



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Desenvolvimento de suportes porosos de biovidro para aplicações biomédicas

Stéphanie Soares

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Ciências Biomédicas

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Abílio Silva

Covilhã, Junho de 2012

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os que de alguma forma contribuíram e tornaram este trabalho viável.

Professor Doutor Abílio por ter sido um grande exemplo de amor à profissão, que conduziu-me com garra, força, motivação, inspiração e muito conhecimento. Agradeço imenso pela oportunidade, orientação, confiança e, acima de tudo por ter acreditado no valor deste trabalho. Muito obrigado por todo o conhecimento e toda a atenção.

Centro de investigação CAST (www.aerospace.ubi.pt), pela disponibilidade das condições laboratoriais.

Centro de investigação C-MADE (www.c-made.ubi.pt), coordenado pelo Professor Doutor João Castro Gomes pela disponibilidade do ensaio com o porosímetro.

Centro de investigação CICS (www.fcsaude.ubi.pt/cics) e pela ajuda da Mestre Joana Valente pela disponibilidade e apoio em ensaios.

Professora Ana Segadães, do departamento de Engenharia Cerâmica e do vidro da Universidade de Aveiro, pelo apoio dado na realização de ensaios práticos e sugestões transmitidas.

Professora Helena Fernandes, do departamento de Engenharia Cerâmica e de vidro da Universidade de Aveiro, pela colaboração, disponibilidade e sugestões transmitidas.

Engenheira Ana Paula, centro de ótica da Universidade da Beira Interior, pelo apoio e pelos serviços prestados.

Meus pais, irmão e cunhada por terem sempre acreditado, e acima de tudo, por me ter ensinado a não desistir, onde a determinada altura é o pensamento mais frequente e por serem uma referência de persistência e na luta de objetivos. Ao meu afilhado que foi a minha fonte de inspiração.

Meu namorado, Bruno Santos, pelo apoio incondicionável e pelo incentivo.

Amigos do R/C direito, amigos de faculdade e fafenses por me terem apoiado e partilhado comigo momentos de angústia e desânimo. Obrigada pela força, compreensão, paciência e carinho.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, exemplos de força e dedicação, bases da minha educação e que sempre me apoiaram, que permitiram o meu sucesso tanto pessoal como profissional. Obrigada por tudo!

Resumo

Com este trabalho pretendeu-se contribuir para o desenvolvimento de uma nova área de conhecimento na Universidade de Beira Interior: desenvolvimento de suportes de biovidro com potencial para serem aplicados na regeneração do tecido ósseo.

Partindo de uma análise cuidada do estado de arte utilizou-se uma composição otimizada - $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-MgO-K}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$, de forma a melhorar a resistência mecânica e a bioatividade através da adição dos óxidos de potássio e de magnésio à composição quaternária do Bioglass 45s5[®] apresentada por Hench.

Após a compreensão e domínio de técnicas, a matéria-prima foi obtida através da fusão a 1500 °C seguido de choque térmico. O biovidro foi moído de forma a obter a granulometria para o tamanho de partículas pretendida, inferior a 40 µm. Otimizou-se o procedimento de homogeneização de mistura com o agente porogénio (sal) e a obtenção de corpos de prova prensados a 100MPa.

Com um ciclo de sinterização controlado através da utilização de análises térmicas (TG, DTA e dilatométrica) reduziu-se os fenómenos de cristalização acentuados da amostra de forma a obtermos uma microestrutura trabecular mais densa. Após a lixiviação para a extração do agente porogénio e maturação foi realizada uma extensa caracterização física, de forma a obtermos um estudo comparativo para as diferentes formulações das amostras quanto à sua densidade, efeito da porosidade e a presença da interconectividade, bem como, a avaliação do seu comportamento mecânico, desde a resistência à compressão, flexão, dureza e módulo de elasticidade. A caracterização microscópica de varimento (SEM) foi essencial para compreender as vantagens morfológicas e o uso de sal enquanto porogénio.

Pela avaliação da toxicidade e da bioatividade demonstrou-se a viabilidade e o potencial dos suportes porosos desenvolvidos enquanto biomaterial.

Finalmente apresentam-se propostas de melhoria, novos caminhos e técnicas de processamento para, sem prejuízo da bioatividade, controlar e otimizar a resistência mecânica com o reforço da estrutura.

Palavras-chave

Biovidro, suportes porosos, porogénio, sal e propriedades mecânicas

Abstract

This work aims to clarifying a new research area in University of Beira Interior: development of bioactive scaffold glass for bone tissue engineering application.

An overview of the state of the art allowed starting with an optimized composition- $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-MgO-K}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ - in a way to improve mechanical resistance and bioactivity through the addition of magnesium and potassium oxides to the Bioglass 45s5[®] quaternary structure, presented by Hench.

After the comprehension and optimization of the techniques, fusion at 1500°C and thermal shock were used for obtain of raw materials. Bioactive glass was grinded to obtain a required granulosity, inferior to 40 μm . The mixture homogenization procedures with the porogenic agent (salt) as well as the obtainment of pressed specimens at 100MPa were optimized.

Thermal analysis (TG, DTA and dilatometry) were used for controlling the sintering cycle, reducing in this manner the accentuated crystallization phenomenon of the samples to obtain a more dense shell microstructure. After leaching, used for the extraction of the porogenic agent and maturation, an extensive physical characterization was used to obtain a comparative study for the different formulations of the sample in regards to its density, porosity effect and interconnectivity, as well as, the evaluation of the mechanical behavior, including resistance to compression, flexing, hardness, and Young module. Characterization through scanning electronic microscopy (SEM) was essential for the comprehension of the morphological advantages and use of salt as a porogenic agent.

Through the evaluation of toxicity and bioactivity, the viability and the potential of the developed porous scaffold were shown as biomaterial.

Finally we present propositions for improvements, as well as, new pathways and processing techniques for controlling and optimizing the mechanical resistance with structure reinforcement, without a loss of bioactivity.

Keywords

Bioactive glass, scaffold, porogen, salt and mechanical properties.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Índice.....	xi
Lista de Tabelas.....	xix
Lista de Acrónimos	xxi
Capítulo 1	1
1. Introdução.....	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Objetivo.....	3
1.3. Escolha da composição	4
1.4. Características do <i>scaffold</i>	6
1.5. Arquitetura do <i>scaffold</i>	7
1.5.1. Agente Porogénico.....	8
1.6. Bioatividade	9
1.6.1. Método da bioatividade.....	11
1.6.2. Fenómenos de cristalização da HCA segundo o modelo proposto por Hench	11
1.7. Sinterização e cristalização	13
1.8. Propriedades mecânicas	16
Capítulo 2	19
2. Materiais e métodos	19
2.1. Caracterização das matérias-primas.....	19
2.2. Preparação da amostra	20
2.3. Análise granulométrica	21
2.3.1. Partículas de vidro.....	21

2.3.2.	Sal	21
2.4.	Análise térmica.....	22
2.4.1.	DTA e TG.....	22
2.4.2.	Dilatometria.....	22
2.5.	Avaliação da microestrutura	23
2.5.1.	DRX	23
2.5.2.	SEM.....	23
2.5.3.	EDS.....	23
2.6.	Prensagem.....	24
2.7.	Secagem e evaporação do ligante.....	25
2.8.	Sinterização	26
2.9.	Lixiviação	26
2.10.	Maturação	26
2.11.	Corte	26
2.12.	Propriedades físicas.....	27
2.12.1.	Porosimetria de mercúrio	28
2.12.2.	Interconectividade.....	28
2.13.	Caracterização mecânica.....	28
2.13.1.	Dureza.....	29
2.13.2.	Flexão em três pontos	29
2.13.3.	Compressão	29
2.13.4.	Módulo de elasticidade	30
2.13.4.1.	Propagação de pulsos ultrassônicos.....	30
2.14.	Avaliação biológica	31
2.14.1.	Citotoxicidade.....	31
2.14.1.1.	Caraterização do perfil de citotoxicidade.....	31
2.14.2.	Bioatividade.....	31

Capítulo 3	35
3. Resultados e discussão.....	35
3.1. Distribuição granulométrica do sal	35
3.2. Distribuição granulométrica do biovidro	36
3.3. Choque térmico.....	37
3.4. EDX	37
3.5. DRX.....	38
3.6. Análise térmica.....	39
3.6.1. DTA e TG.....	39
3.6.2. Dilatometria	40
3.7. DRX.....	41
3.8. Corpos de prova	42
3.9. Estudo da microestrutura	45
3.10. Propriedades físicas	50
3.10.1. Interconectividade	50
3.10.2. Método de Arquimedes	54
3.11. Porosidade	57
3.12. Caracterização mecânica.....	59
3.13. Avaliação biológica.....	63
3.13.1. Citotoxicidade	63
3.13.2. Testes de bioatividade	65
Capítulo 4	69
4. Conclusão	69
4.1. Proposta de trabalhos futuros	70
4.1.1. Reforço de biovidro com fibras.....	70
4.1.2. Agente porogénio.....	73
Capítulo 5	75

5. Bibliografia.....	75
----------------------	----

Lista de Figuras

Figura 1: Localização do Bioglass 45s5 [®] no diagrama de Hench que relaciona a composição com a bioatividade	3
Figura 2 : Esquema síntese da análise do estado de arte e do uso dos três vidros bioativos. .6	
Figura 3: Esquema síntese das propriedades necessárias que um <i>scaffold</i> deve possuir.....	7
Figura 4: Alterações da amostra com o processo de sinterização (Goodall, Depois et al. 2006):	14
Figura 5: Fluxograma ilustrativo das diferentes etapas deste trabalho.	19
Figura 6: Imagem do processo do vazamento do biovidro fundido a 1500°C para água.	21
Figura 7: Fotografia da prensa e da colocação do molde para efectuar o processo de prensagem. Fotografias dos dois tipos de moldes utilizados (a e c). a) molde 1 com dimensões: diâmetro=40mm e h= 40mm, b) observa-se o molde e os seus pinos superiores e inferiores e) molde 2.	25
Figura 8: Imagem ilustrativa do processo de corte dum corpo de prova.....	27
Figura 9: Histograma da distribuição de tamanho de partículas para o sal após 5 minutos de peneiração.	35
Figura 10: Histograma da distribuição de tamanho de partículas para o biovidro puro.....	36
Figura 11: Amostra de biovidro obtido após choque térmico	37
Figura 12: Fluxograma do teste de EDS para visualizar a composição da amostra após o processo de fusão.	38
Figura 13: Difractograma de raio-X do biovidro após o choque térmico.	38
Figura 14: Análise DTA e TG na amostra de 100% biovidro em função da temperatura.	39
Figura 15: Expansão linear em função da temperatura para amostras com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.....	41
Figura 16: Difractograma de raio-X do biovidro após a sinterização numa amostra com 100% de biovidro.	41
Figura 17: Imagens ilustrativas da evolução na obtenção dos corpos de prova em função do modo de homogeneização, tipo de molde, teor de acetona e tipo de ensaio empregue.	42
Figura 18: Imagem do corpo de prova obtido através do molde 2.	43
Figura 19: Diferença no tipo de prensagem empregue em cada molde. O efeito simples foi utilizado no molde 2 e o efeito duplo no molde 2.	44
Figura 20: a) Corte transversal da amostra de 100% de biovidro que permite observação da distribuição da microporosidade da amostra (ampliação 50x), b) utilização de uma ampliação superior para a obtenção de uma melhor visualização dos microporos (ampliação 700x) c) avaliação do tamanho da microporosidade (ampliação 700x) d) presença da rugosidade presente no microporo (ampliação 3000x) e d) formato esférico do microporo visualizado numa ampliação superior (ampliação 3500x).	46
Figura 21: a) corte transversal da amostra com 60% de biovidro onde se observa a distribuição da macroporosidade (ampliação 50x); b) ampliação (60x) aumentada que permite a	

visualização mais detalhada dos macroporos e a sua medição em c); d) interconectividade presente na amostra (ampliação 2000x); e) aumento da ampliação da figura (d) que permite visualizar a espessura do vínculo (ampliação 3000x) e f) maior ampliação do vínculo que permite visualizar a rugosidade presente bem como a boa sinterização deste (ampliação 1000x).....	47
Figura 22: a) corte transversal da amostra com 50% de biovidro onde se observa a distribuição da macroporosidade (ampliação 50x); b e d) interconectividade presente na amostra (ampliação 4000x e 1000x respetivamente); c) aumento da ampliação da figura b que permite visualizar a espessura do vínculo e a rugosidade presente, bem como a boa sinterização deste; e) medição do vínculo apresentado (ampliação 1000x).	48
Figura 23: a) corte transversal da amostra com 40% de biovidro onde se observa a distribuição da macroporosidade (ampliação 50x); b) interconectividade presente na amostra (ampliação 900x); e) visualização dum vínculo espesso e rugoso presente bem como a boa sinterização deste (ampliação 1500x); d) medição do vínculo apresentado (ampliação 1500x).	49
Figura 24: Micrografia dum macroporo com formato quadrangular (ampliação 500x).	49
Figura 25: a) Imagem de uma amostra de 100% de biovidro após imersão no azul metileno em que não se visualiza qualquer subida do corante; b) corte transversal para comprovação da não existência do azul metileno no interior da amostra.	50
Figura 26: a) Imagem que ilustra o processo de imersão da amostra com 60% de biovidro onde se observa a chegada a 1/2 do volume do corpo de prova; b) corpo de prova com 60% biovidro completamente corado pelo azul metileno; c) corte transversal do corpo onde se confirma que o interior da amostra se encontra corado.	51
Figura 27: a) Imagem ilustrativa do processo de imersão da amostra com 40% de biovidro onde se visualiza a chegada a 1/2 do volume do corpo de prova; b) corpo de prova com 40% biovidro totalmente corado pelo azul metileno; c) corte transversal do corpo onde se confirma que o interior da amostra se encontra corado.	52
Figura 28: a) Imagem ilustrativa do processo de imersão da amostra com 40% de biovidro onde se visualiza a chegada aos 40% do volume do corpo de prova; b) corpo de prova com 40% biovidro totalmente corado pelo azul metileno; c) corte transversal do corpo onde se confirma que o interior da amostra se encontra corado.	53
Figura 29: fotografia final após a imersão de todos os corpos de prova em azul metileno....	54
Figura 30: Evolução da porosidade aparente em função do volume aparente para os corpos de prova com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.	55
Figura 31: Evolução da água absorvida em função da porosidade aparente para os corpos de prova com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.	56
Figura 32: Evolução da adição de sal adicionado na manufacturação dos corpos de prova e o sal retido após o processo de lixiviação.	56
Figura 33: Volume cumulativo (ml/g) em função do diâmetro do poro (μm) para as amostra com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.	57

Figura 34: Volume incremental (mL/g) em função do diâmetro do poro (μm) para as amostra com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.	58
Figura 35: representação da compressão em função da percentagem de biovidro em cada corpo de prova com maturação e sem maturação.	59
Figura 36: Efeito das densidades (densidade de sinterização e BD) na compressão para cada corpo de prova com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.	61
Figura 37: Resultado típico de suportes porosos para a tensão em função da deformação. ..	62
Figura 38: Avaliação da atividade celular após 1,2,3,4,5,6 e 7 dias; o controlo negativo (K^-); o controlo positivo (K^+); biomaterial de 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.	64
Figura 39: Micrografia de células osteoblásticas de seres humanos após ser semeado na presença dos biomateriais (*) durante 24, 48 e 72h; o controlo negativo (K^-); o controlo positivo (K^+). Ampliação de 100x.....	65
Figura 40: Resultado após 7 dias de imersão em SBF com ampliação de 15000x em a) e ampliação de 11000x em b).....	66
Figura 41: Fluxograma do EDS obtido da camada depositada à superfície do biomaterial. ...	66
Figura 42: Evolução da variação do pH em função ao tempo de imersão.....	67
Figura 43: Representação esquemática da microestrutura com a presença de uma camada forte.....	70
Figura 44: a e b) corte transversal da amostra com 40% de biovidro+fibras de carbono onde se observa a distribuição da macroporosidade (ampliação 35x e 80x respetivamente) bem como a presença de fibras; c) interconectividade presente na amostra (ampliação 400x); d) visualização da ligação da amostra com a fibra (ampliação 1100x)	72
Figura 45: Resistência à compressão (Mpa) em função da deformação para a mostra com 40% de biovidro e 40% de biovidro + Fibra.	73
Figura 46: Esquema ilustrativo da presença dos agentes porogénio.	74

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição de três tipos de biovidros (em percentagem mássica)	4
Tabela 2: Propriedades mecânicas típicas do bioK e do Bioglass 45s5®	5
Tabela 3: Atividade biológica correspondente a cada ião.	10
Tabela 4: Modelo proposto por Hench apresentado os diferentes fenómenos, reacções e efeito atribuído em cada fase no processo de formação de HCA (Gerhardt and Boccaccini 2010; Bellucci, Cannillo et al. 2011; Newby, El-Gendy et al. 2011).....	12
Tabela 5: Valores dos coeficientes atribuídos a cada óxido.	16
Tabela 6: Função dos iões na temperatura de sinterização.	16
Tabela 7: Propriedades das matérias-primas.	20
Tabela 8: Caracterização do porogénio.	20
Tabela 9: Análise da divisão do sal no intervalo desejado.	22
Tabela 10: Propriedades físicas obtidas a partir do método de Arquimedes.	27
Tabela 12: Ordem, reagente e a sua massa para preparar 1000mL de SBF.....	32
Tabela 13: Comparação da concentração de iões entre o plasma e o SBF.....	33
Tabela 14: Resultados obtidos a partir do software LS200, com o módulo da “Variable speed fluid module plus”	36
Tabela 15: Valor de CTE para cada composição.	40
Tabela 18: Propriedades físicas das amostras.....	54
Tabela 17: Resultatos obtidos pelo PIM.	58
Tabela 19: Resultados da resistência à compressão nos corpos de prova com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro, com maturação (C) e sem maturação (S).	60
Tabela 20: Dureza Vickers (HV) das amostras com 100% e 60% de biovidro.	61
Tabela 21: Caracterização mecânica para os diferentes corpos de prova com composição de 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro, com maturação (C) e sem maturação (S).	62
Tabela 22: Resultados obtidos através da análise da propagação de pulsos ultrasónicos nos corpos de prova com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.	63

Lista de Acrónimos

AA	Água absorvida
BCP	Biphasic calcium phosphate (fosfato de cálcio bifásico)
BD	Bulk density (densidade do corpo)
CTE	Coeficiente térmico de expansão
DA	Densidade aparente
Dc	Densidade de compactação
DR	Densidade Relativa
Ds	Densidade de sinterização
DTA	Differential thermal analysis (análise térmica diferencial)
E	Módulo de elasticidade
ECM	Extracellular matrix (matriz extracelular)
EDS	Energy dispersive spectroscopy (espectroscopia de energia de dispersão)
HÁ	Hidroxiapatite
HCA	Hydroxycarbonateapatite (hidroxiapatitecarbonada)
HOC	Osteoblastic cell (células osteoblásticas)
OCP	Octacalcium phosphate (fosfato octacálcico)
PA	Porosidade aparente
PD	Controlador <i>Program Differential</i>
PID	Controlador <i>Program integer differential</i>
PIM	Porosimetria de intrusão de mercúrio
SBF	Stimulated blood fluid (soro fisiológico simulado)
SEM	scanning electronic microscopy (microscopia de varimento)
Tc	Temperatura de cristalização
TCP	Tri-calcium phosphate (tricálcio fosfato)
TG	Termogravimetria
Tg	Temperatura de transição vítrea
Tic	Temperatura inicial de cristalização

VA	Volume aparente
VD	Volume de difusão
XRD	X-Ray diffraction (difração de raios-x)
Y	Regressão linear

1. Introdução

1.1. Introdução

Uma das áreas das Ciências Biomédicas com grande impacto tecnológico são os Biomateriais devido à sua diversidade relacionada com as diferentes composições, técnicas de síntese ou metodologias de processamento, que permitem a obtenção de materiais que mimetizam os tecidos humanos, com uma microestrutura variada proporcionando diversas características, que possibilitam alcançar uma panóplia de funcionalidades. Neste trabalho, realçamos o campo da ortopedia, dando principal ênfase aos biovidros, na qual se verifica uma sinergia entre a área da medicina e da engenharia de tecidos ósseos, projetados para reparar, reconstruir e substituir porções ósseas ((Navarro, Michiardi et al. 2008; Chevalier and Gremillard 2009; Bellucci, Cannillo et al. 2010; Rahaman, Day et al. 2011; Will, Gerhardt et al. 2012).

A necessidade de reconstruções dos tecidos ósseos permitiu o avanço e o aprimoramento técnico do estudo de biomateriais que pudessem substituir ou otimizar os processos tradicionais, designados por enxertos. Existem três tipos de enxertos: autógeno (do próprio indivíduo), alógeno (de indivíduos da mesma espécie) e xenógenos (de espécies diferentes). O enxerto de um osso autógeno apresenta uma notável alternativa biológica pelas suas propriedades osteocondutora e osteoindutora. Porém, existem vários fatores que limitam a sua aplicabilidade nomeadamente, a necessidade de uma área doadora, a reduzida quantidade de tecido ósseo, o custo eminente, bem como, a cirurgia. Por outro lado, os aloenxertos, apesar de serem utilizados com maior frequência, possuem limitações como a possibilidade de contaminação viral, desencadeamento de reações imunológicas e apresenta-se dispendioso. Por sua vez, os enxertos xenógenos possuem características físico-químicas similares aos ossos humanos e recebem tratamentos adequados na tentativa de evitar respostas imunológicas ou inflamatórias adversas (Cannillo and Sola 2009; Dorozhkin 2010; Dorozhkin 2010; Kolk, Handschel et al. 2012).

Os biomateriais sintéticos, como os fosfatos de cálcio, apresentam propriedades físico-químicas controladas, sendo uma alternativa aos enxertos de outras origens. Estes materiais devem garantir a formação de ligações estáveis com o osso neoformado, ao longo do tempo. As hidroxiapatites (HA), o trifosfato de cálcio e os biovidros são exemplos desta classe de materiais (Ducheyne and Qiu 1999; Dorozhkin 2010).

Inicialmente, na área da ortopedia eram utilizadas cerâmicas de hidroxiapatite (HA - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_4$) e fosfato de cálcio nomeadamente, o fosfato de cálcio bifásico (BCP) e o tricálcio de fosfato (TCP) (Ducheyne and Qiu 1999; Emadi, Roohani Esfahani et al. 2010; Nezafati, Moztarzadeh et al. 2011). Estes biomateriais detêm propriedades favoráveis como:

- Biocompatibilidade, uma vez que possuem uma elevada semelhança química e estrutural com o osso;
- Bioinertes;
- Formam estruturas porosas, facilitavam as infiltrações de células favorecendo o crescimento do tecido ósseo.

No entanto, estes possuem várias desvantagens que impossibilitavam a sua utilização designadamente: a fragilidade, a dificuldade de moldar para implementação, a falta de suporte estrutural provocada pela rápida reabsorção em função da macroporosidade (Xu, Weir et al. 2006). Embora a HA seja muito semelhante à fase mineral do osso e possa ter sido observado como sendo uma configuração eficaz de substituição de enxertos, é difícil controlar a degradação do material (Charriere, Lemaitre et al. 2003) . Com isto, era necessária a descoberta de um novo biomaterial com características mais apropriadas (Charriere, Lemaitre et al. 2003; Xu, Burguera et al. 2007; Liu, Morra et al. 2008; Emadi, Roohani Esfahani et al. 2010; Emadi, Tavangarian et al. 2010; Rahaman, Day et al. 2011).

No final da década de 60, um novo advento proporcionou mudanças significativas no conceito das aplicações das biocerâmicas, o surgimento de vidros bioativos. Esta descoberta pioneira surgiu com Larry Hench que definiu um biomaterial como sendo: "um material bioativo capaz de eliciar uma resposta específica na interface do material resultando na formação de uma ligação entre este e o tecido circundante" para fins biomédicos. Um dos exemplos é o Bioglass 45s5[®], vidro quaternário $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$, figura 1, que tem despoletado grande interesse devido às características que este acarreta na regeneração e na cartilagem óssea. É de notar, que o tecido ósseo é constituído por dois tipos de texturas ósseas: o osso trabecular, no qual reside um elevado número de células por volume na sua superfície, o que determina a atividade metabólica e que permite cerca de 80% para a sua remodelação, devido à sua elevada porosidade; e o osso cortical que não possui tanta atividade, mas oferece resistência ao osso de modo a reduzir o número de fraturas, uma vez que possui uma reduzida porosidade. Como o Bioglass 45s5[®] possui capacidade de promover uma ligação química através de um vínculo apatítico com o tecido ósseo este possui algumas analogias com o osso trabecular. Com o seu desenvolvimento nasceu o conceito de bioatividade e acelerou-se toda a investigação no campo dos materiais para implantes ósseos (Chen, Thompson et al. 2006; Hench 2006; Cannillo and Sola 2009; Bellucci, Cannillo et al. 2010; Hench, Day et al. 2010; Bellucci, Cannillo et al. 2011).

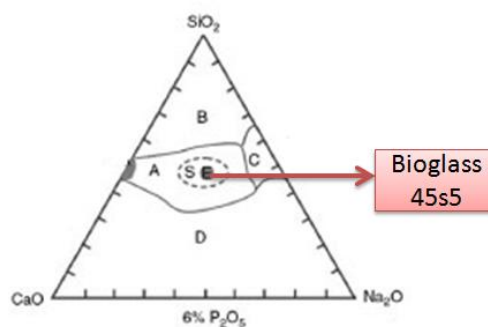


Figura 1: Localização do Bioglass 45s5[®] no diagrama de Hench que relaciona a composição com a bioatividade :

- A- Ligação com o tecido ósseo;
- B- Não ocorre ligação com o tecido ósseo (baixa reatividade);
- C- Não ocorre ligação com o tecido ósseo (elevada reatividade);
- D- Não ocorre ligação com o tecido ósseo (não forma vidro);
- E- Composição do Bioglass 45s5[®];
- S- Ocorre ligação com o tecido ósseo.

Através de uma revisão da literatura verificou-se que o Bioglass 45s5[®] apresenta algumas limitações e que uma das formas de superar será através da adição de óxidos, nomeadamente o óxido de potássio e o óxido de magnésio (Rahaman, Brown et al. 2006). A adição destes óxidos modificadores de rede permite a criação de vidros progressivamente mais reativos. Assim, o biomaterial base selecionado para o presente trabalho, foi o 6P53-b que irá ser descrito ao longo deste capítulo.

1.2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é, partindo de uma revisão bibliográfica, demonstrando a empregabilidade do biovidro como substituto ósseo, compreender a sua síntese, e caracterização comum, avaliar a metodologia para a melhoria das suas propriedades mecânicas, assim como a não toxicidade que este apresenta. Com isto efetuou-se:

- Revisão bibliográfica para avaliar qual o melhor biomaterial mais adequado para ser utilizado em aplicações ortopédicas de elevada porosidade;
- Fabrico pioneiro da matéria-prima na Universidade da Beira Interior;
- Caracterização da matéria-prima;
- Melhoria da composição inicial através da adição de óxidos;
- Aprendizagem de novas metodologias de síntese e de caracterização;
- Identificação de novos caminhos melhorando a composição e consequentemente propriedades.

1.3. Escolha da composição

O Bioglass 45s5[®], o bioK e o 6P53-b são os três biovidros que possuem uma composição melhor em prol dos objetivos deste trabalho. Nesta secção irá justificar-se o porquê da escolha do biovidro 6P53-b, demonstrando que dos três é o que reúne as melhores condições, sempre demonstrando as diferenças em relação ao bioK e ao Bioglass 45s5[®]. Da análise da tabela1 verifica-se que, os biovidros são constituídos por diferentes óxidos, sendo estes divididos em três grupos:

- **Modificadores de rede** - auxiliam na formação da rede modificando-a seguindo a alteração das suas propriedades;
- **Criadores de rede** - não arquitetam a rede, mas ocupam os interstícios na estrutura da rede, normalmente são utilizados os elementos alcalinos ou alcalino-terrosos;
- **Intermediários** - por si só não concebem o vidro, no entanto, são incorporados na rede de criadores de vidro.

Tabela 1: Composição de três tipos de biovidros (em percentagem mássica)

Composição	45s5	bioK	6P53-b
Na ₂ O	24,5	0	9,8
K ₂ O	0	24,4	1,8
MgO	0	0	15,2
CaO	24,5	26,9	19
SiO ₂	45	46,1	51,9
P ₂ O ₅	6	2,6	2,5

O Bioglass 45s5[®] beneficia de uma composição quaternária, como se encontra referenciado na tabela anterior, sendo esta responsável pela bioatividade devido ao baixo teor de sílica, elevado conteúdo de CaO e Na₂O e elevada razão CaO/ P₂O (Bellucci, Cannillo et al. 2011; Rahaman, Day et al. 2011) .

Apesar das suas características favoráveis de bioatividade deparamo-nos num problema de propriedades mecânicas. Pela análise de outras composições presentes na literatura e através da análise da tabela2, verifica-se que o biok possui propriedades mecânicas mais favoráveis

que o Bioglass 45s5[®] e, como o objetivo é melhorar as propriedades mecânicas do biovidro, descartamos esta composição e efetuamos um estudo da literatura em função do bioK (Rahaman, Brown et al. 2006) .

Tabela 2: Propriedades mecânicas típicas do bioK e do Bioglass 45s5[®] .

	Dureza (HV)	Resistência à compressão (MPa)	Módulo de Young (GPa)
45s5 [®]	2,5	0,3	83,4
bioK	2,54	0,32	84,2

Averiguando a composição do bioK em relação ao biovidro anterior, verifica-se a substituição do Na₂O pela adição do K₂O. Com estas modificações, as propriedades mecânicas melhoraram, pelo que a presença do óxido potássio irá ter um papel ativo no melhoramento da resistência da nossa matriz (Rahaman, Brown et al. 2006; Cannillo and Sola 2009; Bellucci, Cannillo et al. 2010; Bellucci, Cannillo et al. 2011).

Segundo a literatura, deve-se suceder um equilíbrio estável através da composição, correlacionando a bioatividade com as propriedades mecânicas para obter um biomaterial com características favoráveis. Deste modo, verifica-se que a remoção do óxido de sódio não é favorável, pois a sua ausência provocará uma redução do poder desvitrificação, bem como a redução da durabilidade química. Como foi enumerado anteriormente, cada óxido possui uma função, neste caso importa-nos ter na composição modificadores de rede para atingirmos as propriedades mais vantajosas, por isso, deve manter-se o óxido de potássio e acrescentar o óxido de magnésio, visto que este promove a redução da taxa de degradação do scaffold e atua de uma forma significativa na melhoria da biocompatibilidade como será descrito posteriormente no esquema da figura 2 (Baino and Vitale-Brovarone 2011).

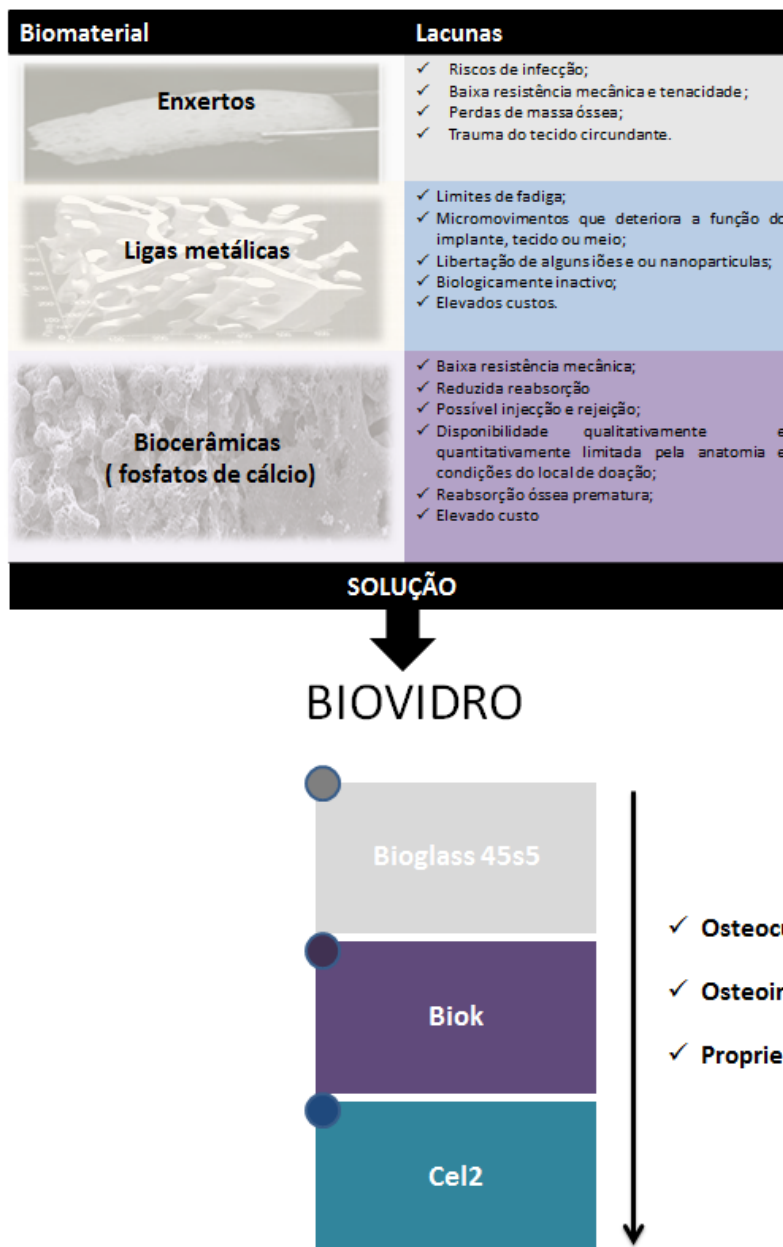


Figura 2 : Esquema síntese da análise do estado de arte e do uso dos três vidros bioativos.

1.4. Características do *scaffold*

Para além do Biomaterial, a componente chave na engenharia dos tecidos para regeneração óssea é o uso de scaffolds temporários, matrizes extracelulares artificiais capazes de conduzir e suportar a regeneração do tecido de uma forma tridimensional (3D). Estes devem assemelhar-se à morfologia óssea, assim como à sua estrutura com o fim de otimizar a integração do tecido circundante. Devido à sua capacidade, este deve cingir determinadas características, nomeadamente:

- **Biodegradabilidade** - a velocidade de reabsorção/degradação deve ser compatível com a velocidade de formação óssea, para que a redução da resistência do material seja compensado pelo aumento da resistência do osso formado;
- **Homogeneidade da estrutura, boa distribuição espacial e 50 a 60% do seu volume deve ser ocupado pela porosidade;**
- **Biocompatibilidade** - não ser tóxico para o corpo humano, não ocorrendo ataques do sistema imunitário, promover a adesão e proliferação celular.
- **Propriedades mecânicas** - comparáveis e equivalentes com o tecido humano, fornecendo um apoio pelas fases iniciais, às transferências de carga e no processo de criação do novo tecido;
- **Osteocondutores e Osteoindutores** - sendo veículos de entrega de citocinas e fatores de crescimento que facultam a produção de uma matriz óssea;
- **Superfície áspera** - melhorar o processo de adesão celular e de proteínas (Vitale-Brovarone, Baino et al. 2009; Li, Cai et al. 2011; Kolk, Handschel et al. 2012).

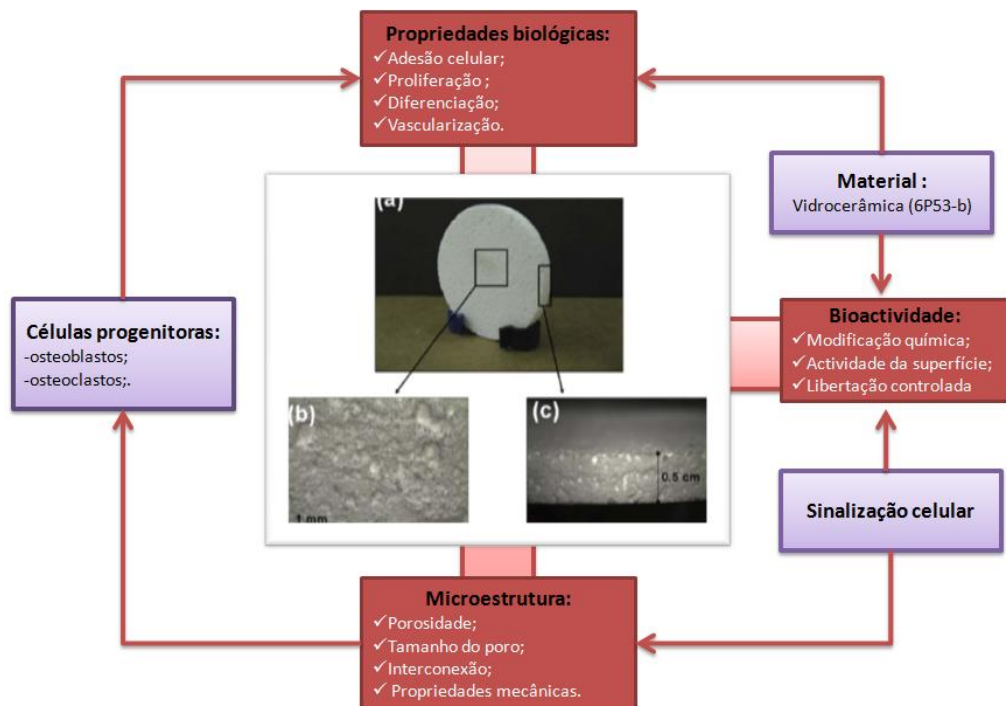


Figura 3: Esquema síntese das propriedades necessárias que um *scaffold* deve possuir.

1.5. Arquitetura do *scaffold*

A incursão do tecido ósseo em implantes é afetada pela geometria 3D e pela osteocondutividade da composição do material. Segundo a literatura, o *scaffold* deve possuir uma estrutura porosa com tamanho de macroporo compreendido entre os 100 e 400 μ m, para

ocorrer: o processo de mineralização óssea pela cativação das células osteogénicas (células osteoblasticas e células osteoclasticas), vascularização (reservatório e canalização para células ósseas) e difusão de nutrientes para a matriz extracelular (ECM) (Karageorgiou and Kaplan 2005; Padilla, Sánchez-Salcedo et al. 2007; Yun, Park et al. 2011). Contudo, na estrutura os macroporos devem apresentar-se interconectados, com finalidade de ser empregues com a função de canais para o transporte de fluidos corporais, vasos e células osteogénicas. Todavia, quanto maior for o número de canais conectados aos poros, melhor será o acesso do fluído corporal ao centro do scaffold e melhor será a eficácia da atividade celular para a ocorrência da formação de um vínculo que possibilita conceber uma certa densidade e criar uma ligação eficiente das células ao scaffold. O tamanho mínimo de interconexão entre os poros é de 20 μm podendo ser expandido até aos 40 μm , sendo este último o valor mais favorável, pois possibilita uma melhor penetração celular para assegurar a formação óssea. As interconexões de 100 μm , mesoporos, nem sempre são favoráveis, pois devem possuir um valor inferior aos poros. Por sua vez, os suportes porosos também possuem uma microporosidade, geralmente inferior a 10 μm , que promove a adesão de proteínas (Tadic, Beckmann et al. 2004; Tancret, Bouler et al. 2006; Chevalier, Chulia et al. 2008; Malasoma, Fritsch et al. 2008; Marques, Almeida et al. 2009; Deb, Mandegaran et al. 2010; Murphy, Haugh et al. 2010).

A porosidade representa a percentagem de espaços vazios num sólido, sendo esta uma propriedade morfológica independente do material. Os poros possibilitam a migração e a proliferação dos osteoblastos e das células mesenquimais, bem como a vascularização. Com isto, verifica-se que a presença de elevada porosidade facilitará o processo de osteogénese.

A permeabilidade dos scaffolds é confrontada com o grau de interconectividade dos macroporos, tal deve-se ao fato desta quantificar a capacidade do meio poroso para transmitir o fluido através dos macroporos conectados, quando submetidos à pressão, podendo, deste modo, controlar o fluxo de nutrientes para as células que migram através do scaffold (Ochoa, Sanz-Herrera et al. 2009; Dias, Fernandes et al. 2012).

1.5.1. Agente Porogénico

Um dos métodos clássicos empregues na criação de macroporosidade é a utilização de um porogénio solúvel que quando se procede à sua lixiviação, devido à sua elevada solubilidade, este é removido dando o tamanho e a forma aos macroporos (Hou, Grijpma et al. 2003; Cannillo, Chiellini et al. 2010; Newby, El-Gendy et al. 2011). Neste trabalho, o porogénio empregue é o cloreto de sódio (sal), com características bem conhecidas:

- Granulometria- as dimensões atribuídas aos macroporos devem-se aos espaços vazios aquando da remoção do sal, pois os valores de porosidade são semelhantes; a diferença entre as partículas de sal e do vidro são fundamentais, para ocorrer

fenómenos de resistência uma vez que, quanto maior for a diferença da granulometria entre estes dois compostos, maior será a resistência atribuída ao scaffold e, para ocorrer fenômenos de coalescência, as partículas de vidro tem que ser inferior às partículas de sal;

- Solubilidade- o biovidro não é solúvel em água, permitindo que apenas as partículas de sal sejam removidas durante a lixiviação;
- Temperatura de fusão - A temperatura de fusão do sal deve ser superior à temperatura de cristalização do biovidro para que não ocorra qualquer tipo de reação e/ou formação de novas fases durante a sinterização do biovidro (Murphy, Dennis et al. 2002; Liang and Rüssel 2006; Tran, Naseri et al. 2011).

1.6. Bioatividade

A bioatividade dos vidros é atribuída à formação de uma camada policristalina de aglomerados de HA na superfície do biovidro num ambiente fisiológico, sendo esta influenciada pela composição do biomaterial e pela sua área de superfície. HA é quimicamente e estruturalmente semelhante ao mineral fosfato de cálcio presente no tecido ósseo humano, por conseguinte, os osteoblastos conseguem proliferar na camada de HA, facultando a formação de um forte vínculo no osso circundante. A bioatividade é testada *in vitro* para investigar a capacidade do biomaterial formar uma camada de HA quando embebida num *stimulated blood fluid* (SBF) - solução acelular com concentração de iões inorgânicos semelhante ao plasma (Vitale-Brovarone, Verné et al. 2008; Saboori, Rabiee et al. 2009; Shih, Chen et al. 2010; Doostmohammadi, Monshi et al. 2011; Vitale-Brovarone, Baino et al. 2012).

Pelas características intrínsecas e de natureza distinta dos diferentes biovidros é de aguardar que estes manifestem índices distintos de bioatividade, isto é, diferentes tempos para o estabelecimento do vínculo com o tecido. Contudo, sabe-se pela literatura que a bioatividade é limitada pela composição, tal pode ser melhorado com um acréscimo da área de superfície, que pode ser atingido tanto pelo processamento em diferentes formas e morfologias, como pela metodologia de síntese empregue, uma vez que, o silício conserva os elevados índices de bioatividade (Rahaman, Day et al. 2011).

Os iões mencionados anteriormente encontram-se envolvidos no metabolismo ósseo, no processo de mineralização e na angiogénese. A compreensão do papel de cada ião em determinadas concentrações e taxas de libertação levam à conceção de vidros bioativos que podem exercer funções tanto na regulação óssea como no controlo genético sobre o ciclo celular dos osteoblastos (as células progenitoras realizam sucessivas mitoses e recebem estímulos do ambiente para instruí-las a entrar em segmentos do ciclo celular) e impulsionar

uma rápida expressão de genes que regulam a osteogénese, e a produção de fatores de crescimento (Gorustovich, Roether et al. 2009; Vitale-Brovarone, Ciapetti et al. 2010; Hoppe, Guldal et al. 2011; Li, Cai et al. 2011). Na tabela seguinte faz-se uma síntese da atividade biológica.

Tabela 3: Atividade biológica correspondente a cada ião.

lão	Atividade biológica	Referências
P	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula a expressão da matriz proteica GLA (MGP), sendo este um regulador chave para a formação de células osteoblásticas quando adicionado a uma cultura de células; • Mineralização da matriz extracelular; • Quanto maior a concentração destes iões mais rápida é a deposição de fosfato de cálcio; 	(Hoppe, Guldal et al. 2011)
Mg	<ul style="list-style-type: none"> • Essencial para a estimulação e metabolismo ósseo; • Interage com as integrinas das células osteoblásticas que são responsáveis pela estabilidade e adesão celular; • Diminui a taxa de degradação; • a depleção de Mg prejudica o crescimento, aumenta a reabsorção e ocorre uma perda do osso trabecular; • Atua na diferenciação dos osteoblastos devido ao aumento da expressão do colagénio tipo I sintetizado pelas células osteoblastos (HOC) e marcadores osteogénicos, osteocalcina, ALP e runX. 	(Huan, Zhou et al. 2010; Hoppe, Guldal et al. 2011; Li, Cai et al. 2011)
Si	<ul style="list-style-type: none"> • Essencial no processo de calcificação e formação óssea; • Induz à precipitação de HCA e mineralização; • Aumenta a taxa de dissolução iónica; • Estimula a formação de colagénio I em células osteoblastos (HOC) bem como a sua diferenciação 	(Hoppe, Guldal et al. 2011)
Ca	<ul style="list-style-type: none"> • Diferenciação e proliferação dos osteoblastos e mineralização da matriz extracelular (ECM); • Essenciais nas vias de sinalização que ocorrem no metabolismo ósseo. 	(Hoppe, Guldal et al. 2011; Li, Cai et al. 2011)
K e Na	<ul style="list-style-type: none"> • Não tem um papel ativo na atividade biológica 	-----

Um aspeto importante a salientar é que a resposta celular não depende unicamente da composição química, mas também de outras características nomeadamente a rugosidade da superfície, porosidade, tamanho do grão e a cristalinidade do *scaffold* (Vitale-Brovarone, Baino et al. 2012).

1.6.1. Método da bioatividade

Kokubo et al. propõe uma solução tampão de concentração iónica muito semelhante ao plasma, designadas de SBF, que visa o estudo das propriedades bioativas dos biomateriais. O grau de bioatividade é classificado segundo o tempo necessário para que ocorra o aparecimento da camada de HCA. Assim, quanto maior for a bioatividade menor será o tempo de interação entre a interface matriz/tecido ósseo, o que permitirá alcançar uma maior força de adesão entre esta e, por conseguinte, alcançar valores superiores de propriedades mecânicas (Vitale-Brovarone, Baino et al. 2009).

Quando a amostra se encontra submersa em SBF, ocorre fenómeno de lixiviação de iões envolvendo a troca de catiões monovalentes, iões de sódio ou potássio a partir do biovidro com H_3O^+ da solução, conduzindo ao aumento do valor de pH. Sabe-se que os osteoblastos preferem meio ligeiramente alcalino, mas também é conhecido, que variações drásticas no pH inibem a atividade dos osteoblastos, podendo originar necrose celular ou apoptose (Vitale-Brovarone, Verné et al. 2007). Por isso, a escolha de biovidro, torna-se mais plausível, pois este biovidro possui uma composição com um menor teor de óxidos monovalentes e um conteúdo superior de pentóxido que nos permitirá manter valores de pH mais ou menos constantes dentro da gama do alcalino (Kokubo and Takadama 2006; Vitale-Brovarone, Verné et al. 2008; Bohner and Lemaitre 2009; Varanasi, Saiz et al. 2009; Verné, Bretcanu et al. 2009; Varila, Fagerlund et al. 2012).

1.6.2. Fenómenos de cristalização da HCA segundo o modelo proposto por Hench

Apesar de haver diferentes modelos de composição do biovidro, o mecanismo de formação de HCA envolve alguns factos análogos (tabela 4). Um exemplo deste acontecimento deve-se à presença de sílica que é necessária para ocorrer a nucleação de HCA dentro dos prazos.

Tabela 4: Modelo proposto por Hench apresentado os diferentes fenômenos, reações e efeito atribuído em cada fase no processo de formação de HCA (Gerhardt and Boccaccini 2010; Bellucci, Cannillo et al. 2011; Newby, El-Gendy et al. 2011).

Fase/Fenômenos	Reações	Efeito
1. Reação entre os íons alcalinos (Na ⁺ e Ca ²⁺) e os íons H ⁺ da solução	$Si-O-Na^+ + H^+ \rightarrow Si-OH + Na^+ (aq)$	<ul style="list-style-type: none"> Hidrólise da sílica e formação do silanol (Si-OH) Aumento do pH devido ao consumo dos íons H⁺
2. Dissolução da sílica	$Si-O-Si + H_2O \rightarrow Si-OH + OH-Si$	<ul style="list-style-type: none"> Aumento da concentração de sílica
3. Condensação e polimerização dos grupos de silanol	$Si-OH + Si-OH \rightarrow Si-O-Si + H_2O$	<ul style="list-style-type: none"> Diminuição dos íons alcalinos; Formação da camada de gel de sílica à superfície
4. Migração do Ca ²⁺ e PO ₃ ⁴⁻ para a superfície da camada de gel de sílica	-----	<ul style="list-style-type: none"> Formação de HCA à superfície da camada de gel de sílica
5. HCA incorpora OH ⁻ e CO ₃ ²⁻	-----	<ul style="list-style-type: none"> HCA cristaliza

De seguida, ocorre a adsorção de fatores de crescimento com proliferação e diferenciação osteoblástica que originará uma matriz rica em colagénio que mineraliza e forma os nanocristais de HCA.

A presença camada de sílica-gel é fundamental à superfície para que ocorra os fenômenos de cristalização e nucleação de HCA. As diferentes fases alistadas na tabela anterior ocorrem ao longo da interface matriz/tecido não depende da presença do tecido, pois estas realizam-se da mesma forma em soluções tamponadas, soro fisiológico simulado SBF (Gerhardt and Boccaccini 2010; Newby, El-Gendy et al. 2011).

Quando a razão de formação de HCA é muito lenta geralmente não ocorre a ligação entre o biomaterial e o tecido ósseo, considerando-se que o biomaterial não apresenta bioatividade. As alterações da composição do biomaterial afetam principalmente as fases 4 e 5, assim

ocorrerá alteração nas características que permitem os fenômenos de ligação, inibição ou reabsorção. O aumento da estabilidade das ligações na interface matriz/tecido, assim como a melhor fixação bioativa possibilitam o aumento do tempo de vida útil do *scaffold*.

1.7. Sinterização e cristalização

Para obter com o sucesso os corpos de prova de biovidro é necessário entender o processo de sinterização assim como a sua interação com a cristalização. Este método pode ser definido como o processo no qual pequenas partículas são ligadas por difusão no estado sólido. Geralmente a etapa de sinterização é realizada de acordo com programas definidos previamente com controladores de temperatura (PD,PID) incorporados em fornos elétricos, em atmosferas controladas. Este mecanismo é controlado tanto pela superfície como pelo volume de difusão dos contornos das partículas como pode ser visualizado na figura 4. Em suma, quando os sólidos são sujeitos a elevadas temperaturas, os iões/átomos constituintes da amostra são orientados para preencher os poros e canais abertos entre os grãos das partículas, bem como para compensar as diferenças de energia superficial, entre as suas superfícies convexas e côncavas. Em fases iniciais, os grãos formam-se e crescem entre as partículas e estrutura da rede em regiões mais instáveis entre as partículas e impetração de compactos para a obtenção de um biomaterial denso densidade dos compactos, diminuindo desta forma o volume total de espaços vazios (Bellucci, Cannillo et al. 2010; Reinoso, Rubio-Marcos et al. 2010). À medida que os poros e os canais abertos são fechados durante o tratamento térmico, as partículas ficam firmemente unidas e a força da densidade e resistência à fadiga da amostra melhoram em flecha. Durante este processo, verifica-se um encolhimento das amostras o qual deve ser contemplado no processo de fabrico. Este método é considerado fulcral para a densificação devido à criação de ligações químicas na estrutura da rede em regiões mais instáveis entre as partículas e impetração de compactos para a obtenção de um biomaterial denso (Upadhyaya 2001; Huang, Pan et al. 2008; Dorozhkin 2010).

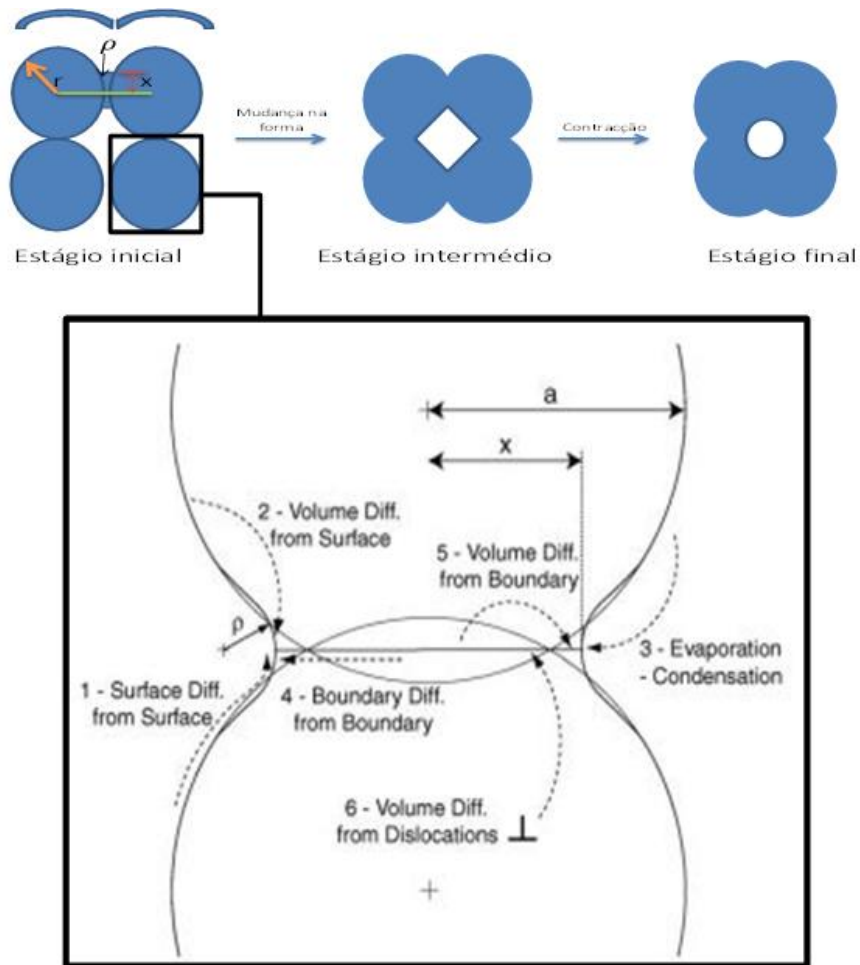


Figura 4: Alterações da amostra com o processo de sinterização (Goodall, Depois et al. 2006):

Estágio inicial - Formação de contactos entre as partículas seguida de mecanismos de difusão volumétrica (DF -difusão através dos poros) de massa promovendo a ligação entre as partículas.

Estágio intermédio- densificação do compacto e diminuição do diâmetro dos poros interligados. Os poros tornam-se cada vez mais esféricos.

Estágio final - isolamento e eliminação gradual dos poros residuais.

A cristalização é o processo de formação de uma fase sólida onde sobrevém a reorganização da rede tridimensional do biomaterial, a partir de uma fase estruturalmente desorganizada amorfa. Geralmente, este processo advém do seguimento de uma lenta nucleação na superfície e um rápido crescimento dos núcleos, sendo por isso necessário uma boa definição dos comportamentos térmicos do biovidro, a fim de prever a natureza, as fases e o grau de cristalização associado ao processo de sinterização (Bretcanu, Chatzistavrou et al. 2009).

A nucleação é o processo chave do controlo da cristalização, uma vez que é o passo inicial da transformação de fases (Höland, Rheinberger et al. 2003; Lefebvre, Chevalier et al. 2007) . Caso não ocorra nucleação, não há crescimento de cristais o que bloqueia o processo de cristalização. Os parâmetros típicos empregues para a nucleação e crescimento dos cristais são importantes para a caracterização das propriedades a elevadas temperaturas. A estabilidade dos biovidros contra a cristalização mediante a sinterização é muitas vezes

descrita com valores relativos calculados a partir da temperatura de cristalização (Fokin, Zanotto et al. 2006). A forma e o crescimento dos cristais são descritos pelo método de Avrami que indica a massa cristalizada (n):

$$n = \frac{2.5 \times R \times T_p^2}{\Delta_t \times E} \quad (\text{eq.1})$$

Onde: R - constante dos gases, T_p - valor da temperatura corresponde à cristalização, ΔE - energia de ativação e Δ_t - metade da largura do pico exotérmico do DTA. Quando o valor $n \sim 1$, a cristalização tende a ocorrer a partir de superfície, quando o $n \sim 3$ ocorre uma cristalização volumétrica.

$$\ln\left(\frac{\alpha}{T_p^2}\right) = -\frac{E}{RT_p} + \text{const} \quad (\text{eq.2})$$

Onde E - energia de ativação (kJ/mol), α - taxa de aquecimento (K/min), T_p pico da temperatura de cristalização e R - constante (8,32 J/kmol). Esta equação permite-nos obter o valor da energia de ativação (E) que também pode ser obtido a partir do declive da curva (Bretcanu, Chatzistavrou et al. 2009; Kashyap, Griep et al. 2011; Fagerlund, Massera et al. 2012).

Uma das formas de reduzir o processo de cristalização consiste na utilização de uma elevada taxa de resfriamento a qual designamos por choque térmico, pois permite a reorganização continua num menor espaço de tempo e volume o que requer uma menor energia do sistema (Khalil and Almajid 2011). É importante frisar que fenómenos de cristalização reduzem a densificação das trabéculas. A estrutura vítrea é atingida no intervalo de transição vítrea (T_g) sucedendo este intervalo antes da temperatura de iniciação da cristalização (T_{ic}) (Romero, Kovacova et al. 2008; Breed and Hall 2012; Duée, Désanglois et al. 2012; Sola, Bellucci et al. 2012).

Este valor de T_g pode ser obtido através da seguinte equação segundo o método de Hupa et all:

$$T_g(^{\circ}\text{C}) = A + B[\text{SiO}_2] + C[\text{Na}_2\text{O}] + D [\text{K}_2\text{O}] + E[\text{CaO}] + F[\text{MgO}] + G[\text{P}_2\text{O}_5] \quad (\text{eq.3})$$

Onde os parâmetros de [A, G], alistados na tabela 5, corresponde à fração molar do composto (O'Donnell 2011). O melhor método de análise de T_g é através da extrapolação da análise térmica diferencial (DTA). A cinética de cristalização deve ser bem controlada para a obtenção do biovidro com cristalização reduzida, para adquirir a dependência dos cristais em função do tempo e/ou temperatura em condições isotérmicas, é empregue a DTA (Salem, Jazayeri et al. 2009).

Tabela 5: Valores dos coeficientes atribuídos a cada óxido.

Óxido	Intervalo (%mol)	Parâmetro	Valor
-	-	A ₍₁₎	-309,26
SiO ₂	37,3-68,4	B	10,34
Na ₂ O	4,8-29,6	C	1,58
K ₂ O	0,0-10,1	D	2,30
CaO	0,0-27,4	E	10,89
MgO	0,0-23,1	F	7,88
P ₂ O ₅	0,0-9,3	G	12,56

(1)- parâmetro de substituição

A alteração da composição do biovidro altera a temperatura de sinterização, mas também as fases cristalinas, favorecendo o controle e a desvitrificação (tabela 6) (Bellucci, Cannillo et al. 2011).

Tabela 6: Função dos íons na temperatura de sinterização.

Íon	Função	Referência
K	Facilita o processo de desvitrificação	(Bellucci, Cannillo et al. 2011; Salman, Salama et al. 2011)
Mg	Aumenta a diferença entre T _g e T _c que atenua a fase de cristalização.	(Watts, Hill et al. 2010; Bellucci, Cannillo et al. 2011; O'Donnell 2011)
Na	Diminui o valor de T _g para aumentar a janela entre este e a T _c	(Wallace, Hill et al. 1999)

1.8. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dependem do tipo de material, da microestrutura e do seu método de fabrico.

Uma das áreas de interesse na otimização da estrutura é a grande limitação do Biovidro pela sua reduzida resistência para suportar cargas multiaxiais e cíclicas impostas pelo meio. Esta limitação deve-se à presença da camada porosa que leva à diminuição da resistência e do seu

módulo de elasticidade. Para colmatar as exigências do valor relativamente elevado de porosidade, aposta-se que o uso do sal como porogénio possa reduzir a fragilidade que a porosidade oferece à estrutura. Durante o processo de sinterização, as partículas do sal asseguram um suporte adequado as paredes do poro e mantém a sua forma até ser alcançado uma densificação adequada de suporte do vidro. Este pode ser obtido pela formação de trabéculas, que irá acarretar um reforço mecânico às paredes dos macroporos. Durante o processo de lixiviação ocorre a remoção do sal que altera a sua estrutura na presença da água e promove modificações da conformação do material. Essas modificações afetam as ligações intra e intermoleculares do biomaterial, ocorrendo ligações do sal com iões que irão contribuir para a formação de *cross-linking*. A presença do sal levará ao aumento da resistência e densificação do *scaffold* (Bellucci, Cannillo et al. 2010; Dorati, Colonna et al. 2010; Bellucci, Cannillo et al. 2011).

Além da porosidade, há um grande grau de incertezas relativas à sua química (alterações nas propriedades mecânicas devido a reações existentes com fluidos corporais) e comportamento mecânico (efeito da resistência mecânica sobre a taxa de dissolução dos materiais). Com isto, verifica-se uma ausência de compreensão da relação entre as propriedades mecânicas dos biovidros e a sua bioatividade. Melhorar as propriedades mecânicas sem alterar a bioatividade dos biovidros é primordial, isto permitirá efetuar uma coligação entre o conhecimento elementar e a melhoria do biomaterial. Através da análise da literatura, optou-se pela adição do MgO e do K₂O ao sistema quaternário para melhorar a relação bioatividade/propriedades mecânicas. Como já foi referido, a presença do magnésio irá ajudar no metabolismo ósseo, mas também irá atuar como o reforço visto que este entra na constituição óssea. A utilização de óxido de potássio permitirá influenciar o reforço das propriedades mecânicas.

A microestrutura pode ser obtida por um processo de sinterização, onde a cristalização e a densificação da matéria ocorre durante o processo de queima (Amaral, Lopes et al. 2002; Khalil and Almajid 2011). No entanto, é necessário controlar o processo de cristalização, uma vez que, este irá trazer repercussões na bioatividade. É de salientar, que o efeito da temperatura sobre a bioatividade dos vidros tem sido discutido na literatura, não apresentando ainda consenso entre diferentes autores (Gerhardt and Boccaccini 2010).

Independentemente da técnica aplicada na deposição, a incompatibilidade da expansão térmica é esperada para induzir elevadas tensões de tração residual no revestimento que podem causar escassez da adesão na interface. O coeficiente de expansão térmica (CTE) altera-se na presença de óxidos, isto é, a adição de óxidos na composição de um biovidro irá alterar o seu valor de CTE. A adição de MgO e K₂O diminuirá o valor de CTE, tal deve-se ao papel de cada um, visto que, são agentes como modificadores de rede. Esta diminuição do seu valor irá promover a expansão (Breed and Hall 2012).

2. Materiais e métodos

Neste capítulo são descritos todos os processos e etapas de manufatura e caracterização dos materiais utilizados neste trabalho. Na figura 5 representa-se um fluxograma de todas as fases deste longo projeto.

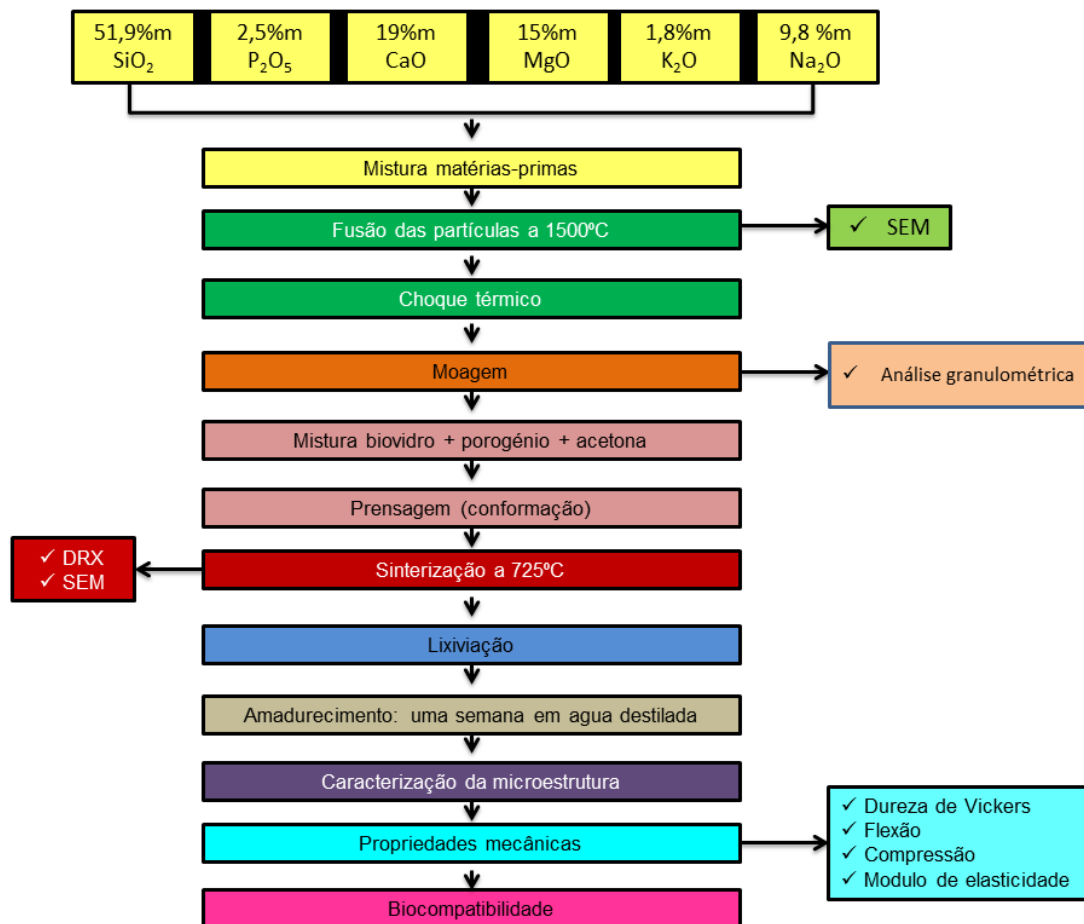


Figura 5: Fluxograma ilustrativo das diferentes etapas deste trabalho.

2.1. Caracterização das matérias-primas

Nas tabelas 7 e 8 descreve-se as características das matérias-primas. A partir da mistura destas matérias-primas obteve-se o vidro bioativo com a adição do porogénio, permitindo a manufatura dos corpos de prova finais.

Tabela 7: Propriedades das matérias-primas.

Óxidos	Massa (%)	Pureza (%)	Densidade (g/cm ³)	Fornecedor
CaO	19	96-100	3,3	Sigma-Aldrich
P ₂ O ₅	2,5	≥ 98,0	2,3	Sigma-Aldrich
SiO ₂	51,9	≥ 99,0	2,6	Sigma-Aldrich
MgO	15		3,58	José M. Vaz Pereira, S.A.
K ₂ CO ₃	1,8	≥ 99,0	2,248	Sigma-Aldrich
Na ₂ O	9,8	< 20	2,27	Sigma-Aldrich
Propriedades típicas	Densidade teórica (g/cm ³)			2,82
	Tamanho médio das partículas			40µm

Tabela 8: Caracterização do porogénio.

Porogénio	Massa (%)	Pureza (%)	Densidade (g/cm ³)	Fornecedor
NaCl	40			
	50	≥ 99,5	2,17	Sigma-Aldrich
	60			

2.2. Preparação da amostra

As diferentes matérias-primas da tabela 7 foram pesadas, numa balança oertling (capacidade até 200g e resolução máxima de 0.0001g), misturadas de forma homogénea e inseridas num cadinho de alta alumina da Sigma-Aldrich de modo a ocupar 2/3 do seu volume.

O cadinho é colocado numa mufla de modelo NLR da TermoLab com controlador 3216 eurotherm (volume útil 200x200x300mm³) com uma taxa de aquecimento de 5°C/min. A velocidade de aquecimento é monitorizada por um programa (itools, www.eurotherm.com) por forma a controlar o ciclo de fusão.

De seguida, a matéria-prima fundida a 1500°C é vertida em água para efectuar um choque térmico para evitar fenómenos de cristalização, obtendo-se assim, fritas amorfas (figura 6). De seguida processa-se uma decantação e as fritas são lavadas com acetona ($\geq 99\%$ pureza).



Figura 6: Imagem do processo do vazamento do biovidro fundido a 1500°C para água.

2.3. Análise granulométrica

2.3.1. Partículas de vidro

As fritas de vidro são sujeitas a um processo de moagem do biovidro através de um moinho automático de zirconia da retsch ou num moinho de bolas de modo a obter partículas com um tamanho $\leq 40\mu\text{m}$. A distribuição do tamanho das partículas é avaliada por um analisador de difração a laser (Coulter) que utiliza uma estreita quantidade de pó que é dispersa em água destilada que será bombeada continuamente através de uma célula a qual será sujeita um feixe de laser e retorna, de seguida, para uma câmara de agitação formando ciclos contínuos de 60 segundos. A média do sinal de difração de 60 segundos é registada para que o analisador de partículas de Coulter controlado pelo software LS200, com o módulo “Variable speed fluid module plus” para obter a curva para a distribuição granulométrica do vidro.

2.3.2. Sal

Dado que o intervalo de interesse encontra-se entre os 425 e 212 μm (grandeza de porosidade desejada) foi necessário um processo de peneiração foi executado num agitador de peneiros retsch, modelo AS 200 control 'g', com peneiros de 200mm de diâmetro que permite o controlo da amplitude, tempo intermediário e tempo global de acordo com a norma DIN-ISO331011. Este método promove a divisão de pós em sucessivos intervalos limitados pela

abertura de uma bateria de peneiros. Os peneiros empregues para esta divisão apresentam-se na tabela 9. Deste modo, o sal comercial foi aproveitado aproximadamente 80%.

Tabela 9: Análise da divisão do sal no intervalo desejado.

Abertura das malhas dos peneiros (μm)	850	600	425	300	212	150	106	75
Massa (g)	0.0130	6.2148	27.0590	34.2153	26.9633	8.5894	1.5562	0.822
Massa (%)	1.27×10^{-4}	0.061	0.264	0.333	0.262	0.084	0.015	0.008

2.4. Análise térmica

2.4.1. DTA e TG

O DTA (análise térmica diferencial) corresponde à diferença de temperatura da amostra do material de referência é medida em função da temperatura enquanto estas são submetidas a uma programação de aquecimento controlado através da utilização de termopares. Ao longo do programa de aquecimento, a temperatura das amostras mantém-se igual até que ocorra alterações físico-químicas sendo estas registadas sob a forma de picos sendo a variação da capacidade calorífica da amostra registada como um deslocamento da linha base. A curva DTA é registada em função da temperatura sendo esta usada principalmente para detetar a temperatura inicial dos processos térmicos e qualitativamente caracteriza-los como endotérmicos ou exotérmicos, entre outros. Este tipo de informação, bem como a sua dependência em relação a uma atmosfera específica, torna este método valioso na determinação de diagramas de fase, expansão térmica, perdas de massa por decomposição térmica e retração devido à sinterização durante o aquecimento e arrefecimento da amostra. Por sua vez, a análise termogravimétrica (TG) é o método de medição de perda de massa de uma amostra em função da temperatura sendo esta submetida a uma programação controlada.

Estes dois métodos foram realizados em conjunto na Universidade de Aveiro, no departamento de Cerâmica

2.4.2. Dilatometria

As amostras de 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro foram submetidas a uma análise dilatométrica para conseguirmos obter os seus respetivos valores de coeficiente de expansão

térmica (CTE) e regressão linear (Y). Estes testes foram realizados na Universidade de Aveiro, departamento de Cerâmica e Vidro através de um dilatómetro Bahr Thermoanalyse GmbH 2000, Modelo DIL801L. As condições de aquecimento, numa atmosfera em ar, foram a uma temperatura de 25°C/min e 5°C/min para o arrefecimento das diversas amostras.

2.5. Avaliação da microestrutura

2.5.1. DRX

Após a homogeneização da mistura biovidro/ sal executou-se a análise de difração de raio-x, num equipamento Rigaky, modelo DMAXIII/C, para visualizar se, antes do processo de sinterização, avaliar se a amostra possuía fases cristalinas ou se a matéria-prima (biovidro) estava amorfo.

Após a sinterização, voltou-se a realizar o mesmo ensaio para visualizar o efeito da temperatura nos corpos de prova para estudar a cristalização/amorfismo, o número de fases presentes e qual o composto atribuído aos picos presentes no difractograma.

2.5.2. SEM

O microscópio eletrónico de varrimento utilizado é da Hitachi s-2700. A amostra é colocada num porta amostra, onde é colocada a amostra para posterior análise, de modo a auxiliar o estudo das propriedades microestruturais das diferentes amostras, em particular a morfologia e o tamanho das partículas, a porosidade e as suas interconexões. Para termos maior convicção quanto à qualidade do processo de sinterização, também utilizamos o SEM para observar a homogeneidade da amostra, bem como, numa fase mais posterior do trabalho, visualizar o ancoramento das células ao biovidro bem como a observação da camada de HCA à superfície do biomaterial.

2.5.3. EDS

O *Energy dispersive spectroscopy* (EDS) encontra-se acoplado ao SEM que captura a energia dispersa pela amostra na forma de raio-X e analisa a composição das amostra. Esta técnica de análise elementar foi empregue após fundirmos as partículas de biovidro por forma a garantir que os elementos da composição de amostra após a fusão e o choque térmico e depois no estudo da presença de HCA através da variação dos iões de cálcio e fósforo ((Verné, Bretcanu et al. 2009).

2.6. Prensagem

A prensagem uniaxial de duplo efeito é a operação de conformação baseada na compactação de um pó granulado contido no interior de uma matriz rígida (aço inoxidável), através da aplicação de pressão (60MPa-100MPa) (Albaro 2001).

A adição dos ligantes visa a obtenção de compactos com maior resistência mecânica. A presença da acetona permite que as partículas de vidro deslizem para um novo arranjo de empacotamento, promove a distribuição da pressão de forma equivalente durante o processo de prensagem, minimiza o surgimento de defeitos como fraturas resultantes da segregação de partículas, e promove uma distribuição homogênea na densidade da amostra, facto este que é fundamental durante o processo de sinterização e conseqüentemente para as propriedades finais do vidro.

O estado de aglomeração influencia o processo de conformação dos mesmos, dependendo da distribuição das partículas, da sua forma e da carga superficial das partículas. Na prensagem seca, recomenda-se a adição de pequenas quantidades de ligantes - acetona. Esta é eliminada posteriormente não sendo contemplada no produto final (Albero 2000).

As características microestruturais alcançadas após a prensagem não só determinam as propriedades mecânicas mas também influenciam nas etapas posteriores do processamento. Como conseqüência, as variáveis de operação envolvida neste processo deverão ser determinadas tendo em vista a compactação que contemple estas características:

- Contribuir para a obtenção de peças suficientemente rígidas que resistam à etapa de extração do molde;
- Após a secagem, atribua a amostra uma resistência mecânica suficiente para suportar as diversas solicitações do ciclo de sinterização;
- Permeabilidade para ocorrer as trocas gasosas durante a sinterização (Rahaman 2003).

Os corpos de prova (discos) foram prensados isostaticamente com efeito duplo numa prensa A.L.L, modelo xx40 (capacidade até 40 toneladas), a 100MPa durante um minuto, ilustra-se na figura 7 os dois tipos de moldes empregues neste procedimento. O molde final, molde 1 (figura 7a), viabiliza que os corpos de prova sejam demoldados com um menor número de imperfeições ao contrário do molde 1 (figura 7c). Os diferentes moldes de aço bem como os seus pinos superiores e inferiores, empregues para moldar os corpos de prova com uma forma cilíndrica.

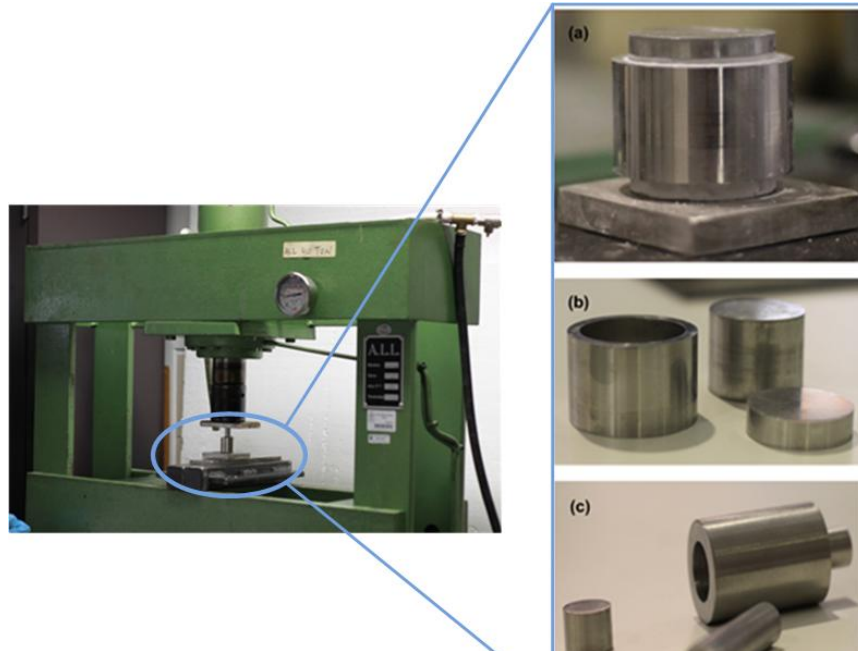


Figura 7: Fotografia da prensa e da colocação do molde para efectuar o processo de prensagem. Fotografias dos dois tipos de moldes utilizados (a e c). a) molde 1 com dimensões: diâmetro=40mm e h= 40mm, b) observa-se o molde e os seus pinos superiores e inferiores e c) molde 2.

2.7. Secagem e evaporação do ligante

O processo de secagem ocorre antes da sinterização pois permite a remoção do ligante no interior da amostra por meio de transporte e evaporação. Deve ser controlada, pois pode ocorrer tensões pela diferença de gradientes podem levar à ocorrência de fraturas.

A acetona é transportada através dos vazios para os meniscos por forças dirigidas motivadas pela evaporação e através dos poros para a superfície pelo vapor. As forças são originadas por sua vez, pela diferença de pressão que existe entre a superfície da amostra e o seu interior. A migração do ligante geralmente ocorre por fluxo de capilaridade que permite a evaporação superficial aumentando a densificação do corpo pelo contacto direto entre as partículas.

Não é muito aconselhado a retirada do ligante através do uso de temperatura pois esta remoção rápida pode provocar a desidratação da amostra e, por conseguinte, criar fraturas ou outros tipos de defeitos à nossa amostra. No presente caso a amostra foi seca à temperatura ambiente, durante 24H.

2.8. Sinterização

O ciclo de sinterização da mufla teve por base os resultados obtidos no DTA. As amostras foram sinterizadas a 725°C com uma taxa de aquecimento de 5°C/ma mufla.

2.9. Lixiviação

A lixiviação de partículas é uma técnica empregue para a obtenção da macroporosidade. Após a sinterização, os cristais de sal são lixiviados num banho termoestático Selecta, Unitronic S320-100, com jacto de água destilada a 50°C para formar a estrutura dos macroporos. O tamanho destes poros pode ser controlado pelo tamanho do cristal de sal e a porosidade pela razão sal/biovidro.

2.10. Maturação

A maturação consiste no desenvolvimento estrutural, após o processo de lixiviação do sal, o que envolve a imersão dos corpos de prova em água destilada durante uma semana.

Durante a imersão, ocorre diferentes reações desde, a coalescência adequados a processos de dissolução e precipitação devido às diferenças de solubilidade entre as superfícies e a expulsão de sal que ainda se encontram presentes mesmo após ter efetuado o processo de lixiviação. Com isto melhoram as propriedades mecânicas devido à minimização das fissuras superficiais bem como à criação ligações cruzadas. Com a maturação verifica-se um endurecimento contínuo da matriz de biovidro pois esta torna-se mais rígida com o tempo (Daglilar, Erkan et al. 2007; Hammouda 2009).

2.11. Corte

No corte das amostras (discos) utilizou-se uma máquina de corte da marca struers, modelo accutom-2 para a prática manual e accutom-5 para a automática (figura 8); sendo utilizado um disco diamantado da struers, modelo 230CA. Estes discos permitem a obtenção de um corte preciso em serie, em diferentes materiais com uma precisão de 5µm com uma força ajustável sendo a velocidade variável da rotação do disco de aproximadamente 2000 a 2500rpm de corte. Como estas amostras são muito porosas, a utilização preferencial é do modo manual visto que conseguíamos evitar a fixação (amarramento) da amostra essencial para ultrapassar a fragilidade que estas continham.



Figura 8: Imagem ilustrativa do processo de corte dum corpo de prova

2.12. Propriedades físicas

A determinação da porosidade foi avaliada por dois métodos. O primeiro rege-se pela técnica de Arquimedes onde determinamos a porosidade a partir da densidade aparente segundo a norma ASTM C20-00 (2010). As amostras foram colocadas em estufa Carbolite (volume útil de 750x600x500 mm³), que detém de um controlador de temperatura Eurotherm com possível programação até 300°C, sendo utilizado 40°C durante 24h para a eliminação da água adsorvida na superfície dos poros. As amostras foram secas considerando esse valor como a massa seca (W1) e, de seguida realizou-se a imersão em água destilada e mediu-se o valor sendo denominado por massa imerso (W2). Estas amostras ficaram em água até atingir a saturação, extraindo o excesso de água à superfície e mediu-se a massa de saturação (W3). Estes valores permitiram-nos calcular diferentes valores de densidades, absorção de água, porosidade que se encontram enunciados na tabela seguinte.

Tabela 10: Propriedades físicas obtidas a partir do método de Arquimedes.

	Unidade	Formula
Densidade aparente	g/cm ³	$DA = \frac{W_1}{W_1 - W_2}$
Densidade do corpo (bulk density)	g/cm ³	$BD = \frac{W_1}{W_3 - W_2}$

Densidade relativa	%	$DR = \frac{Massa}{volume}$
Densidade sinterização	g/cm ³	$DS = \frac{M_{sinterização}}{V_{sinterização}}$
Densidade de compactação	g/cm ³	$Dc = \frac{Massa\ dos\ pós}{Volume}$
Absorção de água	%	$AA = \frac{W_3 - W_1}{W_1}$
Porosidade aparente	%	$PA = \frac{W_3 - W_1}{W_3 - W_2} \times 100$
Volume aparente	cm ³	$VA = \frac{W_1 - W_2}{\rho_{água}}$

2.12.1. Porosimetria de mercúrio

A porosimetria por intrusão de mercúrio (PIM) permitiu obter a distribuição do tamanho médio dos poros bem como o seu volume e a área específica através da utilização de um porosímetro Autopore IV, modelo 9220 da Micromeritics Instrument. Os penetrometros de 5mL com capilar de platina foram empregues no ensaio PIM para as diferentes amostras. Antes de efetuar o ensaio, as amostras estiveram 48h a 60°C numa estufa para remover a água continha para melhorar o contacto entre o mercúrio e amostra.

2.12.2. Interconectividade

A sucção capilar é o processo no qual certos compostos corados (azul metileno) podem ser transportados num biomaterial através da interconectividade dos poros devido à tensão superficial. O transporte visualizado ao longo do corpo de prova é influenciado pela densidade, tensão superficial mas principalmente pela interconectividade dos macroporos (Vitale-Brovarone, Bairo et al. 2009; Vitale-Brovarone, Bairo et al. 2009; Bellucci, Cannillo et al. 2010).

2.13. Caracterização mecânica

A caracterização da amostra foi efetuada através do estudo de ensaios de dureza, flexão, compressão, tenacidade à fratura e densidade. Todos estes processos serão explicados e analisados de seguida.

2.13.1. Dureza

A dureza foi avaliada segundo o método de Vickers sendo esta definida por uma pressão de indentação obtida entre a carga de indentação aplicada e a área da impressão superficial.

No processo de impressão Vickers, o indentador de diamante é forçado contra uma superfície da amostra durante um intervalo de tempo e, de seguida efetua-se a medição da impressão residual na superfície após a remoção do penetrador (Nychka, Li et al. 2008; Hammouda 2009).

Os ensaios de dureza foram realizados num equipamento Mitutoyo, modelo AVK-C2, aplicando uma carga 1Kg de com um tempo de indentação de 10 segundos. Foram realizados 1 indentação em cada amostra, tendo sido realizado para 3 amostras, sendo o comprimento das diagonais medido através de um microscópio ótico integrado no microdurómetro.

$$HV = 1.8544 \frac{F}{d^2} \quad (\text{eq.4})$$

Onde HV representa a dureza Vickers, F a força (N) e d a diagonal (mm).

2.13.2. Flexão em três pontos

O teste foi realizado numa máquina de ensaio da Zwick, modelo 1435, com célula de carga progressiva até 5KN, que consiste em submeter a amostra a uma carga, em que a suas extremidades se encontram apoiadas e separados por uma distância definido com a reação da carga, três pontos (Hammouda 2009).

$$\sigma = \frac{1.5 \times F \times d}{l \times h^2} \quad (\text{eq.5})$$

Onde: F (N) é a força aplicada, d distância entre os apoios (mm), l largura (mm) e h espessura (mm).

2.13.3. Compressão

A resistência à compressão foi avaliada também na máquina de ensaio da Zwick, modelo 1435, com células de carga progressiva até 5KN. Através do ensaio é possível obter a carga máxima necessária para o cálculo da compressão de acordo com a equação (eq.6). A compressão é obtida pela tensão de rutura que depende da força na área do ensaio.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (\text{eq.6})$$

Onde σ tensão de ruptura (MPa), F força (N) necessária para ocorrer a fractura do ensaio e A é a área da amostra (mm²) (Hammouda 2009).

2.13.4. Módulo de elasticidade

O módulo de elasticidade estuda a resistência do material em função da sua taxa de deformação elástica. Este valor é-nos dado através da interpolação dos gráficos tensão em função da deformação.

$$E = \frac{d^3}{4 x l x h^3} x \frac{x_1 - x_2}{\Delta l} \quad (\text{eq.7})$$

Onde: E valor do módulo de elasticidade (GPa), d distância entre os apoios (mm), l largura (mm) e h espessura (mm), x1 e x2 são pontos do eixo das ordenadas (tensão) na zona linear, Δl pontos correspondentes aos anteriores do eixo das abcissas (deformação).

2.13.4.1. Propagação de pulsos ultrassónicos

A determinação do módulo de elasticidade, coeficientes de temperatura e de atenuação pelo método de ultra-som, que possibilita o estudo das propriedades mecânicas sem comprometer a integridade do biomaterial seguindo a norma ASTMCS 597. Para efetuar este teste utilizou-se o dispositivo da Tico Proceq dotado de dois transdutores colocados em contacto com as duas faces opostas de modo que o pulso com frequência de 54KHz percorra todo o corpo. Um dos transdutores é emissor e outro é o recetor. Deste modo, permite medir diretamente o tempo de propagação em microssegundos (μs) e a distância percorrida (mm). A razão entre o tempo de propagação e a distância percorrida permite calcular a velocidade da propagação das ondas do biovidro (Begum, Rajendran et al. 2006; Malasoma, Fritsch et al. 2008) . Com o valor obtido da velocidade (U_L), consegue-se calcular o módulo de elasticidade (E) pela seguinte equação:

$$E = U_L^2 x \rho \quad (\text{eq.8})$$

Onde ρ é a densidade da amostra. A impedância acústica (Z) está relacionada com a velocidade:

$$Z = U_L x \rho \quad (\text{eq.9})$$

O coeficiente de expansão térmico pode ser obtido utilizando a seguinte equação:

$$\alpha_p = 23.2(U - 0.57457) \quad (\text{eq.10})$$

2.14. Avaliação biológica

2.14.1. Citotoxicidade

As células osteoblásticas humanas foram semeadas em frascos-T de 25 cm³ com DMEM-F12 suplementado com inativação por calor e solução antibiótica/antimicótico. Após as células atingirem a confluência, foram subcultivadas por incubação de 3-5 minutos em tripsina e EDTA. De seguida, as células foram centrifugadas, ressuspensas em meio de cultura e, semeadas em frascos-T de 75 cm³. Ao longo deste processo, as células foram mantidas em cultura a 37°C numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂ numa incubadora (Maia, Ribeiro et al. 2009; Ribeiro, Espiga et al. 2009). Posteriormente, as células osteoblásticas humanas foram cultivadas em contacto direto com os biomateriais na placa de 96 poços, cada formulação foi adicionado (n=4), numa densidade de 15x10³ células/ poço. O crescimento celular foi monitorizado empregando um microscópio de luz invertida da Olympus, modelo CX41 equipado com uma câmara digital da Olympus, modelo SP-500 UZ (Coimbra, Alves et al. 2011; Coimbra, Ferreira et al. 2011).

2.14.1.1. Caracterização do perfil de citotoxicidade

As células osteoblásticas humanas foram semeadas na presença dos biomateriais em placa de 96 poços, com DMEM-F12 e, de seguida, incubadas a 37°C, numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂. Após o período de incubação (24,48 e 72 horas), a viabilidade celular foi avaliada através da redução do MTS num produto formazan solúvel em água. A absorvência do formazan foi medida a 492nm utilizando um leitor de microplacas (Sanofi, Pauster Diagnostics). Os poços contendo as células em meios de cultura sem a presença de amostras de biovidro foram utilizados como controlo negativo (K⁻). Às cavidades que continham células foi adicionado etanol (96%) correspondendo ao controlo positivo (K⁺) (Da Silva, Viveiros et al. 2011).

2.14.2. Bioatividade

A bioatividade do biomaterial foi avaliada *in vitro* através da observação da deposição de uma camada de gel de sílica sobre a superfície de cada corpo de prova para 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro, após diferentes tempos de imersão em SBF. O SBF foi preparado no laboratório segundo o protocolo de Kokubo (Kokubo and Takadama 2006), na qual é necessário a adição dos reagentes segundo a ordem indicada pela tabela 12, em água pura.

Tabela 11: Ordem, reagente e a sua massa para preparar 1000mL de SBF.

Ordem	Reagente	Massa (g) em função de 1000mL
1	NaCl	8,035
2	NaHCO ₃	0,355
3	KCl	0,225
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,231
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,311
6	1.0MHCl	39mL
7	CaCl ₂	0,292
8	Na ₂ SO ₄	0,072
9	Tris	6,118
10	1.0MHCl	0,5mL

Os testes de mineralização por deposição de HCA foram efetuados por imersão de amostras lixiviadas em SBF, para 1,7, 14, 21 e 28 dias. O volume de SBF empregue foi calculado a partir da seguinte equação:

$$V_s = \frac{S_a}{10} \quad (\text{eq.11})$$

Onde: V_s é o volume de SBF (mL) e S_a a área de superfície da amostra (mm²). De seguida, a amostra é colocada num *eppendorfs* com o seu devido volume de SBF e colocada numa camara de aquecimento com agitação.

Para avaliar a deposição de HCA, as amostras foram caracterizadas após diferentes períodos de imersão, por EDS e SEM para avaliar a quantitativamente e morfológicamente a HCA.

Durante a imersão, realizou-se sistematicamente a avaliação de pH, cada solução, desta forma monitorou-se as variações de pH promovidas pelo processo de troca iónica entre o biovidro e o SBF.

Tabela 12: Comparação da concentração de íons entre o plasma e o SBF.

Íons	Concentração iónica (mM)	
	Plasma	SBF
Na ⁺	142,0	142,0
K ⁺	5,0	5,0
Mg ²⁺	1,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	103,0	147,8
HCO ₃ ⁻	27,0	4,2
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5

Na tabela 13, apresentam-se as concentrações iónicas, a título comparativo, relativas ao plasma e ao SBF.

3. Resultados e discussão

Os resultados apresentados ao longo da tese foram sempre obtidos como a média mais ou menos o desvio padrão de pelo menos 4 amostras independentes.

3.1. Distribuição granulométrica do sal

A figura 9 representa a distribuição de tamanho de partículas obtidas pelo método de peneiração. O intervalo da dimensão das partículas empregue neste trabalho foi de 212 a 425µm permitindo a obtenção, como iremos discutir mais a frente, de uma variação do valor dos macroporos.

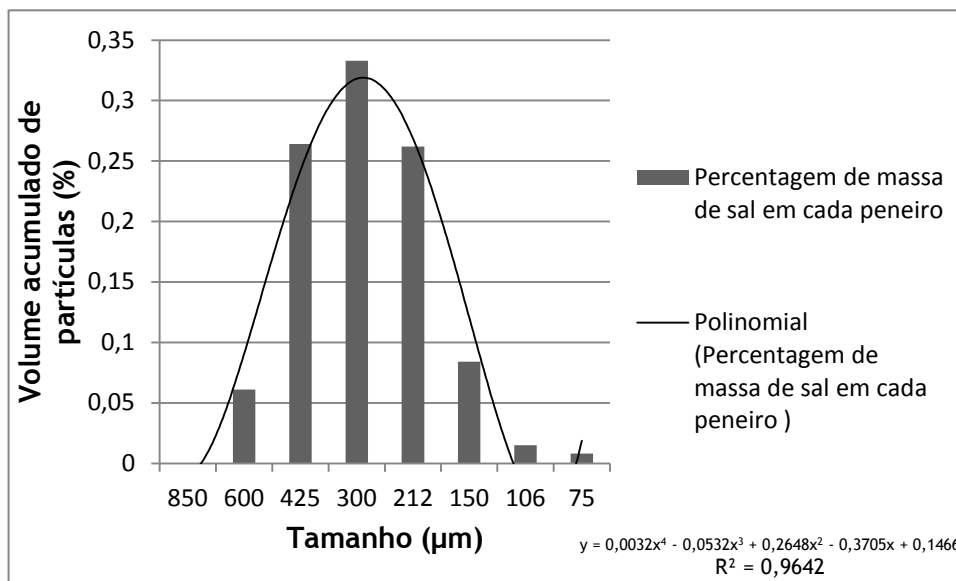


Figura 9: Histograma da distribuição de tamanho de partículas para o sal após 5 minutos de peneiração.

3.2. Distribuição granulométrica do biovidro

Tabela 13: Resultados obtidos a partir do software LS200, com o módulo da “Variable speed fluid module plus”

Amostra	100% Biovidro
Volume (%)	100
Média (µm)	11,23
Mediana (µm)	12,16
d10 (µm)	2,799
d50 (µm)	12,16
d90 (µm)	36,34
Área superfície específica (cm ² /g)	3031

A figura 10 seguinte mostra a distribuição dos tamanhos de partículas médio do biovidro, obtido por difração a laser (Coulter). Pode observar-se, tanto pela tabela como pelo histograma, que há uma configuração bimodal na distribuição das partículas associada a uma diferença na granulometria. Esta desigualdade granulométrica é fulcral pois permite que partículas de pequenas dimensões se alojam entre os poros para auxiliar a coalescência das partículas entre os agregados de maiores dimensões adquirindo, deste modo, um melhor acondicionamento da matriz.

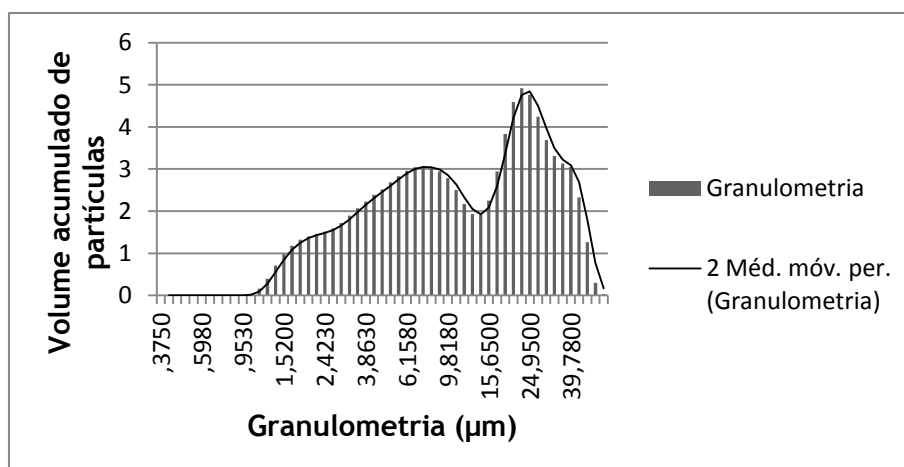


Figura 10: Histograma da distribuição de tamanho de partículas para o biovidro puro.

As dimensões empregues para a manufatura dos corpos de prova foram partículas inferiores a $40\mu\text{m}$, uma vez que estas devem ter granulometria inferior às partículas de sal para obter um scaffold, isto porque caso a granulometria entre o biovidro e o sal sejam equivalentes, não ocorre fenómenos de coalescência uma vez que não formou uma estrutura de rede. De acordo com os resultados obtidos apresentados pela tabela, o tamanho médio das partículas é de $11,2340\mu\text{m}$; com maior fração concentrada em torno de $36,3440\mu\text{m}$. Alguns tamanhos superiores a $40\mu\text{m}$ justificam-se pelo facto das partículas não serem esferas perfeitas.

3.3. Choque térmico

Utilizamos como método de arrefecimento o choque térmico para este transitar para o estado sólido, uma vez que a taxa de arrefecimento é acelerada não permite o rearranjo atómico que se encontram dispersos na fase líquida, inibindo fenómenos de cristalização do biomaterial. A figura seguinte ilustra o resultado obtido após o choque térmico.

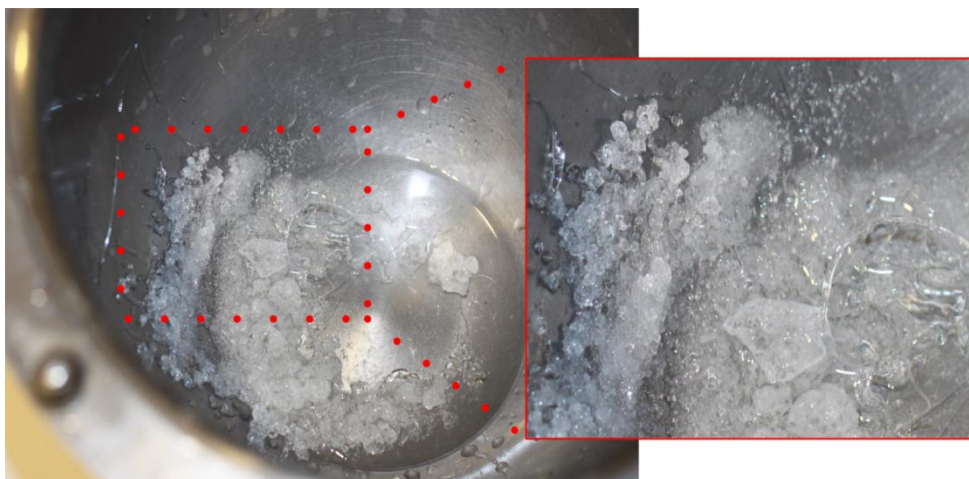


Figura 11: Amostra de biovidro obtido após choque térmico

3.4. EDX

Após a fusão das diferentes matérias-primas, efetuou-se uma análise elementar do biovidro (pós) para verificar se à temperatura de 1500°C se mantinham todos os elementos na composição. Como se pode visualizar pela figura 12, todos os elementos se mantiveram a essa temperatura, conseguindo visualizar-se pelos picos assinalados que correspondem aos óxidos presentes na amostra inicial.

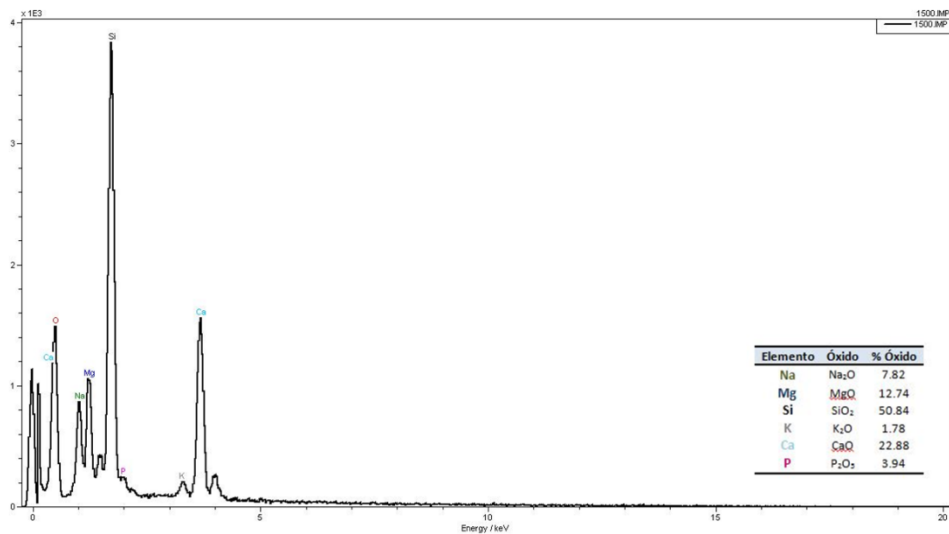


Figura 12: Fluxograma do teste de EDS para visualizar a composição da amostra após o processo de fusão.

3.5. DRX

A natureza amorfa do biovidro (pó) antes ser sinterizado foi confirmada pela ausência de picos cristalinos definidos pelo espectrograma da figura 13. Esta natureza amorfa já era esperada devido à composição selecionada pois biovidro possuiadores de modificadores de rede, tais como o sódio e potássio permite a formação de materiais vítreos devido à ocupação dos íons alcalinos de locais aleatórios na estrutura de sílica, o que consente a formação de uma estrutura que não apresenta periodicidade e estes íons usufruem da capacidade de aumentar o poder de desvitrificação da amostra.

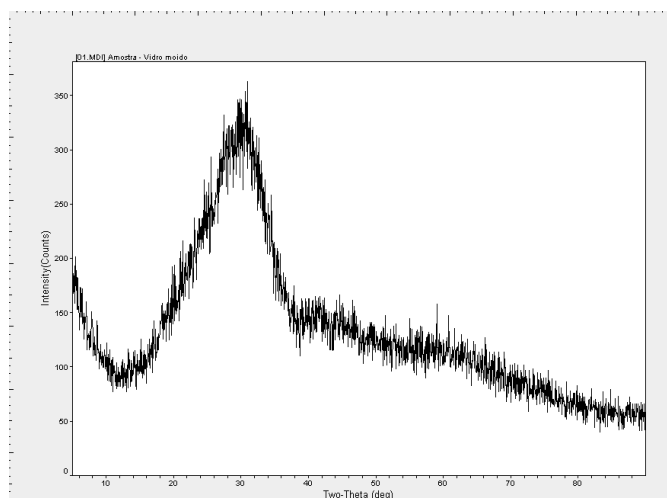


Figura 13: Difractograma de raio-X do biovidro após o choque térmico.

3.6. Análise térmica

3.6.1. DTA e TG

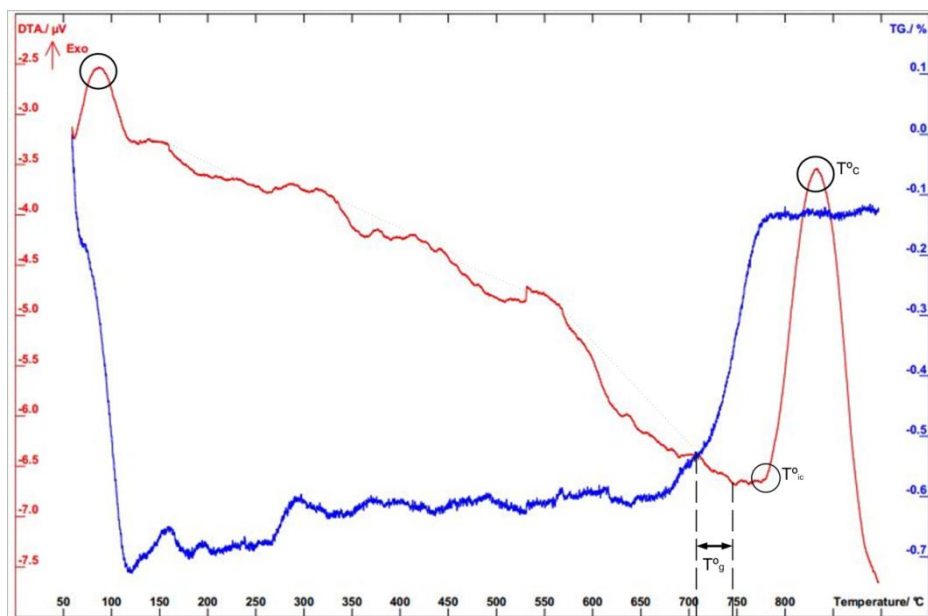


Figura 14: Análise DTA e TG na amostra de 100% biovidro em função da temperatura.

Através da análise da figura 14, o primeiro pico exotérmico visualizado pelo DTA corresponde à libertação de água da adsorção física que não foram removidos durante o processo de secagem. As retas representam processos de densificação ao longo do processo de sinterização.

O segundo pico exotérmico representa o pico da cristalização (T^0_c) que é obtida aproximadamente aos 827°C sendo inicializado o processo aos 780°C. A obtenção do valor de Tg e o seu intervalo são fundamentais, uma vez que possibilita e auxilia a seleção adequada do valor da temperatura de sinterização de modo a reduzir fenômenos de cristalização e diminuir tensões residuais características do processo de resfriamento do vidro.

A partir dos resultados acima indicados é possível estabelecer uma relação entre o comportamento de sinterização e o de cristalização. Através da análise do gráfico verifica-se que a transição vítrea ocorre precedentemente à cristalização sendo que esta pode interferir no processo de sinterização caso não haja uma boa leitura do resultado ou não se escolha o intervalo correto para a temperatura de cristalização. A melhor opção para é definir onde se inicializa a cristalização (T_{ic}) e escolher um valor, próximo mas inferior.

O valor da temperatura de transição vítrea calculado através de método de Hupa et all:

$$\begin{aligned}
 T_g(^{\circ}\text{C}) &= A + B[\text{SiO}_2] + C[\text{Na}_2\text{O}] + D[\text{K}_2\text{O}] + E[\text{CaO}] + F[\text{MgO}] + G[\text{P}_2\text{O}_5] \\
 &= -309.26 + 10.34 \times 51.9 + 1.58 \times 9.8 + 2.30 \times 1.8 + 10.89 \times 19 + 7.88 \times 15 \\
 &\quad + 12.56 \times 2.5 = 603.52
 \end{aligned}$$

A análise térmica revelou baixa cristalinidade como se visualizou pela análise do DRX, não ocorrendo nenhuma alteração das propriedades quanto à sua transparência e translucidez após efetuar o choque térmico. A cinética de cristalização de Avrami para o CEL2 indicou valores de energia de ativação igual a 107,5 kJ/mol e o valor de n ($n \approx 1$) o que significa que a cristalização tende a ocorrer preferencialmente à superfície.

3.6.2. Dilatometria

A análise dos resultados de CTE para cada amostra para as diferentes formulações para α (200 a 300°C) encontram-se alistados na tabela 15.

Tabela 14: Valor de CTE para cada composição.

Composição	CTE (K ⁻¹)
100%	20,9x10 ⁻⁶
60%	17,4x10 ⁻⁶
50%	18,7x10 ⁻⁶
40%	18,8x10 ⁻⁶

Pela análise da figura 15, observa-se quanto menor for a adição de biovidro, maior será a sua expansão linear, isto é, maior será o valor de $\Delta L/L_0$. Também se pode observar que as amostras com adição de sal, produzem um aumento na expansão dos compactos e, por conseguinte, no valor de CTE. Até aos 400°C, o valor da expansão é semelhante para todas as formulações, mas a partir deste, começam a observar-se variações devido ao efeito do sal. Com a adição de sal, a linearidade da resposta fica prejudicada a partir dos 400°C. O ensaio decorre até, aproximadamente aos 750°C, evitando a temperatura de cristalização que se inicializa acima deste valor.

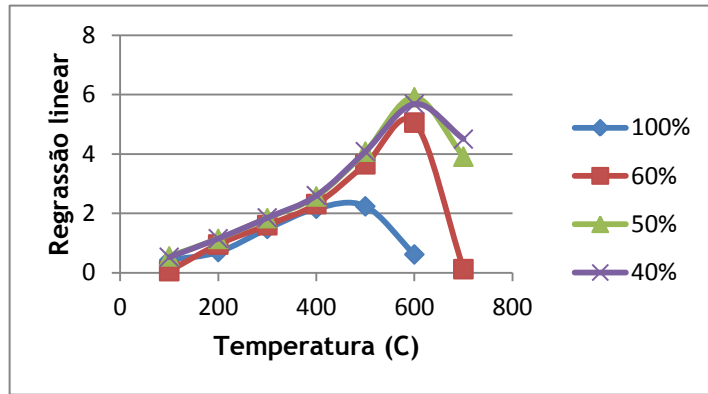


Figura 15: Expansão linear em função da temperatura para amostras com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.

3.7. DRX

Na figura seguinte apresenta-se o difractograma da amostra com 100% de biovidro. Através de uma análise comparativa entre esta e a figura 16 verifica-se uma semelhança de resultados, uma vez que esta também apresentou uma natureza amorfa. Assim, pudemos concluir que a temperatura utilizada na sinterização das amostras foi bem escolhida uma vez que não nos deparamos com fenómenos de cristalização.

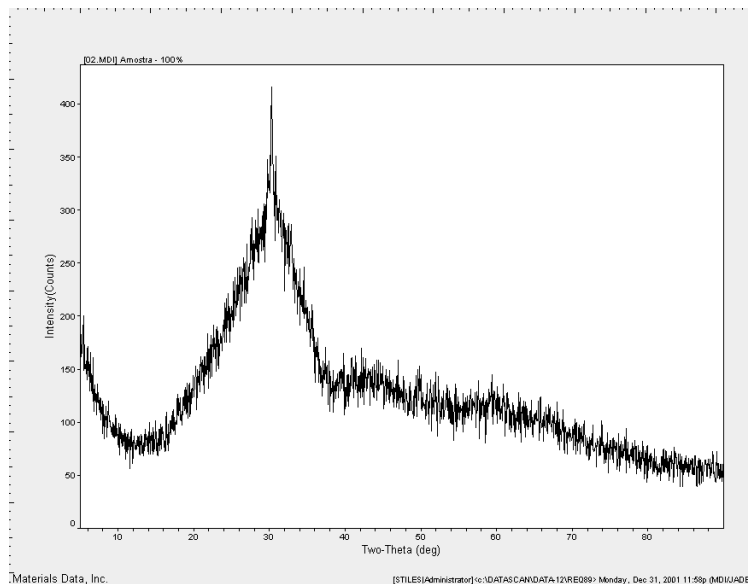


Figura 16: Diffractograma de raio-X do biovidro após a sinterização numa amostra com 100% de biovidro.

3.8. Corpos de prova

A Figura seguinte representa a evolução dos corpos de prova onde se pode inferir a diferença no grau de homogeneização, (figura 17a); diferentes estudos em função do efeito da percentagem de acetona e do molde (figura 17b) resultaram na otimização até ao corpo de prova final (figura 17c).

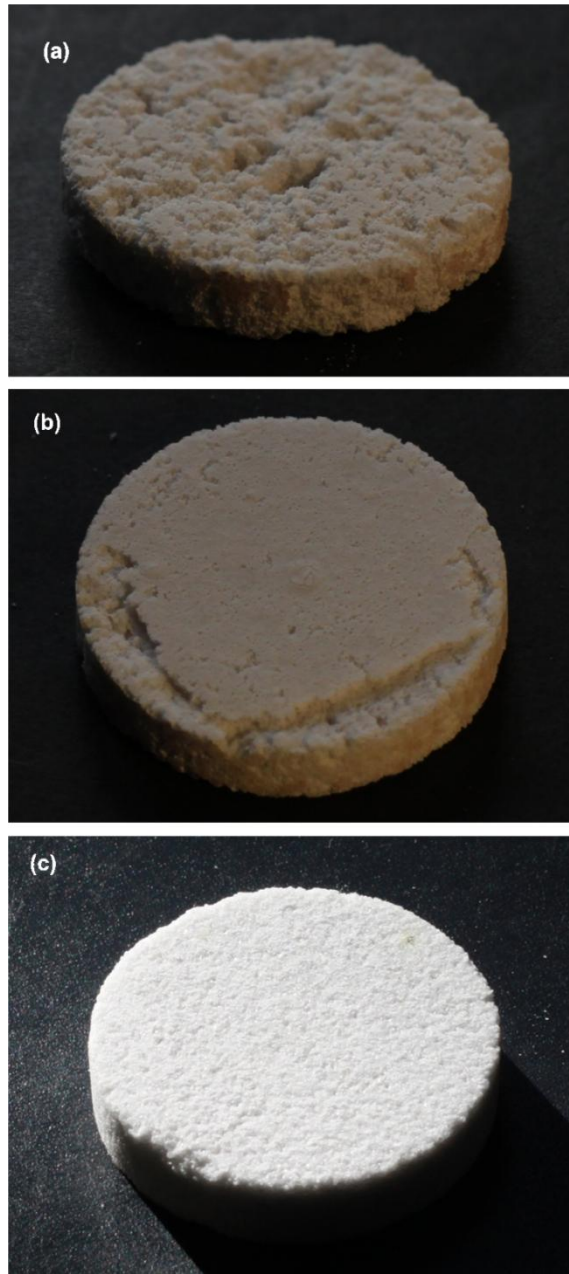


Figura 17: Imagens ilustrativas da evolução na obtenção dos corpos de prova em função do modo de homogeneização, tipo de molde, teor de acetona e tipo de ensaio empregue.

Estes estudos de otimização do corpo de prova final foi bastante complexo de atingir pois verificou-se uma certa dificuldade em reunir as condições ideais para a obtenção de scaffold com as características microestruturais ideais. Na figura 17a) visualiza-se uma grande aglomeração superficial, isto deve-se ao processo inicial de homogeneização entre o sal e o biovidro que foi efetuado de forma manual. Ao concretizar este processo desta forma averigua-se que o sal tinha formado aglomerados à superfície e que, ao longo do processo de lixiviação o scaffold era degradado formando este aspeto de cavidades à superfície. Com isto chegou-se a conclusão que um dos possíveis procedimentos que nos permitia o alcance da homogeneização era através de um agitador magnético mas, este pode alterar a granulometria do sal pois pode fragmenta-lo; outro método seria a aplicação de peneiros com agitação ou com o uso de um vortex. É de sublinhar que os peneiros devem possuir um diâmetro de rede bem superior ao das nossas partículas.

Outra dificuldade sentida era a percentagem ideal de acetona (ligante) a adicionar e a sua remoção para que esta exercesse a sua função de união mas que não fosse em quantidades exageradas, pois após a sua remoção atribuía um aspeto laminar à amostra como se pode visualizar pela figura 17b. A quantidade otimizada é de 20% do seu peso nos corpos de prova que adicionamos o sal e 25% nos corpos de prova que apenas possuem biovidro. Para a extração da acetona, o aconselhado é conservar as amostras à temperatura ambiente pois caso retrainos este componente através de temperatura pode criar desidratação da amostra e fraturas superficiais visíveis.

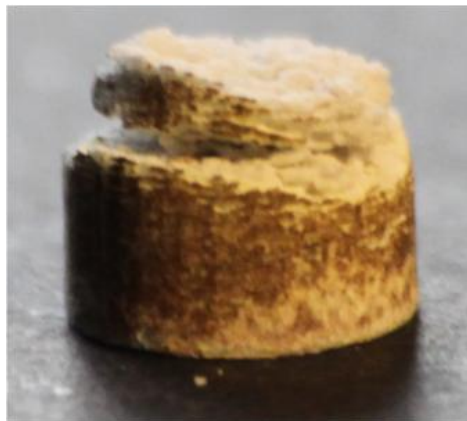


Figura 18: Imagem do corpo de prova obtido através do molde 2.

Inicialmente empregaram-se os moldes 1 mas deparou-se nas enormes dimensões que estes acarretavam e da necessidade de obtermos corpos de prova de reduzidas dimensões mais adequadas para a caracterização mecânica. Com isto construímos o molde número 2 que nos criou bastantes entraves, uma vez que as reduzidas dimensões acarretaram com outras rejeições. As propriedades subjacentes eram os fenómenos de atrito que levavam a vibração

da amostra o que dirigia ao aspeto laminar que sustentámos na figura 18. Outro aspeto significativo é que, para ocorrer compactação necessitávamos de uma pressão de 100 MPa (utilizada no molde 1) e nestas condições de dimensionamento o molde apenas suportava 60 MPa e estes só podia ser utilizado no máximo uma vez pois os punções começavam a deformar plasticamente e não oferecia condições para um novo ensaio. Com isto verificamos que era melhor utilizarmos o molde 1 pois conseguíamos obter uns corpos de prova com melhores condições de processamento e, de seguida efetuar o seu corte.

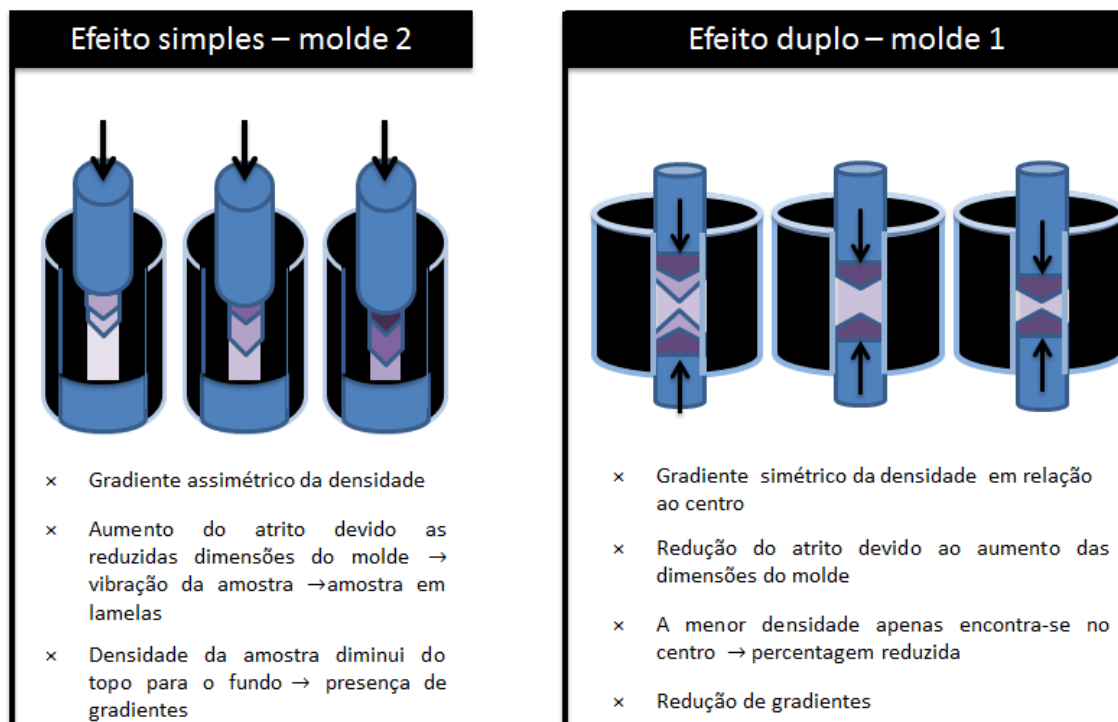


Figura 19: Diferença no tipo de prensagem empregue em cada molde. O efeito simples foi utilizado no molde 2 e o efeito duplo no molde 2.

A figura 19 sintetiza a diferença entre os dois moldes bem como o tipo de prensagem empregue em cada uma. Para obtermos uma homogeneização dos gradientes de densificação é mais vantajoso utilizarmos o molde 1 com o efeito duplo isostático como se encontra explicado na figura.

O aspeto rugoso observado na última figura 17c é fundamental para criar a adesão das células osteoblásticas bem como criar as condições necessárias para aumentar a permeabilidade, tanto para as células como para os fluidos. Os scaffolds aqui produzidos apresentam uma estrutura com características marcantes e diferenciais entre as superfícies interna e a externa como iremos identificar de seguida.

3.9. Estudo da microestrutura

Para as diferentes amostras, com percentagens de biovidro/sal, os parâmetros de manufatura são iguais, apenas diferindo uns dos outros na composição de sal adicionado o que irá levar a diferenças microestruturais quanto à sua porosidade como será visível, nas figuras 20 a 23 de SEM.

A análise da figura 20 permite-nos visualizar que o biovidro sem a presença de porogénio possui uma microporosidade própria que advém de espaços vazios entre partículas que não são ligadas durante a sinterização. A figura 20a e b representam duas micrografias da estrutura interna do scaffold onde é possível observar mais detalhadamente a microporosidade aberta com um formato esférico (figura 20 d e e) que atinge uma variação entre 13 a 19 μm . A superfície rugosa apresentada nas paredes internas favorece os processos celulares e a adesão de proteínas que é criada essencialmente por este tipo de porosidade. A figura 17b também mostra a boa sinterização alcançada uma vez que não se distingue a diferença de partículas empregues na manufatura dos corpos de prova. Por sua vez, as figuras 16a expõem um excelente resultado conseguido pois as trabéculas encontram-se bem densificadas (figura 17c) e espessas (figura 17b) o que irá proporcionar uma boa resistência ao corpo de prova.

Nas figuras 21a, 22a e 23a ilustram-se cortes transversais das amostras com 60, 50 e 40 % de biovidro após a sinterização e lixiviação do porogénio. Nestas pode visualizar-se a distribuição dos macroporos bem como as diferenças nas suas proporções que se encontram correlacionadas com possíveis fraturas do sal durante o processo de prensagem, impedimento da completa compactação devido as grandes dimensões do sal comparativamente ao biovidro e pela própria microporosidade inerente à composição. Pela análise da figura 24 também se pode visualizar a forma quadrangular dos macroporos sendo esta atribuída pela conformação do sal. Os macroporos variam entre os 300 a 400 μm como se verifica pelas medições efetuadas (não podem ser consideradas exatas) na figura 20c. Pode-se também visualizar a muito boa sinterização pela homogeneidade da amostra nas figuras 21d, 21e , 21f, 22c , 22 d e 23 b e c.

Tanto o tamanho do poro como a sua porosidade são controlados pelo tamanho das partículas de sal bem como a sua percentagem adicionada em cada corpo de prova. Estas micrografias representam a estrutura típica de uma matriz porosa. Os macroporos resultantes do processo de lixiviação são bem visíveis em todas as figuras das micrografias, sendo que as suas dimensões aproximam-se ao tamanho dos grãos de sal. A diferença mais notável no conjunto é a quantidade de macroporos que é superior da amostra de 60% biovidro para a de 50% de biovidro, uma vez que a última possui maior percentagem de porogénio. Outro aspeto relevante que nos pudemos deparar é a maioria dos poros encontrarem-se abertos devido às características otimizadas da sinterização dos corpos e à boa lixiviação do sal.

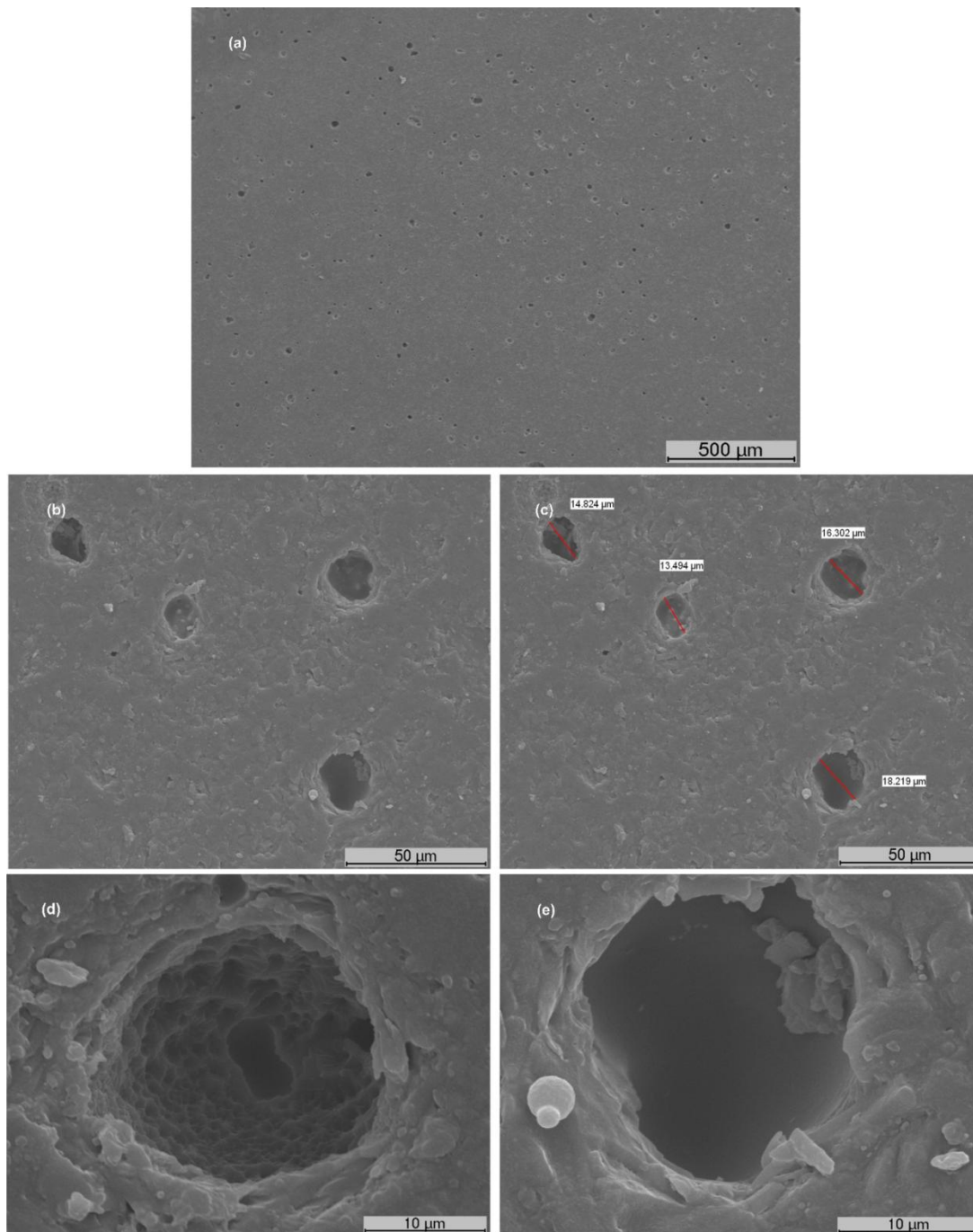


Figura 20: a) Corte transversal da amostra de 100% de biovidro que permite observação da distribuição da microporosidade da amostra (ampliação 50x), b) utilização de uma ampliação superior para a obtenção de uma melhor visualização dos microporos (ampliação 700x) c) avaliação do tamanho da microporosidade (ampliação 700x) d) presença da rugosidade presente no microporo (ampliação 3000x) e d) formato esférico do microporo visualizado numa ampliação superior (ampliação 3500x).

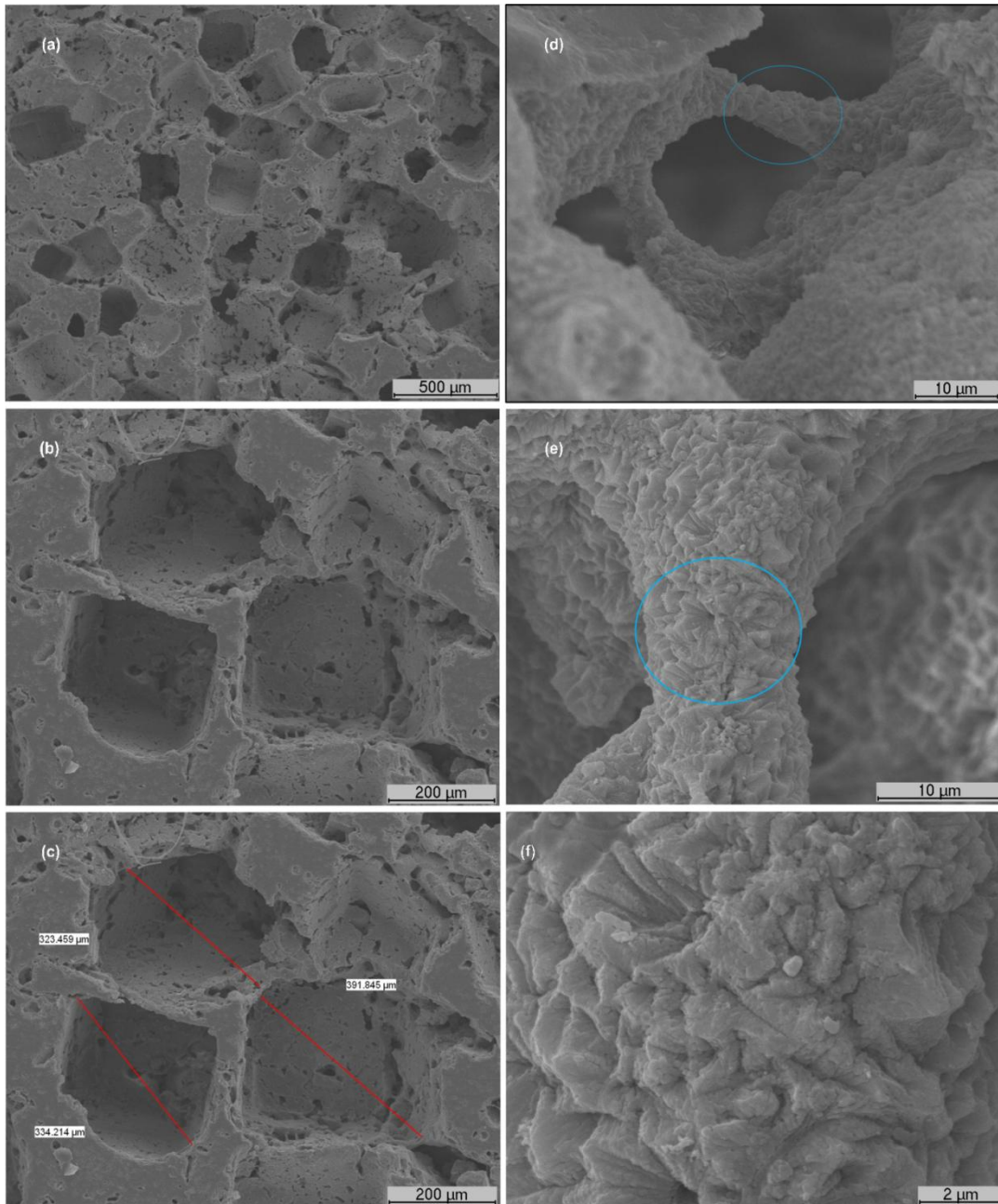


Figura 21: a) corte transversal da amostra com 60% de biovidro onde se observa a distribuição da macroporosidade (ampliação 50x); b) ampliação (60x) aumentada que permite a visualização mais detalhada dos macroporos e a sua medição em c); d) interconectividade presente na amostra (ampliação 2000x); e) aumento da ampliação da figura (d) que permite visualizar a espessura do vínculo (ampliação 3000x) e f) maior ampliação do vínculo que permite visualizar a rugosidade presente bem como a boa sinterização deste (ampliação 1000x).

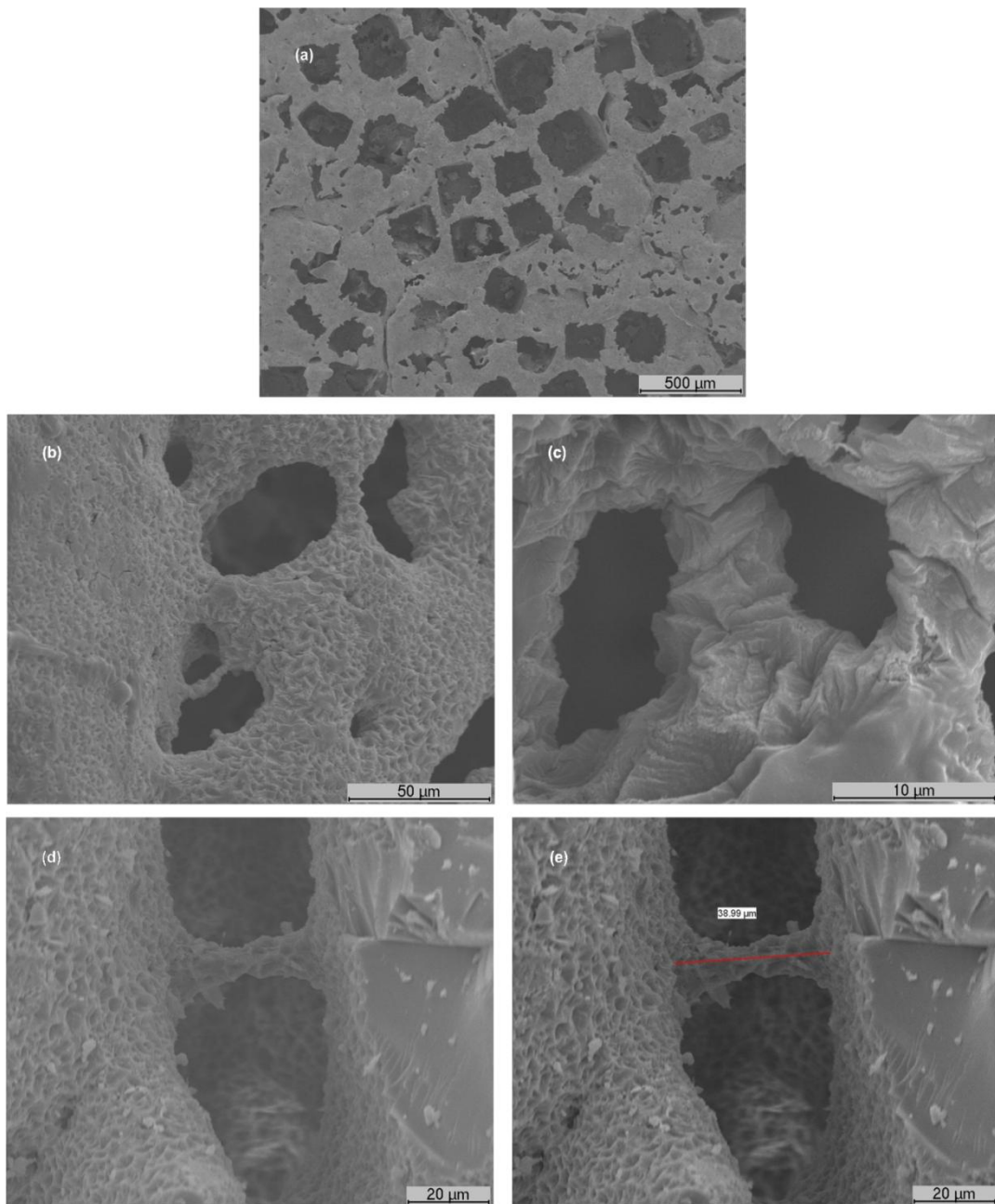


Figura 22: a) corte transversal da amostra com 50% de biovidro onde se observa a distribuição da macroporosidade (ampliação 50x); b e d) interconectividade presente na amostra (ampliação 4000x e 1000x respetivamente); c) aumento da ampliação da figura b que permite visualizar a espessura do vínculo e a rugosidade presente, bem como a boa sinterização deste; e) medição do vínculo apresentado (ampliação 1000x).

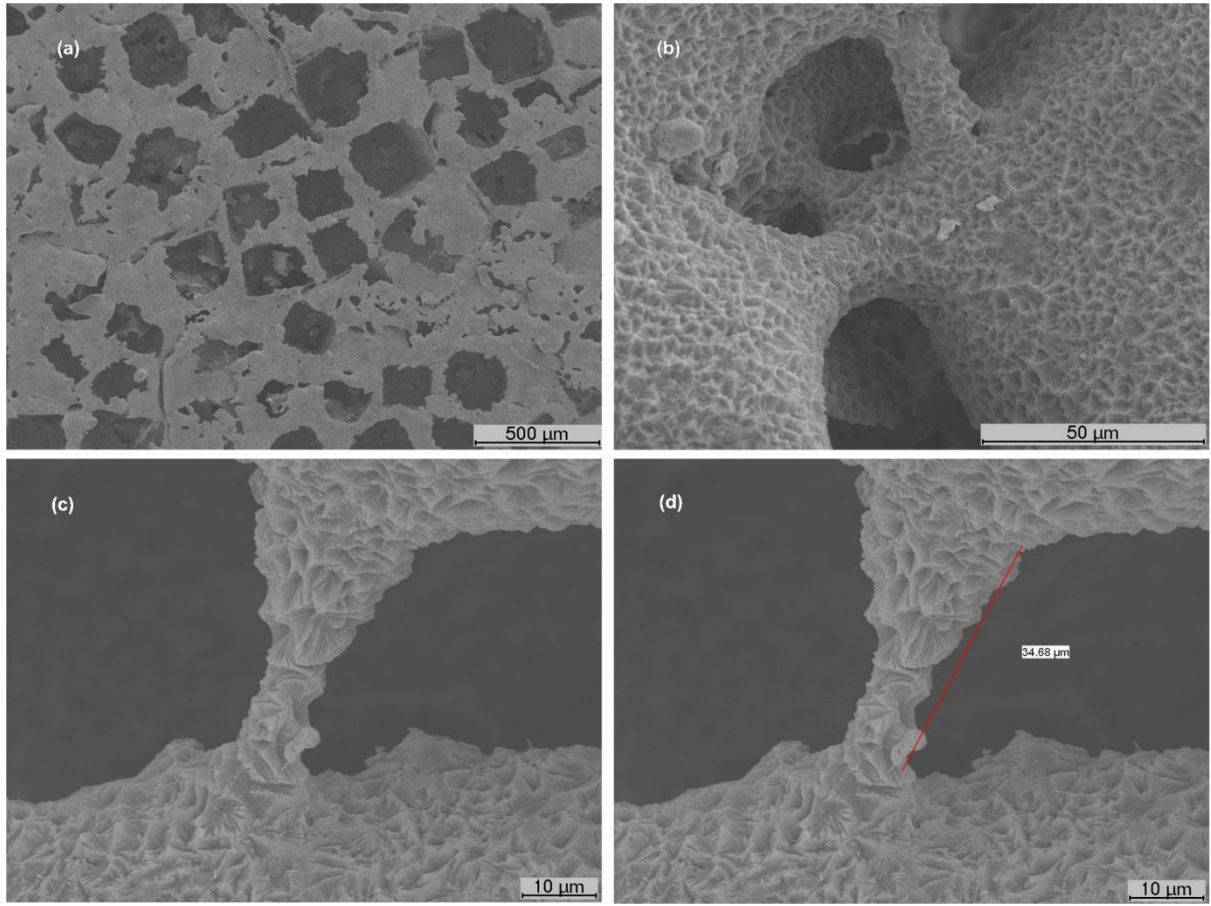


Figura 23: a) corte transversal da amostra com 40% de biovidro onde se observa a distribuição da macroporosidade (ampliação 50x); b) interconectividade presente na amostra (ampliação 900x); c) visualização dum vínculo espesso e rugoso presente bem como a boa sinterização deste (ampliação 1500x); d) medição do vínculo apresentado (ampliação 1500x).

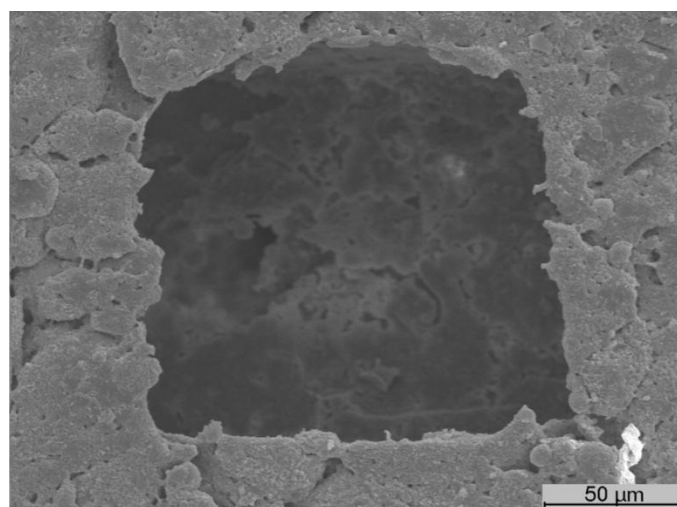


Figura 24: Micrografia dum macroporo com formato quadrangular (ampliação 500x).

3.10. Propriedades físicas

3.10.1. Interconectividade

A interconectividade dos poros por infiltração do azul metileno permitiu averiguar a interconexão entre os macroporos presentes na microestrutura do biovidro (figura 26, 27, 28). Este teste apenas alegou a indicação da interconexão, caso não haja o vínculo entre estes ocorre como na figura 25 a não ascensão do corante ao longo da amostra sendo apenas colorida a parte que se encontra em contacto com o corante.

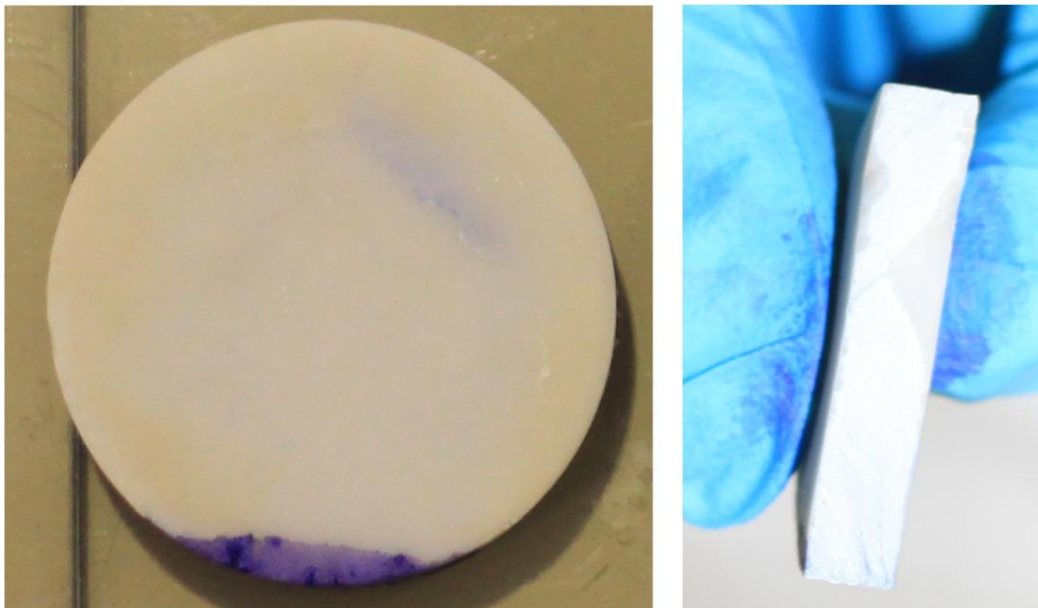


Figura 25: a) Imagem de uma amostra de 100% de biovidro após imersão no azul metileno em que não se visualiza qualquer subida do corante; b) corte transversal para comprovação da não existência do azul metileno no interior da amostra.

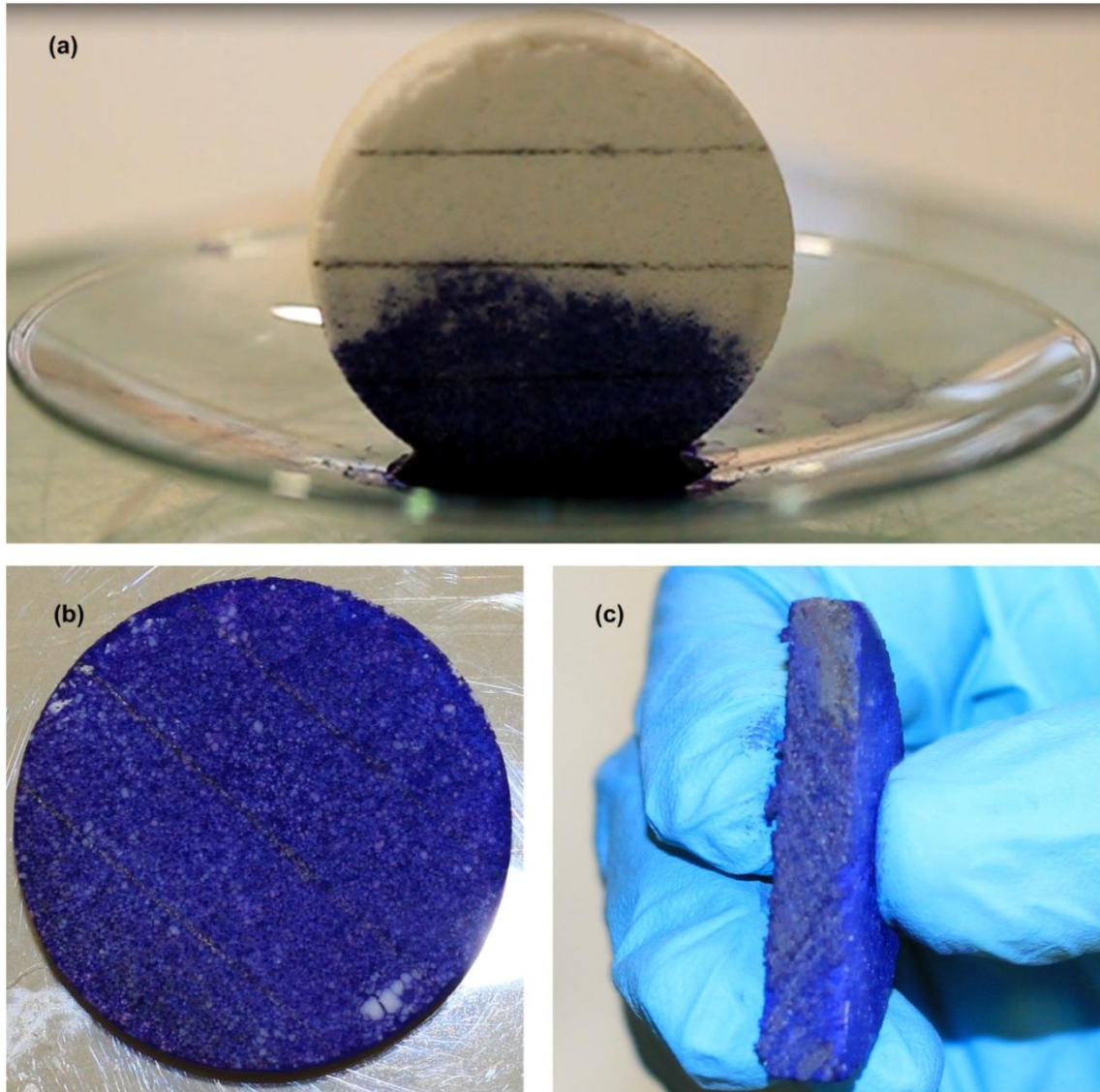


Figura 26: a) Imagem que ilustra o processo de imersão da amostra com 60% de biovidro onde se observa a chegada a 1/2 do volume do corpo de prova; b) corpo de prova com 60% biovidro completamente corado pelo azul metileno; c) corte transversal do corpo onde se confirma que o interior da amostra se encontra corado.

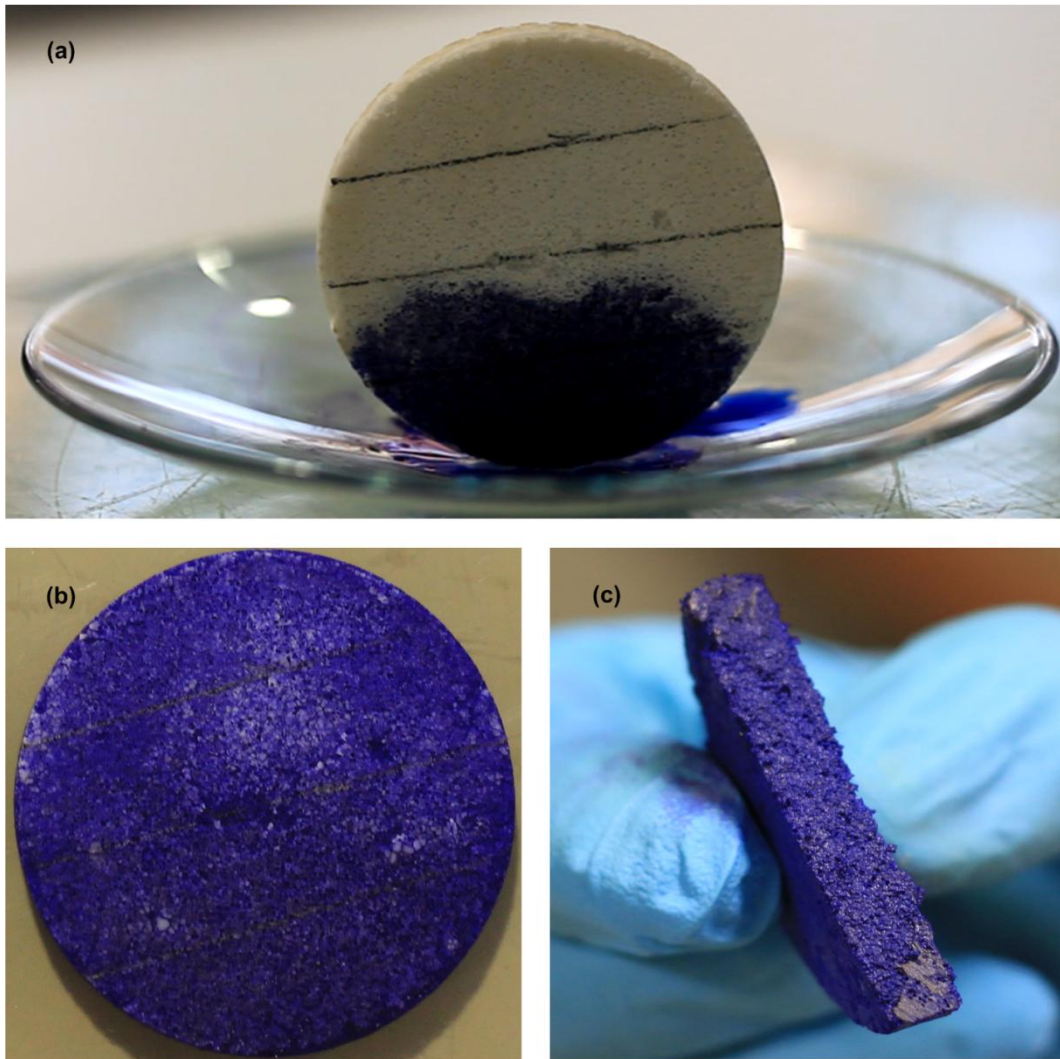


Figura 27: a) Imagem ilustrativa do processo de imersão da amostra com 40% de biovidro onde se visualiza a chegada a $\frac{1}{2}$ do volume do corpo de prova; b) corpo de prova com 40% biovidro totalmente corado pelo azul metileno; c) corte transversal do corpo onde se confirma que o interior da amostra se encontra corado.

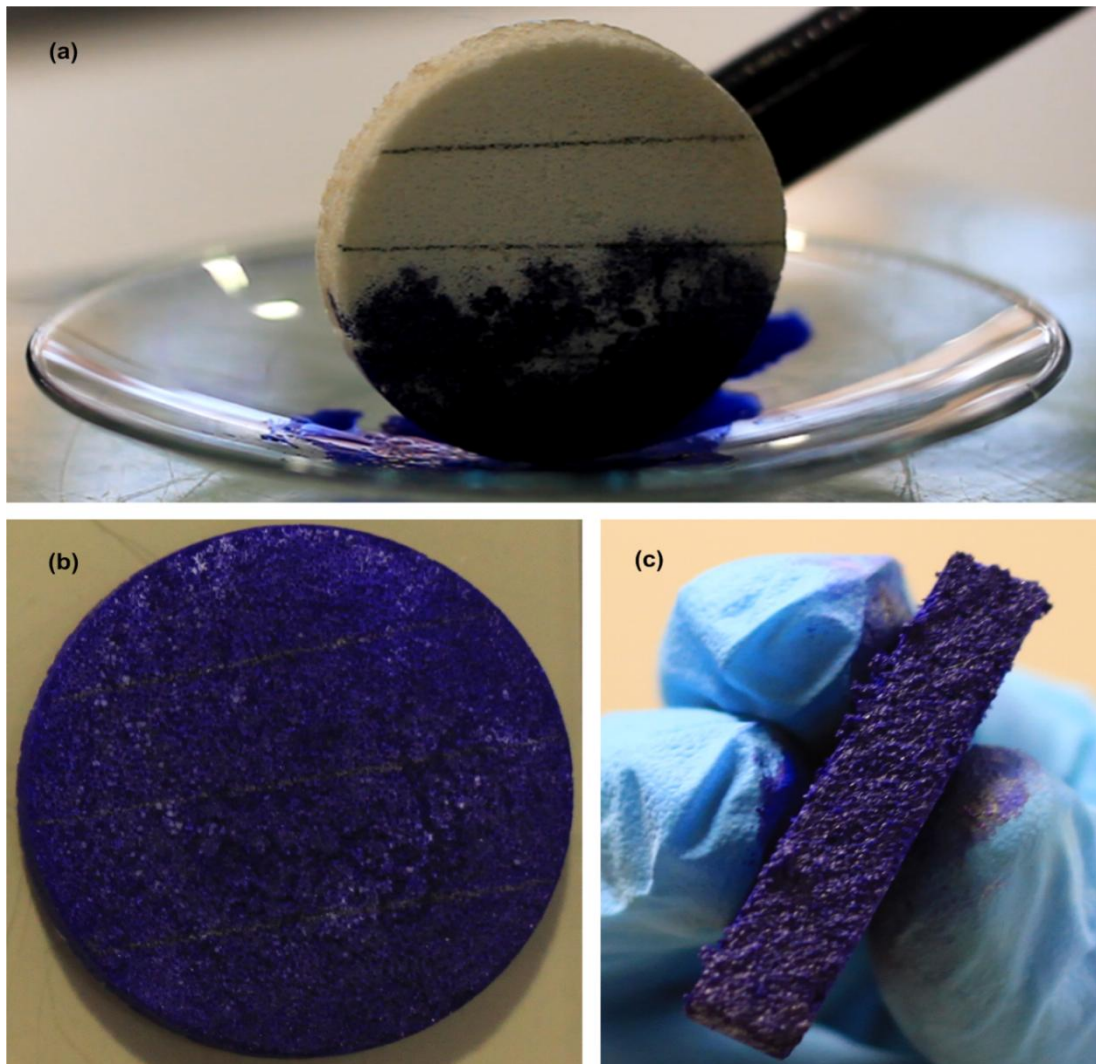


Figura 28: a) Imagem ilustrativa do processo de imersão da amostra com 40% de biovidro onde se visualiza a chegada aos 40% do volume do corpo de prova; b) corpo de prova com 40% biovidro totalmente corado pelo azul metileno; c) corte transversal do corpo onde se confirma que o interior da amostra se encontra corado.

Como se pode visualizar pela figura 29 há diferentes tonalidades, o azul mais atenuado indica-nos uma adsorção mais lenta que pode ser atribuída à presença de canais mais estreitos, por outro lado, o azul concentrado indica-nos que o fluxo do corante através de canais mais amplos pelo que nenhuma zona não ficou por colorir. Com isto conclui-se que quanto maior a porosidade, caso haja interconexão entre os macroporos da rede, mais permeável será o corpo de prova.

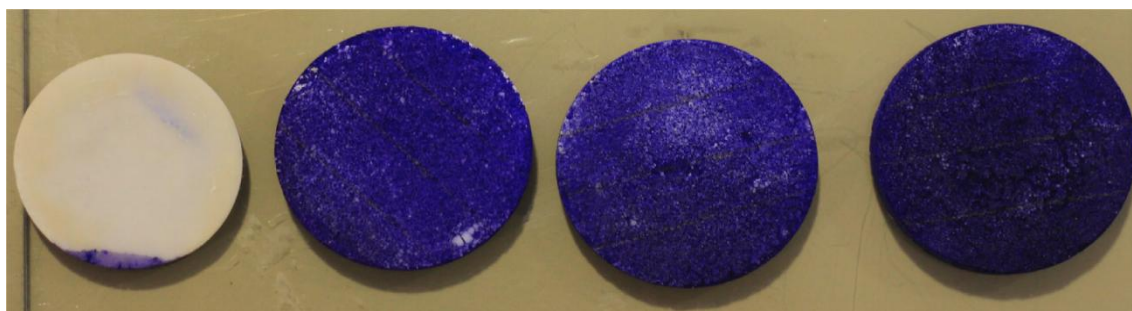


Figura 29: fotografia final após a imersão de todos os corpos de prova em azul metileno.

3.10.2. Método de Arquimedes

Verifica-se, pelo método de Arquimedes, que para diferentes percentagens de biovidro presente em cada amostra se obtém diferentes valores de densidade, porosidade e adsorção de água como se encontra representado na tabela seguinte.

Tabela 15: Propriedades físicas das amostras.

	Composição Biovidro			
	100%	60%	50%	40%
fr	2,67	1,84	1,61	1,7
BD (g/cm ³)	2,61	1,1	0,87	0,76
AA (%)	0,73	36	53	73,5
PA (%)	1,912	40,123	46,01	55,52
VA (g/cm ³)	5,31	4,77	4,34	4,29
φ	-	0,399	0,468	0,436
Dc (g/cm ³)	0,905	1,35	1,23	1,47

DR (g/cm ³)	1,02	1,67	1,85	2,24
DS (g/cm ³)	2,51	3,06	3,36	4,22

Através da análise da tabela 18 verifica-se que há um aumento da DR em função da redução da biovidro na composição, este comportamento sucede devido à morfologia das partículas de biovidro irregulares em função do sal, bem como durante o processo do choque térmico, há uma tensão residual térmica devido há diferença do CTE entre as fases, pode ser uma justificação da redução do valor da densidade relativa.

Durante o ciclo de sinterização, verifica-se que, tanto a presença de granulometria bimodal do biovidro como a diferença entre esta e o sal, são fundamentais no processo de densificação. Quanto maior o teor de sal adicionado, maior é a DS uma vez que existe uma maior DC entre as partículas de sal e de biovidro. A presença de pequenas partículas é fundamental durante este ciclo pois favorecem a coalescência da amostra.

Elevados valores de BD indicam-nos que as trabéculas da rede da microestrutura encontram-se com maior resistência como se pode comparar com os resultados obtidos e indicados pela tabela 18, isto fundamenta o facto que na tabela 18 obtivemos valores superiores de BD nos corpos com maior percentagem de biovidro uma vez que estes apresentam uma diferença no valor de porosidade.

Na figura 30, podemos observar que quanto maior a porosidade aparente existente nos corpos de prova, menor será o seu volume aparente. Este facto atribui-se ao significado da macroporosidade, que consiste em espaços vazios que ocupam um determinado volume existente em cada corpo de prova, logo quando efetuamos o seu cálculo, o volume da amostra será superior nos corpos que possuem maior percentagem de biovidro pois possuem um menor grau de porosidade.

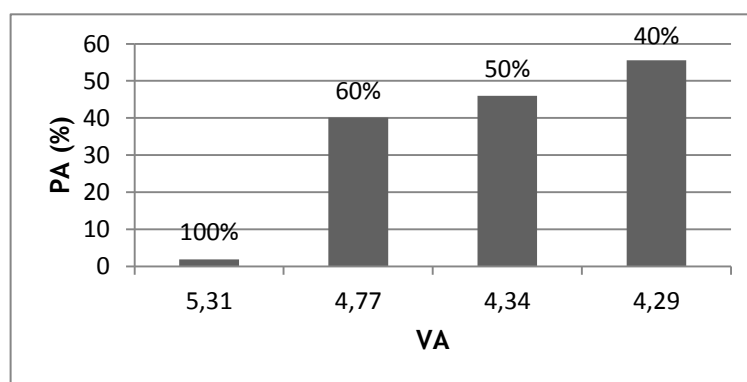


Figura 30: Evolução da porosidade aparente em função do volume aparente para os corpos de prova com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.

Existe uma relação crescente entre a água absorvida e a porosidade. Quanto maior a porosidade e menor a percentagem de biovidro na composição dos corpos de prova, maior será a água retida nos seus macroporos. Esta relação é um indicador de uma elevada taxa de porosidade aberta presente nos nossos ensaios (figura 31).

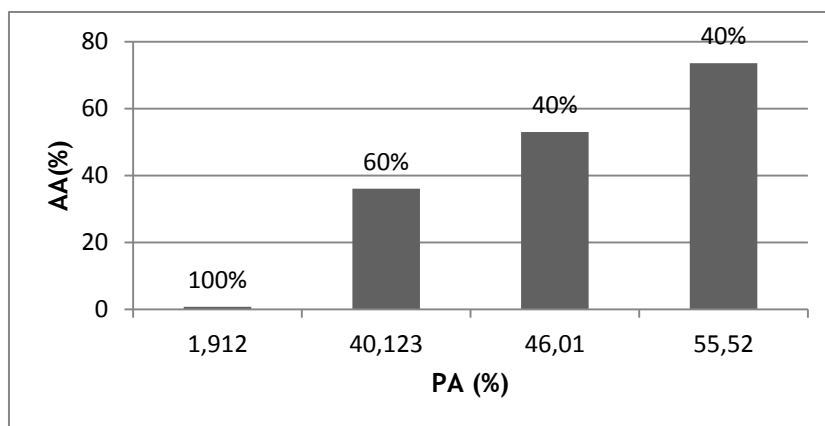


Figura 31: Evolução da água absorvida em função da porosidade aparente para os corpos de prova com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.

A fração de sal retido após a lixiviação, figura 32, é superior nos corpos de prova com menor adição de sal e, que possuem uma menor porosidade aparente. Este dado, também é um indicador da boa interconectividade da rede, uma vez que os valores retidos podem ser considerados como pequenos e estão associados à porosidade fechada.

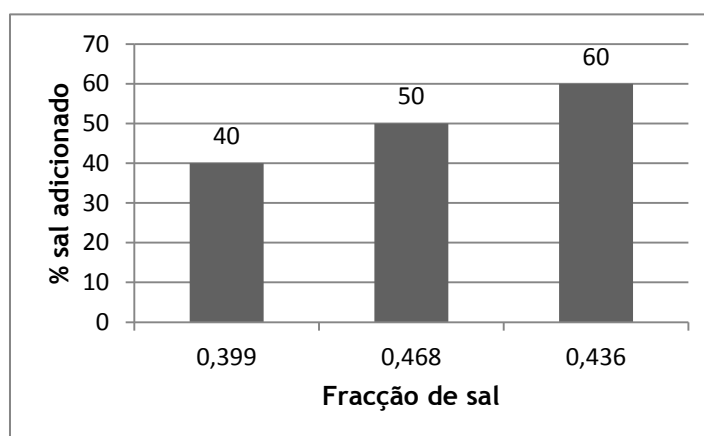


Figura 32: Evolução da adição de sal adicionado na fabricação dos corpos de prova e o sal retido após o processo de lixiviação.

3.11. Porosidade

O ensaio de porosidade por intrusão de mercúrio iniciou-se com uma baixa pressão e posteriormente empregou-se uma alta pressão, a alta pressão é responsável pela destruição das estruturas internas devido à fragilidade das trabéculas. Pode-se observar, através da análise da figura seguinte, que o caminho seguido na primeira fase de intrusão é diferente da segunda fase de extrusão do mercúrio, tal deve-se ao facto na primeira permanecer vestígios de mercúrio na amostra logo, na segunda fase não acompanha a parte dos poros identificada pela intrusão.

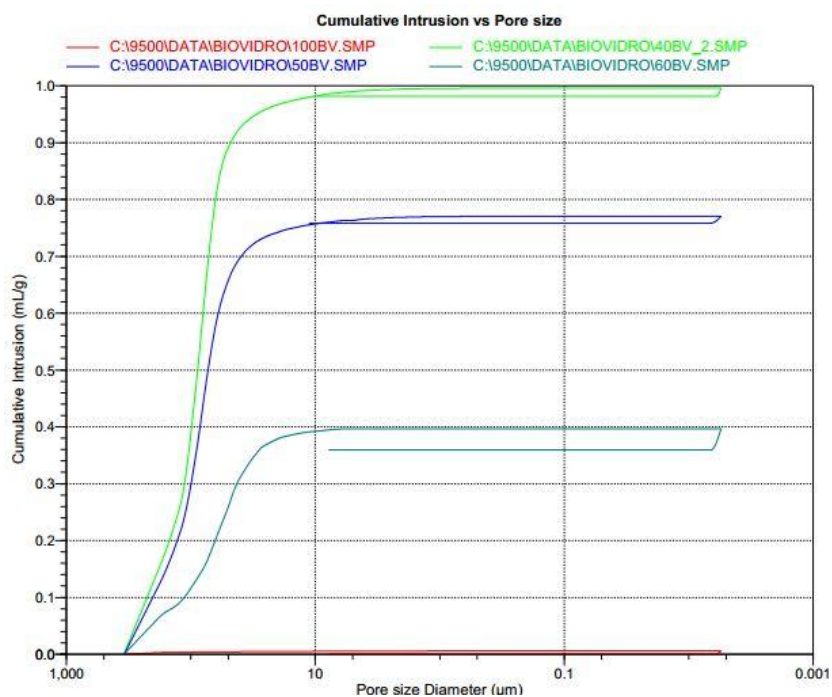


Figura 33: Volume cumulativo (ml/g) em função do diâmetro do poro (μm) para as amostras com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.

Pela análise da figura 34, visualiza-se que a curva possui duas regiões distintas para o diâmetro de poro, esta distribuição deve-se à presença bimodal do tamanho das partículas presentes na mistura utilizada na sinterização das amostras, mas apresenta maior representatividade na faixa de 90 μ m.

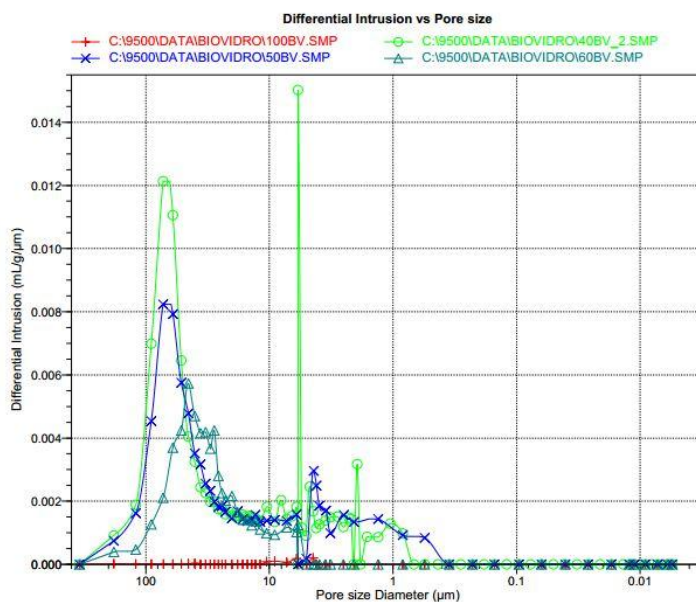


Figura 34: Volume incremental (mL/g) em função do diâmetro do poro (μ m) para as amostras com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.

Tabela 16: Resultados obtidos pelo PIM.

	Composição Biovidro			
	100%	60%	50%	40%
Volume total de intrusão (mL/g)	0,0059	0,3967	0,7702	0,9957
Área total dos poros (m²/g)	0,001	0,030	0,055	0,0646
Média do diâmetro dos poros (μm)	6,516	64,073	85,937	88,161

Pela tabela anterior, pode-se verificar que há uma maior intrusão de volume de mercúrio nas amostras mais porosas, isto é, com menor percentagem de biovidro presente nas amostras. Tal deve-se ao aumento da área total bem como no incremento do diâmetro.

O tamanho do poro obtido na amostra de 100% de biovidro corresponde a valores de microporosidade atribuído durante o processo de sinterização. Estes correspondem a aproximadamente 0,59% do volume total dos poros abertos presente na amostra, distribuem-se entre aproximadamente 0,0055 a 13µm sendo o valor mais frequente 6,5µm.

Em relação às amostras de 60%, 50% e 40%, os poros apresentados na média são considerados como macroporos sendo atribuídos pela presença de sal durante a sinterização que são removidos na lixiviação deixando espaços vazios. Para as amostras de 60% e 50%, o intervalo de distribuição encontra-se aproximadamente de 1 a 180 µm sendo para a amostra de 60% o valor mais frequente 64,1µm, cujo o volume da porosidade aberta é sensivelmente de 39,67% e, no caso da amostra de 50%, o valor frequente é aproximadamente de 85,9µm sendo o volume de porosidade aberta de sensivelmente 77,02%. A amostra de 40% abrange um maior intervalo de distribuição aproximadamente 2 a 263µm sendo o valor mais frequente 88,2 µm cujo o seu volume é sensivelmente 99,57%.

Comparando a análise obtida através de SEM e PIM averigua-se que este apresenta um tamanho de poro bastante inferior sendo este valor atribuído à técnica de medição da pressão em ciclos ou estreitamento circular capaz de reduzir o diâmetro, obtendo-se um assim um valor inferior.

3.12. Caracterização mecânica

Os valores obtidos para a resistência à compressão encontram-se alistados na tabela seguinte em função da composição e da existência ou ausência de maturação das amostras. Valores superiores foram obtidos em amostras com maior percentagem de biovidro, uma vez que, quanto maior é a percentagem de biovidro, mais reforçadas estão as suas trabéculas pois possuem maior densidade (figura 35) têm menor porosidade e número de fraturas.

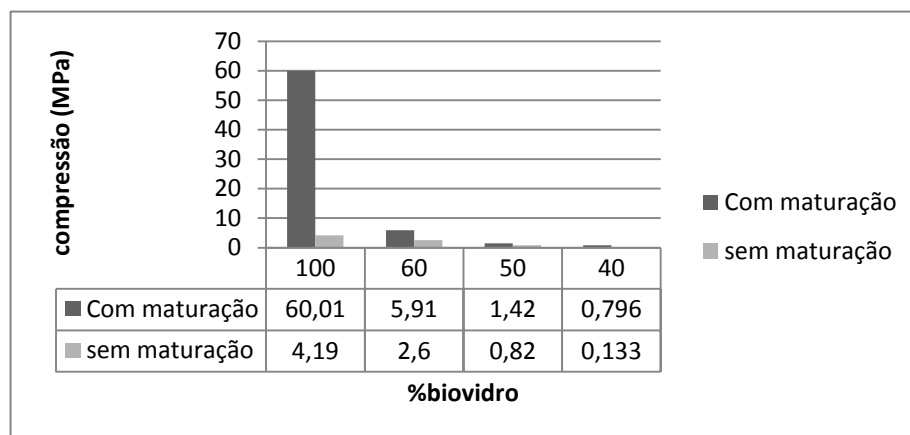


Figura 35: representação da compressão em função da percentagem de biovidro em cada corpo de prova com maturação e sem maturação.

Pela análise da tabela 19 pode visualizar-se que a imersão das amostras em água (maturação) melhora as propriedades mecânicas pois a matriz torna-se mais rígida com o tempo. Uma forma de aumentar os valores de resistência mecânica é melhorar a sua microestrutura, aumentando o seu valor de densidade bem como diminuir ao máximo a presença de defeitos, como por exemplo fissuras, nos corpos de prova.

Tabela 17: Resultados da resistência à compressão nos corpos de prova com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro, com maturação (C) e sem maturação (S).

Estudo de compressão (MPa)							
100%		60%		50%		40%	
S	c	s	c	S	C	S	C
1,27	44,35	2,09	8,88	1,185	1,34	0,136	1,22
7,11	54,03	2,18	3,58	0,608	1,46	0,179	0,46
7,08	78,79	2,89	5,79	0,959	1,46	0,133	1,70
6,53	63,23	1,52	5,39	0,54	1,405	0,084	0,60
Valor médio							
5,5	60,01	2,03	5,91	0,82	1,42	0,133	0,796
Desvio padrão							
2,831	14,652	0,562	2,201	0,303	0,057	0,039	0,574

Na tabela 20, apenas se pode obter os valores de dureza para as amostras de 100% e 60% de biovidro uma vez que as restantes amostras são demasiadamente porosas não se conseguindo visualizar a marca de indentação devido à fragilidade apresentada pela porosidade, tornando-se assim um especto crítico uma vez que a carga de indentação influencia o tamanho e o comprimento da trinca, sendo dependente da microestrutura do biomaterial. Mesmo no corpo de prova de 60% de biovidro, apenas conseguimos efetuar três ensaios.

Os resultados de microdureza Vickers são superiores no corpo de prova de 100% do que os de 60%, deve-se à maior dureza inerente ao biovidro. Quanto maior for a percentagem de biovidro no corpo de prova, maior será a sua microdureza.

Tabela 18: Dureza Vickers (HV) das amostras com 100% e 60% de biovidro.

100% Biovidro	60% Biovidro
Dureza de Vickers (HV)	
680	289
652	308
696	262
647	-
662	-
Valor médio	
667,4	286,3
Desvio padrão	
20,37	23,12

Através da análise dos resultados pelo método de Arquimedes (norma ASTM C20-00 (2010)) e pelos resultados obtidos para a caracterização mecânica, pudemos concluir que a densidade possui um papel ativo nas propriedades mecânicas, uma vez que estes valores irão influenciar a dureza, resistência à flexão e à compressão.

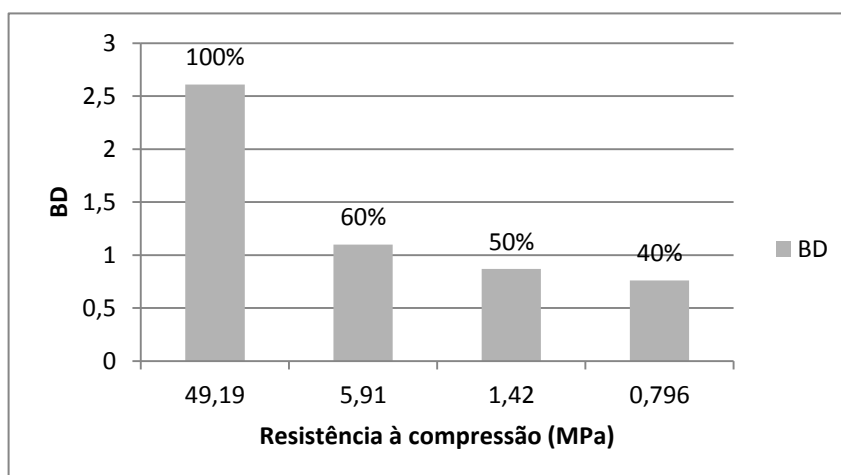


Figura 36: Efeito das densidades (densidade de sinterização e BD) na compressão para cada corpo de prova com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.

Da análise da figura 36, as amostras com maior BD exibem melhores propriedades mecânicas. Além do valor da densidade, devemos dar grande realce à porosidade eminente da microestrutura, uma vez que está diretamente relacionada e também irá afetar os valores mecânicos.

Tabela 19: Caracterização mecânica para os diferentes corpos de prova com composição de 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro, com maturação (C) e sem maturação (S).

	Dureza	Flexão	Compressão	
	(HV)	(MPa)	(MPa)	
	C	C	C	S
100%	667,4	-	6,53	63,23
60%	262	4,4725	5,91	1,82
50%	-	2,83236	1,42	0,82
40%	-	1,74779	0,796	0,133

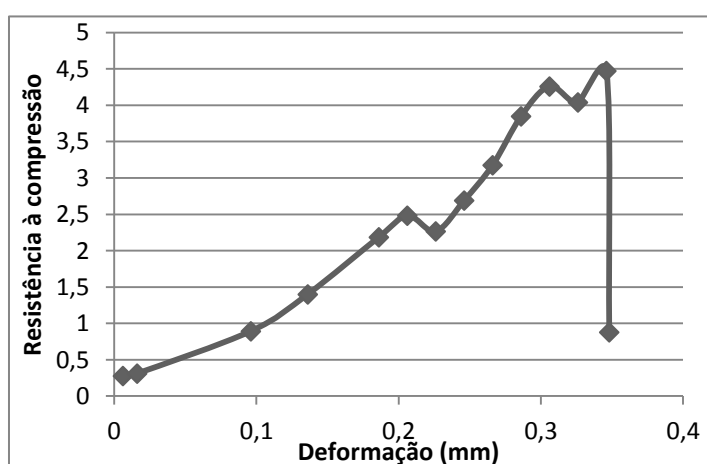


Figura 37: Resultado típico de suportes porosos para a tensão em função da deformação.

No gráfico anterior, apresenta-se um resultado típico da tensão em função da deformação em suportes porosos. Através da sua análise, observa-se uma inclinação positiva até obter um

valor superior, depois do alcance deste ponto, ocorre o colapso das trabéculas, sendo a amostra ainda capaz de suportar valores maiores uma vez que estes colapsos apenas envolvem trabéculas menos resistentes entre os poros.

Tabela 20: Resultados obtidos através da análise da propagação de pulsos ultrasónicos nos corpos de prova com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.

Composição em Biovidro (%)	Velocidade ultrasónica (μs)	Módulo de elasticidade (GPa)	Coefficiente de expansão Térmica ($\text{m/sx}10^5$)
100	6,51	1,1019	15089,9
60	5,94	0,4871	13770,7
50	4,72	0,1879	10927,8
40	4,61	0,1231	10683,3

Os valores de velocidade e módulo de elasticidade calculados através da técnica de ultra-sons para os diferentes corpos de prova apresentam-se na tabela 22. O valor do módulo de elasticidade foi superior para corpos de prova com maior percentagem de biovidro. É de realçar que esta medida experimental nos oferece informações a partir do interior dos corpos de prova, com isto pode-se concluir que para valores inferiores de biovidro, a presença de porosidade é superior o que pode reduzir o valor do módulo de elasticidade. Isto pode-se visualizar a partir do valor da velocidade, uma vez que os corpos porosos implicam uma menor velocidade para o sinal atingir o seu lado oposto. Os valores apresentados são inferiores aos que deveriam deter por este método uma vez que não utilizamos o gel, introduzindo assim um erro de leitura na interface entre a amostra e o transdutor, para não contaminarmos os corpos de prova.

3.13. Avaliação biológica

3.13.1. Citotoxicidade

As células humanas dos osteoblastos foram semeadas à mesma densidade inicial em placas de 96 poços, com ou sem biomateriais para avaliar a citotoxicidade. A adesão celular e proliferação foram caracterizadas utilizando um microscópio de luz invertido (figura 41). Da figura 39 conclui-se que as células aderiram e cresceram na presença das amostras com 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro e no controlo negativo. No entanto, o controlo positivo não foi observado a adesão celular. As células mortas com a sua típica forma esférica foram

visualizadas. A visualização do crescimento celular na presença das amostras mostrou que todos os biomateriais testados são biocompatíveis.

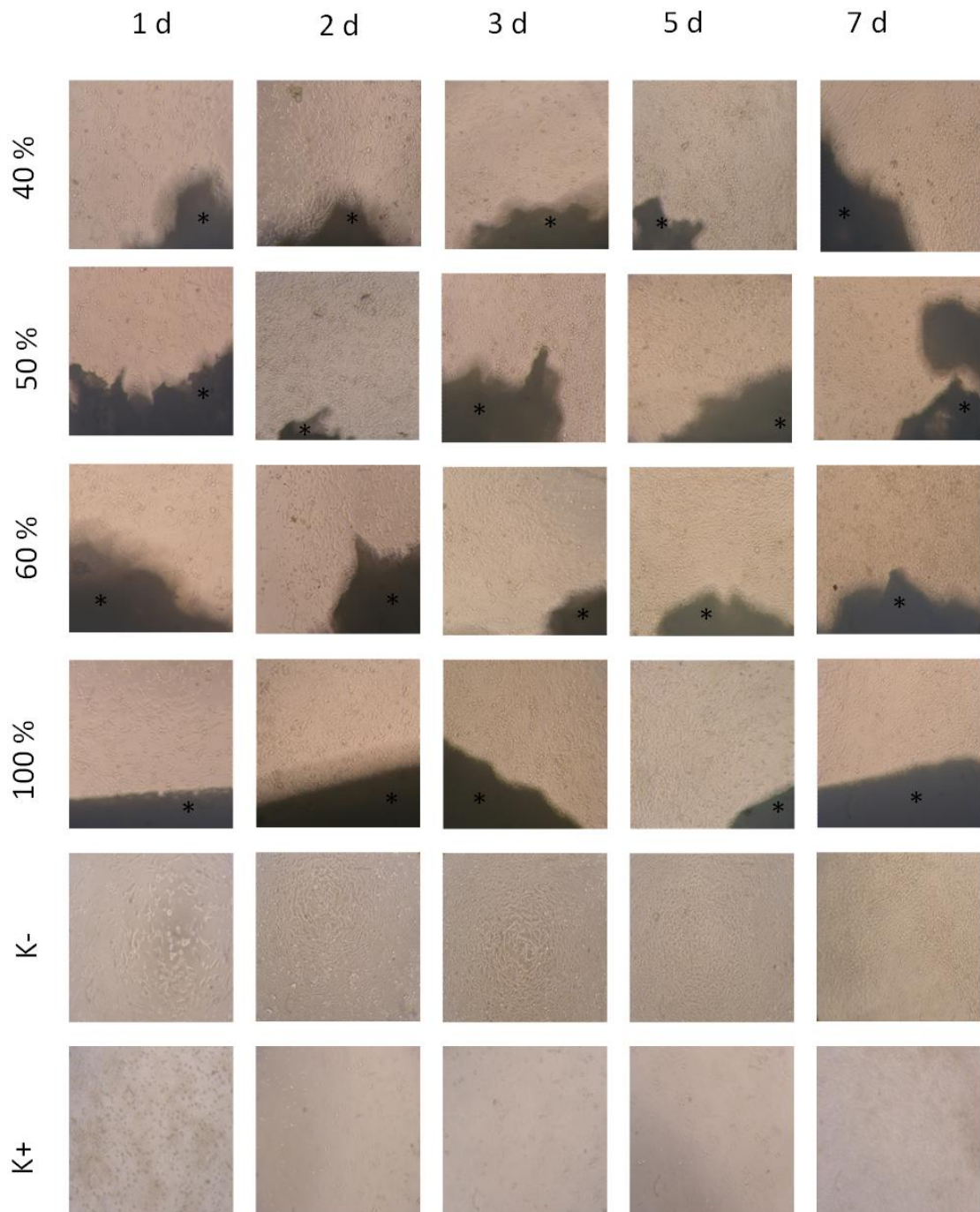


Figura 38: Avaliação da atividade celular após 1,2,3,4,5,6 e 7 dias; o controle negativo (K⁻); o controle positivo (K⁺); biomaterial de 100%, 60%, 50% e 40% de biovidro.

O ensaio de MTS também foi concretizado com o fim de melhorar caracterização dos perfis citotóxicos dos biomateriais. Os resultados do ensaio MTS, como pudemos analisar pela figura 40, demonstraram que as células na presença de amostras testadas tiveram uma viabilidade semelhante à do controlo negativo. Além disso, a análise estatística realizada para os resultados de 7 dias revelou uma diferença estatisticamente significativa entre o controlo positivo e as células expostas aos biomateriais e do controlo negativo ($p < 0,0001$). Estes resultados revelaram que estas amostras de biovidro, num futuro próximo, são bons candidatos a ser aplicados para aplicações biomédicas. Cada resultado é a média \pm erro padrão da média de pelo menos três experiências.

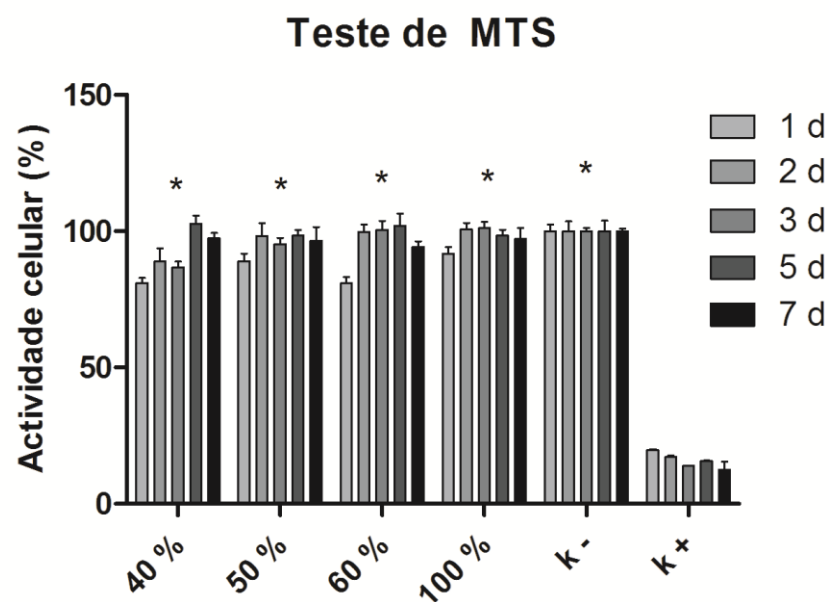


Figura 39: Micrografia de células osteoblásticas de seres humanos após ser semeado na presença dos biomateriais (*) durante 24, 48 e 72h; o controlo negativo (K⁻); o controlo positivo (K⁺). Ampliação de 100x.

3.13.2. Testes de bioatividade

A figura 40 representa a imagem SEM do corpo de prova com 40% de biovidro lixiviadas após a imersão por 7 dias em SBF. Nesta imagem, observa-se a deposição de uma camada rica e uniforme em Ca/P, que apresenta uma morfologia sensivelmente esférica. Todavia somente após 28 dias de imersão é que conseguimos visualizar uma forma muito semelhante da HA, uma vez que a deposição desta em materiais ósseos ocorre de uma forma mais lenta. A deposição destes iões ocorre de uma forma contínua à medida que o tempo de imersão se torna superior.

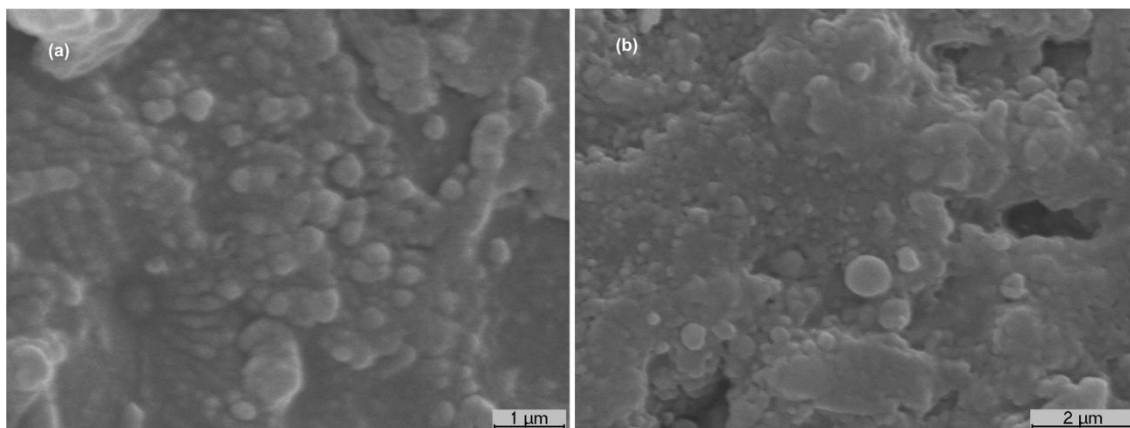
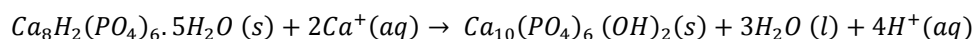


Figura 40: Resultado após 7 dias de imersão em SBF com ampliação de 15000x em a) e ampliação de 11000x em b).

Os resultados quanto a análise EDS da figura 41 representam o estudo da camada depositada à superfície do biomaterial com 40% de biovidro são obtidos através de valores quantitativos das áreas dos picos dos respetivos elementos. A razão de CA/P obtida através deste processo foi de aproximadamente 1,3 que corresponde ao fosfato octacálcico ($Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$), cujo o seu valor teórico é representado por $Ca/P=1,33$. A fase OCP é considerada como metastável sendo esta uma fase precursora da HCA ($Ca/P=1,67$) com o aumento do tempo de imersão. Esta transição de fase pode ser descrita pela seguinte equação, cujo o processo corresponde à hidrólise da OCP:



Este resultado demonstra que o que foi visualizado através da técnica de SEM é, de facto, Ca-P.

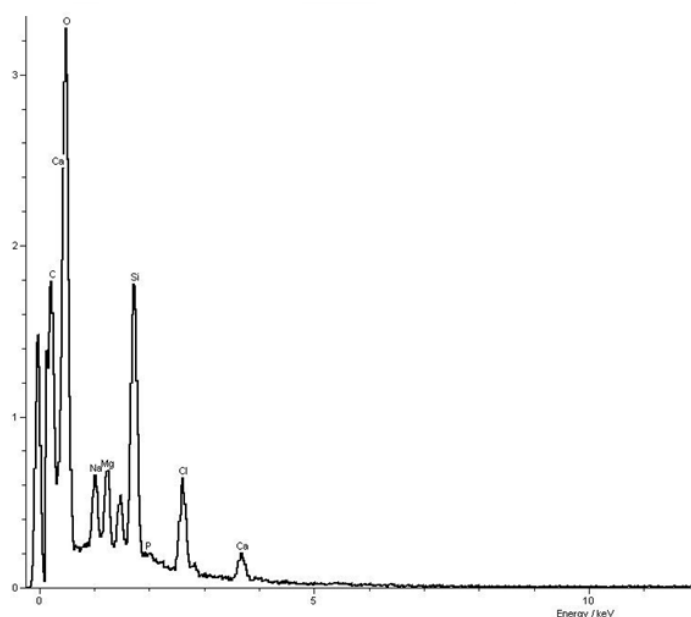


Figura 41: Fluxograma do EDS obtido da camada depositada à superfície do biomaterial.

A figura 42 demonstra a variação do pH ao longo do tempo de imersão na amostra de 40% de biovidro. Verifica-se um aumento progressivo do pH ao longo do tempo de imersão sendo, o seu valor passado sete dias igual a 9. Tais variações de pH atuam de uma forma significativa nos mecanismos envolvidos no processo de dissolução/ precipitação, considerando que as reações envolvidas durante a formação de fases intermediárias da HA, conclui-se valores de alcalinos de pH favorecem a deposição de HA e/ou fases intermediários.

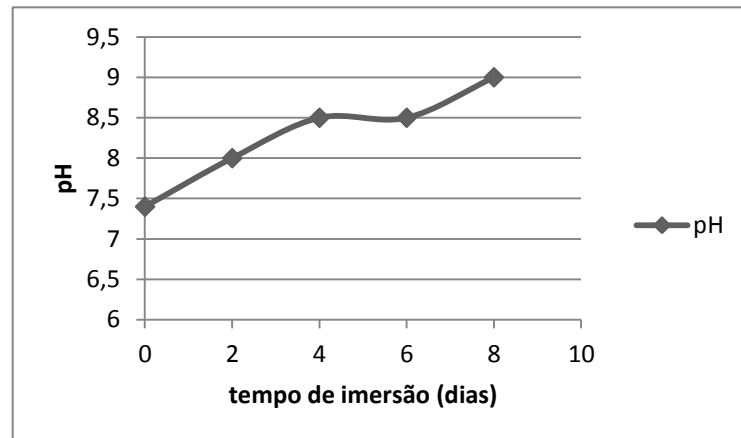


Figura 42: Evolução da variação do pH em função ao tempo de imersão.

Outro fator que influenciou a dissolução foi a microestrutura porosa pois um elevado tamanho de macroporo aumenta a taxa de dissolução.

Outro dado relevante, foram os baixos valores entre a área específica da amostra e o volume de SBF empregues neste estudo, promoveram a formação de camadas de OCP, porém a sua cinética é mais lenta. Em períodos mais longos. É de esperar que o SBF ocorra modificação da morfologia dos precipitados, nesta etapa, apresentando valores de HA.

4. Conclusão

No estudo cinético da sinterização averigua-se que a nossa amostra possui uma reduzida cristalização podendo concluir-se que houve um bom controlo dos parâmetros de térmicos o que acarretou em densidades superiores das trabéculas das nossas amostras com diferentes percentagens de biovidro.

O osso trabecular possui valores de compressão entre 2-12MPa, sendo que as nossas amostras se encontram dentro deste intervalo exceto a de 40% de biovidro, mas para valores de 90% de porosidade associada a esta amostra, obtivemos valores de compressão cerca de 50% superiores aos valores do Bioglass 45s5® tradicionalmente empregue. Um dos fatores que conduziu à obtenção de valores superiores foi a utilização da maturação que melhorou cerca de 16 % em relação ao valor inicial para cada formulação considerando este método essencial na manufatura do corpo de prova final. Para valores de módulo de elasticidade, obtiveram-se valores entre 0,123-1,9GPa, estes encontram-se dentro dos valores tabelados para o osso, uma vez que este detém dum intervalo de 0,05-0,5GPa. Os resultados dos estudos mecânicos indicam a possibilidade de melhorar as características dos vidros bioativos simplesmente otimizando a composição. Ao variar o nível de rutura da rede, a produção dum biovidro com propriedades físicas torna-se viável. Tal pode ser conseguido através da manipulação de quantidades molares relativas aos modificadores de rede.

Após a lixiviação das diferentes amostras, atingiram-se uma porosidade aberta interligada variável entre 39 a 99 %, bem como um tamanho de macroporos entre 2 a 280µm para as diferentes percentagens de sal adicionado o que vai de acordo com a literatura. No presente estudo, pode-se concluir que o uso do sal como porogénio dirige há relevância no tamanho dos poros, uma vez que o seu valor depende da granulometria empregue do sal. A determinação da distribuição volumétrica dos poros é uma característica necessária ao controlo de qualidade dos biomateriais para demonstrar a viabilidade da bioatividade.

Os resultados de citotoxicidade mostram a não toxicidade das nossas amostras, sendo estas capazes de induzir à proliferação. Após a imersão em SBF, verifica-se que as amostras possuem uma reatividade superficial, uma vez que houve a deposição de um intermediário da HA. Estes dois testes realizados *in vitro* indicam que o nosso biovidro são potencialmente bioativos estando aptos, para um futuro próximo serem utilizados após uma análise *in vivo*.

A composição do biovidro otimizada neste trabalho apresenta potencialidades que fundamentam a continuidade da investigação promovendo assim, à otimização e funcionalização das mesmas no corpo humano. As características finais de um determinado

produto definem os seus limites de utilização, isto é, através da análise de toda a literatura e do conhecimento atingido neste domínio, averigua-se a possibilidade de melhorar o desempenho das características do biovidro apresentado neste trabalho.

4.1. Proposta de trabalhos futuros

Ao longo do trabalho foram aprendidas técnicas e metodologias que permitem elaborar um campo de trabalho na melhoria dos materiais e otimização das suas propriedades.

4.1.1. Reforço de biovidro com fibras

Através da análise da literatura, verifica-se que a presença de uma camada forte permitirá obter uma microestrutura possuidora de trabéculas mais resistentes, uma em vez que o scaffold terá não só uma camada macroporosa, mas também outro revestimento que irá auxiliar o reforço como pudemos visualizar na figura 43 (Xu, Burguera et al. 2007).

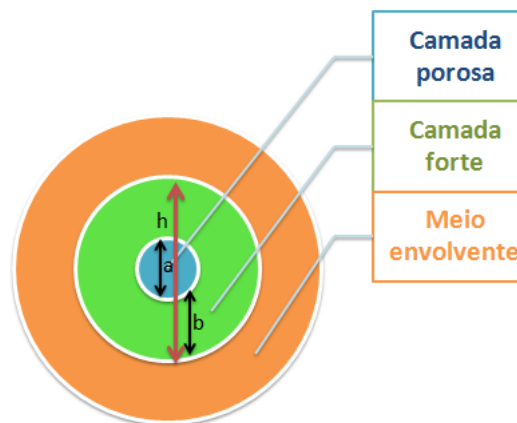


Figura 43: Representação esquemática da microestrutura com a presença de uma camada forte.

Um possível efeito da relação da espessura (h) na propriedade da estrutura de camadas:

$$h = \frac{b}{a}$$

O objetivo da adição de um elemento de reforço é a busca de uma melhoria notável nas propriedades mecânicas do biovidro, o aumento da tenacidade à fratura e a diminuição do número de fissuras. Tanto a fibra como a matriz são assumidas para trabalhar em conjunto e, fornecer um sinergismo necessário para a criação de um composto eficaz a nível mecânico.

Iniciamos um estudo preliminar com fibras de carbono, uma vez que, têm sido empregues como reforço de biomateriais para alcançar valores de compressão e resistência à tração, assim como, melhorar a tenacidade. O uso deste tipo de fibras numa matriz de biovidro

permite-nos suportar valores superiores de carga uma vez que esta é transferida pela matriz para a fibra, por deformação de cisalhamento na interface matriz-fibra. A transferência de carga é possível devido às diferenças propriedades físicas da matriz e da fibra (Canal Barnils and Ginebra Molins 2012).

Das características fundamentais para obter um reforço no compósito final, as mais realçadas pela literatura são:

- Comprimento/ diâmetro da fibra;
- Tipo de fibras empregues e distribuição;
- Aderência;
- Fração volumétrica;
- Tipo de orientação no corpo de prova.

Da teoria dos materiais compósitos o aumento na fração de fibras, melhora o desempenho pois estas irão alojar-se nas microfissuras diminuindo a sua propagação, ou seja, as fibras de reforço terão um papel ativo neste processo quanto à sua diminuição que irá originar um aumento do módulo de elasticidade e da tensão máxima devido à resistência mecânica atribuída a estas fibras. Por vezes, a utilização de fibras curtas em grandes percentagens pode diminuir a eficiência do reforço uma vez que estas, devidas as suas reduzidas dimensões, tendem a ter dificuldades a ancorar-se a matriz e podem surgir problemas quanto à homogeneização durante o processo de mistura. Com isto surge o conceito de volume crítico permitindo determinar a quantidade de fibras necessárias sem que haja perturbação no reforço (Chou, Gao et al. 2010; Gao, Chou et al. 2010). O volume crítico é a função do comprimento, diâmetro e o tipo de fibra empregue bem como o seu método de obtenção. O valor mínimo para a fração volume de fibras (V_{cr}), isto é, a quantidade de fibras que asseguram a resistência da matriz pode ser descrito pela seguinte equação:

$$V_{crt} = \frac{\sigma_{mu}}{\sigma_{mu} + (\sigma_{fu} - \sigma'_f)}$$

Onde σ_{mu} resistência à fratura, σ'_f tensão na fibra quando a matriz falha σ_{fu} resistência à fratura da fibra.

As fibras de carbono empregues neste trabalho são descontínuas pois encontram-se dispersas aleatoriamente pela matriz e são de curtas dimensões. A fração volumétrica empregue foi de 1% do peso do corpo de prova com 40% de biovidro e 60% de sal (amostra de menor resistência). O processo de mistura foi efetuado através de agitador com a adição de um teor mínimo de acetona para auxiliar no processo de coligação da adesão da interface Fibra / biovidro, crucial para promover a transferência da tensão. De notar em consideração que as matrizes de biovidro são corpos porosos contendo uma porosidade com diferentes diâmetros

de macroporosidade que afeta as propriedades mecânicas mas também a interface fibra /matriz. O efeito da porosidade cria uma redução do contacto entre a fibra matriz.

Segundo a literatura, a introdução deste tipo de fibras não conduz a nenhuma inconveniência para o processo de mineralização através da deposição de HCA, uma vez que a adição destas, não poder dirigir a nenhuma alteração da biocompatibilidade na interface biovidro/fibras (Price, Waid et al. 2003; Canal Barnils and Ginebra Molins 2012).

A função destes ensaios preliminares foi avaliar a viabilidade da adição de um elemento de reforço e verificar quais os seus respetivos efeitos na microestrutura. Neste capítulo referiram-se as fibras de carbono pois era o material disponível e de fácil acesso no laboratório.

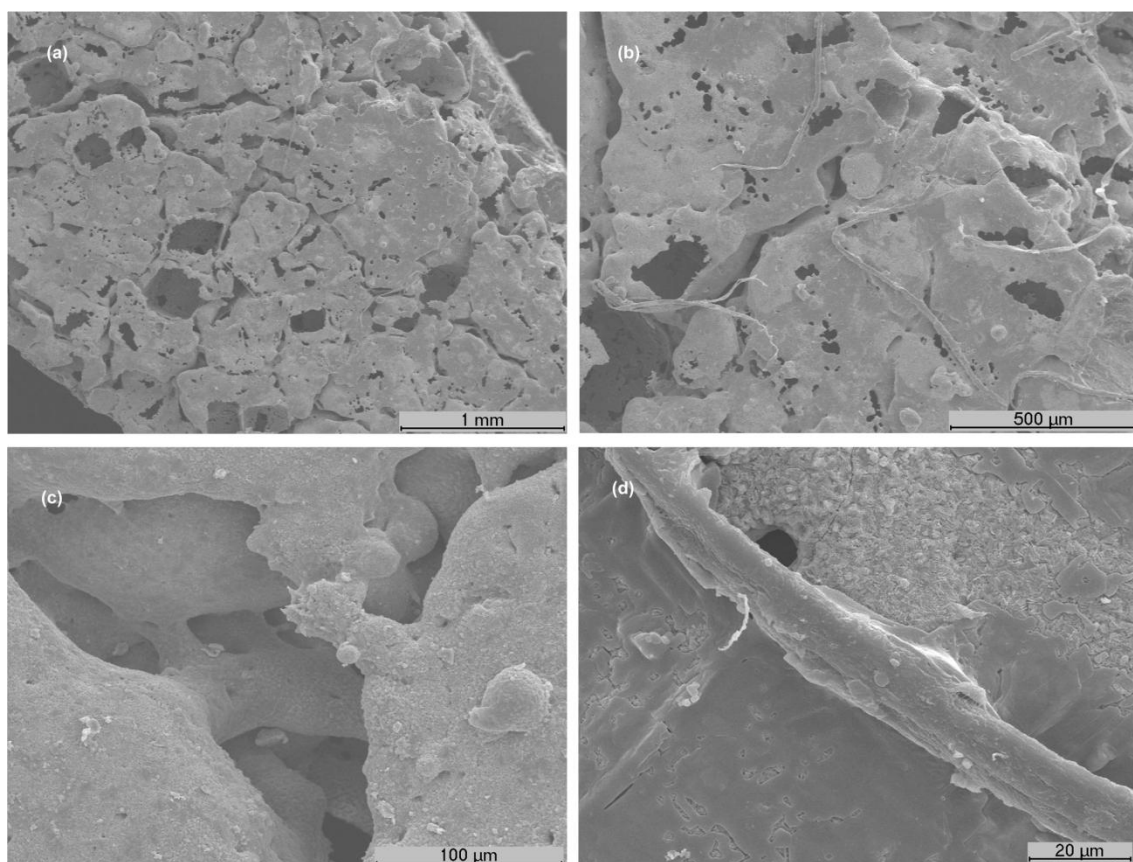


Figura 44: a e b) corte transversal da amostra com 40% de biovidro+fibras de carbono onde se observa a distribuição da macroporosidade (ampliação 35x e 80x respetivamente) bem como a presença de fibras; c) interconectividade presente na amostra (ampliação 400x); d) visualização da ligação da amostra com a fibra (ampliação 1100x)

Na figura 44 consente a interação da interface biovidro/fibra de carbono, onde pudemos visualizar a presença de fibras e a porosidade eminente (figura 44a e b) bem como a sua adesão à amostra (figura 44 d). Através do estudo da figura c pode-se concluir: a presença de fibras de carbono não altera a boa densificação das trabéculas e não altera a interconectividade mais interna presente, embora não se tenha visualizado, o que pode indicar que estas encontram-se preferencialmente à superfície devido às suas dimensões.

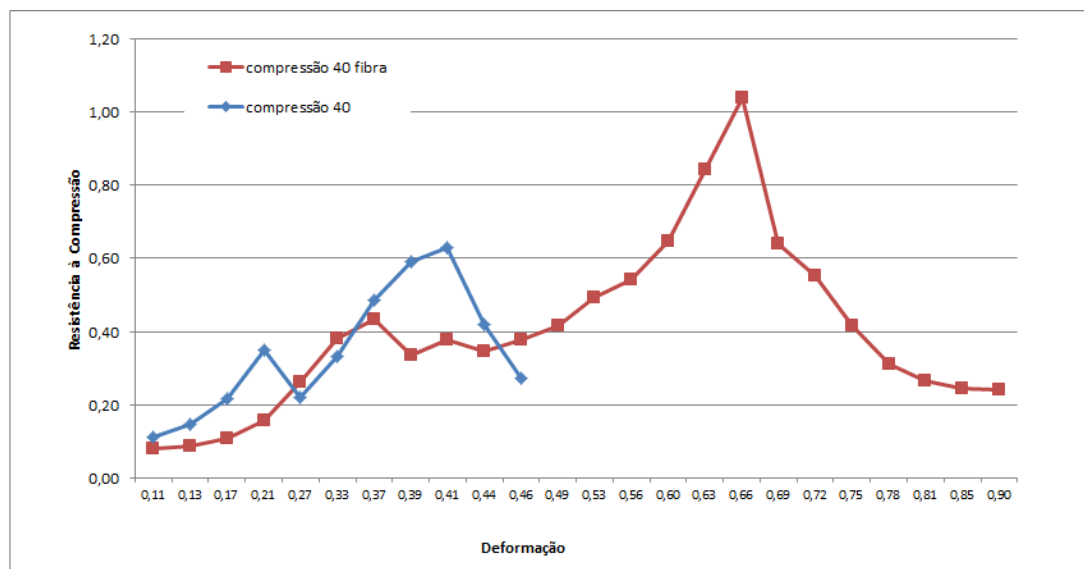


Figura 45: Resistência à compressão (Mpa) em função da deformação para a mostra com 40% de biovidro e 40% de biovidro + Fibra.

Na figura anterior pode-se averiguar o efeito benéfico da adição de fibras na amostra de 40% uma vez que o resultado da resistência à compressão aumentou sensivelmente 50% em relação à amostra sem a adição de fibras. Outro aspeto relevante é o colapso das trabéculas mais debilitadas ocorrem numa fase mais tardia na amostra com a adição de fibra comparativamente à outra amostra. Através deste ensaio, obtém-se uma mais-valia da empregabilidade de fibras em suportes porosos uma vez que melhorou significativamente o resultado deste ensaio.

4.1.2. Agente porogénio

A pesquisa do porogénio ideal possui o compromisso entre: o maior volume de poros, propriedades mecânicas e maior interconectividade.

O uso sal como agente porogénio na mistura de biovidro/fibras pode dificultar a homogeneidade da mistura criando-se aglomerados de sal/fibras levando à obtenção dum scaffold frágil. Outro ponto relevante era a dificuldade na remoção do sal no interior do scaffold devido à raridade da presença de interconexões entre os macroporos da superfície

com os do interior devido à presença de fibras que intersectavam os macroporos. Com isto, surge a necessidade de utilizar outro agente porogénio para facilitar a interconexão, reduzir o número de aglomerados e aumentar a resistência das trabéculas na amostra.

Uma boa solução será o uso de PVA (figura 46), visto que é um polímero hidrofílico, não necessitando de ser removido através de temperatura sendo muito vantajoso, pois o aumento da temperatura leva à formação da cristalização da amostra e à diminuição da bioatividade e pode ser removido em simultâneo com o sal pois este é removido através de lixiviação a quente (Tadic, Beckmann et al. 2004).

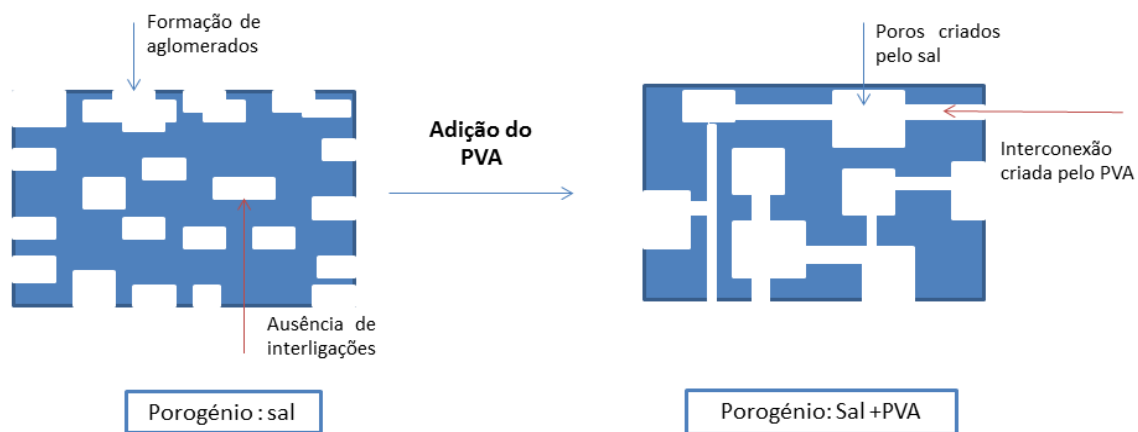


Figura 46: Esquema ilustrativo da presença dos agentes porogénio.

De forma a melhorar os resultados obtidos e compreender melhor o efeito do porogénio na amostra, bem como a bioatividade das diferentes formulações pensa-se que seria uma mais-valia a utilização de ensaios de espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de emissão por plasma induzido acoplado (ICP).

5. Bibliografia

- Albaro, J. L. A. (2001). "A Operação de Prensagem: Considerações Técnicas e sua Aplicação Industrial. Parte V: Descrição da Etapa de Prensagem." Cerâmica Industrial **6**(3): 26-32.
- Albero, J. L. A. (2000). "A Operação de Prensagem: Considerações Técnicas e sua Aplicação Industrial Parte I: O Preenchimento das Cavidades do Molde." Cerâmica Industrial **5**(5): 23-28.
- Amaral, M., M. A. Lopes, et al. (2002). "Densification route and mechanical properties of Si₃N₄-bioglass biocomposites." Biomaterials **23**(3): 857-862.
- Baino, F. and C. Vitale-Brovarone (2011). "Three-dimensional glass-derived scaffolds for bone tissue engineering: Current trends and forecasts for the future." Journal of Biomedical Materials Research Part A.
- Begum, A. N., V. Rajendran, et al. (2006). "Effect of thermal treatment on physical properties of bioactive glass." Materials chemistry and physics **96**(2): 409-417.
- Bellucci, D., V. Cannillo, et al. (2010). "Potassium based bioactive glass for bone tissue engineering." Ceramics International **36**(8): 2449-2453.
- Bellucci, D., V. Cannillo, et al. (2010). "Shell Scaffolds: A new approach towards high strength bioceramic scaffolds for bone regeneration." Materials Letters **64**(2): 203-206.
- Bellucci, D., V. Cannillo, et al. (2011). "Calcium and potassium addition to facilitate the sintering of bioactive glasses." Materials Letters.
- Bellucci, D., V. Cannillo, et al. (2011). "Coefficient of thermal expansion of bioactive glasses: Available literature data and analytical equation estimates." Ceramics International **37**(8): 2963-2972.
- Bellucci, D., V. Cannillo, et al. (2011). "A new potassium-based bioactive glass: Sintering behaviour and possible applications for bioceramic scaffolds." Ceramics International **37**(1): 145-157.
- Bellucci, D., V. Cannillo, et al. (2011). "Macroporous Bioglass®-derived scaffolds for bone tissue regeneration." Ceramics International **37**(5): 1575-1585.
- Bohner, M. and J. Lemaître (2009). "Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?" Biomaterials **30**(12): 2175-2179.
- Breed, S. and M. Hall (2012). "Regression model for predicting selected thermal properties of next-generation bioactive glasses." Acta biomaterialia.

Bretcanu, O., X. Chatzistavrou, et al. (2009). "Sintering and crystallisation of 45S5 Bioglass[®] powder." Journal of the European Ceramic Society **29**(16): 3299-3306.

Canal Barnils, C. and M. P. Ginebra Molins (2012). "Fibre-reinforced calcium phosphate cements: a review."

Cannillo, V., F. Chiellini, et al. (2010). "Production of Bioglass[®] 45S5-Polycaprolactone composite scaffolds via salt-leaching." Composite Structures **92**(8): 1823-1832.

Cannillo, V. and A. Sola (2009). "Potassium-based composition for a bioactive glass." Ceramics International **35**(8): 3389-3393.

Charriere, E., J. Lemaitre, et al. (2003). "Hydroxyapatite cement scaffolds with controlled macroporosity: fabrication protocol and mechanical properties." Biomaterials **24**(5): 809-817.

Chen, Q. Z., I. D. Thompson, et al. (2006). "45S5 Bioglass[®]-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering." Biomaterials **27**(11): 2414-2425.

Chevalier, E., D. Chulia, et al. (2008). "Fabrication of porous substrates: A review of processes using pore forming agents in the biomaterial field." Journal of pharmaceutical sciences **97**(3): 1135-1154.

Chevalier, J. and L. Gremillard (2009). "Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years." Journal of the European Ceramic Society **29**(7): 1245-1255.

Chou, T.-W., L. Gao, et al. (2010). "An assessment of the science and technology of carbon nanotube-based fibers and composites." Composites Science and Technology **70**(1): 1-19.

Coimbra, P., P. Alves, et al. (2011). "Sodium hyaluronate/chitosan polyelectrolyte complex scaffolds for dental pulp regeneration: synthesis and characterization." International journal of biological macromolecules.

Coimbra, P., P. Ferreira, et al. (2011). "Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications." International journal of biological macromolecules **48**(1): 112-118.

Da Silva, M. S., R. Viveiros, et al. (2011). "Development of 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate-based molecular recognition devices for controlled drug delivery using supercritical fluid technology." International journal of pharmaceutics.

Daglilar, S., M. Erkan, et al. (2007). "Water resistance of bone-cements reinforced with bioceramics." Materials Letters **61**(11): 2295-2298.

Deb, S., R. Mandegaran, et al. (2010). "A porous scaffold for bone tissue engineering/45S5 Bioglass[®] derived porous scaffolds for co-culturing osteoblasts and endothelial cells." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **21**(3): 893-905.

Dias, M., P. Fernandes, et al. (2012). "Permeability analysis of scaffolds for bone tissue engineering." Journal of Biomechanics.

Doostmohammadi, A., A. Monshi, et al. (2011). "A comparative physico-chemical study of bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite." Ceramics International.

Dorati, R., C. Colonna, et al. (2010). "Effect of porogen on the physico-chemical properties and degradation performance of PLGA scaffolds." Polymer Degradation and Stability **95**(4): 694-701.

Dorozhkin, S. V. (2010). "Bioceramics of calcium orthophosphates." Biomaterials **31**(7): 1465-1485.

Dorozhkin, S. V. (2010). "Calcium orthophosphates as bioceramics: State of the art." Journal of Functional Biomaterials **1**(1): 22-107.

Ducheyne, P. and Q. Qiu (1999). "Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function." Biomaterials **20**(23-24): 2287-2303.

Duée, C., F. Désanglois, et al. (2012). "Predicting glass transition and crystallization temperatures of silicate bioglasses using mixture designs." Journal of Non-Crystalline Solids.

Emadi, R., S. Roohani Esfahani, et al. (2010). "A novel, low temperature method for the preparation of-TCP/HAP biphasic nanostructured ceramic scaffold from natural cancellous bone." Materials Letters **64**(8): 993-996.

Emadi, R., F. Tavangarian, et al. (2010). "Biodegradable and bioactive properties of a novel bone scaffold coated with nanocrystalline bioactive glass for bone tissue engineering." Materials Letters **64**(13): 1528-1531.

Fagerlund, S., J. Massera, et al. (2012). "T-T-T behaviour of bioactive glasses 1-98 and 13-93." Journal of the European Ceramic Society **32**(11): 2731-2738.

Fokin, V. M., E. D. Zanotto, et al. (2006). "Homogeneous crystal nucleation in silicate glasses: a 40 years perspective." Journal of Non-Crystalline Solids **352**(26): 2681-2714.

Gao, L., T.-W. Chou, et al. (2010). "A comparative study of damage sensing in fiber composites using uniformly and non-uniformly dispersed carbon nanotubes." Carbon **48**(13): 3788-3794.

Gerhardt, L. C. and A. R. Boccaccini (2010). "Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering." Materials **3**(7): 3867-3910.

Goodall, R., J. F. Despois, et al. (2006). "Sintering of NaCl powder: Mechanisms and first stage kinetics." Journal of the European Ceramic Society **26**(16): 3487-3497.

Gorustovich, A. A., J. A. Roether, et al. (2009). "Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences." Tissue Engineering Part B: Reviews **16**(2): 199-207.

Hammouda, I. M. (2009). "Reinforcement of conventional glass-ionomer restorative material with short glass fibers." Journal of the mechanical behavior of biomedical materials **2**(1): 73-81.

- Hench, L. L. (2006). "The story of Bioglass®." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **17**(11): 967-978.
- Hench, L. L., D. E. Day, et al. (2010). "Glass and medicine." International Journal of Applied Glass Science **1**(1): 104-117.
- Höland, W., V. Rheinberger, et al. (2003). "Control of nucleation in glass ceramics." Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences **361**(1804): 575-589.
- Hoppe, A., N. S. Guldal, et al. (2011). "A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics." Biomaterials.
- Hou, Q., D. W. Grijpma, et al. (2003). "Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique." Biomaterials **24**(11): 1937-1947.
- Huan, Z., J. Zhou, et al. (2010). "Magnesium-based composites with improved in vitro surface biocompatibility." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **21**(12): 3163-3169.
- Huang, R., J. Pan, et al. (2008). "A two-scale model for simultaneous sintering and crystallization of glass–ceramic scaffolds for tissue engineering." Acta biomaterialia **4**(4): 1095-1103.
- Karageorgiou, V. and D. Kaplan (2005). "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis." Biomaterials **26**(27): 5474-5491.
- Kashyap, S., K. Griep, et al. (2011). "Crystallization kinetics, mineralization and crack propagation in partially crystallized bioactive glass 45S5." Materials Science and Engineering: C **31**(4): 762-769.
- Khalil, K. A. and A. A. Almajid (2011). "Effect of high-frequency induction heat sintering conditions on the microstructure and mechanical properties of nanostructured magnesium/hydroxyapatite nanocomposites." Materials & Design.
- Kokubo, T. and H. Takadama (2006). "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?" Biomaterials **27**(15): 2907-2915.
- Kolk, A., J. Handschel, et al. (2012). "Current trends and future perspectives of bone substitute materials—From space holders to innovative biomaterials." Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.
- Lefebvre, L., J. Chevalier, et al. (2007). "Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments." Acta materialia **55**(10): 3305-3313.
- Li, J., S. Cai, et al. (2011). "In vitro biocompatibility study of calcium phosphate glass ceramic scaffolds with different trace element doping." Materials Science and Engineering: C.

Liang, W. and C. Rüssel (2006). "Resorbable, porous glass scaffolds by a salt sintering process." Journal of materials science **41**(12): 3787-3792.

Liu, X., M. Morra, et al. (2008). "Bioactive calcium silicate ceramics and coatings." Biomedicine & Pharmacotherapy **62**(8): 526-529.

Maia, J., M. P. Ribeiro, et al. (2009). "Ocular injectable formulation assessment for oxidized dextran-based hydrogels." Acta biomaterialia **5**(6): 1948-1955.

Malasoma, A., A. Fritsch, et al. (2008). "Micromechanics of bioresorbable porous CEL2 glass ceramic scaffolds for bone tissue engineering." Advances in Applied Ceramics **107**(5): 277-286.

Marques, A. C., R. M. Almeida, et al. (2009). "Sol-gel-derived glass scaffold with high pore interconnectivity and enhanced bioactivity." J. Mater. Res **24**(12): 3495-3502.

Murphy, C. M., M. G. Haugh, et al. (2010). "The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering." Biomaterials **31**(3): 461-466.

Murphy, W. L., R. G. Dennis, et al. (2002). "Salt fusion: an approach to improve pore interconnectivity within tissue engineering scaffolds." Tissue engineering **8**(1): 43-52.

Navarro, M., A. Michiardi, et al. (2008). "Biomaterials in orthopaedics." Journal of the Royal Society Interface **5**(27): 1137-1158.

Newby, P., R. El-Gendy, et al. (2011). "Ag-doped 45S5 Bioglass®-based bone scaffolds by molten salt ion exchange: processing and characterisation." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **22**(3): 557-569.

Nezafati, N., F. Moztafzadeh, et al. (2011). "Synergistically reinforcement of a self-setting calcium phosphate cement with bioactive glass fibers." Ceramics International **37**(3): 927-934.

Nychka, J. A., D. Li, et al. (2008). "In vitro bioactivity of 45S5 bioactive glass as a function of indentation load." Journal of the mechanical behavior of biomedical materials **1**(3): 243-251.

O'Donnell, M. D. (2011). "Predicting bioactive glass properties from the molecular chemical composition: Glass transition temperature." Acta biomaterialia.

Ochoa, I., J. A. Sanz-Herrera, et al. (2009). "Permeability evaluation of 45S5 Bioglass[®]-based scaffolds for bone tissue engineering." Journal of Biomechanics **42**(3): 257-260.

Padilla, S., S. Sánchez-Salcedo, et al. (2007). "Bioactive glass as precursor of designed-architecture scaffolds for tissue engineering." Journal of Biomedical Materials Research Part A **81**(1): 224-232.

Price, R. L., M. C. Waid, et al. (2003). "Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers." Biomaterials **24**(11): 1877-1887.

Rahaman, M. N. (2003). Ceramic processing and sintering, CRC Press.

- Rahaman, M. N., R. F. Brown, et al. (2006). Bioactive glasses for nonbearing applications in total joint replacement, Elsevier.
- Rahaman, M. N., D. E. Day, et al. (2011). "Bioactive glass in tissue engineering." Acta biomaterialia.
- Reinosa, J. J., F. Rubio-Marcos, et al. (2010). "Sintering behaviour of nanostructured glass-ceramic glazes." Ceramics International **36**(6): 1845-1850.
- Ribeiro, M. P., A. Espiga, et al. (2009). "Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing." Wound Repair and Regeneration **17**(6): 817-824.
- Romero, M., M. Kovacova, et al. (2008). "Effect of particle size on kinetics crystallization of an iron-rich glass." Journal of materials science **43**(12): 4135-4142.
- Saboori, A., M. Rabiee, et al. (2009). "Synthesis, characterization and *in vitro* bioactivity of sol-gel-derived $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$ bioglass." Materials Science and Engineering: C **29**(1): 335-340.
- Salem, A., S. Jazayeri, et al. (2009). "Dilatometric study of shrinkage during sintering process for porcelain stoneware body in presence of nepheline syenite." Journal of Materials Processing Technology **209**(3): 1240-1246.
- Salman, S., S. Salama, et al. (2011). "The role of strontium and potassium on crystallization and bioactivity of $\text{Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ glasses." Ceramics International.
- Shih, C., H. Chen, et al. (2010). "Synthesis and *in vitro* bioactivity of mesoporous bioactive glass scaffolds." Materials Science and Engineering: C **30**(5): 657-663.
- Sola, A., D. Bellucci, et al. (2012). "Heat treatment of $\text{Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ bioactive glasses: Densification processes and postsintering bioactivity." Journal of Biomedical Materials Research Part A **100A**(2): 305-322.
- Tadic, D., F. Beckmann, et al. (2004). "A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoids sintering." Biomaterials **25**(16): 3335-3340.
- Tancret, F., J. M. Bouler, et al. (2006). "Modelling the mechanical properties of microporous and macroporous biphasic calcium phosphate bioceramics." Journal of the European Ceramic Society **26**(16): 3647-3656.
- Tran, R. T., E. Naseri, et al. (2011). "A new generation of sodium chloride porogen for tissue engineering." Biotechnology and applied biochemistry.
- Upadhyaya, G. (2001). "Some issues in sintering science and technology." Materials chemistry and physics **67**(1-3): 1-5.
- Varanasi, V., E. Saiz, et al. (2009). "Enhanced osteocalcin expression by osteoblast-like cells (MC3T3-E1) exposed to bioactive coating glass ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$)

sub> 5</sub>—MgO—K< sub> 2</sub> O—Na< sub> 2</sub> O system) ions." Acta biomaterialia **5**(9): 3536-3547.

Varila, L., S. Fagerlund, et al. (2012). "Surface reactions of bioactive glasses in buffered solutions." Journal of the European Ceramic Society.

Verné, E., O. Bretcanu, et al. (2009). "Early stage reactivity and in vitro behavior of silica-based bioactive glasses and glass-ceramics." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **20**(1): 75-87.

Vitale-Brovarone, C., F. Baino, et al. (2009). "Foam-like scaffolds for bone tissue engineering based on a novel couple of silicate-phosphate specular glasses: synthesis and properties." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **20**(11): 2197-2205.

Vitale-Brovarone, C., F. Baino, et al. (2012). "Bioactive glass-derived trabecular coating: a smart solution for enhancing osteointegration of prosthetic elements." Journal of Materials Science: Materials in Medicine: 1-12.

Vitale-Brovarone, C., F. Baino, et al. (2009). "High strength bioactive glass-ceramic scaffolds for bone regeneration." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **20**(2): 643-653.

Vitale-Brovarone, C., G. Ciapetti, et al. (2010). "Resorbable Glass-Ceramic Phosphate-based Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Synthesis, Properties and, In Vitro Effects on Human Marrow Stromal Cells." Journal of Biomaterials Applications.

Vitale-Brovarone, C., E. Verné, et al. (2007). "Development of glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering: Characterisation, proliferation of human osteoblasts and nodule formation." Acta biomaterialia **3**(2): 199-208.

Vitale-Brovarone, C., E. Verné, et al. (2008). "Biocompatible glass–ceramic materials for bone substitution." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **19**(1): 471-478.

Wallace, K. E., R. G. Hill, et al. (1999). "Influence of sodium oxide content on bioactive glass properties." Journal of Materials Science: Materials in Medicine **10**(12): 697-701.

Watts, S. J., R. G. Hill, et al. (2010). "Influence of magnesia on the structure and properties of bioactive glasses." Journal of Non-Crystalline Solids **356**(9–10): 517-524.

Will, J., L. C. Gerhardt, et al. (2012). "Bioactive Glass-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering." [Without Title]: 1-32.

Xu, H. H. K., E. F. Burguera, et al. (2007). "Strong, macroporous, and< i> in situ</i>-setting calcium phosphate cement-layered structures." Biomaterials **28**(26): 3786-3796.

Xu, H. H. K., M. D. Weir, et al. (2006). "Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold." Biomaterials **27**(24): 4279-4287.

Yun, H. S., J. W. Park, et al. (2011). "Effect of pore structures of bioactive glass balls on biocompatibility in vitro and in vivo." Acta biomaterialia.

