massa) relativa à fase amorfa é informada no gráfico. Dados experimentais (Y_{obs}), calculados (Y_{cal}), diferença ($Y_{\text{obs}} - Y_{\text{cal}}$), fundo e padrão são mostrados em todos os gráficos de 10 a 60°, assim como o GoF.

Independentemente do momento em que o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ foi adicionado às sínteses, todos os vidros formaram precipitados do tipo couve-flor, característicos do recobrimento de HAp nas superfícies de materiais bioativos após imersão em SBF, como evidenciado pelas imagens de MEV (Figura 5.11, 5.12 e 5.13).

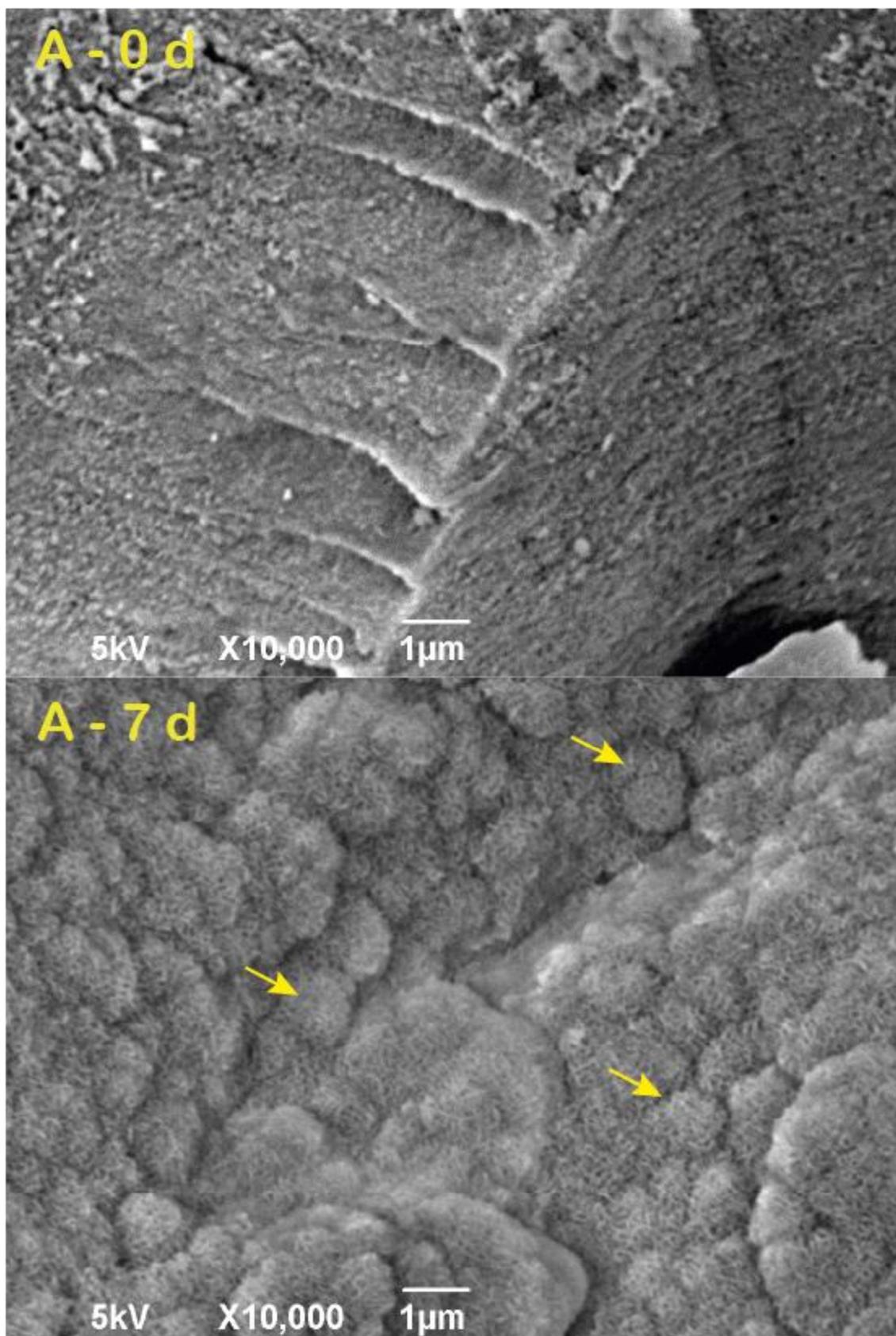


Figura 5.11 Imagens de MEV obtidas da superfície do vidro bioativo produzido via síntese A ([TEOS] → [TEP] → [Ca(NO₃)₂]) antes (controle) e após imersão por 7 dias em SBF. As setas apontam os precipitados na forma de couve-flor recobrimento a superfície do vidro.

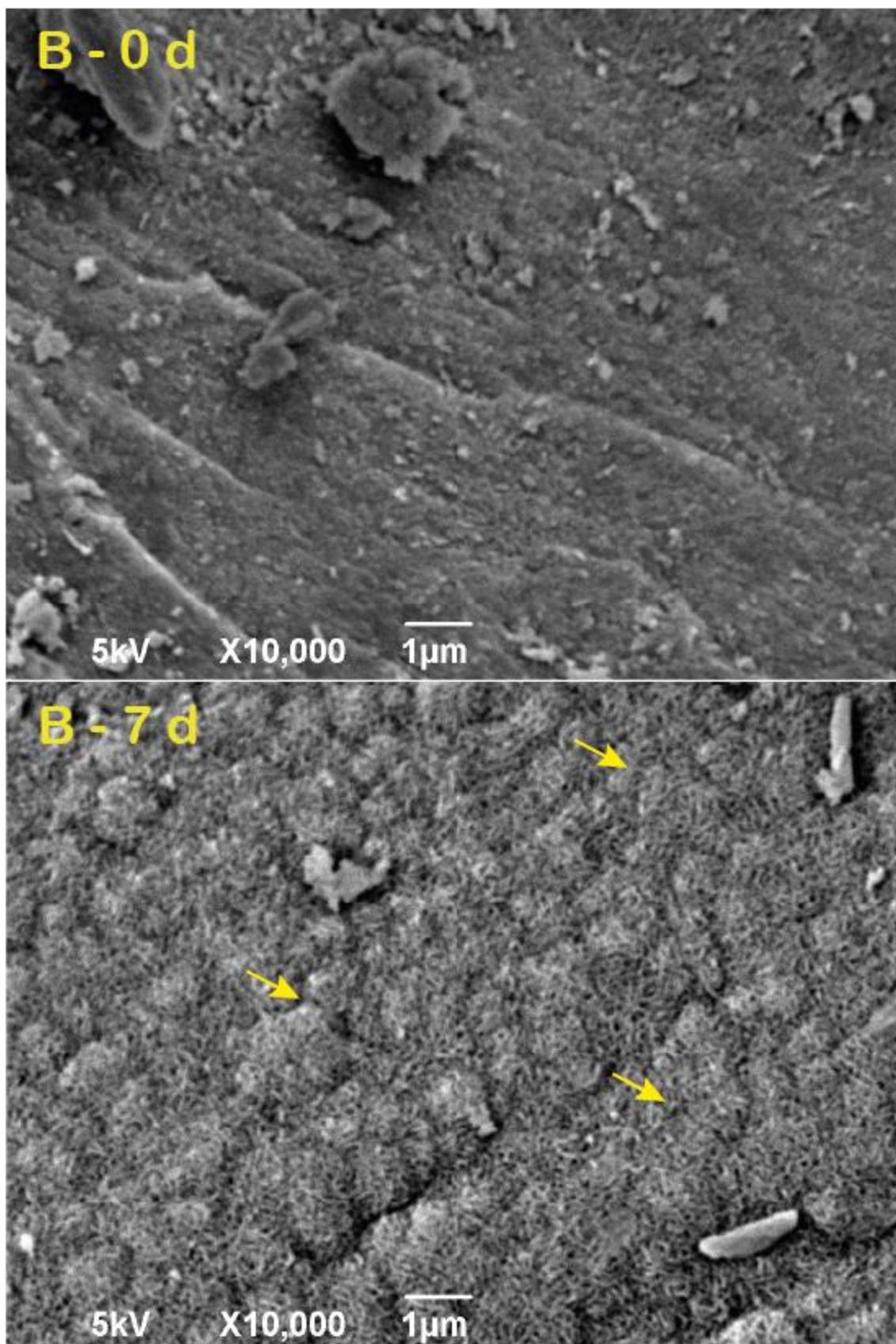


Figura 5.12 Imagens de MEV obtidas da superfície do vidro bioativo produzido via síntese B ([TEOS + TEP] → [Ca(NO₃)₂]) antes (controle) e após imersão por 7 dias em SBF. As setas apontam os precipitados na forma de couve-flor recobrimento a superfície do vidro.

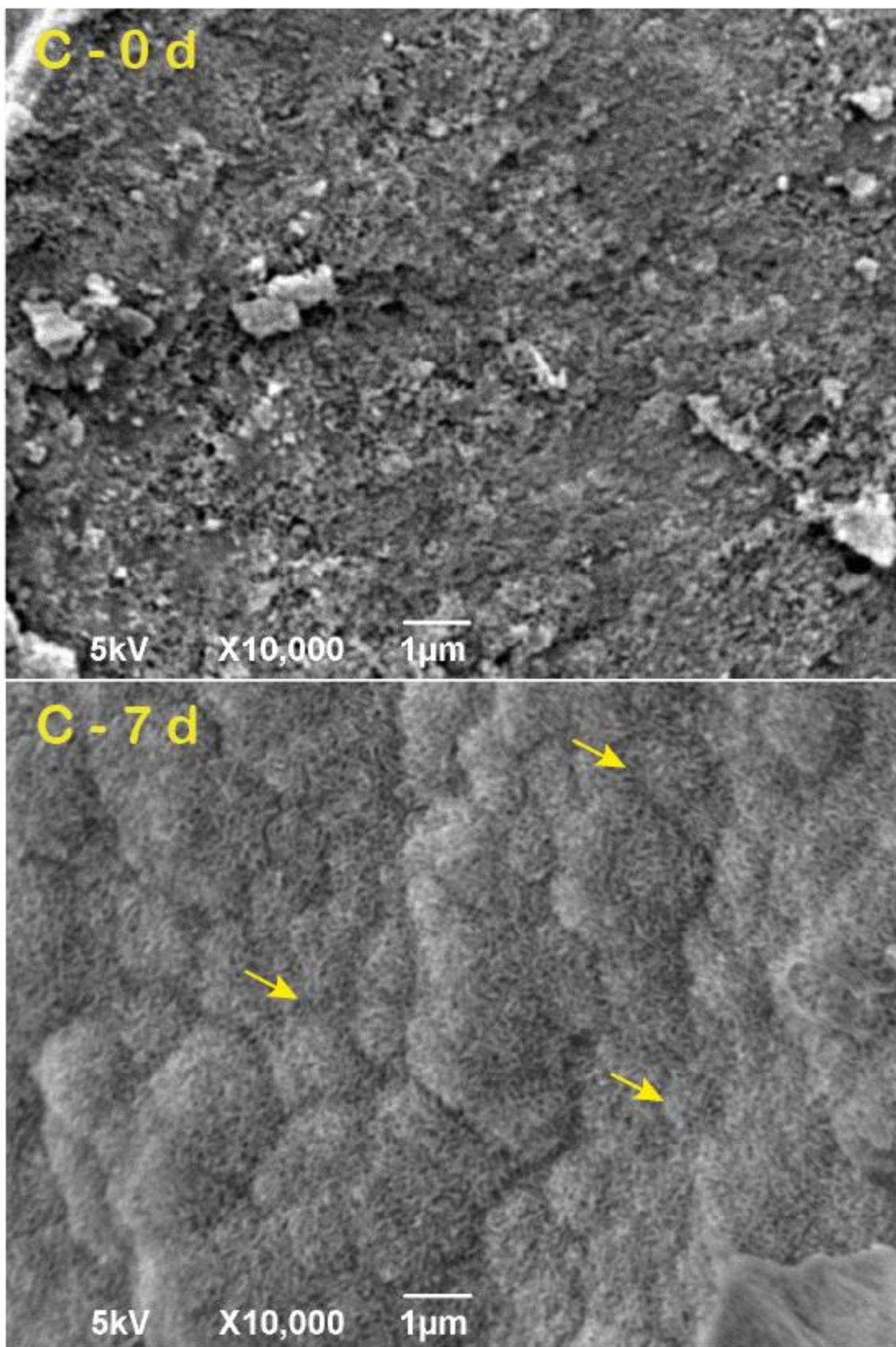


Figura 5.13 Imagens de MEV obtidas da superfície do vidro bioativo produzido via síntese C ([TEOS + TEP + Ca(NO₃)₂]) antes (controle) e após imersão por 7 dias em SBF. As setas apontam os precipitados na forma de couve-flor recobrimento a superfície do vidro.

Para as amostras com 7 dias de imersão em SBF também foram obtidas imagens de MET (Figura 5.14). As imagens mostraram que esses precipitados eram formados por vários cristais em forma de agulha crescendo da superfície do vidro, e atingindo até 200 nm de comprimento.

As imagens apresentam zonas mais escuras que mostram aglomerados em forma de agulha crescendo na superfície do biovidro. A difração de elétrons foi realizada nas bordas do desses precipitados e exibiram anéis típicos de um material policristalino. As distâncias interplanares foram calculadas através do *Digital Macrograph*. Foi observado um anel descontínuo com $d_{hkl} \sim 3,6 \text{ \AA}$ correspondente ao plano $(0\ 0\ 2)$ da HAp e contínuo em $2,9 \text{ \AA}$ referente ao plano $(2\ 1\ 1)$ da HAp, corroborando com os resultados encontrados no DRX (Figura 5.9) [86–88]. O anel descontínuo observado para o plano $(0\ 0\ 2)$ indica o forte empilhamento desses planos, ou seja, os cristais de HAp na forma de agulha apresentam textura (orientação preferencial) na direção $[0\ 0\ 1]$.

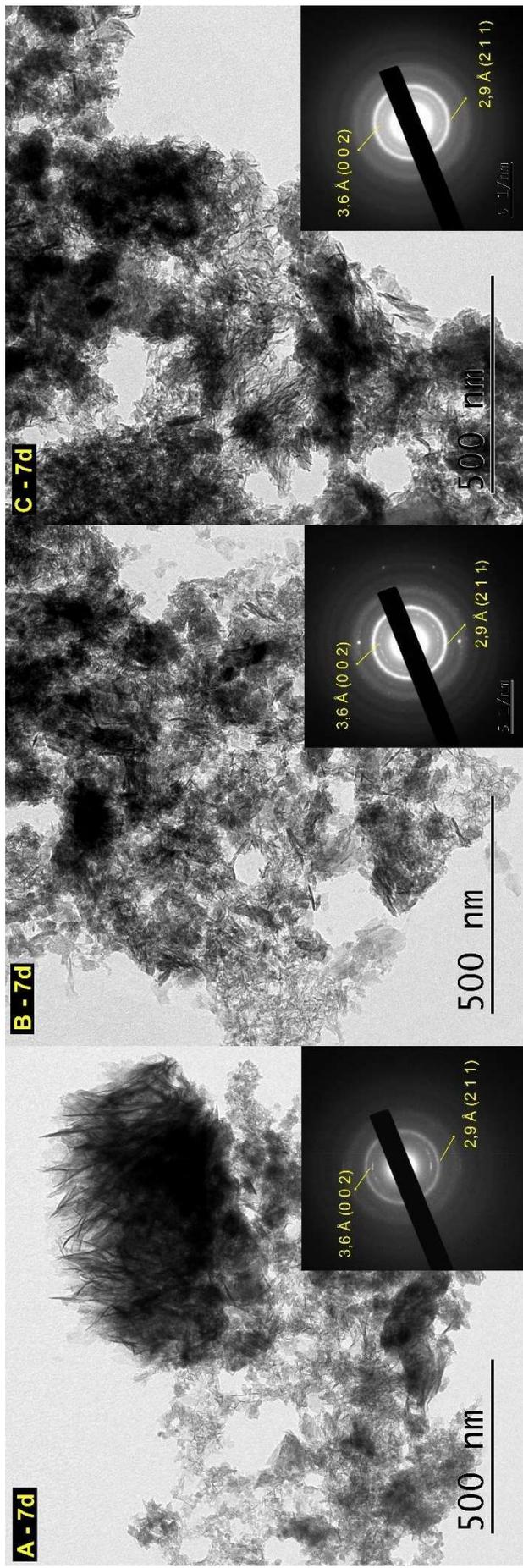


Figura 5.14 Imagens de MET obtidas das amostras após imersão na solução SBF por 7 dias e padrões de difração de elétrons obtidos das regiões observadas. Os anéis de difração referentes aos planos $(2\ 1\ 1)$ e $(0\ 0\ 2)$ da HAp são mostrados nas imagens juntamente com suas respectivas distâncias interplanares d_{hkl} .

De forma a responder à questão que ainda se impõe até aqui: se a cinética de formação da HAp na superfície dos vidros bioativos foi afetada pelas diferenças entre as sínteses, análises de composição via EDS foram realizadas após imersão das amostras por 1, 4 e 7 dias em SBF. Os teores de Ca, Mg e P foram expressos em relação à concentração de Si, uma vez que se trata do substrato vítreo: Ca/Si, Mg/Si, P/Si (Figura 5.15). A razão adicional de Ca/P (Figura 5.16) também foi calculada a partir dos dados EDS de composição das amostras.

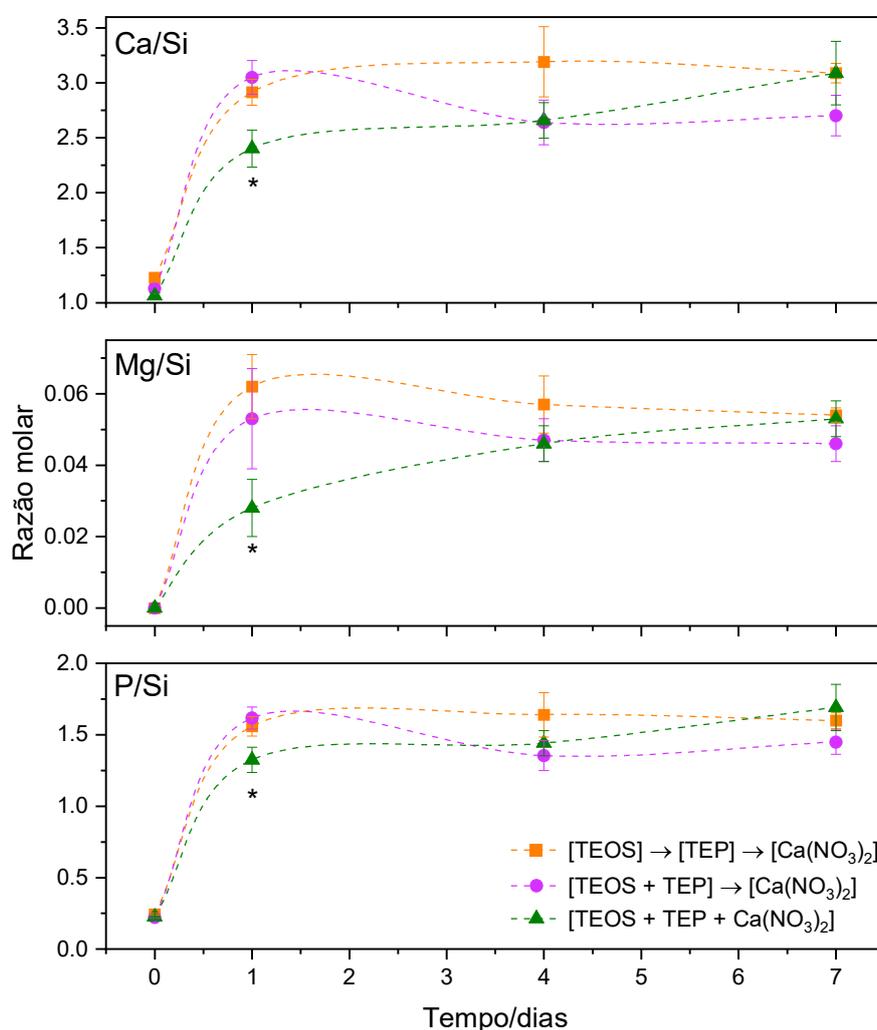


Figura 5.15 Evolução de composição das amostras obtidas via EDS ao longo do tempo de imersão em SBF. Os teores relativos de Ca, Mg e P em relação ao Si são mostrados nas curvas: a) Ca/Si, b) Mg/Si e c) P/Si.

As quantidades de Ca/Si, Mg/Si e P/Si aumentaram com o tempo, o que confirmou que a superfície do vidro estava sendo gradualmente recoberta por HAp. Todas as amostras tratadas a 700 °C já apresentam cálcio e fósforo em sua superfície por conta de composição química original dos vidros, independentemente do contato com o SBF. Devido a isso, as razões Ca/Si e P/Si indicadas na Figura 5.15 têm início em valores acima de zero. Uma vez que íons Mg^{2+} não estão presentes na composição original do vidro, eles são uma boa sonda para explorar a cinética da precipitação de HAp. Sabe-se que íons Mg^{2+} tendem a ser capturados da solução SBF durante a precipitação de HAp [89]. Analisando o acúmulo de Ca, Mg e P na superfície ao longo do tempo, não foi observada nenhuma diferença significativa para as três sínteses, exceto ao analisar o primeiro dia de imersão em SBF. Neste tempo, a amostra em que o $Ca(NO_3)_2$ foi adicionado durante as hidrólises do TEOS e TEP (Síntese C: [TEOS + TEP + $Ca(NO_3)_2$]) apresentou menos Ca, Mg e P em relação ao Si do que as outras amostras. Isso indicou claramente que esta amostra sofreu um atraso na captura de Ca, Mg e P da solução SBF, sugerindo um atraso na precipitação de HAp, apesar dos resultados de DRX não terem sensibilidade para indicar alterações. A microestrutura formada nesta síntese composta por mesoporos menores e com Ca^{2+} e PO_4^{3-} não concentrados em regiões específicas provavelmente prejudicou a difusão iônica e atrasou a nucleação da HAp. De qualquer forma, esse atraso não significou alterações significativas na bioatividade geral das amostras após 7 dias de imersão, uma vez que a quantidade de HAp formada foi a mesma.

Para as três sínteses, a HAp foi formada já com 1 dia de imersão em SBF com valores de razão Ca/P próximos de 1,67 que corroboram com os resultados discutidos anteriormente.

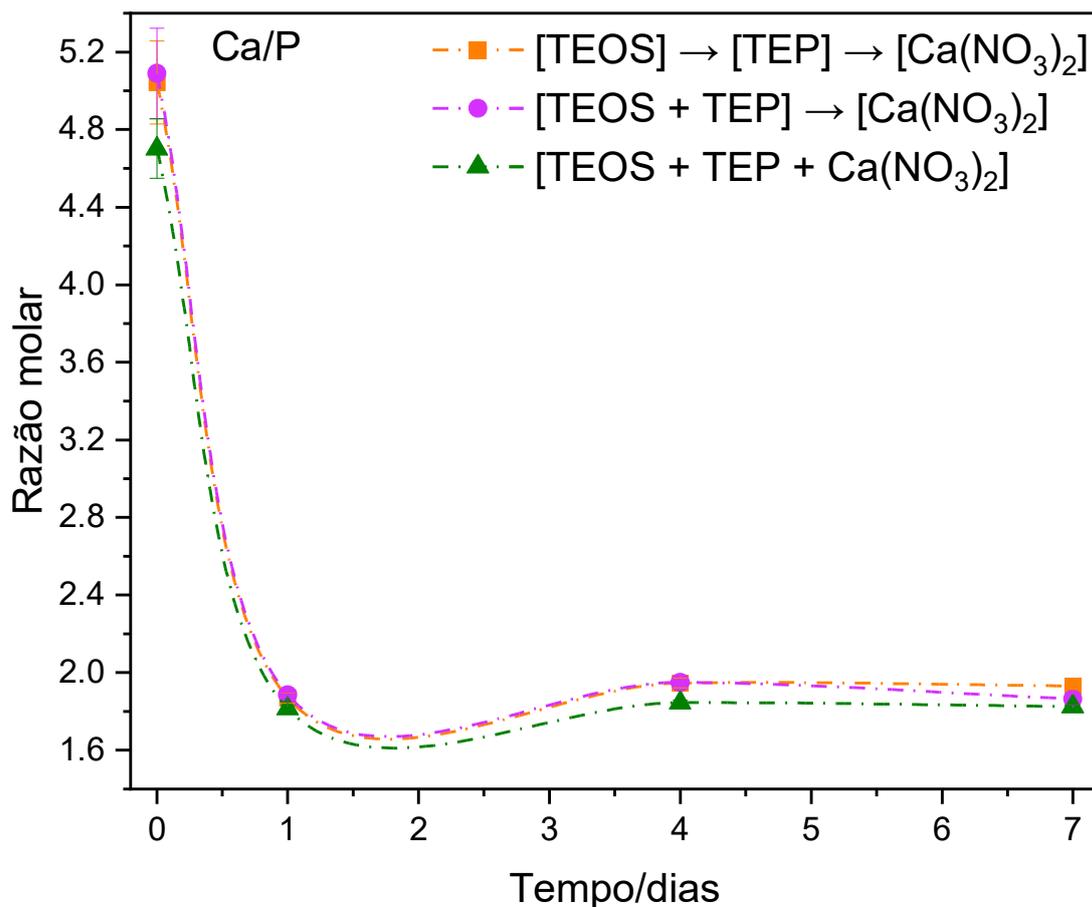


Figura 5.16 Análises de EDS da razão Ca/P para os vidros bioativos sintetizados. Amostras em contato com SBF a 37 °C nos tempos 0, 1, 4 e 7 dias.

Para melhor compreensão de como a adsorção de proteínas pode ser afetada pelas modificações microestruturais nos vidros bioativos, foram realizados testes de 24 h de imersão em solução de BSA ($1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Figura 5.17).

Uma maior quantidade de albumina foi adsorvida nas amostras às quais $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ foi adicionado durante as hidrólises de TEOS e TEP (Síntese C: [TEOS + TEP + $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$]).

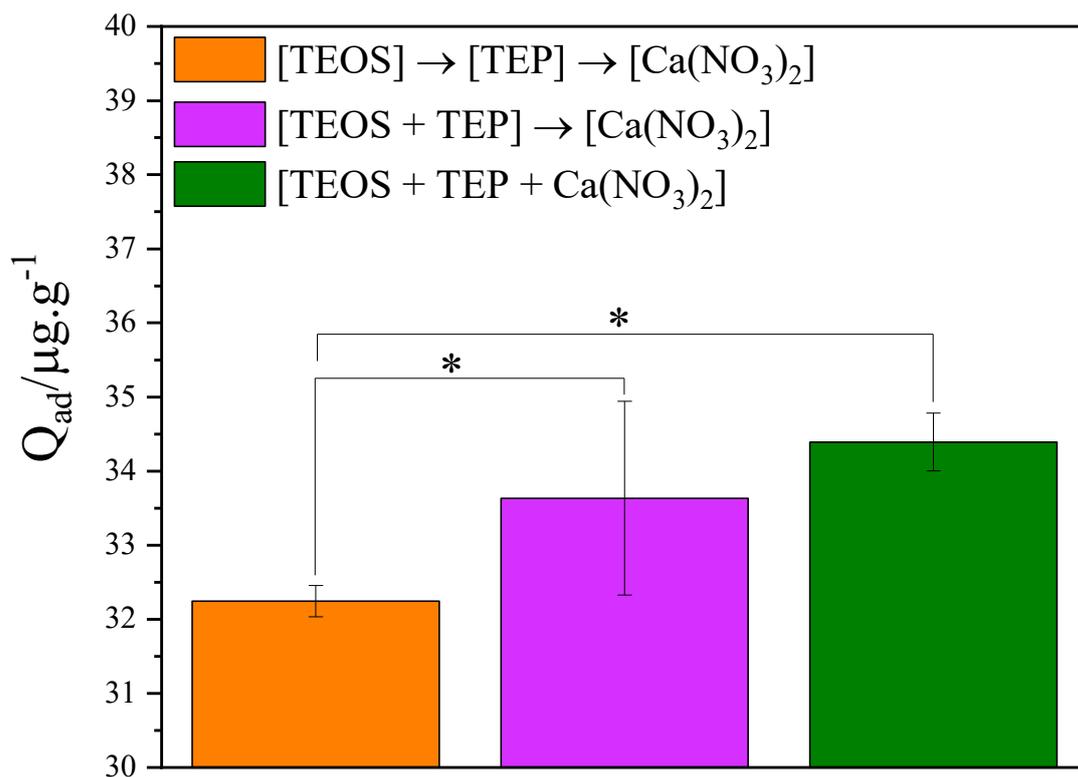


Figura 5.17 Quantidade de albumina bovina adsorvida por grama de biovidro. *Diferença significativa ($n= 3$; $p \leq 0,05$).

Isto foi consistente com a análise de adsorção de N_2 (Tabela 5.3) que revelou uma maior área de superfície e menor porosidade, o que significa que a amostra poderia adsorver mais proteína do que as outras amostras. Porém, para avaliar a eficácia da adsorção para cada amostra, foi calculada a quantidade de proteína adsorvida por área de superfície de acordo com a Equação 3 e expressos na Figura 5.18.

Os resultados obtidos e o teste estatístico são apresentados na Figura 5.18 e indicam um comportamento oposto ao que foi observado em relação a quantidade de albumina adsorvida por grama de biovidro.

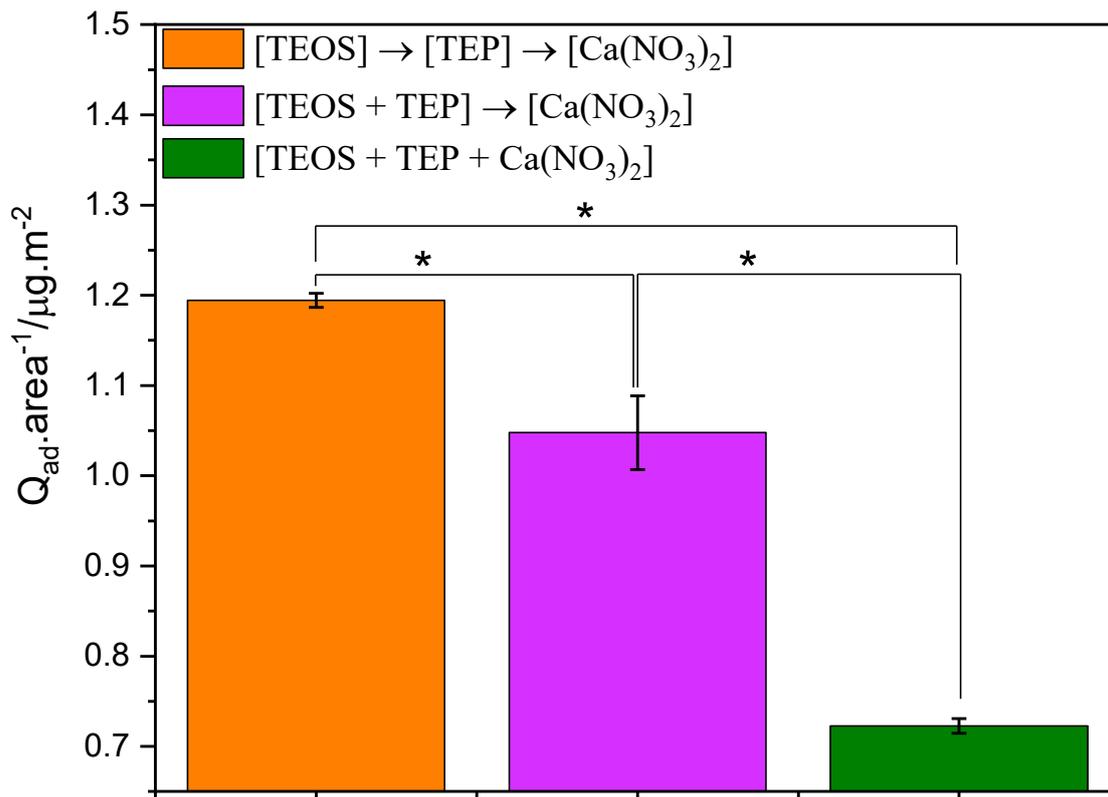


Figura 5.18 Quantidade de albumina bovina adsorvida por área superficial dos vidros. *Diferença significativa ($n=3$; $p \leq 0,05$).

Neste caso, esta mesma amostra (síntese C) teve o menor valor de adsorção por m^2 . Apesar da maior quantidade de proteína adsorvida, pode-se supor que as capacidades de adsorção da síntese em que o $Ca(NO_3)_2$ foi adicionado simultaneamente a TEOS e TEP foram inferiores às das demais. Uma explicação para esta menor capacidade de adsorção poderia ser a difusão da albumina. A albumina é uma proteína de formato elíptico com tamanho médio de 4 nm [90]. O tamanho médio dos poros medido para a amostra na qual o $Ca(NO_3)_2$ foi adicionado simultaneamente com a hidrólise de TEOS e TEP foi de aproximadamente 2,3 nm (Tabela 5.3). Portanto, essa menor capacidade de adsorção poderia ser interpretada como a incapacidade da albumina de se difundir nestes poros, em vez de uma menor quantidade de locais de adsorção. Esta hipótese é ainda mais reforçada se considerarmos que quanto maiores forem os mesoporos, maior será a capacidade de adsorção.

No geral, pode-se supor que a mineralização prévia dos nanocristais de HAp durante a síntese teria um impacto significativo na adsorção de proteínas sempre que os nanocristais de HAp estivessem mais expostos em uma rede de sílica menos polimerizada e sem a formação de calcita.

6. CONCLUSÃO

A adição de nitrato de cálcio após a hidrólise de TEOS e TEP impediu a distribuição homogênea de Ca^{2+} na rede vítrea e gerou regiões ricas em Ca que promoveram a mineralização precoce de nanocristais de HAp durante o tratamento térmico. Esse processo semelhante à desvitrificação gerou um vidro com mesoporos maiores, causando aumento significativo na adsorção de proteínas. Por outro lado, esse processo de formação precoce de HAp durante a síntese não teve impacto significativo na formação posterior de HAp em SBF, ou seja, na bioatividade das amostras, uma vez que a quantidade de HAp formada nas amostras foi semelhante após 7 dias em SBF. Portanto, conclui-se que a bioatividade dos vidros não pode ser modulada pela escolha do momento em que o nitrato de cálcio é adicionado na síntese sol-gel. No entanto, os resultados revelaram que a capacidade de adsorção de proteínas pelo vidro foi maior quando o nitrato de cálcio for adicionado após a hidrólise de TEOS e TEP.

7. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o efeito da mineralização precoce de hidroxiapatita sobre o comportamento celular.

- Estudar o efeito do tempo de homogeneização após adição do $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sobre a microestrutura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Simila HO, Boccaccini AR. Sol-gel bioactive glass containing biomaterials for restorative dentistry: A review. *Dent Mater* 2022; 38: 725–747.
- [2] Hench LL, Roki N, Fenn MB. Bioactive glasses: Importance of structure and properties in bone regeneration. *J Mol Struct* 2014; 1073: 24–30.
- [3] Dash PA, Mohanty S, Nayak SK. A review on bioactive glass, its modifications and applications in healthcare sectors. *J Non Cryst Solids* 2023; 614: 122404.
- [4] Cannio M, Bellucci D, Roether JA, et al. Bioactive Glass Applications: A Literature Review of Human Clinical Trials. *Materials (Basel)* 2021; 14: 5440.
- [5] Siqueira RL, Zanotto ED. The influence of phosphorus precursors on the synthesis and bioactivity of SiO₂-CaO-P₂O₅ sol-gel glasses and glass-ceramics. *J Mater Sci Mater Med* 2013; 24: 365–379.
- [6] Bueno OMVM, Herrera CL, Bertran CA, et al. An experimental and theoretical approach on stability towards hydrolysis of triethyl phosphate and its effects on the microstructure of sol-gel-derived bioactive silicate glass. *Mater Sci Eng C*; 120. Epub ahead of print 1 January 2021. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111759.
- [7] Santos SC, Barreto LS, dos Santos EA. Nanocrystalline apatite formation on bioactive glass in a sol-gel synthesis. *J Non Cryst Solids* 2016; 439: 30–37.
- [8] Doostmohammadi A, Monshi A, Fathi MHH, et al. A comparative physico-chemical study of bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite. *Ceram Int* 2011; 37: 1601–1607.
- [9] Kalampounias a. G, Bouropoulos N, Katerinopoulou K, et al. Textural and structural studies of sol-gel derived CaO- and MgO silica glasses. *J Non Cryst Solids* 2008; 354: 749–754.
- [10] Letaief N, Lucas-Girot A, Oudadesse H, et al. Effect of aging temperature on the structure, pore morphology and bioactivity of new sol-gel synthesized bioglass. *J Non Cryst Solids* 2014; 402: 194–199.
- [11] Santos SC, Lazaro GS, dos Santos EA. Ordering in sol-gel-derived bioactive

- glasses and its influence on the dissolution/precipitation behavior in a complex culture medium. *J Non Cryst Solids* 2018; 494: 50–58.
- [12] Rámila A, Balas F, Vallet-Regí M. Synthesis routes for bioactive sol-gel glasses: Alkoxides versus nitrates. *Chem Mater* 2002; 14: 542–548.
- [13] Yu B, Turdean-Ionescu CA, Martin RA, et al. Effect of Calcium Source on Structure and Properties of Sol–Gel Derived Bioactive Glasses. *Langmuir* 2012; 28: 17465–17476.
- [14] Pajares-Chamorro N, Chatzistavrou X. Bioactive Glass Nanoparticles for Tissue Regeneration. *ACS Omega* 2020; 5: 12716–12726.
- [15] Chen Q-Z, Li Y, Jin L-Y, et al. A new sol–gel process for producing Na₂O-containing bioactive glass ceramics. *Acta Biomater* 2010; 6: 4143–4153.
- [16] Kaur G, Pickrell G, Sriranganathan N, et al. Review and the state of the art: Sol–gel and melt quenched bioactive glasses for tissue engineering. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* 2016; 104: 1248–1275.
- [17] Alves OL, Gimenez; I de F, Mazali IO. A arte de fazer vidro. *Química Nov na Esc* 2001; 1: 13–24.
- [18] De Araújo LBS. *Bioatividade: Uma propriedade secundária em vidros bioativos de composições complexas?* São Cristóvão, <https://ri.ufs.br/jspui/handle/riufs/14760> (2021).
- [19] Acosta MHR. *Avaliação da Anomalia da Teoria de Nucleação Clássica em Vidros Silicatos*. Universidade Federal de São Carlos, 2021.
- [20] Riaño LPN. Preparação e caracterização óptica de vidros dopados com terras raras contendo nanoestruturas de prata. *Univ Fed Pernambuco* 2006; 131.
- [21] Zachariasen WH. The atomic arrangement in glass. *J Am Chem Soc* 1932; 54: 3841–3851.
- [22] Santos SC. *Formação de nanocristais de hidroxiapatita durante a síntese de um biovidro quaternário do tipo SiO₂.Na₂O.CaO.P₂O₅ via Sol-Gel*. São Cristóvão, 2016.

- [23] Akerman M. Natureza , Estrutura e Propriedades do Vidro. 2000; 1–37.
- [24] Souza MT, Cesconeto FR, Arcaro S, et al. Caracterização de areias de quartzo do estado de Mato Grosso do Sul para aplicações industriais. *Cerâmica* 2014; 60: 569–574.
- [25] Ramírez Acosta MH, Raphael Rodrigues L, Cassar DR, et al. Further evidence against the alleged failure of the classical nucleation theory below the glass transition range. *J Am Ceram Soc* 2021; 104: 4537–4549.
- [26] Santos SC. *Biocompósitos de $x\text{SiO}_2 \cdot (y-n)\text{CaO} \cdot z\text{P}_2\text{O}_5 \cdot n\text{CuO}/\text{PVA}$ obtidos por tape casting aquoso: propriedades osteogênica e antibacteriana*. São Cristóvão, <https://ri.ufs.br/jspui/handle/riufs/15078> (2021).
- [27] Martinez AL. Vidros oxifluoretos e borato de bário para preparação de vitro-cerâmicas com propriedades ópticas não lineares. 2001; 101.
- [28] Gupta PK. Non-crystalline solids : glasses and amorphous solids. 1996; 195: 158–164.
- [29] Acosta MHR. Avaliação da anomalia da teoria de nucleação clássica em vidros silicatos.
- [30] Martin RA, Yue S, Hanna J V, et al. Characterizing the hierarchical structures of bioactive sol–gel silicate glass and hybrid scaffolds for bone regeneration. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci* 2012; 370: 1422–1443.
- [31] Lazaro GS. *Efeito individual e combinado de óxidos do tipo MO (M = Sr, Zn, Mg) sobre as propriedades térmicas e reatividade de superfícies de biovidros*. Universidade Federal de Sergipe, 2014.
- [32] Jones JR, Gibson IR. Ceramics, Glasses, and Glass-Ceramics. In: *Biomaterials Science*. Elsevier, pp. 289–305.
- [33] Wu Z, Tang T, Guo H, et al. In vitro degradability, bioactivity and cell responses to mesoporous magnesium silicate for the induction of bone regeneration. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2014; 120: 38–46.
- [34] Fujibayashi S, Neo M, Kim H-M, et al. *A comparative study between in vivo bone*

- ingrowth and in vitro apatite formation on Na₂O-CaO-SiO₂ glasses*. 2003.
- [35] Siqueira RL, Zanotto ED. Biosilicato®: Histórico De Uma Vitrocerâmica Brasileira De Elevada Bioatividade. *Quim Nova* 2011; 34: 1231–1241.
- [36] Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra ; D C, et al. Materiais cerâmicos utilizados para implantes. *Rev eEtrônica Mater e Process* 2007; 2.3: 35–42.
- [37] Arnold A, Dennison E, Kovacs CS, et al. Hormonal regulation of biomineralization. *Nat Rev Endocrinol* 2021; 17: 261–275.
- [38] Zhang X, Guo X, Zhang J, et al. Nucleation, crystallization and biological activity of Na₂O-CaO-P₂O₅-SiO₂ bioactive glass. *J Non Cryst Solids*; 568. Epub ahead of print 15 September 2021. DOI: 10.1016/j.jnoncrysol.2021.120929.
- [39] Lopes JH. *Biovidros derivados do 45S5: os efeitos do Nb₂O₅ ou da modificação da superfície com Ca²⁺ sobre a estrutura e bioatividade*. Universidade Estadual de Campinas. Epub ahead of print 27 February 2015. DOI: 10.47749/T/UNICAMP.2015.944357.
- [40] Cölfen H. A crystal-clear view. *Nature Materials* 2010; 9: 960–961.
- [41] Cölfen H, Mann S. Higher-order organization by mesoscale self-assembly and transformation of hybrid nanostructures. *Angewandte Chemie - International Edition* 2003; 42: 2350–2365.
- [42] Cruz M, Ferreira C, Nogueira L, et al. Aspectos Químicos da Biomineralização Óssea. *Quim Nova* 2021; 45: 578–593.
- [43] Dorozhkin S V. Calcium orthophosphates and human beings: a historical perspective from the 1770s until 1940. *Biomatter* 2012; 2: 53–70.
- [44] Cristina M, Toledo M De, Pereira VP. A variabilidade de composição da apatita associada a carbonatitos. 2001; 22: 27–64.
- [45] Hench LL. The story of Bioglass®. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006, pp. 967–978.
- [46] Soares S, Silva A, Correia I. Porous Bioglass Scaffold for Orthopedics Applications. 2016; 22: 1–6.

- [47] Jones JR, Hench LL. Biomedical materials for new millennium: Perspective on the future. *Mater Sci Technol* 2001; 17: 891–900.
- [48] Bellon PA. *Síntese do biovidro e sua caracterização*. Universidade de São Paulo, 2012.
- [49] Acevdo LA. Caracterização e avaliação in-vitro de biovidro experimental em micropartículas para o tratamento da hipersensibilidade dentinária cervical. *Anal Nilai Moral Dalam Cerita Pendek Pada Maj Bobo Ed Januari Sampai Desember 2015* 2016; 200.
- [50] Gomes P. *Scaffolds derivados do biovidro 58S contendo íons Na: Síntese por sol-gel e modificação de superfície para liberação de óxido nítrico*. Universidade Federal de Campinas, 2017.
- [51] Wen C, Bai N, Luo L, et al. Structural behavior and in vitro bioactivity evaluation of hydroxyapatite-like bioactive glass based on the SiO₂-CaO-P₂O₅ system. *Ceram Int* 2021; 47: 18094–18104.
- [52] Li A, Qiu D. Phytic acid derived bioactive CaO-P₂O₅-SiO₂ gel-glasses. *J Mater Sci Mater Med* 2011; 22: 2685–2691.
- [53] Stober W. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range 1. 1968; 69: 62–69.
- [54] Gonzaga Pedrosa G. *Estudos dos efeitos da radiação gama nas propriedades ópticas dos íons Eu³⁺ em géis de sílica*. Universidade Federal de Pernambuco, <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/8532> (2002).
- [55] Guimarães FBAP, Barrioni BR, Oliveira ACX, et al. Síntese sol-gel de scaffolds porosos de vidro bioativo com adição de agente porogênico. *Univ Fed Minas Gerais* 2016; 108.
- [56] Brinker CJ, Scherer, George W. *Sol-Gel Science The physics and chemistry of sol-gel processing*. Academic P. Boston, 1990.
- [57] Tilocca A, Cormack AN. Structural Effects of Phosphorus Inclusion in Bioactive Silicate Glasses. 2007; 14256–14264.

- [58] Ruiz-Clavijo A, Hurt A, Kotha A, et al. Effect of Calcium Precursor on the Bioactivity and Biocompatibility of Sol-Gel-Derived Glasses. *J Funct Biomater* 2019; 10: 13.
- [59] Hung GY, Chen PY, Wang CY, et al. Tailoring bioactive and mechanical properties in polycrystalline CaO–SiO₂–P₂O₅ glass-ceramics. *Ceram Int* 2023; 49: 7289–7298.
- [60] Kuzielová E, Palou M, Lokaj J, et al. Bioactivity investigation of glass and glass ceramics in Li₂O-SiO₂-CaO-P₂O₅- CaF₂ system. *Adv Appl Ceram* 2008; 107: 203–209.
- [61] Perry DL, Wren AW. The effect of copper addition on strontium-containing silicate-based sol-gel bioactive glass for tissue regeneration. *J Non Cryst Solids* 2024; 625: 122761.
- [62] Lallukka M, Miola M, Najmi Z, et al. Cu-doped bioactive glass with enhanced in vitro bioactivity and antibacterial properties. *Ceram Int* 2024; 50: 5091–5103.
- [63] Yu J, Jiang Q, Li J, et al. Control of the valence state of copper ions through the addition of P₂O₅ in sol-gel silicate glass. *Ceram Int* 2023; 49: 14702–14709.
- [64] Queiroz PM, Barrioni BR, Valverde TM, et al. Study of the manganese and calcium synergetic influence on mesoporous bioactive glass characteristic. *J Non Cryst Solids*; 622. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.1016/j.jnoncrysol.2023.122656.
- [65] Barrioni BR, Norris E, Li S, et al. Osteogenic potential of sol–gel bioactive glasses containing manganese. *J Mater Sci Mater Med*; 30. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1007/s10856-019-6288-9.
- [66] Sinitsyna P, Engblom M, Hupa L. Impact of substituting K₂O for Na₂O on physico-chemical properties and in vitro bioactivity of bioactive glass S53P4. *Open Ceram* 2023; 16: 100440.
- [67] Borges R, Oliveira JSS, Queiroz AP, et al. On the structure of Ag-containing sol-gel bioactive glasses: A surface crystal growth of metallic silver removes its network modifier role in the glass structure. *Open Ceram*; 16. Epub ahead of print

2023. DOI: 10.1016/j.oceram.2023.100449.
- [68] Pinto e Souza IE, Barrioni BR, Miriceia NML, et al. Synergistic effect of cobalt and cerium on the structural properties and biological behavior of sol-gel-derived mesoporous bioactive glass nanoparticles. *J Non Cryst Solids*; 613. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.1016/j.jnoncrysol.2023.122391.
- [69] Bertran O, Del Valle LJ, Revilla-López G, et al. Synergistic approach to elucidate the incorporation of magnesium ions into hydroxyapatite. *Chem - A Eur J* 2015; 21: 2537–2546.
- [70] Jiang C, Ramteke DD, Li J, et al. Preparation and characterization of binary Mg-silicate glasses via Sol-Gel route. *J Non Cryst Solids* 2023; 606: 122204.
- [71] Kapp M, Li C, Xu Z, et al. Protein adsorption on sio₂-cao bioactive glass nanoparticles with controllable ca content. *Nanomaterials* 2021; 11: 1–13.
- [72] Sharma K, Kedia S, Singh AK, et al. Morphology and structural studies of laser treated 45S5 bioactive glass. *J Non Cryst Solids* 2016; 440: 43–48.
- [73] Kokubo T, Yamaguchi S. Simulated body fluid and the novel bioactive materials derived from it. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 2019; 107: 968–977.
- [74] Doumas, BT, Bayse DD, Carter RJ, et al. *A Candidate Reference Method for Determination of Total Protein in Serum I. Development and Validation*. 1981.
- [75] Simon S, Muresan-Pop M, Simon V, et al. Influence of partial replacing of CaO by SrO on structure and bioactivity of calcium-phospho-silicate glasses. *J Mol Struct* 2024; 1301: 137334.
- [76] Lopes JH, Bueno OMVM, Mazali IO, et al. Investigation of citric acid-assisted sol-gel synthesis coupled to the self-propagating combustion method for preparing bioactive glass with high structural homogeneity. *Mater Sci Eng C* 2019; 97: 669–678.
- [77] Grigoraviciute-Puroniene I, Zarkov A, Tsuru K, et al. A novel synthetic approach for the calcium hydroxyapatite from the food products. *J Sol-Gel Sci Technol* 2019; 91: 63–71.

- [78] Marsh AC, Mellott NP, Crimp M, et al. Ag-doped Bioactive Glass-Ceramic 3D Scaffolds: Microstructural, Antibacterial, and Biological Properties. *J Eur Ceram Soc* 2021; 41: 3717–3730.
- [79] Handke M, Sitarz M, Rokita M, et al. Vibrational spectra of phosphate-silicate biomaterials. *J Mol Struct* 2003; 651–653: 39–54.
- [80] Agathopoulos S, Tulyaganov DU, Ventura JMG, et al. Structural analysis and devitrification of glasses based on the CaO-MgO-SiO₂ system with B₂O₃, Na₂O, CaF₂ and P₂O₅ additives. *J Non Cryst Solids* 2006; 352: 322–328.
- [81] McMillan P. Structural studies of silicate glasses and melts-applications and limitations of Raman spectroscopy. *American Mineralogist*; 69.
- [82] Thommes M, Kaneko K, Neimark A V., et al. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 2015; 87: 1051–1069.
- [83] Putz F, Waag A, Balzer C, et al. The influence of drying and calcination on surface chemistry, pore structure and mechanical properties of hierarchically organized porous silica monoliths. *Microporous Mesoporous Mater* 2019; 288: 109578.
- [84] Todan L, Anghel EM, Osiceanu P, et al. Structural characterization of some sol-gel derived phosphosilicate glasses. *J Mol Struct* 2015; 1086: 161–171.
- [85] Tiskaya M, Shahid S, Gillam D, et al. The use of bioactive glass (BAG) in dental composites: A critical review. *Dent Mater* 2021; 37: 296–310.
- [86] Kim H-M, Himeno T, Kokubo T, et al. Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid. *Biomaterials* 2005; 26: 4366–4373.
- [87] Pan HB, Darvell BW. Solid titration of octacalcium phosphate. *Caries Res* 2009; 43: 322–330.
- [88] Seredin P, Goloshchapov D, Buylov N, et al. Compositional Analysis of the Dental Biomimetic Hybrid Nanomaterials Based on Bioinspired Nonstoichiometric Hydroxyapatite with Small Deviations in the Carbonate Incorporation. *Nanomaterials* 2022; 12: 4453.

- [89] Santos SC, Lazaro GS, Santos EA. Ordering in sol-gel-derived bioactive glasses and its influence on the dissolution/precipitation behavior in a complex culture medium. *J Non Cryst Solids* 2018; 494: 50–58.
- [90] Luo Q, Andrade JD. Cooperative Adsorption of Proteins onto Hydroxyapatite. *J Colloid Interface Sci* 1998; 200: 104–113.