



**Diogo Manuel Costa
Gomes**

**Síntese e caracterização de vidros antimicrobianos
pelo método sol-gel**



**Diogo Manuel Costa
Gomes**

**Síntese e caracterização de vidros antimicrobianos
pelo método sol-gel**

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

o júri

presidente

Professor Doutor José Maria da Fonte Ferreira

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

Doutora Bárbara Joana Martins Leite Ferreira

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

Professora Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes

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

agradecimentos

Às minhas orientadoras, a Professora Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes e a Doutora Maria Paula da Silva Seabra pela partilha de conhecimentos, disponibilidade e orientação durante a elaboração deste trabalho.

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

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

Aos meus colegas de laboratório pela ajuda e partilha de conhecimentos.

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

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

Aos meus colegas de mestrado pela companhia e diversão durante os tempos de trabalho.

Aos meus amigos pela sua presença.

À minha família pela paciência.

palavras-chave

Vidro, Sol-gel, Bioactivo, Antimicrobiano, Prata

resumo

A ocorrência de infecções relacionadas com a implantação de biomateriais limita o seu uso extensivo em determinadas aplicações clínicas. O presente trabalho tem como objectivo produzir vidros bioactivos pelo método sol-gel, que, para além de promoverem a regeneração do tecido ósseo, tenham um efeito antimicrobiano local. Para tal, foi escolhida a composição 24,8% SiO₂ : 41,2% CaO : 13,7% P₂O₅ : 20,3% MgO (%molar) previamente estudada, revelando ser um vidro potencialmente bioactivo, à qual se adicionou percentagens variadas de prata (1, 2, 3 e 5% em peso). Os materiais foram caracterizados em termos do seu comportamento térmico (ATD/TG), estrutura (FTIR, UV-vis), área superficial específica (BET), taxas de dissolução, bioactividade em SBF e actividade antimicrobiana (*Escherichia coli*). Os testes de dissolução mostraram uma taxa de dissolução baixa e uma variação mínima no valor de pH, o que pode ser um benefício em relação à sua citocompatibilidade. Os testes de bioactividade em SBF sugerem a formação de uma camada de fosfatos de cálcio na superfície dos vidros o que sugere a sua bioactividade. Os testes de actividade antimicrobiana foram realizados para todas as amostras com granulometrias diferentes (<20µm e entre 20µm e 63µm) para duas concentrações de vidro (0,025 mg/mL e 0,1 mg/mL). Os resultados sugerem um aumento de actividade antimicrobiana com o incremento da percentagem de prata utilizada. A actividade antimicrobiana é total nas amostras com 3 e 5% de prata, para ambas as concentrações, sendo que a amostra sem prata tem uma actividade quase nula. O aumento da concentração de vidro promove uma maior actividade antimicrobiana para todas as amostras. A granulometria do vidro também afecta a sua eficiência sendo maior para menores granulometrias.

keywords

Glass, Sol-gel, Bioactive, Antimicrobial, Silver

abstract

The occurrence of infections related to the implantation of biomaterials limits its extensive use in certain clinical applications. This study aims to produce bioactive glasses by sol-gel method, which, in addition to promoting the regeneration of bone tissue, has a local antimicrobial effect. A previously studied composition of 24.8% SiO₂ : 41.2% CaO : 13.7% P₂O₅ : 20.3% MgO (molar %) which revealed to be a potentially bioactive glass was selected, to which varying silver percentages were added (1, 2, 3 and 5 wt.%). The materials were characterized in terms of thermal behavior (DTA/TG), structure (FTIR, UV-vis) specific surface area (BET), dissolution rates, bioactivity in SBF and antimicrobial activity (*Escherichia coli*). The dissolution tests showed a low rate of dissolution and a minimal pH variation, which can be a benefit in terms of cytocompatibility. SBF bioactivity tests suggest the formation of a calcium phosphate layer on the surface of the glasses that suggest their bioactivity. Antimicrobial activity tests were performed for all samples with different particle sizes (<20µm and between 20µm and 63µm) for two glasses concentrations (0.025 mg/mL and 0.1 mg/mL). The results showed an increase of the antimicrobial activity with the rise of the silver content. The antimicrobial activity of the samples with 3 and 5 wt.% of silver is total (100%), for both concentrations, whereas the sample without silver exhibits an almost null activity. Increasing the used glass concentration promotes a higher antimicrobial activity for all the samples, as well as smaller particle size, that has greater antimicrobial activity.

Índice

Índice de Imagens	iii
Índice de Tabelas	vi
Abreviaturas	viii
Capítulo 1.....	1
1. Introdução	3
1.1. Objectivos	3
1.2. Estrutura da tese.....	3
Capítulo 2.....	5
2. Revisão da Literatura	7
2.1. Vidros bioactivos.....	7
2.2. Método sol-gel.....	12
2.3. Infecções associadas a biomateriais.....	14
2.4. Prata como agente antimicrobiano	15
Capítulo 3.....	19
3. Procedimento Experimental.....	21
3.1. Materiais.....	21
3.2. Síntese dos vidros	22
3.3. Caracterização	22
3.3.1. Análise Térmica Diferencial e Gravimétrica	22
3.3.2 Análise granulométrica	23
3.3.3. Difraccção de raios X (DRX).....	23
3.3.4. Área superficial específica (BET).....	23
3.3.5. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) e Espectroscopia de dispersão de energia (EDS)	23
3.3.6. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	24
3.3.7. Ensaio de dissolução em água destilada	24
3.3.8. Ensaio antimicrobianos	25
3.3.9. Espectroscopia de Emissão por Plasma Induzido (ICP).....	26
Capítulo 4.....	29
4. Resultados e Discussão.....	31

4.1. Caracterização dos vidros	31
4.1.1. Comportamento térmico	31
4.1.2. Difraccção de raios X.....	33
4.1.3. Distribuição Granulométrica	34
4.1.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	38
4.1.5. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) e Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS).....	40
4.2. Ensaio de dissolução em água destilada.....	43
4.3. Ensaio de Bioactividade em SBF	44
4.3.1. Variação das concentrações iónicas do SBF	44
4.3.2. Difraccção de raios X.....	48
4.3.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	50
4.3.4. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) e Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS).....	53
4.4. Ensaio Antimicrobianos	58
Capítulo 5.....	63
Conclusões e Sugestões para trabalhos Futuros	65
5.1. Trabalho futuro.....	66
Referências	67

Índice de Imagens

Figura 1 - Bioactividade de vários materiais em função do tempo de implantação: (a) Bioactividade relativa (b) Percentagem de tecido ósseo interfacial. [3]	7
Figura 2 - (a) Reacções de hidrólise e (b) (c) condensação de um precursor alcóxido de silício. R=grupo alquila. [65].....	14
Figura 3 - ATG/DTA do V20.....	31
Figura 4 - ATG/DTA do V20 Ag2.	32
Figura 5 - DTA/ATD do V20 Ag5.....	33
Figura 6- Difractogramas dos vidros após calcinação a 600°C.	34
Figura 7 - Distribuição granulométrica do V20.....	35
Figura 8 - Distribuição granulométrica do V20 Ag1.	35
Figura 9 - Distribuição granulométrica do V20 Ag2.	36
Figura 10 - Distribuição granulométrica do V20 Ag3.	36
Figura 11 - Distribuição granulométrica do V20 Ag5.	37
Figura 12 - Espectros FTIR dos materiais em estudo.	38
Figura 13 - Espectros FTIR (UV-vis) das várias composições em estudo.....	40
Figura 14 - Micrografias, obtidas por SEM, da composição V20 com a) ampliação de 500x e b) ampliação de 1500x.	41
Figura 15 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag1 com a) ampliação de 500x e b) ampliação de 1500x.	41
Figura 16 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag2 com a) ampliação de 500x e b) ampliação de 1500x.	41
Figura 17 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag3 com a) ampliação de 500x e b) ampliação de 1500x.	42
Figura 18 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag5 com a) ampliação de 500x e b) ampliação de 1500x.	42
Figura 19 - Variação do valor de pH da água destilada com o tempo de imersão das diferentes composições.....	43
Figura 20 - Evolução da % Δ P das diferentes composições com o tempo de imersão em água destilada.....	44
Figura 21 - Variação, com o tempo de imersão, da concentração dos vários iões na solução de SBF para o V20.	45
Figura 22 - Variação, com o tempo de imersão, da concentração dos vários iões na solução de SBF para o V20 Ag1.....	45
Figura 23 - Variação, com o tempo de imersão, da concentração dos vários iões na solução de SBF para o V20 Ag2.....	46
Figura 24 - Variação, com o tempo de imersão, da concentração dos vários iões na solução de SBF para o V20 Ag5.....	47
Figura 25 - Variação do pH da solução SBF com o tempo de imersão para as várias composições.	48
Figura 26 - DRX da composição V20 após imersão de 16 horas, 3 dias e 7 dias em SBF.	48

Figura 27 - DRX da composição V20 Ag1 após imersão de 16 horas, 3 dias e 7 dias em SBF.....	49
Figura 28 - DRX da composição V20 Ag2 após imersão de 16 horas, 3 dias e 7 dias em SBF.....	49
Figura 29 - DRX da composição V20 Ag5 após imersão de 16 horas, 3 dias e 7 dias em SBF.....	50
Figura 30 - Espectros de transmissão no infravermelho com transformada de Fourier obtidos para o V20 após diferentes tempos de imersão.....	51
Figura 31 - Espectros de transmissão no infravermelho com transformada de Fourier obtidos para o V20 Ag1 após diferentes tempos de imersão.....	51
Figura 32 - Espectros de transmissão no infravermelho com transformada de Fourier obtidos para o V20 Ag2 após diferentes tempos de imersão.....	52
Figura 33 - Espectros de transmissão no infravermelho com transformada de Fourier obtidos para o V20 Ag5 após diferentes tempos de imersão.....	52
Figura 34 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 após 16 horas de imersão com a) ampliação de 1500x e b) ampliação de 10000x.....	53
Figura 35 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 após 3 dias de imersão com a) ampliação de 1500x e b) ampliação de 10000x.....	54
Figura 36 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 após 7 dias de imersão com a) ampliação de 1500x e b) ampliação de 10000x.....	54
Figura 37 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag1 após 16 horas de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.....	55
Figura 38 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag1 após 3 dias de imersão com ampliação de a)1500x e b)10000x.....	55
Figura 39 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag1 após 7 dias de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.....	55
Figura 40 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag2 após 16 horas de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.....	56
Figura 41 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag2 após 3 dias de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.....	56
Figura 42 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag2 após 7 dias de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.....	57
Figura 43 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag5 após 16 horas de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.....	57
Figura 44 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag5 após 3 dias de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.....	58
Figura 45 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag5 após 7 dias de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.....	58
Figura 46 - Percentagem de redução das UFC para a concentração de 0,025 mg/mL de material.....	59
Figura 47 -Percentagem de redução das UFCs para as concentrações de 0,025 mg/mL e 0,1 mg/mL de material.....	60
Figura 48 - Actividade antimicrobiana da composição V20 Ag3 para a concentração de material de 0,01 mg/mL.....	61

Figura 49 - Actividade antimicrobiana da composição V20 Ag5 para diferentes concentrações..... 61

Índice de Tabelas

Tabela 1 -Concentração iônica de várias espécies no Simulated Body Fluid e no plasma humano. [9].....	8
Tabela 2 - Aplicações clínicas de alguns materiais.	12
Tabela 3 - Etapas gerais do processo sol-gel. Adaptado [65].....	13
Tabela 4 – Identificação das matérias-prima e quantidade utilizada.	21
Tabela 5 - Ordem de adição, reagente, quantidade, fornecedor e grau de pureza dos reagentes utilizados na preparação de 1 litro de SBF.....	26
Tabela 6 - Valores o tamanho médio das partículas e da área superficial especifica dos vidros preparados.....	38
Tabela 7 - Bandas de transmitância ATR para as diferentes.....	39
Tabela 8 - Atribuição das principais bandas de vibração (zona UV-Vis).....	40
Tabela 9 - Bandas de transmitância ATR para os diferentes materiais.	53

Abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ATD – Análise Térmica Diferencial

ATR – Reflectância total atenuada

ASE – Área superficial específica

BET – Brunauer-Emmett-Teller

CFU – Unidades formadoras de colónias

DRX – Difraccção de raios X

EDS – Espectroscopia por dispersão de energia

FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

HÁ – Hidroxiapatite

ICP – Espectroscopia de Emissão por Plasma Induzido

SBF – Simulated Body Fluid

T_g - Temperatura de transição vítrea

Capítulo 1

Introdução e Objectivos

1. Introdução

1.1. Objectivos

O objectivo deste trabalho foi a obtenção e caracterização de vidros potencialmente bioactivos com propriedades antimicrobianas fabricados pelo método de sol-gel. com diferentes percentagens de óxido prata na sua composição.

Como ponto de partida foi seleccionado um vidro de referência, que em trabalhos anteriores [1], demonstrou ter características bioactivas em fluidos fisiológicos sintéticos, de composição molar 25.43% SiO₂ : 32.68% CaO : 10.89% P₂O₅ : 31.00% MgO e o mesmo vidro com 1, 2, 3 e 5 mol% Ag₂O, escolhido como agente antimicrobiano. Foi então realizado um estudo sobre a influência da adição de diferentes percentagens de óxido de prata na estrutura, dissolução, potencial bioactivo e propriedades antimicrobianas das amostras.

1.2. Estrutura da tese

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

Capítulo 2

Revisão da Literatura

2. Revisão da Literatura

2.1. Vidros bioativos

Hench introduziu o conceito de bioactividade [2] com a descoberta de um material capaz de provocar uma reacção biológica específica na interface com o tecido hospedeiro e responsável pela formação de uma ligação forte entre o tecido vivo e o material em contacto com o tecido. Este conceito, embora tenha sido inicialmente associado à ligação com o tecido ósseo, é também aplicável a outros tipos de tecidos.

Entre os materiais que exibem esta propriedade existem vidros, como o Bioglass® [3], vidros cerâmicos, como o Ceravital® [4-5] e o A-W [5], cerâmicos densos de fosfato de cálcio, como a hidroxiapatite sintética (HA) [6] e compósitos bioativos como o HAPEx™ (compósito de polietileno de elevada densidade e hidroxiapatite) [7]. Apesar de todos serem bioativos, existem diferenças ao nível do mecanismo de ligação, do tempo que demora a processar-se a ligação, da espessura da camada de ligação, etc. [3]

A bioactividade relativa dos vários materiais, na figura 1 (a), pode correlacionar-se com a taxa de formação da ligação interfacial do implante com o osso, figura 1 (b). [3]

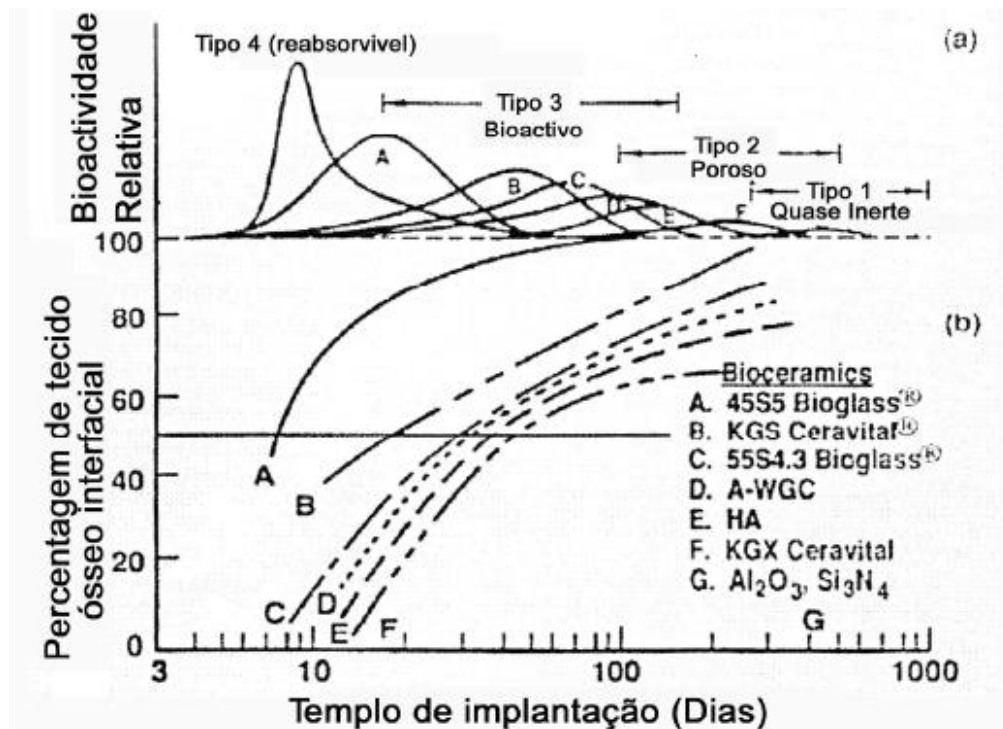


Figura 1 - Bioactividade de vários materiais em função do tempo de implantação: (a) Bioactividade relativa (b) Percentagem de tecido ósseo interfacial. [3]

Quando colocados no corpo, os materiais bioactivos ligam-se espontaneamente ao osso vivo através de uma camada apatítica formada à sua superfície, sem que se seja envolvida por tecido fibroso. A formação de uma camada apatítica quando o material é colocado em contacto com um líquido acelular que simule os fluidos corporais, indica a potencial bioactividade desse material. Kokubo et al. [9] desenvolveram uma solução aquosa acelular com pH entre 7.25 e 7.40 com uma concentração iónica idêntica à do plasma humano, o SBF (simulated body fluid). A composição iónica está descrita na tabela 1 comparativamente com a do plasma humano.

Tabela 1 -Concentração iónica de várias espécies no Simulated Body Fluid e no plasma humano. [9]

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

Nos materiais bioactivos do tipo 3 na figura 1, existe uma grande diferença na taxa de ligação e proliferação do tecido ósseo, o que indica que diferentes factores bioquímicos estão envolvidos na interface tecido-implante, dependendo da composição e da cinética das reacções superficiais.

Hench e Wilson [10] propuseram duas classes de bioactividade para distinguir os diferentes tipos de materiais:

- Classe A - implantes osteoprodutivos (osteoadutivos);
- Classe B - implantes osteocondutivos.

A bioactividade de Classe A ocorre quando o material provoca uma resposta intracelular e extracelular na sua interface. A osteoprodução ocorre quando há proliferação de tecido ósseo numa superfície, devido a um aumento da actividade dos osteoblastos. Os implantes bioactivos osteoprodutivos apresentam elevados índices de bioactividade e podem formar ligações tanto com o osso como com tecidos moles.

A bioactividade de Classe B ocorre quando o material provoca apenas uma resposta extracelular à sua superfície. Os implantes bioactivos de Classe B são osteocondutivos, ou seja, o implante simplesmente providencia uma interface biocompatível, sobre a qual o osso

crece. Os implantes bioactivos osteocondutores apresentam baixos níveis de bioactividade, e ligam-se apenas aos ossos. Os materiais bioactivos de Classe A apresentam osteocondução e osteoprodução do osso enquanto a Classe B apresenta apenas a osteocondução.

A descoberta do Bioglass® e do conceito de bioactividade levou ao aparecimento de uma nova área de investigação em vidros e vidros cerâmicos para reparação e substituição óssea [11, 12-15]. O comportamento bioactivo de vidros e vidros cerâmicos é atribuído à capacidade de formação de uma camada apatítica na sua superfície, com uma composição e estrutura equivalentes às da fase mineral do osso [3].

O mecanismo responsável pela bioactividade de vidros e vidros cerâmicos envolve complexos fenómenos físico-químicos, amplamente documentadas na literatura [16-26]. A composição química do vidro e vidro cerâmico, a morfologia da superfície e a estrutura interna têm uma função importante na maneira como se processa a bioactividade [27-29].

Segundo Hench et al. [30,31], as reacções que ocorrem na superfície do vidro podem ser resumidas em cinco estágios:

- 1 - Troca iónica entre a solução e a superfície do vidro, com libertação de iões como Na^+ , Ca^{2+} e PO_4^{3-} e conseqüente formação de grupos silanol (Si-OH);
- 2 - Dissolução de sílica solúvel do vidro, devido à quebra das ligações Si-O-Si ;
- 3 - Policondensação de grupos silanol e formação de uma camada porosa rica em sílica;
- 4 - Aumento da concentração de Ca^{2+} e PO_4^{3-} na solução com o tempo, devido à libertação de iões do vidro e posterior formação de um filme rico em $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ na superfície do vidro. A elevada área superficial da camada rica em sílica favorece a nucleação heterogénea do filme de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ amorfo;
- 5 - Cristalização de uma camada de hidroxiapatite (HÁ) pela incorporação de aniões OH^- e CO_3^{2-} da solução.

A maior parte das composições de vidros e vidros cerâmicos usadas em aplicações biomédicas pertence a sistemas muito complexos, em que a função individual de cada componente não é completamente evidente. Novos avanços têm vindo a ocorrer devido à

aplicação das mais recentes técnicas experimentais que permitem estudar e distinguir o papel de cada elemento no comportamento do material. A influência da sílica e do fósforo na bioactividade de vidros e vidros cerâmicos tem sido amplamente estudada. O efeito de alguns óxidos tais como Na_2O , MgO , B_2O_3 , Al_2O_3 , FeO_3 e F_2O na reactividade superficial, tem sido referido para vidros do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO}$, embora se encontrem na literatura referências a outros sistemas [22, 24, 27, 32].

O biomaterial ideal para implantação é aquele que é biológica e mecanicamente compatível com o osso [33]. As propriedades mais importantes de um material bioactivo podem ser divididas em quatro categorias: mecânicas, físicas, químicas e biológicas. As propriedades físicas e mecânicas controlam as características funcionais dos implantes, enquanto as propriedades químicas e biológicas controlam a capacidade do implante manter a sua função ao longo de todo o tempo de implantação. [34]

Em grande parte dos biovidros produzidos através de fusão a altas temperaturas os componentes base encontrados são SiO_2 , P_2O_5 , Na_2O , CaO e MgO . O primeiro e mais amplamente estudado é o Bioglass® 45S5 descoberto por Hench, no início dos anos 70, e formado por 45% SiO_2 , 24.5% Na_2O , 24.5% CaO e 6% P_2O_5 em percentagem mássica. [11, 35].

Além da fusão, os vidros também podem ser preparados por via sol-gel. Este método permite utilizar uma maior gama de composições e obter uma maior homogeneidade nos vidros bioactivos produzidos. [36-39]

No desenvolvimento de vidros cerâmicos para aplicações biomédicas devem ser referidos dois tipos de materiais, que diferem na aplicação e como consequência nas propriedades pretendidas: materiais usados para utilização em ortopedia e materiais usados em medicina dentária. O primeiro grupo é usado na fabricação de próteses ortopédicas. O segundo grupo inclui os que são usados no tratamento e restauração de dentes, em coroas, pontes e enchimentos. Os requisitos dos vidros cerâmicos para estes dois tipos de aplicação são completamente diferentes. A ortopedia requer propriedades biocompatíveis e na maior parte dos casos bioactivas. Um vidro cerâmico bioactivo forma uma camada apatítica carbonatada que permite a ligação com o osso e até com o tecido mole. Dependendo da sua aplicação, se deve ou não ser sujeito a cargas elevadas, os vidros cerâmicos podem necessitar de cumprir certos requisitos no que diz respeito à dureza, módulo de Young e resistência a fractura. Em relação aos vidros cerâmicos para aplicações dentárias restaurativas, os requisitos são diferentes, uma vez que estes materiais têm de ser compatíveis com o ambiente oral, mas não deve ocorrer bioactividade na superfície do dente restaurado. Neste caso é importante que propriedades como a cor, a dureza e o

desgaste correspondam às do dente natural. Como resultado destes diferentes requisitos, são utilizados sistemas químicos distintos e o desenvolvimento do vidro cerâmico é focado em diferentes fases cristalinas que apresentam diferentes propriedades. [40]

Os vidros e vidros cerâmicos fazem parte de um vasto grupo de materiais designados por biocerâmicos, a que pertencem também outros materiais cerâmicos à base de fosfatos de cálcio. [40-44]

Todos os vidros e vidros cerâmicos bioativos, bem como os cerâmicos de fosfato de cálcio formam uma ligação química interfacial forte com o osso. Contudo, os biovidros cerâmicos têm resistência à flexão, tensão de ruptura, e tenacidade à fractura inferiores às do osso e apresentam um módulo elástico que é superior ao do osso. Isto significa que a maior parte dos biocerâmicos apresentam uma baixa compatibilidade biomecânica em aplicações onde são sujeitas a carga. [45-47]

As limitações biomecânicas de vidros e vidros cerâmicos bioativos podem ultrapassar-se através da aplicação de filmes para revestir substratos mecanicamente fortes. Metais [48-50] e alumina [51] são usualmente utilizados como substratos.

Os revestimentos bioativos possuem a bioactividade dos vidros e dos cerâmicos aliada à capacidade biomecânica dos substratos. A capacidade de ligação deste tipo de materiais pode eventualmente ajudar a implantar próteses ortopédicas sem recorrer ao uso de cimentos. A desvantagem deste método é a fraca fiabilidade da ligação revestimento/substrato a longo prazo. [52-54]

Tradicionalmente, os vidros bioativos têm sido usados em aplicações clínicas na forma de bloco monolítico [55] ou em pó [56-59]. Estes materiais têm demonstrado propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias [60-62] muito promissoras para uma grande variedade de aplicações no campo da medicina regenerativa. Como consequência das suas limitações biomecânicas os vidros e vidros cerâmicos são principalmente usados em situações de baixo esforço mecânico preferencialmente de compressão. As principais utilizações são: reparação do ouvido médio, substituição de vértebras e crista íliaca. Na tabela 2 apresentam-se alguns biomateriais cerâmicos e as suas aplicações clínicas.

Tabela 2 - Aplicações clínicas de alguns materiais.

Materiais	Tipo	Aplicações Clínicas
Bioglass®	Vidro	Prótese do ouvido médio, raízes dentárias, tratamentos periodontais, reconstrução maxilo-faciais, enchimento de defeitos ósseos
Ceravital®	Vitrocerâmico	Prótese do ouvido médio
Bioverit®	Vitrocerâmico	Prótese do ouvido médio, raízes dentárias, espaçador vertebral
Cerabone®	Vitrocerâmico	Próteses de vértebras, espaçador vertebral , crista íliaca, enchimento
HÁ	Cerâmico	Prótese do ouvido médio, raízes dentárias, tratamentos periodontais, reconstrução maxilo-facial, enchimento de defeitos ósseos
PE/HA	Compósito polímero-cerâmico	Reconstrução de órbitas

Reconhecida a importância da formação da camada de fosfato de cálcio como requisito de bioatividade, é também essencial saber controlar a reactividade superficial dos materiais. Um vidro muito reactivo pode não permitir integração com o tecido hospedeiro, um vidro ou vidro cerâmico muito pouco reactivo pode tornar-se num material quase inerte no tempo considerado útil para as necessidades do organismo.

2.2. Método sol-gel

Uma grande parte dos vidros e vidros cerâmicos bioactivos conhecidos é produzida pela via convencional de fusão e vazamento. Esta técnica utiliza altas temperaturas (> 1300°C) para transformar as matérias-primas precursoras no vidro final.

O processo sol-gel tem vindo a ganhar notoriedade nos últimos anos, por permitir a síntese de materiais vítreos, vitrocerâmicos e cerâmicos a temperaturas muito mais baixas que as utilizadas nos processos convencionais. Este processo envolve a formação de uma suspensão coloidal, o sol, seguida de sua geleificação, formando uma rede em uma fase líquida contínua, o gel [63]. A fase líquida do gel é removida num processo de secagem posterior. Por fim, o gel seco resultante pode ser sinterizado a temperaturas relativamente baixas para formar um sólido amorfo e denso [64]. As etapas gerais e breve explicação, bem como as temperaturas a que ocorre o processo, estão resumidas na tabela 3.

Tabela 3 - Etapas gerais do processo sol-gel. Adaptado [65]

Etapa	Descrição	Temperatura (°C)
Etapa 1: Síntese	Mistura dos precursores e catalisadores; ocorre a hidrólise e a condensação com vista à formação do gel.	Temperatura ambiente (pode ser sujeito a aquecimento)
Etapa 2: Formação do gel	Formação da rede; aglomeração e ligação das partículas até se formar o gel.	Temperatura ambiente
Etapa 3: Envelhecimento	Fortalecimento e compactação do gel.	60
Etapa 4: Secagem	Remoção dos produtos resultantes da condensação, deixando nanoporos intersticiais.	120
Etapa 5: Estabilização	Remoção dos nitratos, silanóis e poros interparticulares.	600

O processo sol-gel apresenta algumas vantagens, podendo citar-se a elevada pureza dos compostos obtidos, a diversidade de composições conseguida, a estabilidade química e térmica, as baixas temperaturas de densificação necessárias comparadas com as técnicas convencionais, e os diferentes produtos que podem ser obtidos, como fibras, recobrimentos, peças monolíticas, pós e membranas.

Entre as desvantagens da técnica, incluem-se o alto custo dos precursores e a dificuldade para se obter peças maciças e recobrimentos com uma espessura considerável, devido à elevada contracção que o material sofre durante a secagem [66,67].

Para a preparação do sol, é necessária a selecção adequada de precursores, os quais podem ser orgânicos (alcóxidos) ou inorgânicos. Os alcóxidos são compostos organometálicos precursores de monómeros inorgânicos, e são os mais utilizados pois reagem prontamente com a água. Os alcóxidos dissolvem-se no solvente, que geralmente é um álcool, e depois da adição de água à solução convertem-se num sol, resultado da formação de pequenas cadeias poliméricas a partir da hidrólise dos precursores [67].

O processo sol-gel é descrito como o conjunto de duas reacções: a hidrólise e a condensação, sendo que na última poderá ocorrer condensação de álcool ou condensação de água.

O processo sol-gel é descrito como o conjunto de duas reacções: a hidrólise e a condensação, sendo que na última poderá ocorrer condensação de álcool ou condensação de água.

A hidrólise é a principal reacção que conduz a transformação de precursores alcóxidos em óxidos, podendo ser definida como a reacção que ocorre quando uma molécula de água interage com o alcóxido, substituindo a ligação OR, onde R é um grupo alquila, por um grupo hidroxilo (OH). A figura 2 (a) mostra a reacção de hidrólise para um alcóxido de silício. Após ocorrer a hidrólise, a reacção de condensação envolvendo os grupos silanóis (Si – OH) ocorre, produzindo ligações do tipo siloxano (Si – O – Si) além dos produtos álcool, ou água (figura 2 (b) e 2 (c)).

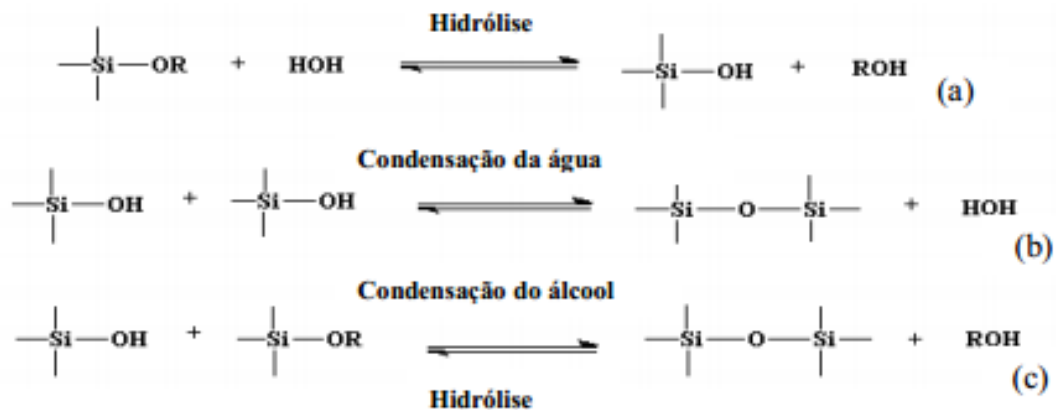


Figura 2 - (a) Reacções de hidrólise e (b) (c) condensação de um precursor alcóxido de silício. R=grupo alquila. [65]

O mecanismo de hidrólise de um alcóxido metálico é complexo e é afectado por parâmetros como o solvente, o catalisador, a agitação, a temperatura, e o pH. Na transição de sol a gel a evolução química do sistema não é afectada pela geleificação. A composição, estrutura e propriedades do gel alteram-se no tempo na etapa de envelhecimento [68]. Assim que o gel é produzido, ocorre uma secagem para remover os solventes residuais, como o álcool e a água, antes do tratamento térmico. No tratamento térmico o gel seco é tratado para ser convertido em vidro. Este processo requer um tratamento térmico acima da temperatura de transição vítrea, T_g . Durante esta conversão, ocorrem as transformações químicas e estruturais: adsorção física da água e solventes das paredes dos microporos, carbonização e combustão de grupos orgânicos residuais. [64]

2.3. Infecções associadas a biomateriais

Um dos maiores obstáculos no uso de implantes é a ocorrência de infecções associadas aos biomateriais [69, 70]. A ocorrência das infecções após o implante de biomateriais é um processo complexo e dependente de uma série de factores intrínsecos

interligados nomeadamente à superfície do material implantado, à resposta imunológica do hospedeiro e à capacidade de adaptação do microrganismo invasor. O processo de adesão bacteriana às superfícies dos biomateriais é mediado por interacções entre as estruturas da membrana celular e grupos específicos na superfície do biomaterial [70].

Na tentativa de reparar o trauma causado pela colocação do implante o organismo responde activamente mediante reacções inflamatórias e histológicas para integrar ou isolar o corpo estranho encontrado. A integração tecidual de um biomaterial depende da habilidade das células teciduais se ligarem quimicamente à superfície dos biomateriais. Além disso, as interacções entre células bacterianas ou células de tecidos à superfície de um substrato dependem da natureza da superfície, da estrutura atómica e da composição do biomaterial implantado [71].

Gristina & Sherk [70] sugerem que as superfícies dos biomateriais são disputadas entre as células do tecido local e as de colonização microbiana sendo que a perturbação das defesas imunológicas do hospedeiro constitui um factor essencial. Caso sejam as células do tecido adjacente a aderir ao biomaterial, a superfície é recoberta e defendida, diminuindo a probabilidade de colonização bacteriana.

O processo de colonização bacteriana num biomaterial começa com a modificação da sua superfície, pela criação de um filme condicionante, a partir de fluídos corporais encontrado ao redor do implante. Estes fluídos podem ser saliva, urina, soro ou sangue dependendo da região [69].

2.4. Prata como agente antimicrobiano

Para diminuir a incidência de infecções associadas aos implantes podem ser utilizados agentes antimicrobianos, os quais matam ou inibem o crescimento das bactérias. Os compostos antimicrobianos são classificados com base na sua origem, podendo ser naturais ou sintéticos.

As propriedades antimicrobianas da prata são conhecidas em várias culturas e há muitos séculos. Por exemplo, os Fenícios armazenavam água e outros líquidos em garrafas revestidas de prata para evitar a sua contaminação. Moedas de prata eram também utilizadas em garrafas de leite para o manter fresco. Um outro exemplo são os reservatórios de água de navios e aviões feitos de prata os quais eram capazes de conservar a água potável durante vários meses. Em 1884, tornou-se uma prática comum administrar gotas de nitrato de prata aquoso nos olhos dos recém-nascidos para prevenir a transmissão, durante

o parto, de *Neisseria gonorrhoeae* de mães infectadas para as crianças. Durante a primeira Guerra Mundial a prata foi muito utilizada no tratamento dos soldados para deter o crescimento microbiano.

Este efeito é conhecido como efeito oligodinâmico, definido como a capacidade que quantidades extremamente pequenas que certos metais possuem para exercerem efeito sobre as bactérias [72]. O estudo das propriedades oligodinâmicas foi iniciado por von Naegeli em 1893 e desde então, tem sido base para o desenvolvimento de muitos processos e produtos [73].

A prata é o elemento mais tóxico para os microorganismos na seguinte sequência:

Ag > Hg > Cu > Cd > Cr > Pb > Co > Au > Zn > Fe > Mn > Mo > Sn [74]

A prata é, no entanto, dentro do grupo destes metais o menos tóxico para os seres humanos, não evidenciando efeitos prejudiciais quando utilizado em pequenas concentrações [75,76].

O efeito antimicrobiano dos iões prata abrange um amplo espectro de actividade incluindo fungos, bactérias e vírus. Esta acção dos iões prata sobre microrganismos pode variar desde a destruição quase instantânea do mesmo, acção microbicida, até uma prolongada acção microbiostática, em que a sua multiplicação é impedida.

O mecanismo de acção da prata sobre os micróbios ainda é totalmente conhecido, mas têm sido sugeridos os potenciais mecanismos de acção da prata metálica, iões de prata e nanopartículas de prata de acordo com as alterações morfológicas e estruturais encontradas nas células bacterianas.

O mecanismo de acção da prata está ligado com a sua interacção com compostos de grupo tiol encontrados nas enzimas respiratórias de origem bacteriana células. A prata liga-se à parede da célula bacteriana e a membrana celular e inibe o processo de respiração.

O mecanismo de acção antimicrobiana de iões de prata é atribuído ao efeito de às mudanças estruturais e morfológicas de que as células são alvo. É sugerido que quando as moléculas de ADN estão em estado de relaxamento, a replicação do mesmo pode ser realizada de forma eficaz. No entanto, quando o ADN está na forma condensada, perde sua capacidade de replicação, ou seja, quando os iões de prata penetram o interior da célula bacteriana, a molécula de ADN passa à sua forma condensada e perde a sua capacidade de replicação, levando à morte celular. Além disso, tem sido relatado que os metais pesados reagem com as proteínas pela ligação com o grupo tiol, inactivando as mesmas.

As nanopartículas de prata mostram a propriedade antimicrobiana eficiente em comparação com outros sais devido à sua área superficial específica extremamente grande, que proporciona melhor contacto com microorganismos. Estas ligam-se à membrana da célula chegando inclusive a penetrar no interior das bactérias. As nanopartículas de prata interagem com as proteínas membranares contendo enxofre, bem como com os compostos que contêm fósforo, como o ADN. Assim, as nanopartículas inibem o processo respiratório e a divisão celular finalmente levando à morte celular. [75]

Existem no entanto diferenças entre os dois principais grupos de bactérias (Gram-positivas ou Gram-negativas). O invólucro celular (membrana citoplasmática + parede celular) apresenta diferenças na composição e espessura desse invólucro influenciam na maior ou menor facilidade da acção dos iões metálicos. As bactérias Gram-negativas possuem na parede celular uma fracção denominada de membrana externa, que confere a esses organismos maior resistência a ataques químicos.

Novos agentes contendo iões prata em forma de cremes, soluções, nylon, pele artificial e cateteres tem sido sendo desenvolvidos nas últimas décadas pelas indústrias médicas, farmacêuticas e biológicas [76-77]. O nitrato de prata é o composto mais utilizado na clínica médica, principalmente no controle de infecções decorrentes de queimaduras e em feridas crónicas na pele [78-79].

Segundo Zhao e Stevens [80], a acção biocida da prata caracteriza-se por um ataque imediato, um tempo de acção curto, e uma taxa rápida de morte. Este modo de acção sugere uma possível explicação para o facto de as bactérias não terem desenvolvido uma forte resistência à prata. Por outro lado, a prata não exerce nenhum efeito grave no corpo humano. Os efeitos para a saúde mais comuns associados à exposição prolongada à prata são o desenvolvimento de uma pigmentação característica e irreversível na pele, argíria, ou nos olhos, argirose. A área afectada apresenta coloração azul-aczentada e é mais pronunciada em áreas do corpo expostas à luz solar [81,82]. A prata metálica parece ter um efeito mínimo no corpo humano enquanto os compostos solúveis de prata são mais propensos a produzir argíria e argirose [82-85].

Capítulo 3

Procedimiento Experimental

3. Procedimento Experimental

3.1. Materiais

Para a preparação dos vidros com a composição molar:

25,43% SiO₂: 32,68% CaO : 10,89% P₂O₅: 31,00% MgO + X% Ag₂O (X=0, 1, 2, 3 e 5)

foram seleccionadas as matérias-primas indicadas na tabela 4. Nesta tabela também estão indicadas as quantidades utilizadas de cada uma das matérias-primas.

Tabela 4 – Identificação das matérias-prima e quantidade utilizada.

Nome e Fórmula Química	Marca Comercial	Pureza	Massa/Volume
Nitrato de Cálcio tetrahidratado (Ca(NO₃)₂·4H₂O)	Sigma-Aldrich	>99%	12,54 g
Nitrato de Magnésio hexahidratado (Mg(NO₃)₂·6H₂O)	Sigma-Aldrich	99%	12,94 g
Nitrato de Prata (AgNO₃)	Sigma-Aldrich	99%	Variável (cada 1% adicionado 0.55 g)
Tetraetilortossilicato - TEOS (Si(OC₂H₅)₄)	Aldrich	99%	9,24 mL
Trietilfosfato - TEP ((C₂H₅)₃PO₄)	Aldrich	99,8%	6,02 mL

A composição base, sem prata, foi objecto de estudo noutra trabalho tendo em vista a avaliação da sua bioactividade [1] e foi designada por V20, em referência à % ponderal de MgO em 20%. Em função da quantidade de prata adicionada ao vidro V20, os vidros preparados foram identificados por diferentes designações:

- V20 sem Ag – 0% de prata adicionada; (V20)

- V20 1% Ag – 1% de prata adicionada; (V20 Ag1)
- V20 2% Ag – 2% de prata adicionada; (V20 Ag2)
- V20 3% Ag – 3% de prata adicionada; (V20 Ag3)
- V20 5% Ag – 5% de prata adicionada. (V20 Ag5)

3.2. Síntese dos vidros

Para a síntese das várias composições de vidro foram preparadas duas soluções:

- Solução A: mistura de TEOS e TEP em 10 mL de ácido nítrico (HNO_3) com concentração de 0,1 M;
- Solução B: mistura dos nitratos de cálcio magnésio e prata em 25 mL de água destilada.

As soluções foram mantidas, sob agitação, durante 1 hora a 50°C para garantir a sua homogeneidade. Em seguida, as soluções A e B foram misturadas e colocadas novamente a agitar durante 1 hora. Ao fim deste tempo, o pH foi ajustado para 3,5 através da adição de HNO_3 concentrado (1M).

Em seguida, a solução final foi colocada numa estufa a 60°C durante 7 dias para remover a água adsorvida fisicamente com vista ao seu envelhecimento e à formação do gel inicial. Uma vez formada a estrutura gelificada inicial, a solução foi colocada numa estufa a 120°C durante 3 dias para remover os produtos resultantes da condensação.

Finalmente, as amostras foram calcinadas a 600°C durante duas horas e trinta minutos com uma taxa de aquecimento de 10°C/minuto.

3.3. Caracterização

3.3.1. Análise Térmica Diferencial e Gravimétrica

As análises térmicas diferencial (ATD) e gravimétrica (ATG) dos pós antes da calcinação foram efectuadas num equipamento Seteram Labsys DTA/TG-DSC. A velocidade de aquecimento foi de 5 °C min⁻¹, desde os 50°C até aos 900°C. Estas análises tiveram como objectivo identificar a natureza das reacções que ocorreram durante o aquecimento,

as temperaturas a que ocorrem as principais transformações e aferir a variação de massa deste material com a temperatura.

3.3.2 Análise granulométrica

A avaliação da distribuição do tamanho das partículas dos vidros foi efectuada recorrendo ao princípio de difracção laser num equipamento Coulter LS Particle Size Analyser 230.

Para estudos posteriores, foi decidido preparar vidros com duas granulometrias. Para tal os vidros foram peneirados a 20 e 63 μm , obtendo-se pós com partículas inferiores a 20 μm e entre 20 μm e 63 μm .

3.3.3. Difracção de raios X (DRX)

A caracterização mineralógica dos materiais produzidos foi efectuada num difractómetro Rigaku Geigerflex D/Max-SérieC, equipado com um monocromador curvo de grafite, utilizando radiação $\text{CuK}\alpha$. A técnica de difracção de raios X (DRX) foi utilizada para verificar a existência ou não de fases cristalinas nos materiais sintetizados após desagregação num almofariz. A identificação das fases cristalinas presentes foi feita recorrendo à base de dados PDF (Powder Diffraction File) disponibilizada pelo JCPDS/ICDD (Joint Committee on Powder Diffraction Standards/International Centre for Diffraction Data; Swarthmore, Pensilvânia, EUA).

3.3.4. Área superficial específica (BET)

As áreas superficiais específicas dos pós dos vidros preparados foram determinadas pelo método de adsorção física de azoto gasoso, desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller (BET). Para a realização desses ensaios foi utilizado um equipamento Quantasorb da QuantaChrome. Antes da determinação do volume de gás adsorvido, os pós permaneceram em vácuo a 200°C durante 4 horas.

3.3.5. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) e Espectroscopia de dispersão de energia (EDS)

A observação microestrutural da superfície das amostras foi efectuada por microscopia electrónica de varrimento (SEM), num microscópio da HITACHI, modelo S-4100, que opera a 25 KeV. Este equipamento está equipado com um sistema de espectroscopia de dispersão de energia (Energy Dispersive X ray Spectroscopy -EDS), que permitiu avaliar os elementos químicos presentes.

As amostras foram fixadas em porta amostras de alumínio com fita-cola de carbono de dupla face e posteriormente revestidas com um filme de carbono recorrendo a um depositador de carbono (EMITECH K950).

3.3.6. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho (IV) por transformada de Fourier é um método de caracterização usado para determinar a composição química dos materiais, com base nas bandas de absorção do espectro. Esta técnica foi utilizada para identificar pormenores da estrutura dos vidros preparados neste trabalho. As amostras foram moídas e secas para a preparação de pastilhas com brometo de potássio (KBr). O intervalo espectral analisado compreendeu a região entre 400 e 4000 cm^{-1} e a resolução foi de 4 cm^{-1} .

3.3.7. Ensaio de dissolução em água destilada

O estudo da dissolução das amostras foi efectuado em água destilada a 37°C, tendo-se avaliado a percentagem de perda de peso das amostras e a variação do pH da solução com o tempo de imersão.

Para a determinação da percentagem de perda de peso das amostras, % ΔP , foi utilizada a seguinte equação:

$$\% \Delta P = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

onde P_i é o peso inicial da amostra e P_f é o peso da amostra após imersão.

A variação do pH da água destilada e da percentagem de perda de peso das amostras de vidro foram determinadas às 2, 4, 8 e 16 horas de imersão. Todas as medições foram feitas em triplicado.

Nestes ensaios foram colocados 0,0250 g de cada amostra dentro de recipientes de plástico tendo-se efectuado a pesagem do conjunto. Em seguida foram adicionados 10 mL

de água destilada a cada recipiente que, depois de devidamente fechados, foram colocados numa estufa a 37 °C durante os diversos intervalos de tempo. Após o término do tempo de imersão, as amostras foram retiradas da estufa, foi medido o pH da solução e o líquido sobrenadante foi retirado. Para secar a água remanescente os recipientes, destapados, foram colocados numa estufa a 50 °C durante 48 horas e, findo esse tempo, foram novamente pesados.

3.3.8. Ensaios antimicrobianos

Para a determinação da actividade antimicrobiana dos materiais preparados foram usadas células de *Escherichia coli* ATCC25922 (*E. coli*). Os ensaios foram efectuados tendo como base a norma ASTM E2149 para a determinação da actividade antimicrobiana de agentes antimicrobianos imobilizados (Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents). As células bacterianas foram enumeradas através do método convencional de contagem em placa. Todo o material de laboratório bem como as soluções foram previamente esterilizadas por exposição, durante 15 minutos, a radiação ultravioleta. Os vidros em teste foram esterilizados numa estufa a 160°C durante 2h. Os vidros foram preparados e incubados na ausência de luz.

Cada material foi pesado e de seguida incubado com uma quantidade definida de células de *E. coli*. Estas células foram obtidas através da promoção do seu crescimento durante cerca de 16h, a 37°C em meio de cultura LB (Luria-Bertani, Merck). Para eliminação de restos do meio de cultura as células foram centrifugadas, duas vezes, a 4000G, durante 5 minutos. As células sedimentadas foram novamente colocadas em suspensão em volumes definidos de uma solução tampão de K₂HPO₄ com um pH de 7. A densidade de unidades formadoras de colónias (CFU) por mL de solução oscilou 10⁹ e 10¹⁰ e foram em seguida incubadas com os materiais em estudo durante 1h a 20°C com agitação. Após a incubação, diluições seriadas de alíquotas da suspensão de células foram semeadas em placas de petri contendo meio de cultura LA (Luria agar, Merck). Após incubação (37°C, 24h), as CFUs foram contadas, permitindo o cálculo da redução no número de células viáveis após incubação com os materiais em teste (R) através da expressão:

$$\%R = \frac{(C_0 - C)}{C_0} \times 100$$

onde C_0 representa o número de CFUs observadas na amostra controlo, e C representa o número de CFUs após incubação na presença do material em teste. Cada ensaio foi repetido três vezes. Os ensaios são realizados sob agitação constante num volume final de suspensão de 1,1 mL.

Como controlos, foram realizados testes com o vidro V20 (sem prata) e também na ausência de qualquer material (ensaio só com células).

3.3.9. Espectroscopia de Emissão por Plasma Induzido (ICP)

Para a realização dos ensaios de bioactividade em fluido fisiológico simulado (SBF) foram seleccionados quatro composições de vidro: V20, V20 Ag1, V20 Ag2 e V20 Ag5. Foram seleccionados três tempos de imersão: 16 horas, 3 e 7 dias. Os ensaios foram feitos em duplicado.

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

Nestes ensaios as amostras são imersas em SBF, de composição iónica semelhante à do plasma sanguíneo humano, preparado de acordo com o protocolo apresentado por Kokubo [5]. A composição iónica do plasma sanguíneo humano e do SBF são apresentadas na Tabela 5.

Na preparação do SBF todo o material de laboratório utilizado foi previamente esterilizado por radiação ultravioleta. A um litro de água destilada, seguindo a ordem indicada na tabela 8, foram adicionadas, sob agitação constante, as quantidades descritas de cada reagente.

Tabela 5 - Ordem de adição, reagente, quantidade, fornecedor e grau de pureza dos reagentes utilizados na preparação de 1 litro de SBF.

Ordem de adição	Reagente	Quantidade	Fornecedor	Grau de pureza (%)
1	NaCl	7,996 g	Panreac	99,5
2	NaHCO ₃	0,350 g	Sigma-Aldrich	99,7
3	KCl	0,224 g	Sigma-Aldrich	99,5
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,228 g	Calbiochem	100
5	HCl (1M)	~90% de 40 mL	Panreac	
6	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,305 g	Sigma-Aldrich	99,0
7	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,548 g	Fluka	99,0

8	Na ₂ SO ₄	0,071 g	Panreac	99,0
9	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	6,057 g	Merck	99,8

O volume total de HCl não foi utilizado na etapa 5, para que no final, o restante, fosse utilizado para acertar o valor de pH para valores próximos do valor de pH do plasma sanguíneo humano, entre 7,2 a 7,4. O SBF foi mantido a 5 °C no frigorífico, com um pH final de 7,4.

A determinação analítica da concentração dos elementos presentes em solução, após dissolução dos vidros em SBF em tempos variados, foi efectuada por espectroscopia de emissão por plasma induzido (ICP) num espectrofotómetro Jobin Yvon 70 Plus, França, no Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro. Até à realização das análises, a solução SBF, bem como as amostras recolhidas após o término de cada ensaio, foram conservadas a 5 °C, em recipientes de polipropileno.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

As composições estudadas pertencem ao sistema $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-MgO}$ sobre o qual existem vários trabalhos. A este sistema base foram adicionadas várias percentagens de prata (1, 2, 3 e 5% em massa).

4.1. Caracterização dos vidros

A composição padrão utilizada e cuja composição molar é 25,43% SiO_2 : 32,68% CaO : 10,89% P_2O_5 : 31,00% MgO foi já alvo de diversos estudos; no entanto, o vidro foi sempre preparado pelo processo de fusão. Pelo contrário, neste trabalho recorreu-se ao método sol-gel para preparar os vidros em estudo.

Neste estudo foram preparadas e caracterizadas cinco composições: V20, V20 Ag1, V20 Ag2, V20 Ag3 e V20 Ag5.

4.1.1. Comportamento térmico

As condições utilizadas para obter os vidros foram seleccionadas com base nos resultados obtidos nas análises térmicas que é uma ferramenta fundamental para determinar a temperatura de recozimento e as temperaturas de cristalização.

Os resultados obtidos nas análises térmicas dos vidros V20, V20 Ag2 e V20 Ag5 encontram-se patentes, respectivamente, nas figuras 3, 4 e 5.

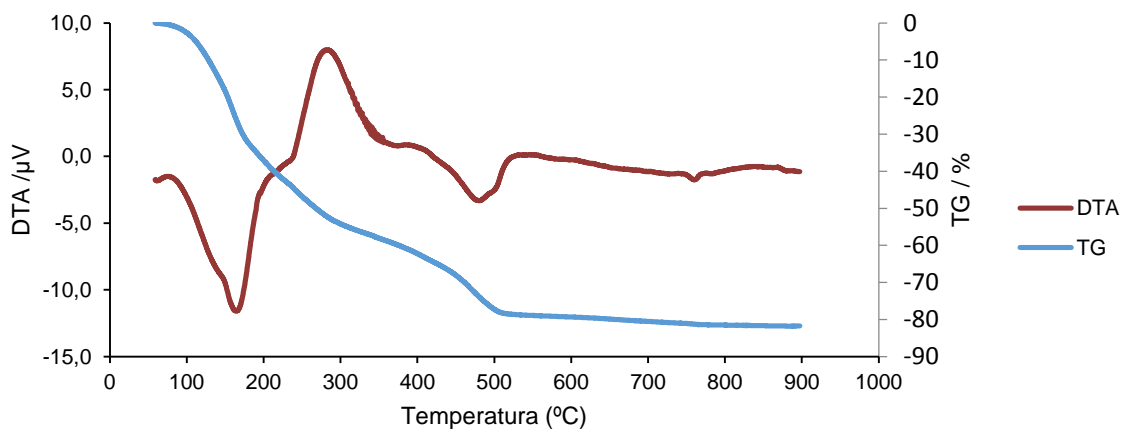


Figura 3 - ATG/DTA do V20

A DTA do V20 apresenta dois picos endotérmicos que ocorrem às temperaturas de 180°C e 500°C. Observa-se um pico exotérmico por volta dos 300°C.

Os picos endotérmicos são associados à eliminação de H₂O e álcool, física e quimicamente adsorvidos a 180°C e a eliminação dos nitratos a 500°C. O pico exotérmico a 300°C correspondente à queima de orgânicos

As várias reacções estão associadas a perdas de peso que são significativas durante a reacção exotérmica, mantendo-se depois constantes até ao final do ensaio. As perdas de peso de amostra foram de cerca de 80%.

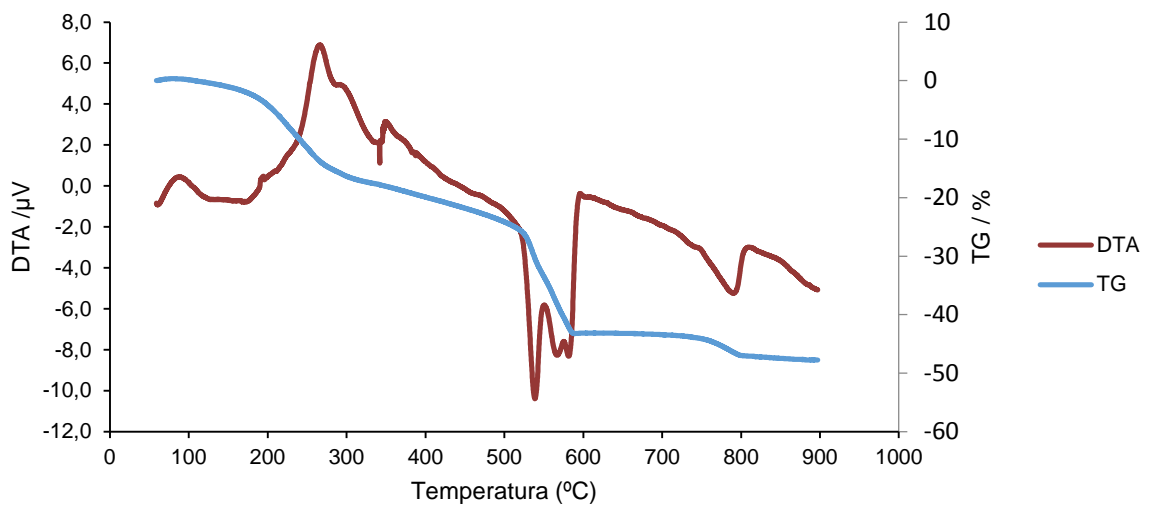


Figura 4 - ATG/DTA do V20 Ag2.

A DTA do V20 Ag2 apresenta diversos picos, quer endotérmicos, quer exotérmicos. Os endotérmicos ocorrem às temperaturas de 540°C e 800°C. Os picos exotérmicos ocorrem por a 250°C, 350°C, 560°C e 600°C.

O pico endotérmico a 540°C é associado à eliminação dos nitratos. Os picos exotérmicos a 250°C e 350°C correspondentem à queima de orgânicos.

As várias reacções estão associadas a perdas de peso que são significativas durante a reacção exotérmica, mantendo-se depois constantes até ao final do ensaio. As perdas de peso de amostra foram de cerca de 45%.

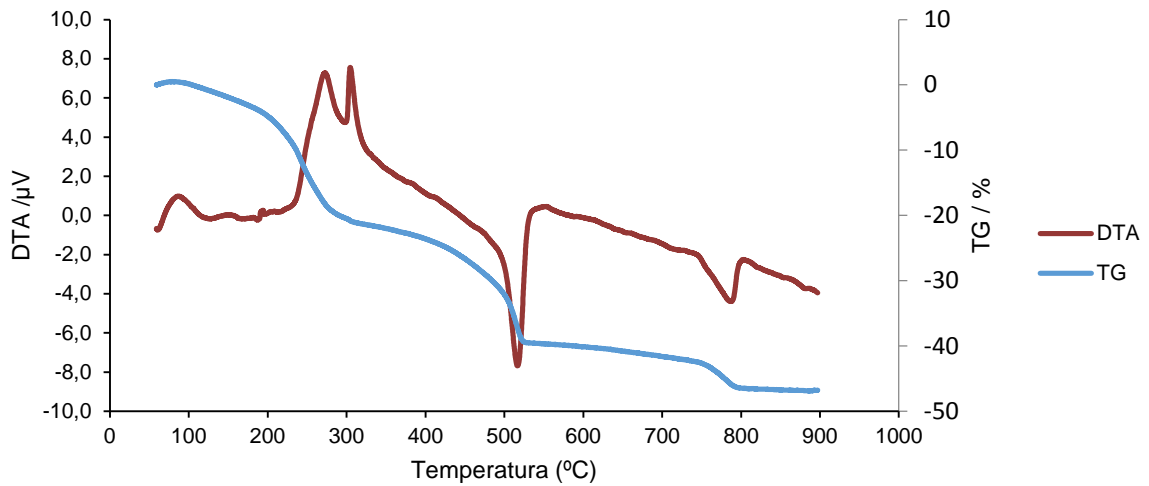


Figura 5 - DTA/ATD do V20 Ag5

A DTA do V20 Ag5 apresenta vários picos, quer endotérmicos, quer exotérmicos. Os endotérmicos ocorrem às temperaturas 520°C e 790°C. Os picos exotérmicos ocorrem entre os 250°C e 300°C.

O pico endotérmico a 520°C é associado à eliminação dos nitratos. Os picos exotérmicos a 250°C e 300°C correspondentem à queima de orgânicos.

As várias reacções estão associadas a perdas de peso que são significativas durante a reacção exotérmica, mantendo-se depois constantes até ao final do ensaio. As perdas de peso de amostra foram de cerca de 45%.

Nas ATDs efectuadas a estes vidros apresentam a deflexão endotérmica correspondente ao intervalo de temperaturas onde se situa a temperatura de transição vítrea por volta dos 500°C sendo a temperatura um pouco mais elevada no vidro V20 Ag2.

Tendo em conta esta indicação e para garantir uma eficiente relaxação de tensões optou-se por fazer a calcinação dos vidros a uma temperatura um pouco superior (600°C).

4.1.2. Difracção de raios X

Na figura 6 estão representados os difractogramas dos diferentes vidros após calcinação a 600°C.

- ^a Hidroxiapatite [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$] 01-076-0694
^b Fosfato de Cálcio [$\text{Ca}_2(\text{P}_2\text{O}_7)$] 01-071-2123
^c Periclase [MgO] 01-075-1525
^d Prata (Ag) 01-071-3762

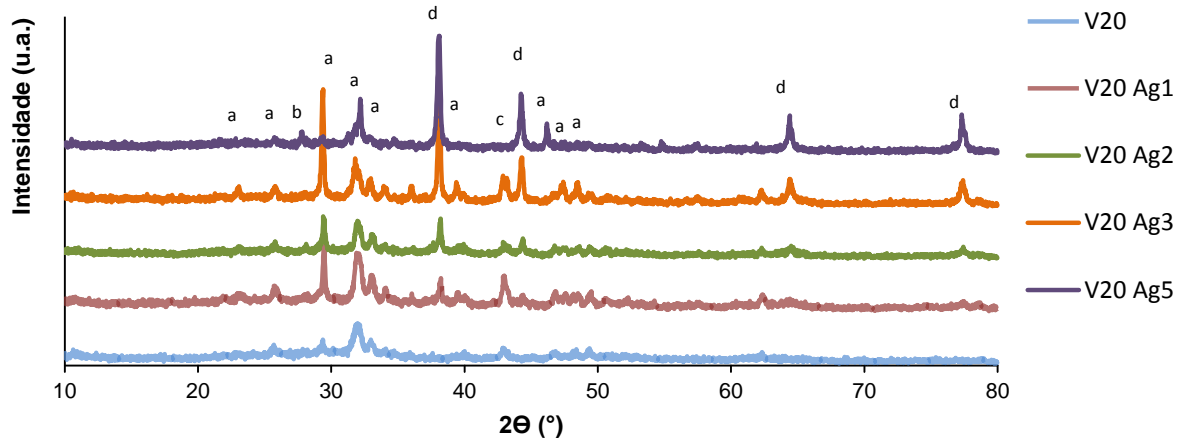


Figura 6- Difractogramas dos vidros após calcinação a 600°C.

A hidroxiapatite está presente em todas as composições preparadas, sendo que para o V20 é a única fase cristalina que se observa.

A presença da fase cristalina prata (Ag) é notória para todas as composições que contêm prata, sendo visível um aumento da intensidade do pico com o incremento da sua concentração no vidro.

É também visível um pequeno pico associado ao fosfato de cálcio para a V20 Ag5. Nos vidros com 1 e 3% de prata observa-se a presença de periclase.

4.1.3. Distribuição Granulométrica

As curvas de distribuição granulométrica dos materiais estudados, após moagem, determinadas por difracção laser, estão representadas nas figuras 7 a 11.

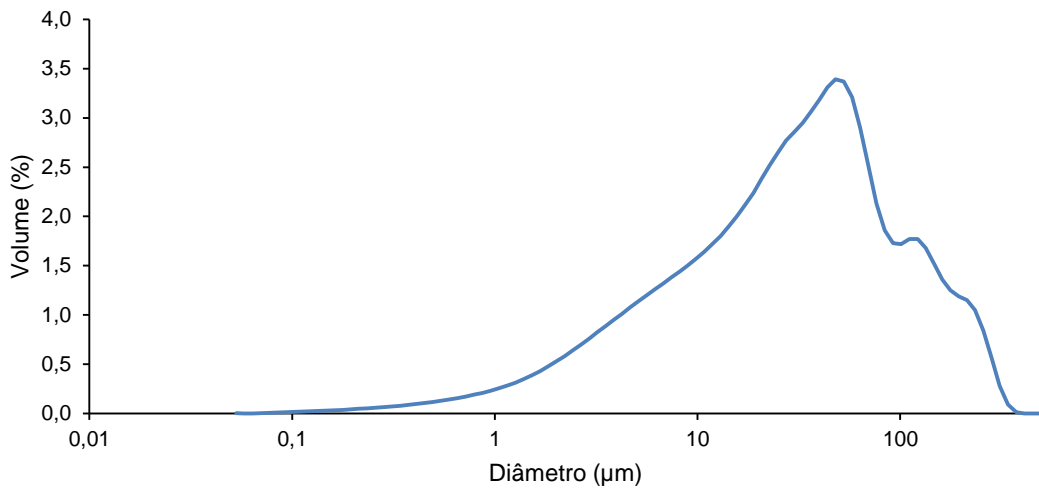


Figura 7 - Distribuição granulométrica do V20.

Para o V20 observa-se uma distribuição granulométrica larga existindo partículas com tamanho entre 0,1 e ~ 350 µm (figura 7). A partir destes resultados foi determinado o tamanho médio de partícula (D_{50}) que é 41,02 µm.

A área superficial específica, determinada por adsorção gasosa de N_2 , é 126,34 m²/g.

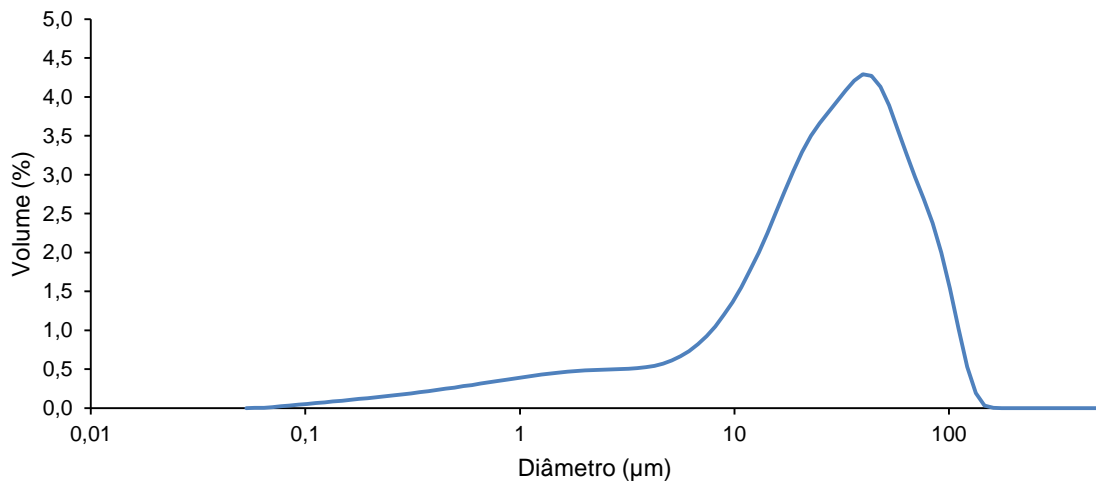


Figura 8 - Distribuição granulométrica do V20 Ag1.

O V20 Ag1 também exibe uma distribuição granulométrica larga, com partículas de tamanho entre 0,05 e ~ 150 µm (Figura 8). O tamanho médio de partícula (D_{50}) é 26,97 µm.

A área superficial específica, determinada por adsorção gasosa de N_2 , é 3,75 m²/g.

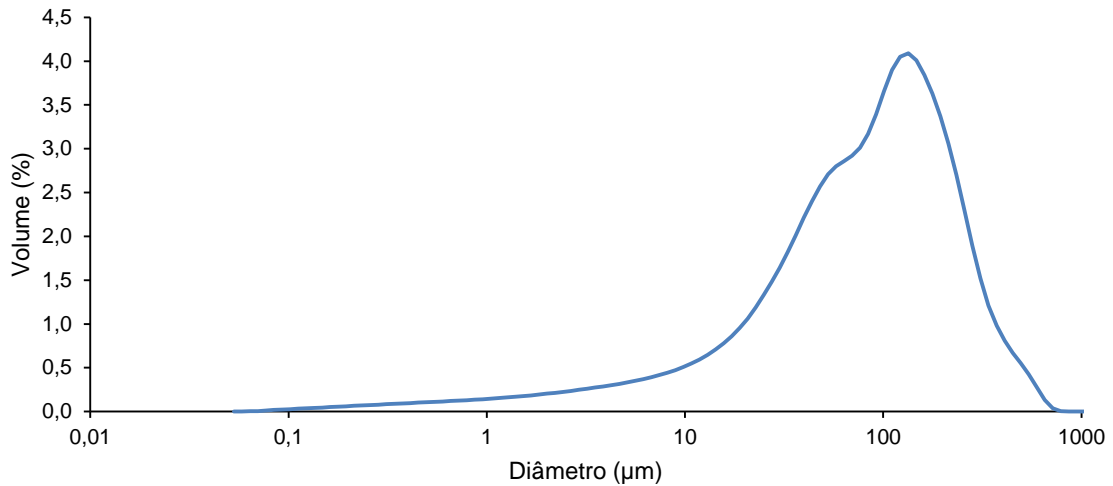


Figura 9 - Distribuição granulométrica do V20 Ag2.

Para o V20 Ag2, é possível observar uma distribuição granulométrica larga, com partículas de tamanho entre 0,05 a ~ 700 µm. A partir destes resultados foi determinado o tamanho médio de partícula a 50 % vol. da distribuição, tendo sido encontrado o valor de 92,32 µm.

A área de superfície específica foi determinada por adsorção gasosa de N₂, segundo o método de BET, tendo-se encontrado o valor de 8,75 m²/g.

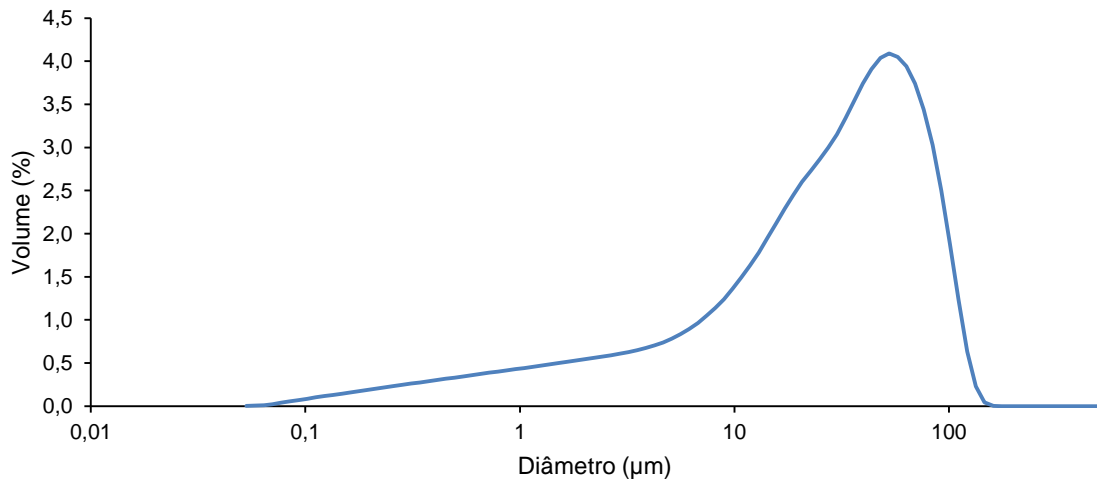


Figura 10 - Distribuição granulométrica do V20 Ag3.

No caso do V20 Ag3 a distribuição granulométrica também é larga, com partículas de tamanho variando entre 0,05 a ~ 160 μm . A partir destes resultados foi determinado o tamanho médio de partícula a 50 % vol. da distribuição, tendo sido encontrado o valor de 28,17 μm .

A área de superfície específica foi determinada por adsorção gasosa de N_2 , segundo o método de BET, tendo-se encontrado o valor de 23,23 m^2/g .

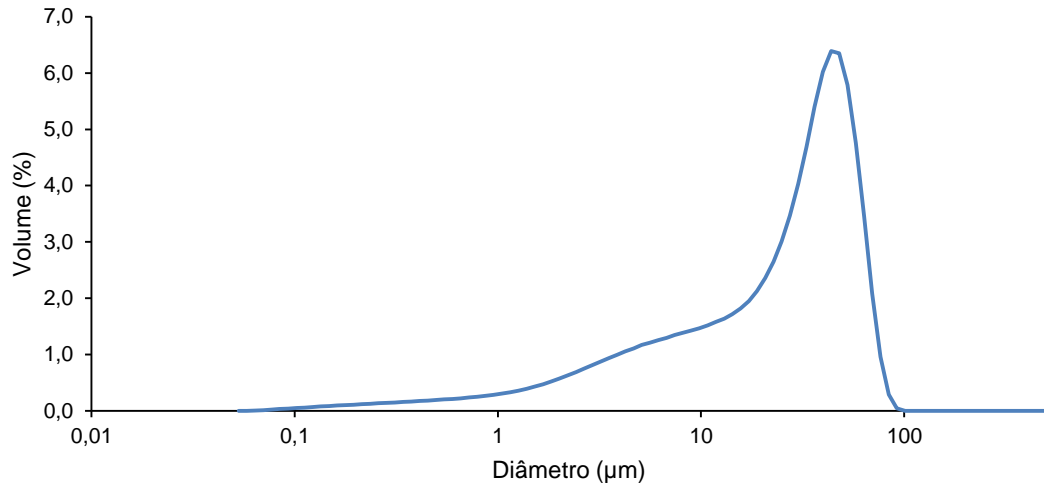


Figura 11 - Distribuição granulométrica do V20 Ag5.

Para o V20 Ag5, é possível observar uma distribuição larga, com partículas de tamanho variando entre 0,05 a ~ 90 μm . A partir destes resultados foi determinado o tamanho médio de partícula a 50 % vol. da distribuição, tendo sido encontrado o valor de 23,09 μm .

A área superficial específica foi determinada por adsorção gasosa de N_2 , segundo o método de BET, tendo-se encontrado o valor de 9,10 m^2/g .

Na tabela 5 apresenta-se a variação do tamanho médio das partículas com a composição. A partir destes valores é possível notar que a adição de prata promove uma diminuição do tamanho das partículas. No entanto, a composição com 2% Ag exibe um valor bastante superior a todas as composições preparadas.

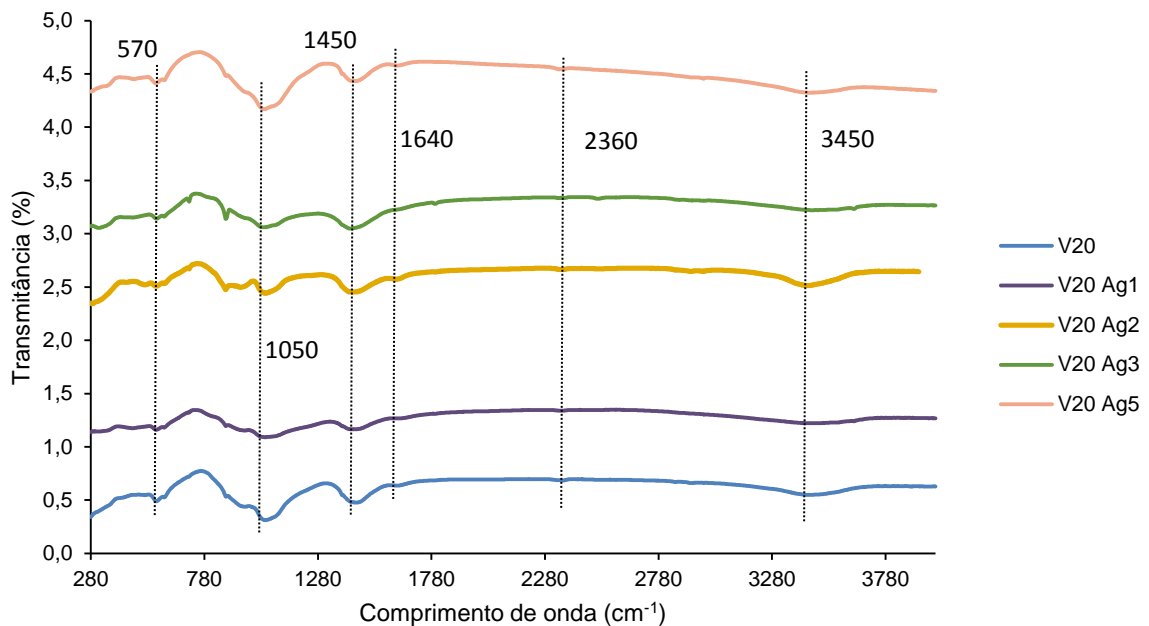
Tabela 6 - Valores o tamanho médio das partículas e da área superficial específica dos vidros preparados.

Composições	Tamanho médio de partícula (μm)	ASE (m^2/g)
V20	41.02	126.34
V20 Ag1	26.97	3.75
V20 Ag2	92.32	8.75
V20 Ag3	28.17	23.23
V20 Ag5	23.09	9.10

4.1.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As diversas composições foram analisadas por FTIR, com base nas bandas de absorção do espectro.

Os espectros FTIR podem ser vistos na figura 12.

**Figura 12** - Espectros FTIR dos materiais em estudo.

As bandas de transmitância ATR para os diferentes materiais, bem como a sua interpretação encontram-se na tabela 5.

Através da análise dos espectros procurou-se identificar as vibrações envolvidas, tal como, atribuir os grupos químicos relacionados a estas vibrações.

Analisando os espectros de IV verifica-se que as bandas de transmitância variam ligeiramente para as diferentes composições. A banda larga observada a $\sim 3435 \text{ cm}^{-1}$ e a

3442 cm^{-1} é referente ao estiramento simétrico da ligação O-H devida à adsorção de água superficial dos pós, notória no V20, V20 Ag2 e V20 Ag5. Observa-se também a presença da banda a 1630 cm^{-1} , para as composições anteriores, correspondente à vibração da ligação O-H da água molecular. [85]

A banda a 2360 cm^{-1} , referente ao CO_2 , pode ser atribuída à presença de CO_2 atmosférico no interior do aparelho, sendo esta banda notória em todas as composições. O pico a 1050 cm^{-1} é atribuído à ligação assimétrica Si-O-Si e o pico a ~ 600 à ligação PO_4^{3-} . [86]

A 570 cm^{-1} surge também a banda de vibrações de flexão P-O atribuída à formação de fosfato de cálcio amorfo. [87]

Tabela 7 - Bandas de transmitância ATR para as diferentes.

Bandas (cm^{-1})	Interpretação	V20	V20 Ag1	V20 Ag2	V20 Ag3	V20 Ag5
3500-3435	OH (ν_1)	X		X		X
2360	CO_2	X	X	X	X	X
1630-1640	H_2O	X		X		X
1450	CH ₂	X	X	X	X	X
1060-1045	Estiramento simétrico Si-O-Si	X	X	X	X	X
960	Vibração estiramento Si-O ou Si-OH	X	X		X	
620-600, 592-590, 581-580, 574-573,568	PO_4^{3-}	X	X	X	X	X

Para as diversas composições, foram obtidos espectros de absorvância na região do ultra-violeta e do visível (UV-vis), os quais estão apresentados na figura 13.

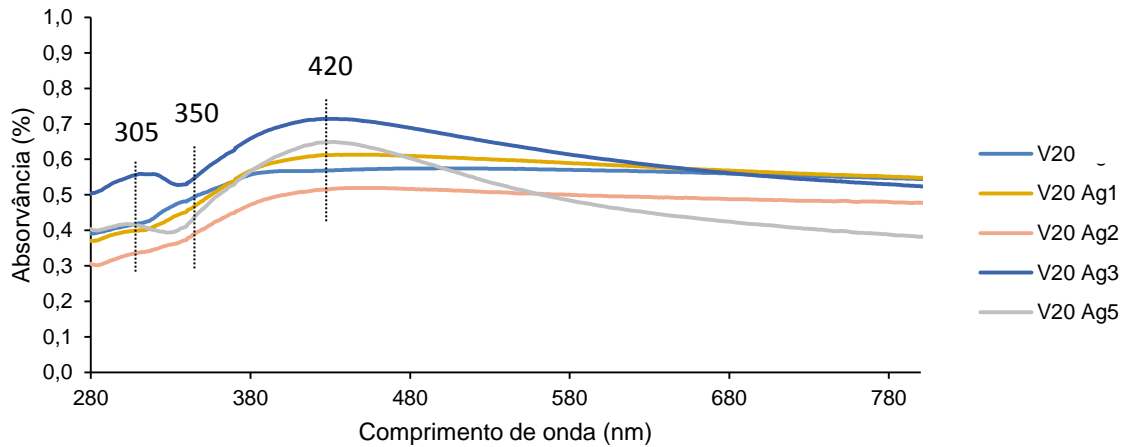


Figura 13 - Espectros FTIR (UV-vis) das várias composições em estudo.

As principais bandas de vibração representadas no gráfico da Figura 13 encontram-se resumidas na tabela 7. [88]

Tabela 8 - Atribuição das principais bandas de vibração (zona UV-Vis).

Bandas (nm)	Interpretação	V20 Ag1	V20 Ag2	V20 Ag3	V20 Ag5
305	Ag ⁺	X	X	X	X
350	Ag	X			X
420	Ag ⁰	X	X	X	X

Analisando o gráfico, é possível ver que a composição sem Ag não apresenta nenhum pico correspondente à prata conforme o expectável. Todas as outras composições apresentam um pico associado à prata iónica e a aglomerados de prata. Quanto à prata metálica, as composições V20 Ag1 e V20 Ag5 apresentam um pico associado à prata metálica, ao contrário das outras composições.

4.1.5. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) e Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS)

A observação das partículas das diferentes composições por SEM, figuras 14 a 18, permite concluir que para cada composição, a morfologia das partículas é diferente.

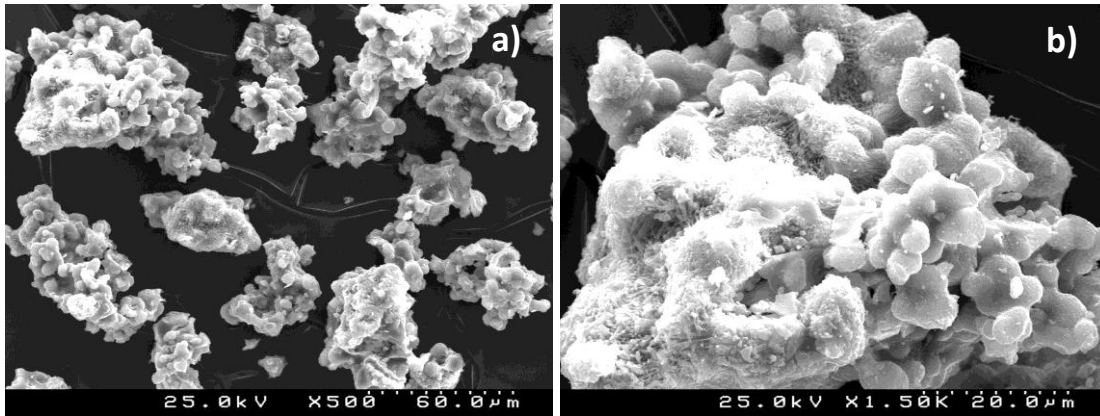


Figura 14 - Micrografias, obtidas por SEM, da composição V20 com a) ampliação de 500x e b) ampliação de 1500x.

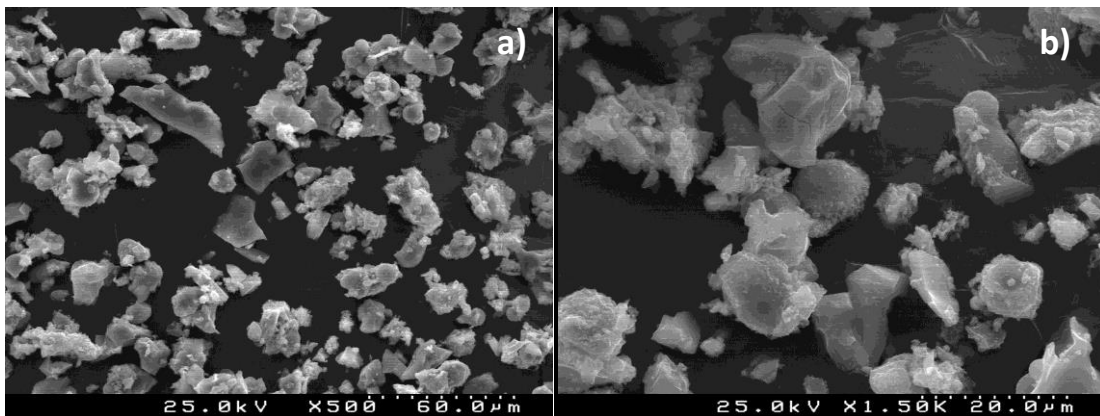


Figura 15 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag1 com a) ampliação de 500x e b) ampliação de 1500x.

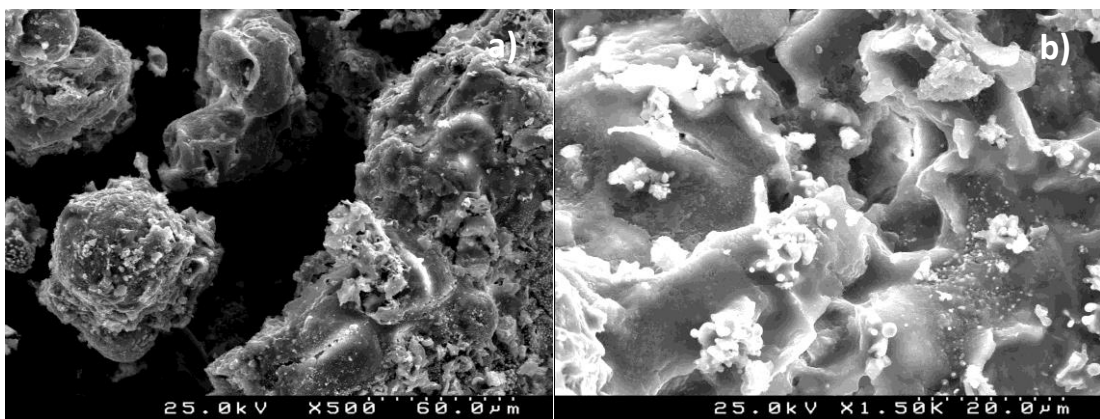


Figura 16 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag2 com a) ampliação de 500x e b) ampliação de 1500x.

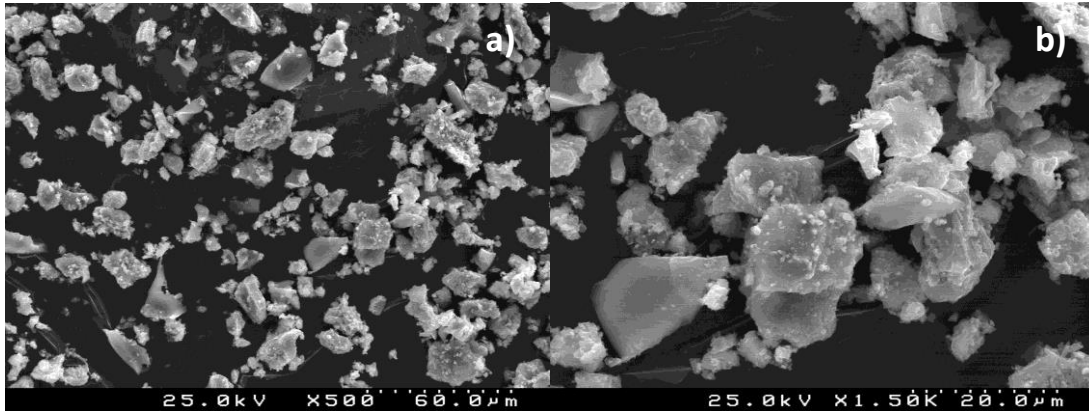


Figura 17 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag3 com a) ampliação de 500x e b) ampliação de 1500x.

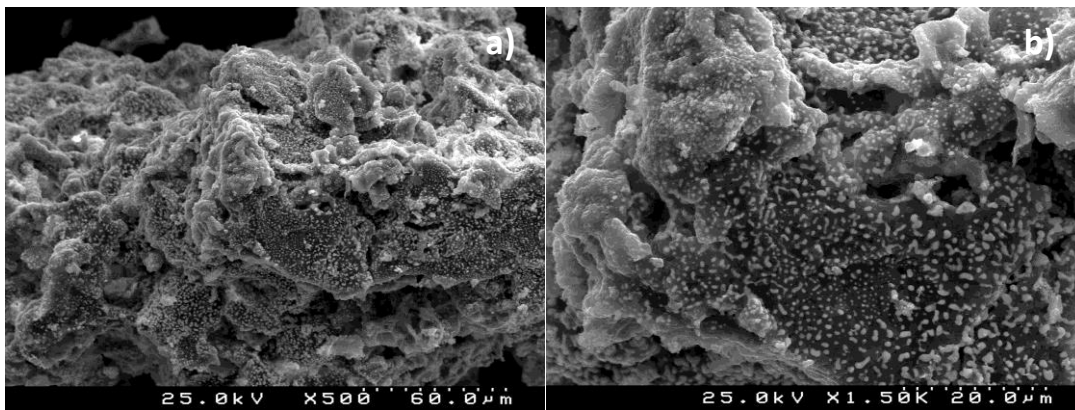


Figura 18 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag5 com a) ampliação de 500x e b) ampliação de 1500x.

Pela observação das imagens obtidas por SEM é possível observar que as diversas composições apresentam partículas com formas e tamanhos heterogêneos. O V20, V20 Ag1 e V20 Ag3 possuem partículas com tamanho inferior a 60 µm, tal como determinado por difração laser (Coulter). Pelo contrário o V20 Ag2 e o V20 Ag5 apresentam partículas com tamanhos bem superiores ao tamanho determinado pelo Coulter.

É também visível que as superfícies das partículas não são lisas e observar a existência de alguns poros, que podem resultar da evaporação lenta da água.

A figura 18 que corresponde ao V20 Ag5 apresenta zonas mais claras à superfície, o que pode sugerir que a prata se encontra na superfície das partículas, sendo assim mais fácil a sua dissolução.

4.2. Ensaio de dissolução em água destilada

Os resultados experimentais da evolução do valor de pH com o tempo de imersão das amostras dos materiais em água destilada estão representados na figura 19.

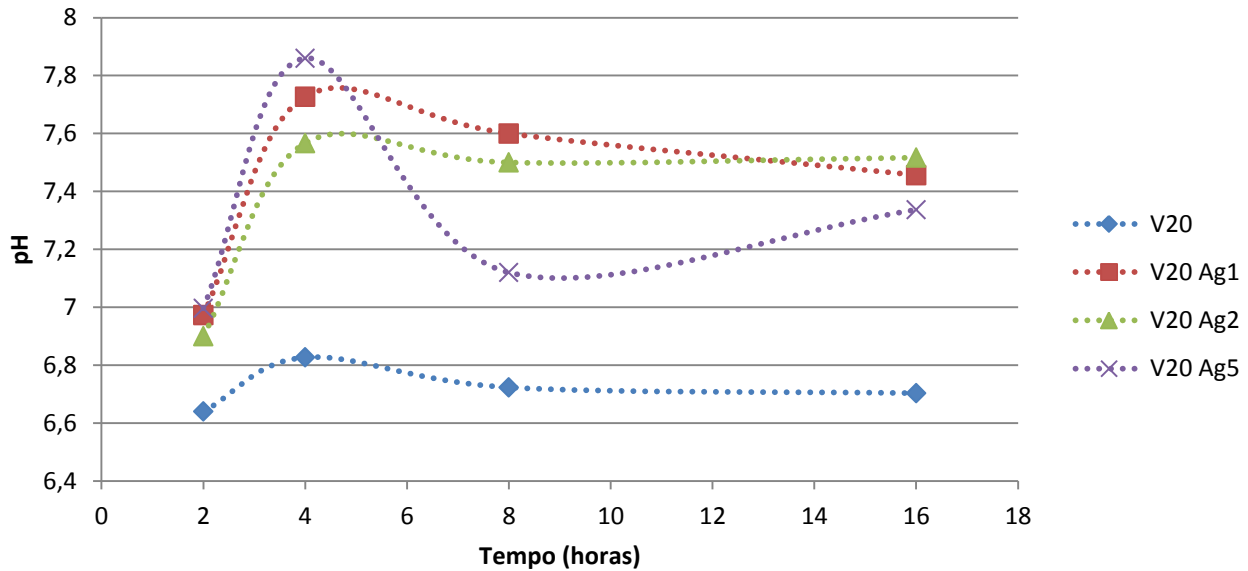


Figura 19 - Variação do valor de pH da água destilada com o tempo de imersão das diferentes composições.

Os valores iniciais do pH variam entre 6,6 e 7,0 para as diversas composições testadas. Nas primeiras horas de imersão ocorre um pequeno aumento do valor de pH para todas as amostras, sendo atingido o valor máximo de 7,8 ao fim de 4 horas de imersão. Depois observa-se uma pequena redução e posterior estabilização. Ao fim das 16 horas de imersão, o pH das soluções situa-se entre 6,7 e 7,5.

Em relação às composições, nota-se que para o V20 a variação do pH é bastante menos significativa (entre 6,6 e 6,8) do que para as composições com prata (6,9 e 7,8).

Os resultados da variação da percentagem de perda de peso das diferentes composições estão representados na figura 20.

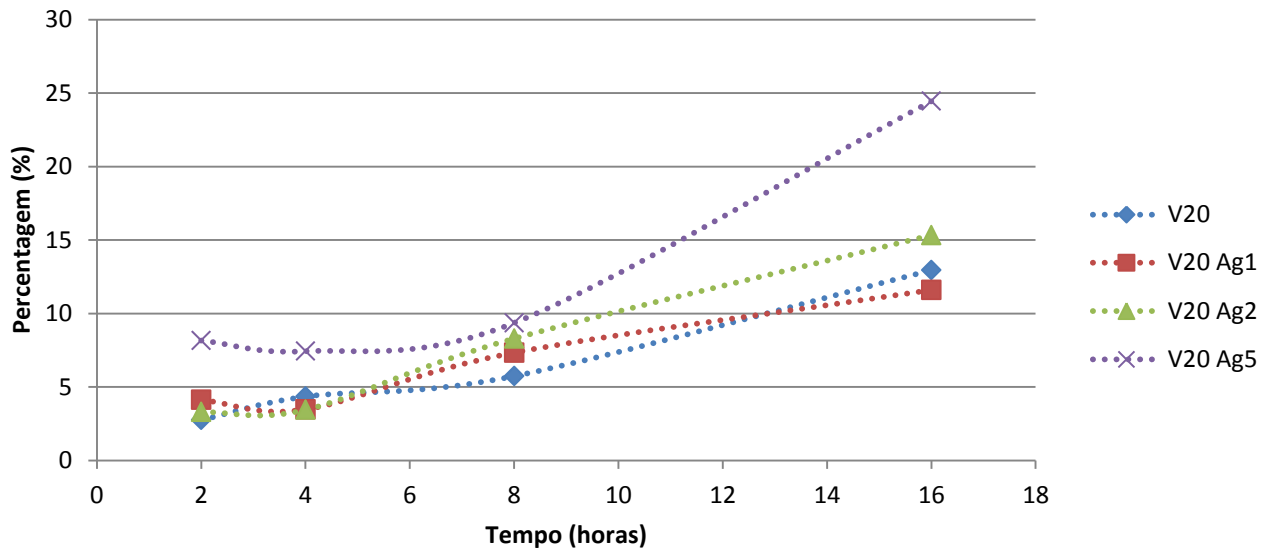


Figura 20 - Evolução da %ΔP das diferentes composições com o tempo de imersão em água destilada.

Conforme os dados do gráfico anterior a perda de peso, após imersão em água destilada, aumenta com o tempo de imersão. Ao fim de 2 horas a perda de peso é de cerca de 5%, aumentando pouco às 8 horas. Ao fim de 16 horas os valores da perda de peso são bastante significativos, chegando a 25% para a composição V20 Ag5.

Existem também indícios de que a perda de peso aumenta com a percentagem de prata presente na composição. Este efeito é particularmente visível após 16 horas de imersão observando-se, respectivamente, cerca de 12, 13, 15 e 24% para as composições sem prata e com 1, 2 e 5% de prata.

4.3. Ensaio de Bioactividade em SBF

4.3.1. Variação das concentrações iónicas do SBF

A imersão das amostras em SBF promove a dissolução de todos os iões do material como se pode observar nas figuras 21 a 24

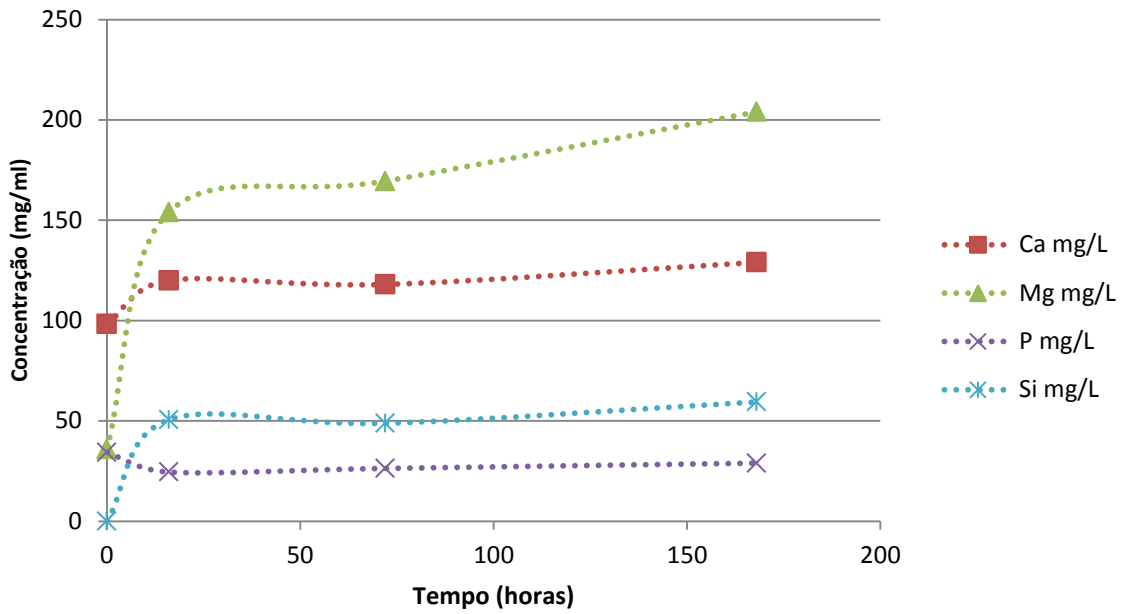


Figura 21 - Variação, com o tempo de imersão, da concentração dos vários íões na solução de SBF para o V20.

Ao observar a figura 21, podemos ver que nas primeiras 16 horas ocorre dissolução dos íões de magnésio, silício e cálcio, sendo que o íão fósforo se deposita no material. Para tempos mais longos (3 e 7 dias) a dissolução continua mas com uma taxa muito mais lenta com exceção do íão magnésio para o qual a taxa diminui mas mantém-se relativamente elevada.

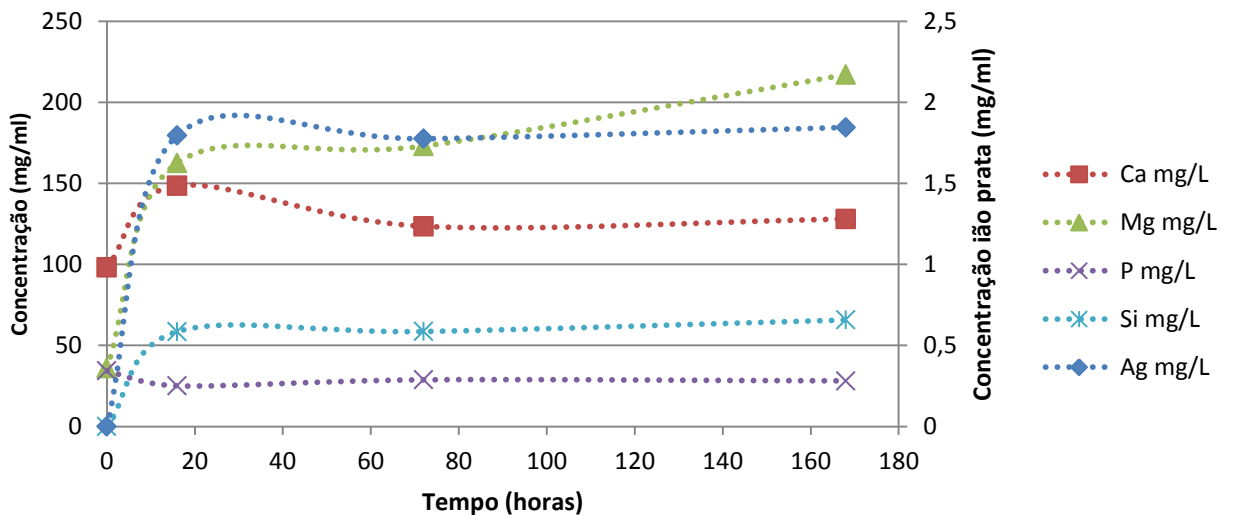


Figura 22 - Variação, com o tempo de imersão, da concentração dos vários íões na solução de SBF para o V20 Ag1.

No caso do V20 Ag1 (figura 22), podemos ver que nas primeiras 16 horas ocorre dissolução dos íons magnésio, silício, cálcio e prata, sendo que o íon fósforo se deposita. Para tempos de imersão mais longos, o íon cálcio também se deposita no material e a dissolução do silício torna-se muito mais lenta. A concentração do íon magnésio no SBF continua a aumentar de forma significativa, em particular entre os 3 e os 7 dias.

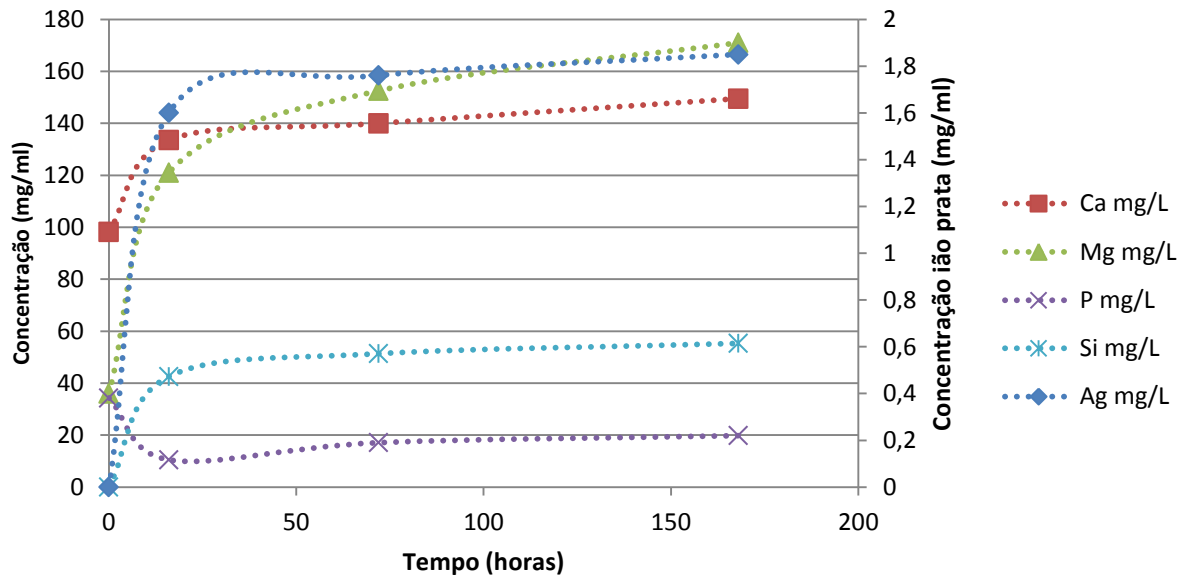


Figura 23 - Variação, com o tempo de imersão, da concentração dos vários íons na solução de SBF para o V20 Ag2.

Ao observar a figura 23, podemos ver que, tal como observado para o V20 1Ag, nas primeiras 16 horas ocorre dissolução dos íons magnésio, silício, cálcio e prata, sendo que o íon fósforo se deposita no material. A dissolução dos íons magnésio e cálcio diminui ligeiramente comparativamente às outras composições (V20 e V20 1Ag). Para os tempos testados, não se verifica, ao contrário do observado para o V20 Ag1, a deposição do íon cálcio, apesar da quantidade de íons dissolvidos ser um pouco menor do que a observada para o V20 Ag1.

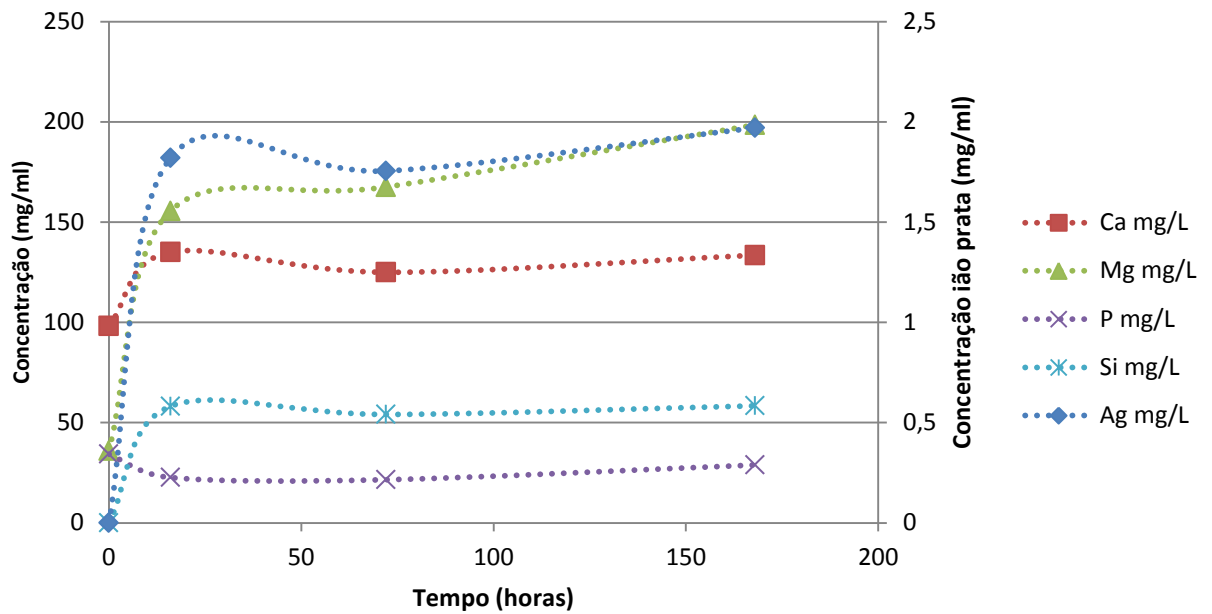


Figura 24 - Variação, com o tempo de imersão, da concentração dos vários íons na solução de SBF para o V20 Ag5.

Nas primeiras 16 horas de imersão do V20 Ag5 em SBF (figura 24) ocorre a dissolução dos íons magnésio, silício, cálcio e prata, sendo que o íon fósforo se deposita no material. Para tempos de imersão mais longos (3 e 7 dias), a dissolução continua a uma taxa mais lenta, excepto o íon cálcio que se deposita no material e o íon magnésio que apresenta uma taxa de dissolução significativa.

A avaliação do valor do pH das soluções permitiu observar que este não exhibe uma variação significativa e que o comportamento é semelhante para todas as composições. Após 16h de imersão a solução exhibe um pH ~7,5; este valor diminuiu ao fim de 3 dias. Após esta diminuição, o pH, volta a aumentar até valores de ~7,7 aos 7 dias.

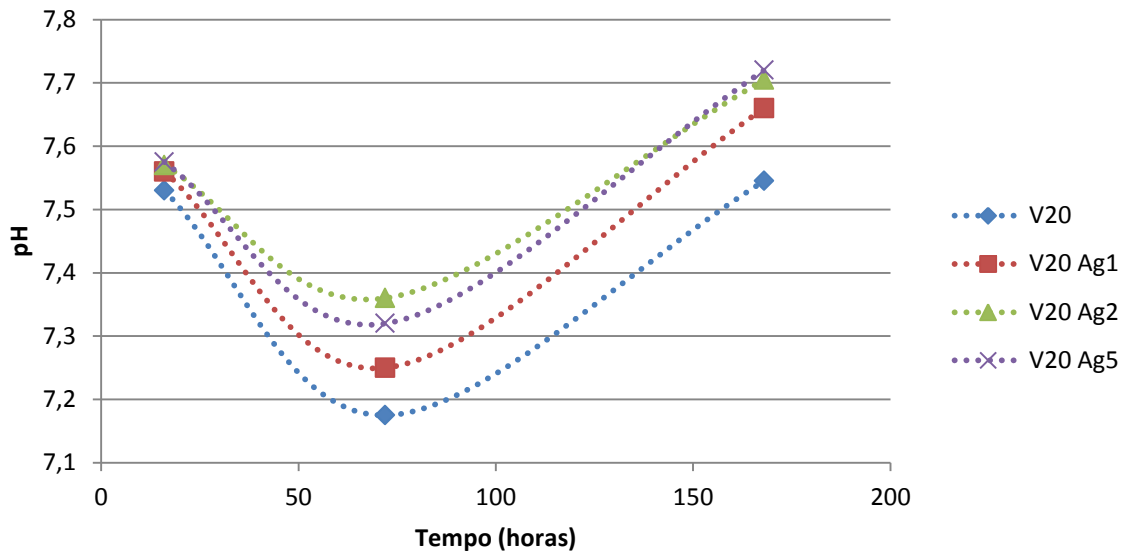


Figura 25 - Variação do pH da solução SBF com o tempo de imersão para as várias composições.

4.3.2. Difracção de raios X

Nas figuras 25 a 28 estão representados os difractogramas das diferentes composições após imersão em SBF, para os respectivos tempos de imersão.

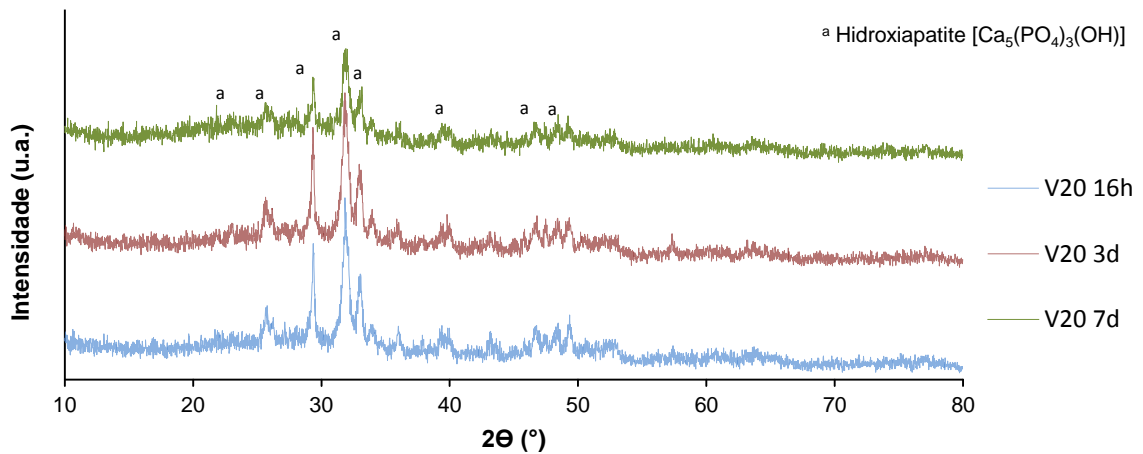


Figura 26 - DRX da composição V20 após imersão de 16 horas, 3 dias e 7 dias em SBF.

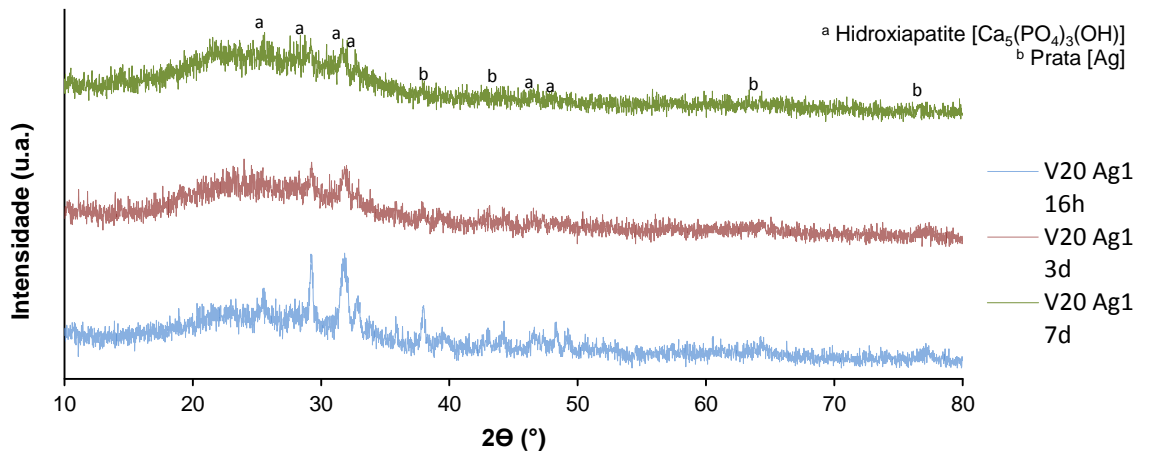


Figura 27 - DRX da composição V20 Ag1 após imersão de 16 horas, 3 dias e 7 dias em SBF.

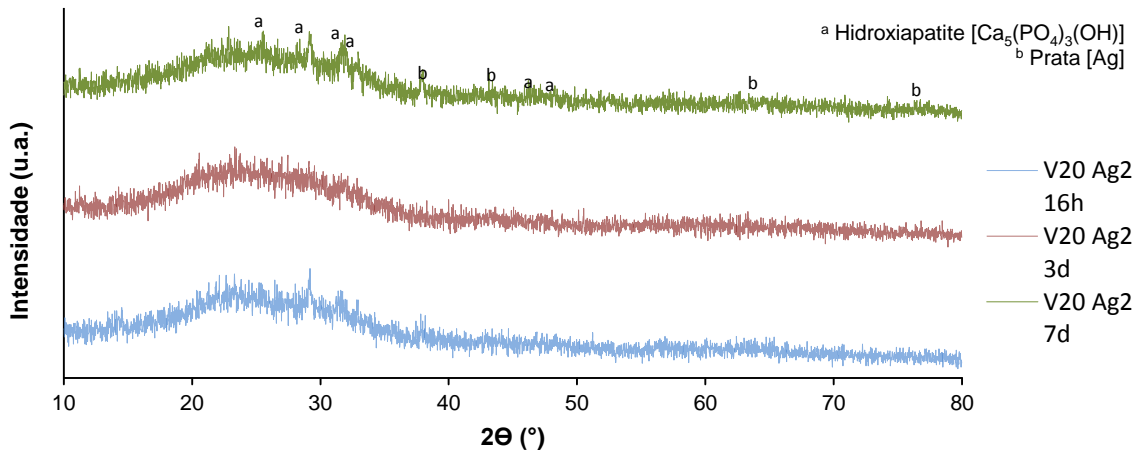


Figura 28 - DRX da composição V20 Ag2 após imersão de 16 horas, 3 dias e 7 dias em SBF.

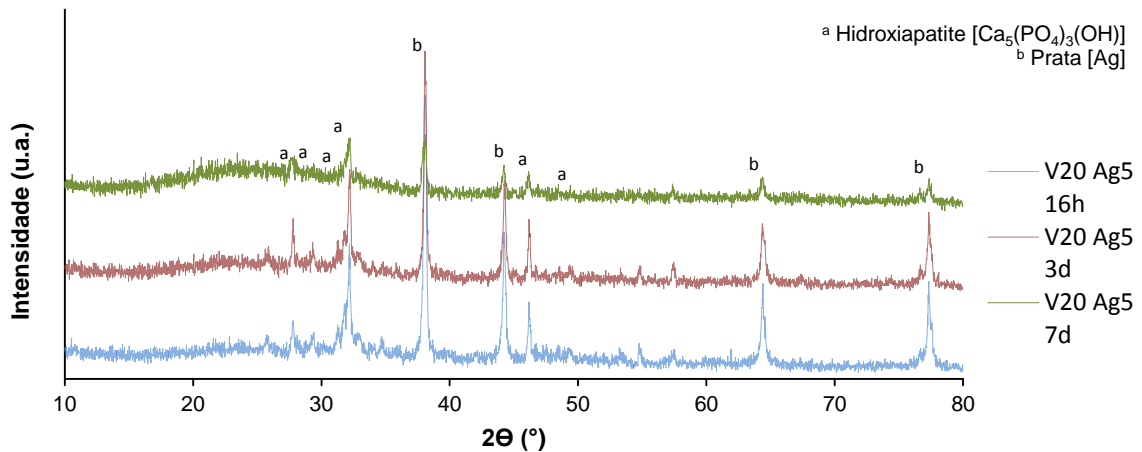


Figura 29 - DRX da composição V20 Ag5 após imersão de 16 horas, 3 dias e 7 dias em SBF.

A presença de hidroxiapatite é notória em todos os materiais. No entanto, não é claro se esta se deve à deposição de hidroxiapatite após imersão em SBF ou se se trata das fases detectadas inicialmente após calcinação. A presença de prata para as composições com adição da mesma também é visível nos espectros, sendo particularmente notória, como seria expectável, no V20 Ag5 (figura 29).

O V20 e o V20 Ag5 apresentam picos bem definidos mas a sua intensidade diminuiu com o incremento do tempo de imersão em SBF (figura 26 e 29). No caso do V20 Ag5 observa-se uma diminuição da intensidade dos picos de ambas as fases (hidroxiapatite e prata). Pelo contrário, o V20 Ag1 e o V20 Ag2 são quase amorfos exibindo apenas alguns picos de pequena intensidade. A influência do tempo de imersão em SBF na sua cristalinidade é, assim, muito menos evidente, no entanto também parece ter ocorrido a dissolução das fases cristalinas (figuras 27 e 28).

4.3.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Após imersão em SBF os materiais foram analisados por FTIR. Os espectros FTIR para as várias composições e distintos tempos de imersão estão patentes nas figuras 30 a 33.

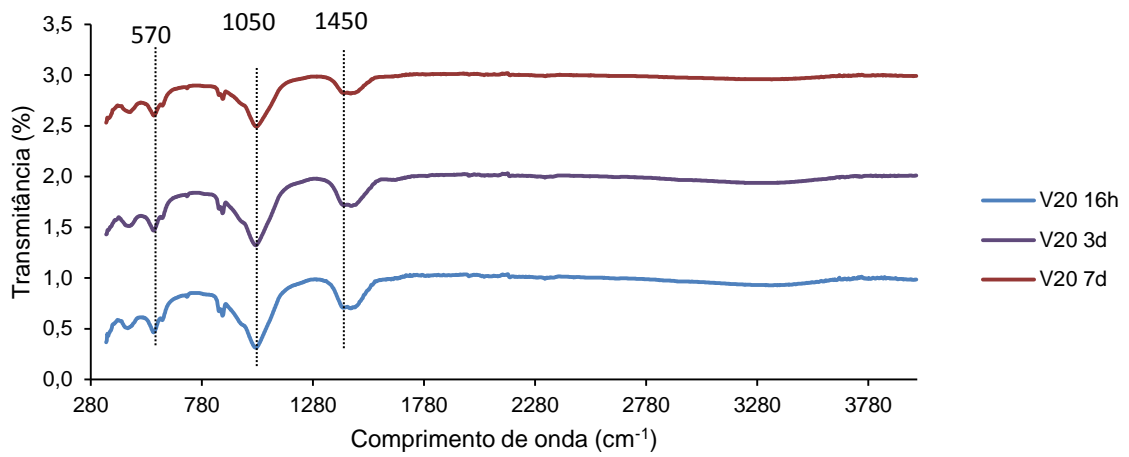


Figura 30 - Espectros de transmissão no infravermelho com transformada de Fourier obtidos para o V20 após diferentes tempos de imersão.

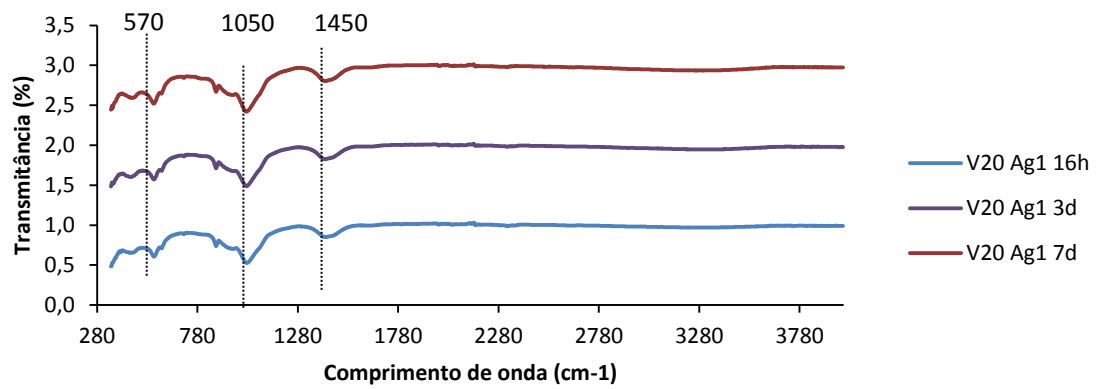


Figura 31 - Espectros de transmissão no infravermelho com transformada de Fourier obtidos para o V20 Ag1 após diferentes tempos de imersão.

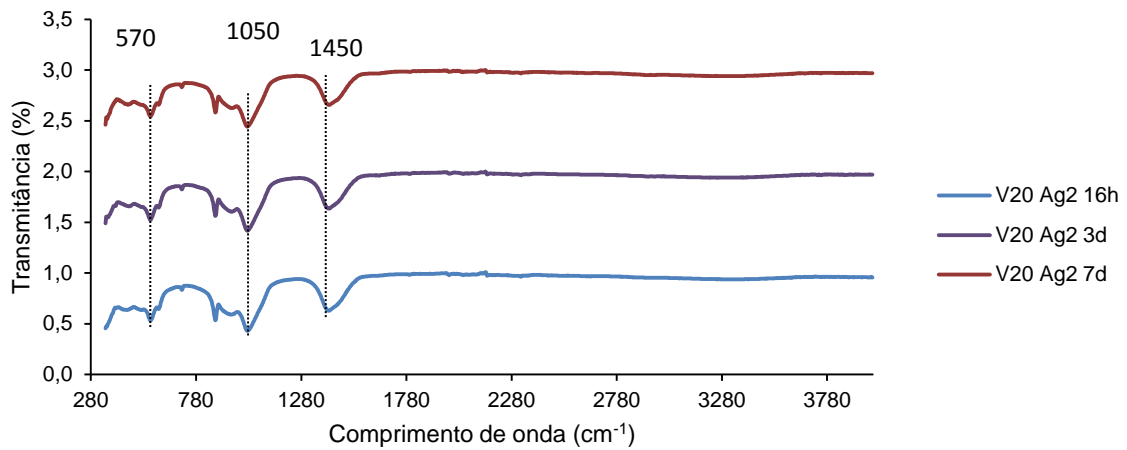


Figura 32 - Espectros de transmissão no infravermelho com transformada de Fourier obtidos para o V20 Ag2 após diferentes tempos de imersão.

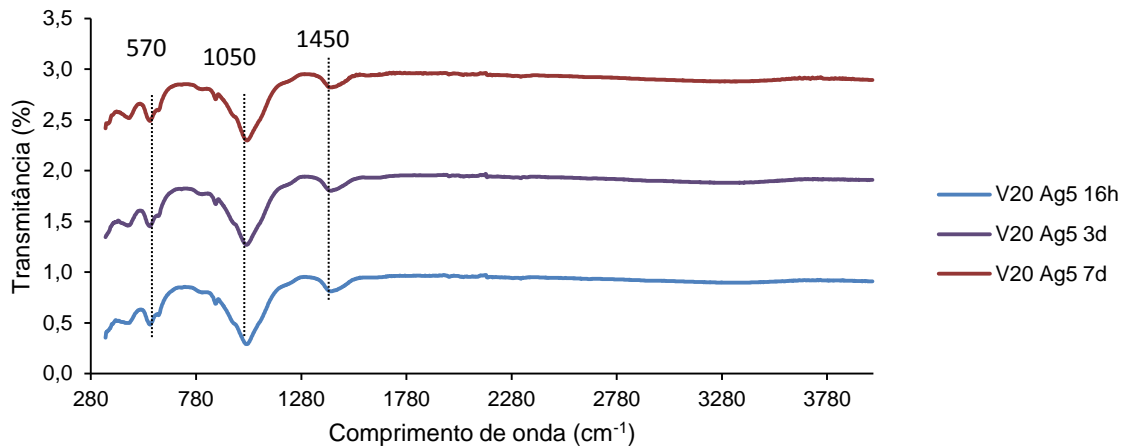


Figura 33 - Espectros de transmissão no infravermelho com transformada de Fourier obtidos para o V20 Ag5 após diferentes tempos de imersão.

As bandas de transmitância ATR para os diferentes materiais, bem como a sua interpretação encontram-se na tabela 10.

Através da análise dos espectros procurou-se identificar as vibrações envolvidas, tal como, atribuir os grupos químicos relacionados a estas transições.

As bandas localizadas entre 1300-1600 cm⁻¹ são consistentes com a presença de carbonatos de cálcio, resultantes da reacção de CO₂ da atmosfera com o cálcio presente na superfície do material, e são observadas para todas as composições e para todos os tempos de imersão. [86]

Os picos a 1050 cm^{-1} são atribuídos à ligação assimétrica Si-O-Si e o pico a ~ 600 à ligação PO_4^{3-} . A 580 cm^{-1} surge também a banda de vibrações resultante da flexão P-O atribuída à formação de fosfato de cálcio amorfo, sendo estas visíveis em todas as composições e para todos os tempos de imersão. Verifica-se o início da formação de uma nova banda a 564 cm^{-1} correspondente ao início de cristalização desta fase. [87] Este pico pode indicar a deposição de fosfato de cálcio amorfo sobre as amostras que contém hidroxiapatite.

Tabela 9 - Bandas de transmitância ATR para os diferentes materiais.

Bandas (cm^{-1})	Interpretação	16h	3d	7d
1450	CH ₂	X	X	X
1060-1045	Estiramento simétrico Si-O-Si	X	X	X
620-600, 592-590, 581-580, 574-573, 568	PO_4^{3-}	X	X	X

4.3.4. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) e Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS)

4.3.4.1. V20

Nas figuras 34 a 36 é possível observar o V20 após diferentes tempos de imersão em SBF.

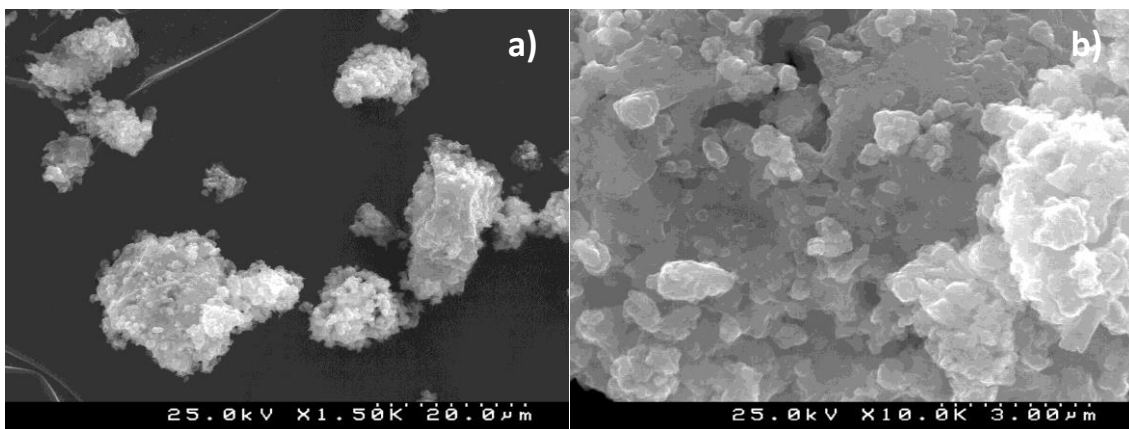


Figura 34 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 após 16 horas de imersão com a) ampliação de 1500x e b) ampliação de 10000x.

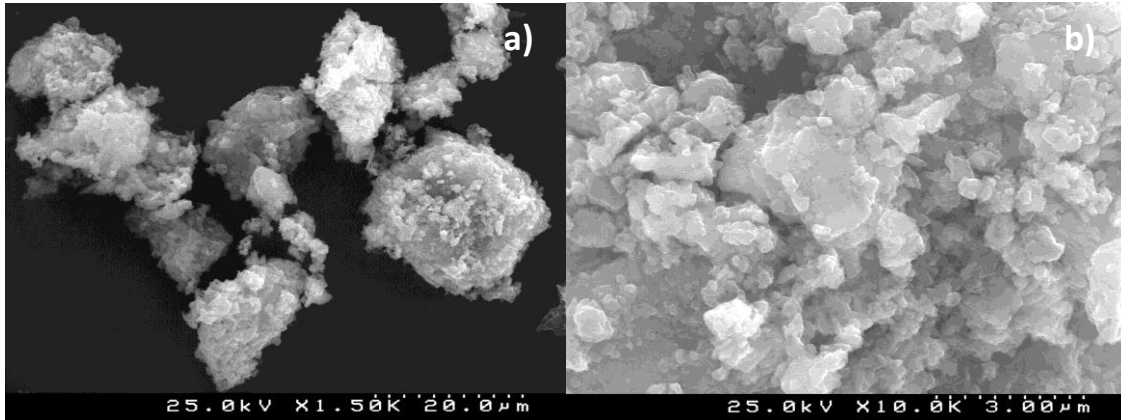


Figura 35 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 após 3 dias de imersão com a) ampliação de 1500x e b) ampliação de 10000x.

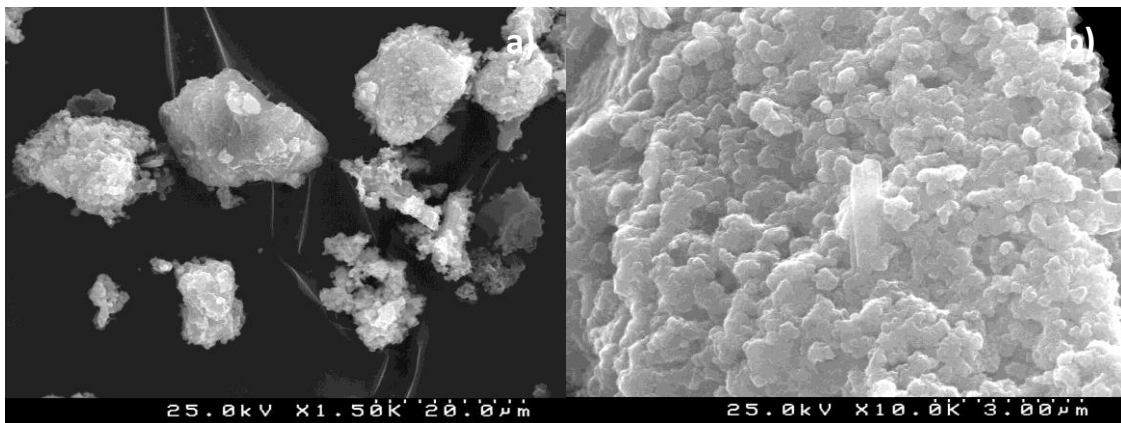


Figura 36 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 após 7 dias de imersão com a) ampliação de 1500x e b) ampliação de 10000x.

Pela observação das imagens obtidas por SEM é possível verificar que a rugosidade superficial do V20 aumenta com o incremento do tempo de imersão. A superfície dos aglomerados de partículas evolui de uma estrutura com apenas algumas protuberâncias esféricas (figura 34b) para uma estrutura com a superfície totalmente preenchida por pequenas partículas (figura 36b). Nota-se também a presença de alguma porosidade superficial nas figuras 34-36b.

4.3.4.2. V20 Ag1

Nas figuras 37 a 39 é possível observar o V20 Ag1 após diferentes tempos de imersão em SBF.

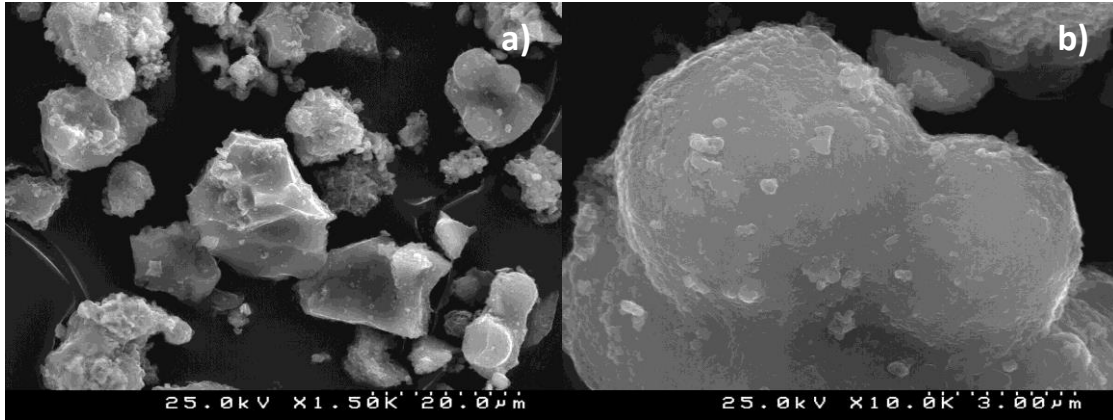


Figura 37 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag1 após 16 horas de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.

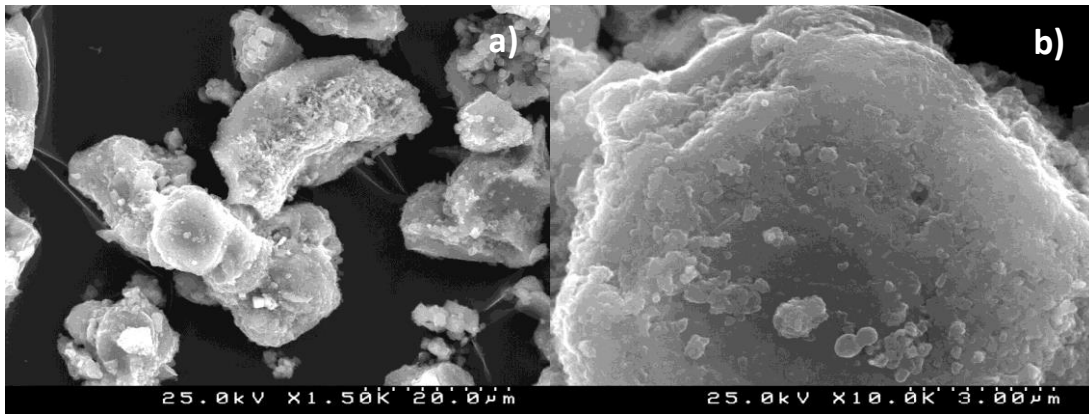


Figura 38 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag1 após 3 dias de imersão com ampliação de a)1500x e b)10000x.

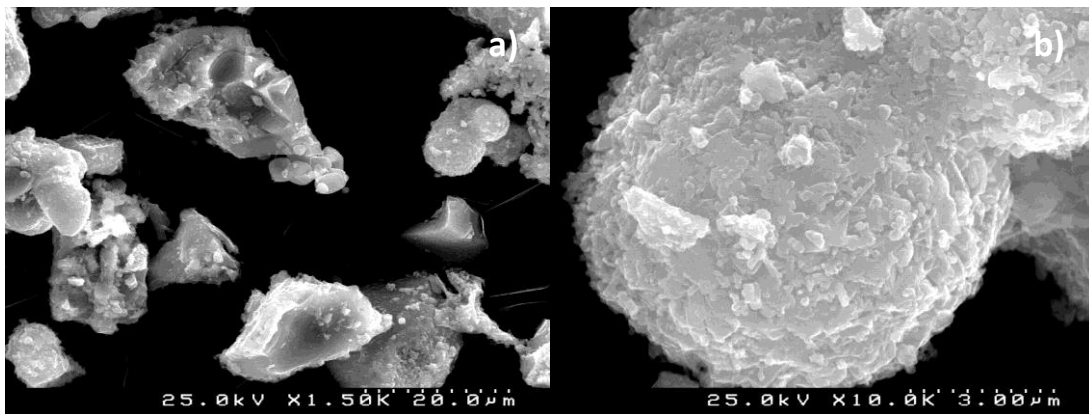


Figura 39 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag1 após 7 dias de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.

Pela observação das imagens obtidas por SEM é possível verificar que também no caso do V20 Ag1 a rugosidade superficial aumenta com o tempo de imersão. A superfície

quase lisa observada após 16h de imersão (figura 37b) evolui para uma superfície muito irregular.

4.3.4.3. V20 Ag2

Nas figuras 40 a 42 é possível observar o V20 Ag2 após diferentes tempos de imersão em SBF.

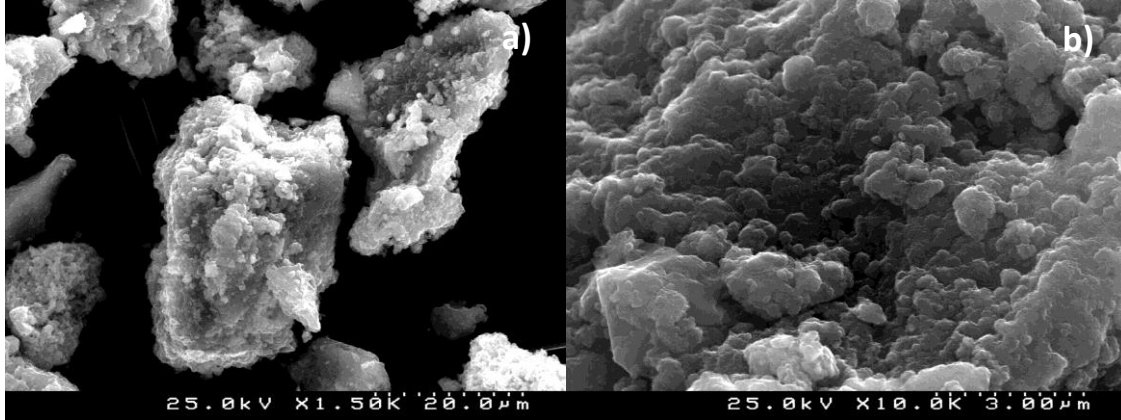


Figura 40 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag2 após 16 horas de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.

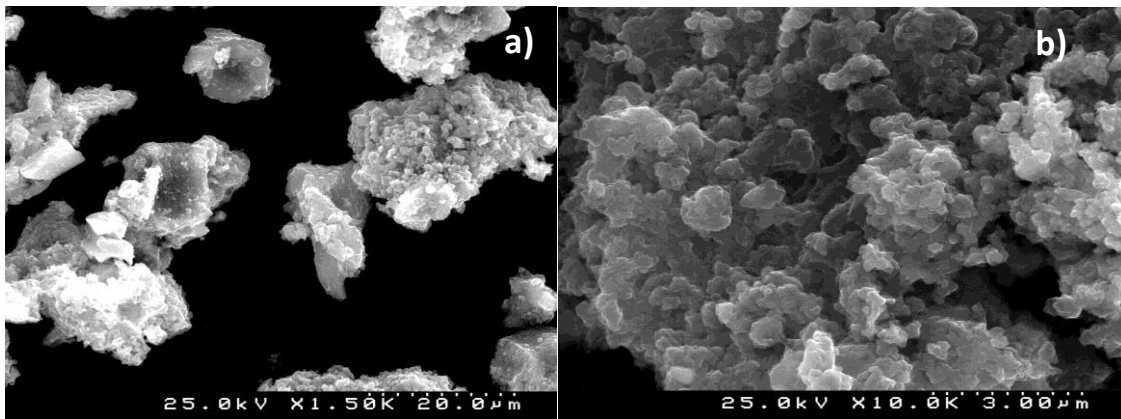


Figura 41 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag2 após 3 dias de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.

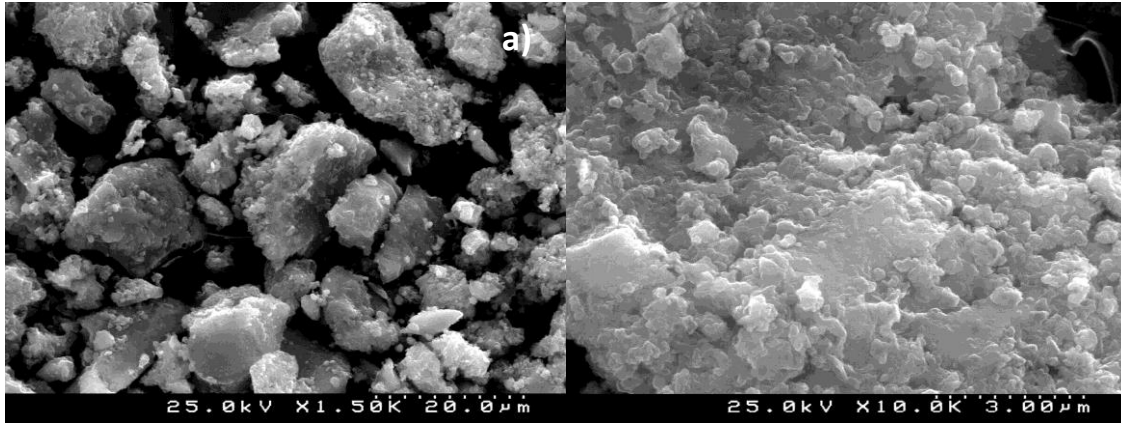


Figura 42 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag2 após 7 dias de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.

Pela observação das imagens obtidas por SEM é possível verificar que o V20 Ag2 não apresenta diferenças significativas da sua superfície com o aumento do tempo de imersão. A superfície das dos aglomerados de partículas é, para todos os tempos de imersão, constituída por uma estrutura com a superfície repleta de pequenas esferas e alguma porosidade.

4.3.4.4. V20 Ag5

Nas figuras 43 a 45 é possível observar o V20 Ag5 após diferentes tempos de imersão em SBF.

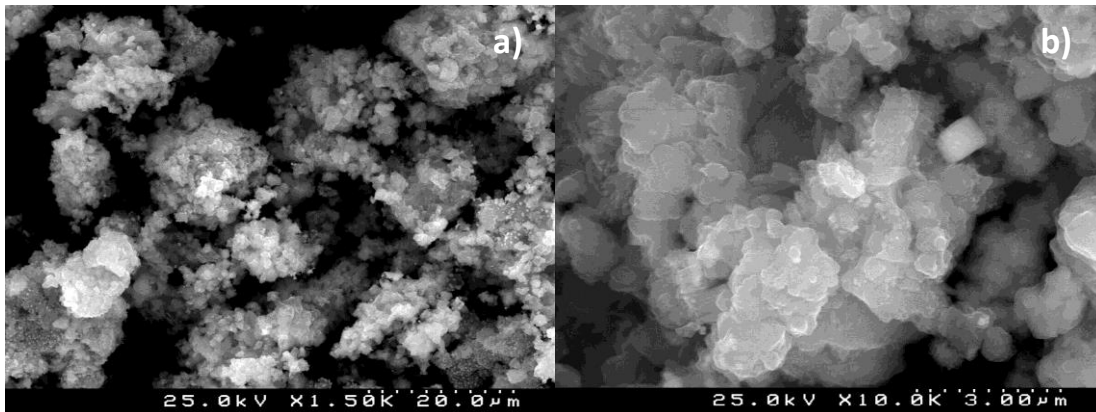


Figura 43 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag5 após 16 horas de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.

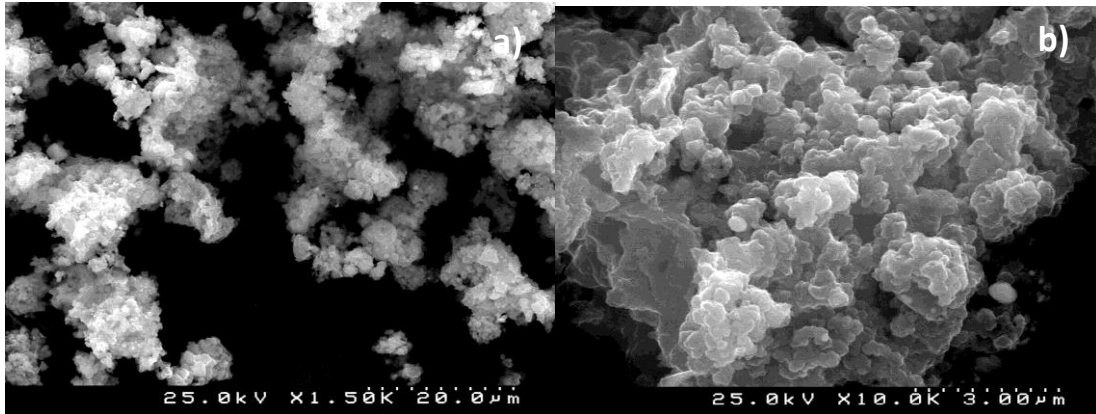


Figura 44 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag5 após 3 dias de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.

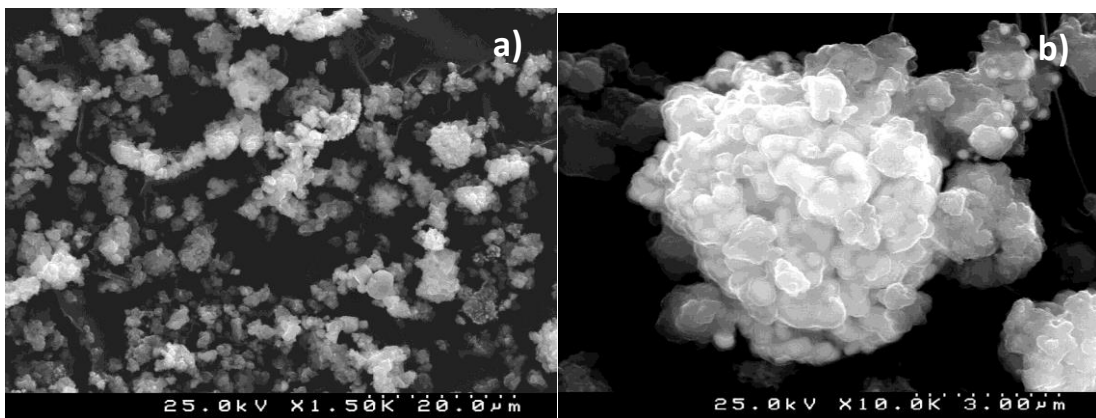


Figura 45 - Micrografias, obtidas por SEM, do V20 Ag5 após 7 dias de imersão com ampliação de a) 1500x e b) 10000x.

Pela observação das imagens obtidas por SEM é possível verificar que o V20 Ag5 apresenta diferenças da sua superfície com o aumento do tempo de imersão. A superfície dos aglomerados de partículas, é para todos os tempos de imersão, uma estrutura com a superfície totalmente repleta de pequenas esferas e alguma porosidade. Após 7 dias de imersão nota-se a formação de uma camada esbranquiçada superficial.

4.4. Ensaio Antimicrobianos

Os resultados obtidos para a percentagem de redução da *E. coli* na presença dos diferentes materiais em suspensão, com uma concentração de 0,025 mg/mL, podem ser observados na figura 46.

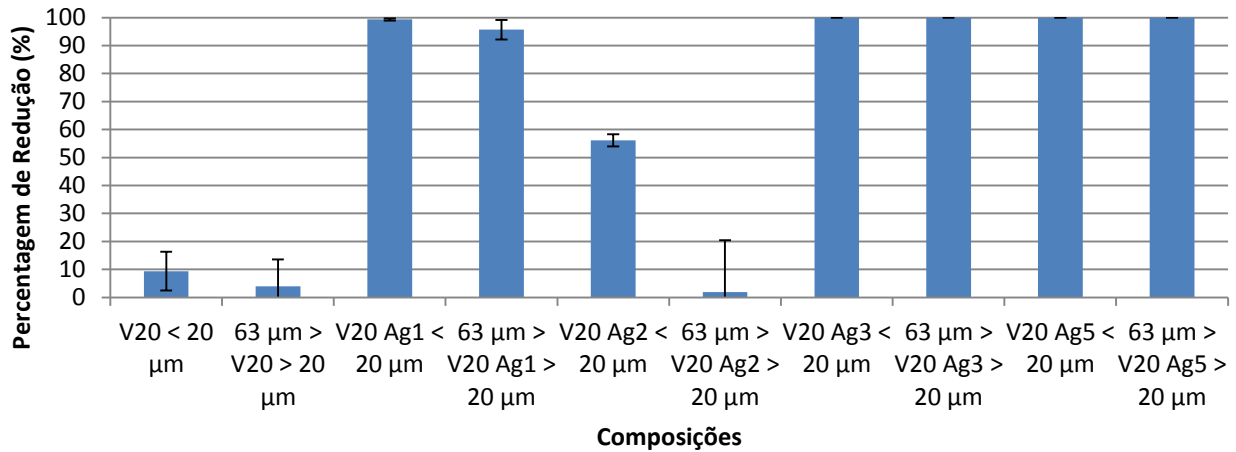


Figura 46 - Percentagem de redução das UFC para a concentração de 0,025 mg/mL de material.

Como se pode observar na figura 50 o V20 tem uma acção antimicrobiana quase nula. A para a fracção mais fina ($\Phi < 20 \mu\text{m}$) promoveu um redução de 9% e a fracção mais grosseira ($20 \mu\text{m} > \Phi < 63 \mu\text{m}$) apenas 4%. A acção antimicrobiana aumenta com o incremento da quantidade de prata, excepto quando esta é aumentada de 1 para 2% (V20 Ag1 e V20 Ag2).

Para a concentração de 0,025 mg/mL de material a actividade antimicrobiana é total (100% de redução) para ambas as granulometrias do V20 Ag3 e V20 Ag5, pelo que nestes casos é impossível retirar conclusões quanto à influência do tamanho de partícula. Nas outras composições (V20 Ag1 e V20 Ag2), é notório que à menor granulometria corresponde uma maior actividade antimicrobiana, pelo que se pode concluir que quanto menor a granulometria das composições, maior será a sua actividade antimicrobiana.

A influência da concentração de material utilizada nos ensaios antimicrobianos foi também testada tendo-se utilizado duas concentrações (0,025 e 0,1 mg/L) para as duas granulometrias, figura 47. Apesar de, para a concentração de 0,025 mg/L a redução da *E. coli* já ser 100% para algumas das composições, foi testada uma concentração superior para averiguar a influência da concentração na redução.

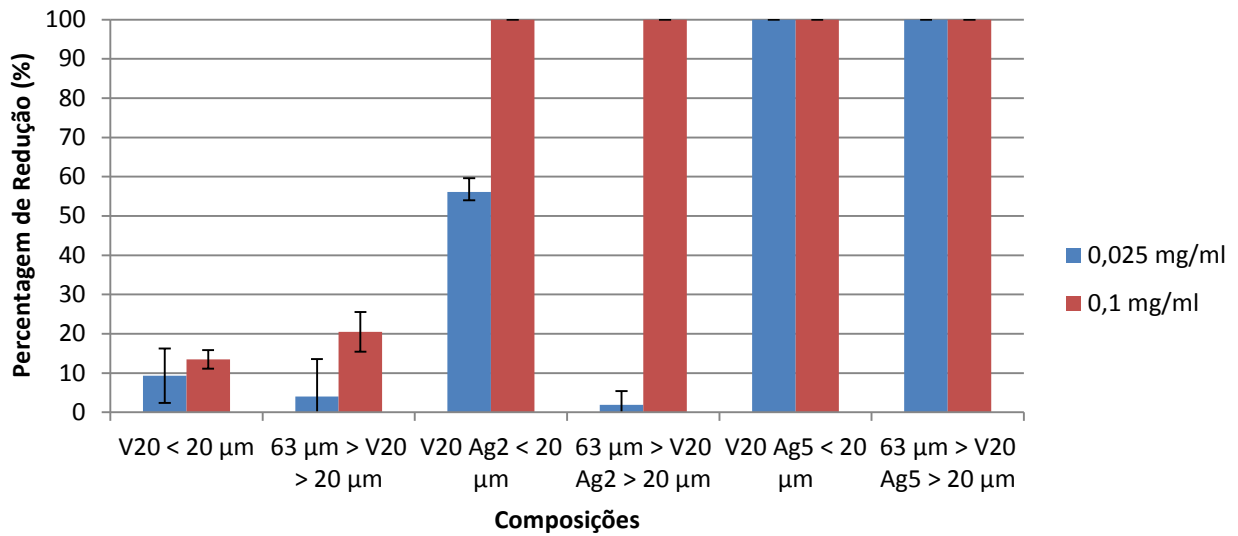


Figura 47 -Porcentagem de redução das UFCs para as concentrações de 0,025 mg/mL e 0,1 mg/mL de material.

A actividade antimicrobiana do V20 aumenta ligeiramente com o incremento da concentração de material de 0,025 para 0,1 mg/L.

Para a concentração mais elevada (0,1 mg/mL) a actividade antimicrobiana é total (100% de redução) para ambas as granulometrias testadas do V20 Ag2 e V20 Ag5. Para a menor concentração (0,025 mg/mL) a actividade antimicrobiana do V20 Ag5 também é total (figura 47). Pelo contrário, no caso do V20 Ag2 o efeito antimicrobiano depende da granulometria e da concentração sendo, obviamente maior, para concentrações mais elevadas ou menores granulometrias. Para o V20 Ag2 ($\Phi < 20 \mu\text{m}$) a diminuição da concentração de material de 0,1 para 0,025 mg/mL diminuiu a percentagem de redução da *E. coli* de 100 para 56%. Para a concentração mais elevada (0,025 mg/L) o aumento do tamanho das partículas do V20 Ag2 (de $\Phi < 20 \mu\text{m}$ para $63 \mu\text{m} > \Phi > 20 \mu\text{m}$) promoveu uma diminuição da percentagem de redução de $\approx 54\%$.

Para a composição V20 Ag3 que apresenta actividade antimicrobiana máxima para a concentração de 0,025 mg/mL, foram realizados novos testes com uma concentração de material menor (0,01 mg/mL) encontrando-se os resultados obtidos na figura 48.

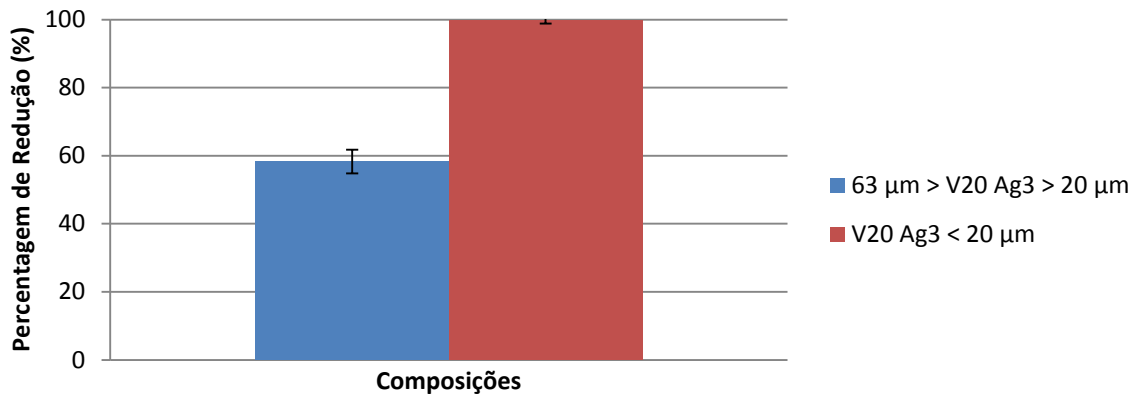


Figura 48 - Actividade antimicrobiana da composição V20 Ag3 para a concentração de material de 0,01 mg/mL.

Como se pode observar na figura 48, para a concentração de 0,01 mg/mL, a actividade antimicrobiana do V20 Ag3 depende da sua granulometria, ao contrário do que se observou para concentrações mais elevadas (0,025 e 0,1 mg/mL, figura 50). A diminuição da concentração de material de 0,025 para 0,01 mg/mL promoveu um decréscimo de R de 100% para 59%, para a granulometria mais grosseira ($63 \mu\text{m} > \Phi > 20 \mu\text{m}$). No caso do material com partículas inferiores a 20 μm , apesar da acentuada diminuição da concentração, manteve-se a redução total das bactérias *E. coli*.

Com o intuito de determinar a concentração mínima inibitória para o V20 Ag5, foram realizados testes para duas concentrações adicionais: 0,01 e 0,001 mg/mL, encontrando-se os resultados obtidos na figura 49.

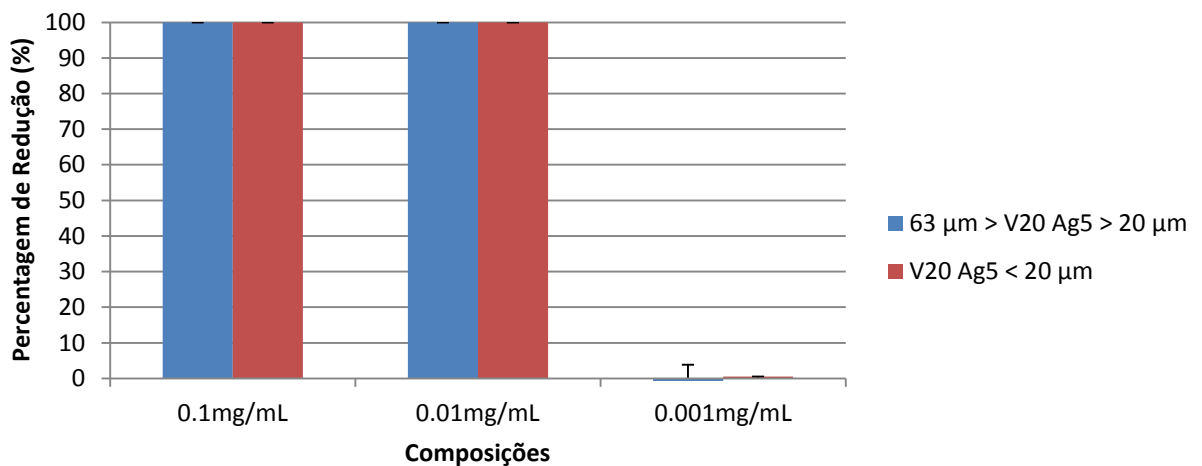


Figura 49 - Actividade antimicrobiana da composição V20 Ag5 para diferentes concentrações.

Para as concentrações 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL de material, a actividade antimicrobiana para a *E. coli* é máxima (100 %). Pelo contrário, para a concentração de 0,001 mg/mL verifica-se que a redução da bactéria é incipiente (0,5%). Assim, pode-se concluir que para o V20 Ag5 a concentração mínima inibitória se encontra entre 0,01 e 0,001 mg/mL de material para ambas as granulometrias testadas

Capítulo 5

Conclusões e Sugestões para trabalhos Futuros

Conclusões e Sugestões para trabalhos Futuros

Neste trabalho prepararam-se, pelo método de sol-gel, vidros pertencentes ao sistema $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-MgO}$. A composição molar do vidro base (V20) é: 25,43% de SiO_2 , 32,68% de CaO , 10,89% de P_2O_5 e 31,00% de MgO . Com o intuito de verificar a influência da adição de prata nas propriedades do material foram preparados vidros com 1, 2, 3 e 5 % molar de Ag_2O denominados, respectivamente, como V20 Ag1, V20 Ag2, V20 Ag3 e V20 Ag5. Após calcinação a 600°C é detectada, por difracção de raios X, a presença de hidroxiapatite, em todas as composições, e de prata nas que seria expectável.

Os ensaios de dissolução em água destilada efectuados sugerem que as amostras se degradam ao longo dos intervalos de tempo estudados (16 h, 3 e 7 dias) sem que ocorram oscilações acentuadas dos valores de pH, o que poderia ser prejudicial para as células humanas em contacto com o material.

Os resultados obtidos por ICP nos ensaios de imersão das amostras em SBF, em conjunto com os resultados obtidos por difracção de raios X e por espectroscopia FTIR, sugerem a formação de precipitados de fosfato de cálcio na superfície das amostras testadas, o que indicia a bioactividade destes materiais.

A determinação da actividade antimicrobiana dos materiais preparados para a *Escherichia coli* ATCC25922 permite concluir que:

- a composição sem prata (V20) promove uma percentagem de redução da *E. coli* muito diminuta para ambas as concentrações de material (0,025 e 0,1 mg/mL) e granulometrias ($\Phi < 20 \mu\text{m}$ para $63 \mu\text{m} > \Phi > 20 \mu\text{m}$) testadas;
- a adição de prata promoveu um aumento muito significativo da sua actividade antimicrobiana, a qual é tanto mais elevada quanto maior é a percentagem de prata na composição do vidro;
- para o V20 Ag5, a concentração mínima inibitória situa-se entre 0,01 e 0,001 mg/mL de material;
- o aumento da concentração de material implica um incremento da actividade antimicrobiana para todas as composições testadas;
- a granulometria dos vidros tem um efeito relevante na sua actividade antimicrobiana, sendo que quanto menor o tamanho das partículas, maior a sua actividade antimicrobiana;
- o V20 Ag5, para as concentrações iguais ou superiores a 0,01 mg/ml de material, promove uma redução total da *E.coli* para ambas as granulometrias testadas;
- na presença de V20 Ag3 a redução da bactéria *E. coli* é total (para ambas as granulometrias ensaiadas) quando a concentração de vidro é 0,025 mg/mL; pelo contrário,

para 0,01 mg/mL de material este efeito é apenas observado para o V20 Ag3 com $\Phi < 20$ μm .

5.1. Trabalho futuro

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

- Determinação da concentração mínima para a máxima actividade antimicrobiana das amostras;
- Determinação da actividade antimicrobiana das amostras para bactérias Gram-Positivas;
- Determinação da quantidade ideal de prata a juntar aos materiais de modo a manter a actividade antimicrobiana diminuindo os custos;
- Realização de testes de citocompatibilidade;
- Estudo da utilização dos particulados em revestimento de implantes metálicos;
- Produção e caracterização de compósitos de matriz polimérica com enchimento de um dos materiais produzidos neste trabalho.

Referências

- [1] N. Almeida. *Efeito da ceramização na reactividade superficial de vidros de Ca-P-Mg-Si*. Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Universidade de Aveiro, 2006.
- [2] L.L. Hench and J. Wilson. *Surface-Active biomaterials*. Science, 1984. p. 630-636.
- [3] L.L. Hench. *Bioceramics: from concept to clinic*. J. Am. Ceram. Soc., 1991. p. 1487-1510.
- [4] C. Ohtsuki, H. Kushitani, T. Kokubo, S. Kotani, T. Yamamuro. *Apatite formation on the surface of Ceravital-type glass-ceramic in the body*. Journal of Biomedical Materials Research. p. 1419-1432.
- [5] T. Kokubo, S. Ito, Z. T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka. *Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass ceramic A-W*. Journal of Biomedical Materials Research, 1990. p. 331-343.
- [6] H. Aoki. *Science and medical applications of hydroxyapatite*. Japanese Association of Apatite Science. 1991.
- [7] W. Bonfield, J. Bowman, M. D. Grynopas. *Composite Materials for use in Orthopaedics*. 1981
- [8] G.A. Rodan. *Introduction to bone biology*. Bone, 1992. p. S3-S6.
- [9] T. Kokubo, H. Hushitani, S. Salla, T. Kitsugi, and T. Yamamuro. *Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in Bioactive glassceramic*. Journal of Biomedical Materials Research, 1990. p. 721-734.
- [10] L.L. Hench and J. Wilson. *An Introduction to Bioceramics*. World Scientific, 1993.
- [11] W. Cao and L.L. Hench. *Bioactive Materials*. Ceramics international, 1996. p. 493-507.
- [12] J.M.M. Oliveira. *Vidros cerâmicos do sistema MgO-3CaO.P2O5-SiO2 para implantologia Óssea*. Departamento de Engenharia de Materiais e do Vidro, Universidade de Aveiro, 1994.
- [13] C. Ohtsuki, T. Kokubo, and T. Yamamuro. *Mechanism of apatite formation on CaO-SiO2-P2O5 glasses in simulated body fluid*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1992. p. 84-92.
- [14] O. Peitl, E.D. Zanotto, and L.L. Hench. *Highly Bioactive P2O5-Na2O-CaOSiO2 Glass-ceramics*. Journal of Non-Crystalline Solids, 2001. p. 115-126.

- [15] D. Tadic and M. Epple. *A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone*. *Biomaterials*, 2004. p. 987-994.
- [16] C.Y. Kim, A.E. Clark, and L.L. Hench. *Early stages of calcium phosphate films on silicate glasses*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1989. p. 195-202.
- [17] I. Rehman, L.L. Hench, W. Bonfield, and R. Smith. *Analysis of surface layers on bioactive glasses*. *Biomaterials*, 1994 p. 865-870.
- [18] C. Ohtsuki, T. Kokubo, and T. Yamamuro. *Mechanism of apatite formation on CaO-SiO₂-P₂O₅*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1992. p. 290-296.
- [19] T. Kokubo. *Surface chemistry of bioactive glass-ceramics*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1990. p. 138-151.
- [20] T. Kokubo. *Bioactive glass-ceramics: Properties and applications*. *Biomaterials*, 1991. p. 155-163.
- [21] T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, and T. Yamamuro. *Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body fluid*. *Journal of materials science: Materials in medicine*, 1992. p. 79-83.
- [22] O.H. Andersson, K.H. Karlsson, and K. Kangasniemi. *Calcium Phosphate formation at the surface of bioactive glass in vivo*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1990. p. 290-296.
- [23] O.H. Andersson, G. Liu, K.H. Karlsson, L. Niemi, J. Miettinen, and J. Juhanoja. *In vivo Behaviour of glasses in the SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅-Al₂O₃-B₂O₃ system*. *Journal of materials science: Materials in medicine*, 1990. p. 219-227.
- [24] O.H. Andersson and K.H. Karlsson. *On the bioactivity of silicate glass*. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1991. p. 145-151.
- [25] P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakinishi, N. Soga, T. Nakamura, and T. Yamamuro. *Process of formation of bone-like apatite layer on silica gel*. *Journal of materials science: Materials in medicine*, 1993. p. 127-131.
- [26] P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi and N. Soga. *Apatite formation induced by silica gel in a simulated body fluid*. *Journal of American Ceramic Society*, 1992. p. 2094-97.
- [27] J.M. Oliveira, R.N. Correia, and M.H. Fernandes, *Effects of Si speciation on the in vitro bioactivity of glasses*. *Biomaterials*, 2002. p. 371-379.
- [28] A.J. Salinas, J. Roman, M. Vallet-Regi, J.M. Oliveira, R.N. Correia, and M.H. Fernandes. *In vitro bioactivity of glass and glass-ceramics of the 3CaO.P₂O₅-CaO.SiO₂-CaO.2SiO₂ system*. *Biomaterials*, 2000. p. 251-257.

- [29] J. Roman, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, J.M. Oliveira, R.N. Correia, and M.H. Fernandes. *Role of acid attack in the in vitro bioactivity of a glass-ceramic of the $3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO}\cdot\text{SiO}_2\text{-CaO}\cdot 2\text{SiO}_2$ system*. *Biomaterials*, 2001. p. 2013-2019.
- [30] R.Z. LeGeros, R. Kijkowska, and J.P. LeGeros. *Formation and transformation of octacalcium phosphate OCP*. *Scanning Electron Micro*, 1984. p. 1771-1777.
- [31] R.Z. LeGeros. *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*. Monographs in Oral Science, ed. H.M. Meyers. Vol. 15. 1991.
- [32] K. Ohura, T. Nakamura, T. Yamamuro, T. Kokubo, Y. Ebisawa, Y. Kotoura, and M. Oka. *Bone bonding Ability of P_2O_5 - free $\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ Glasses*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1991. p. 357-365.
- [33] I.B. Leonor, A. Ito, K. Onuma, N. Kanzaki, and R.L. Reis. *In vitro bioactivity of starch thermoplastic/hydroxyapatite composite biomaterials: an in situ study using atomic force microscopy*. *Biomaterials*, 2003. p. 579-585.
- [34] P.N.D. Aza, Z.B. Luklinska, C. Santos, F. Guitian, and S.D. Aza. *Mechanism of bone-like formation on a bioactive implant in vivo*. *Biomaterials*, 2003. p. 1437-1445.
- [35] L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, and T.K. Greenlee. *Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1971. p. 117.
- [36] M. Vallet-Regí, A.M. Romero, C.V. Ragel, and R.Z. LeGeros. *XRD, SEM/EDS, and FTIR studies of in vitro growth of a apatite-like layer on sol-gel glasses*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999. p. 416-421.
- [37] M. Vallet-Regí, C.V. Ragel, and A.J. Salinas. *Glasses with Medical applications*. *Journal of Inorganic Chemistry*, 2003. p. 1029-1042.
- [38] M. Vallet-Regí, D. Arcos, and J. Pérez-Pariente. *Evolution of porosity during in vitro hydroxycarbonate apatite growth in sol-gel glasses*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000. p. 23-28.
- [39] M. Vallet-Regí, A. Rámila, S. Padilla, and B. Muñoz. *Bioactive glasses as accelerators of apatite bioactivity*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003. p. 580-585.
- [40] G.E. Levitt, P.H. Crayton, E.A. Monroe, and R.A. Condrate. *Forming methods for apatite prothesis*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1969. p.683-685.
- [41] J.P. LeGeros, M.H. Taheri, and G. Quirolgico, *Formation and stability of apatite: Effects of some cationic substitutes*. Proc. 2nd Int. Congress on Phosphorous Compounds, 1980. Boston p. 41-53 and 89-103.

- [42] R.Z. LeGeros, R. Kijkowska, and J.P. LeGeros. *Formation and transformation of octacalcium phosphate OCP*. Scanning Electron Micro, 1984. p. 1771-1777.
- [43] R.Z. LeGeros. *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*. Monographs in Oral Science, ed. H.M. Meyers. Vol. 15. 1991.
- [44] I. Izquierdo-Barba, A.J. Salinas, and M. Vallet-Regí. *Effect of the continuous solution exchange on the in vitro reactivity of a CaO-SiO₂ sol-gel glass*. Journal of Biomedical Materials Research, 2000. p. 191-199.
- [45] E. Verné, E. Bona, E. Angelini, F. Rosalbino, and P. Appendino. *Correlation Between Microstructure and Properties of Biocomposite Coatings*. Journal of European Ceramic Society, 2002. p. 2315-2323.
- [46] M. Wang. *Developing bioactive composite materials for tissue replacement*. Biomaterials, 2003. p. 2133-2151.
- [47] O. Peitl, R.L. Oréface, L.L. Hench, and A.B. Brennan. *Effect of the crystallization of bioactive glass reinforcing agents on the mechanical properties of polymer composites*. Materials Science and Engineering A, 2004. p. 245-251.
- [48] L.L. Hench, H.A. Paschall, W.C. Allen, and G. Piotrowski. *Interfacial behaviour of ceramics implants*. Natl Bur Stand Spec Publ, 1975. p. 19-35.
- [49] T. Yamuro, L.L. Hench, and J. Wilson. *Calcium phosphate and hydroxyapatite ceramics*. Handbook of bioactive ceramics. Vol. II. 1990.
- [50] S. Lopez-Esteban, E. Saiz, S. Fujino, T. Oku, K. Suganuma, and A.P. tomsia. *Bioactive glass coatings for Orthopedic metallic implants*. Journal of The European Ceramic Society, 2003. p. 2921-2930.
- [51] D.C. Greespan and L.L. Hench. *Chemical and mechanical beaviour of bioglass-coated alumina*. Journal of Biomedical Materials Research, 1976. p. 503-509.
- [52] J.A. Helsen, J. Proost, J. Schrooten, G. Timmermans, E. Brauns, and J. Vandertraeten. *Glasses and Bioglasses: Synthesis and Coatings*. Journal of European Ceramic Society, 1997. p. 147-152.
- [53] F. Horgan and B.J. Meenan. *Effects of substrate Morphology on Osteoblastic Responce to thin film Calcium Phosphate Coatings*. Bioceramics, 2003. p. 433-436.
- [54] C.V. Brovarone, E. Verné, A. Krajewski, and A. Ravaglioli. *Graded coatings on ceramic substrates for biomedical applications*. Journal of The European Ceramic Society, 2001. p. 2855-2862.
- [55] H.R. Stanley, M.B. Hall, A.E. Clark, C.J. King, L.L. Hench, and J.J. Berte. *Using 45S5 Bioglass® cones as endosseous ridge maintenance implantes to present alveolar*

ridge resorption: a 5-year evaluation. International Journal of Oral Maxillofacial Implants, 1997. p. 95-105.

[56] T.B. Lovelace, J.T. Melloning, R.M. Meffert, A.A. Jones A.A. Jones, P.V. Nummikoski, and D.L. Cochran. *Clinical evaluation of bioactive glass in the treatment of periodontal osseous defects in humans*. Journal of Periodontol, 1998. p.1027-35.

[57] S.J. Froum, M.A. Weinberg, and D. Tarnow. *Comparison of bioactive glass synthetic bone graft particles and open debridement in the treatment of human periodontal defects*. Journal Periodontal, 1998. p. 698-709.

[58] J.R. Jones, P. Sepulveda, and L.L. Hench. *Dose-Dependent Behavior of Bioactive Glass Dissolution*. Journal of Biomedical Materials Research, 2001. 58: p. 720-726.

[59] P. Sepulveda, J.R. Jones, and L.L. Hench. *In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses*. Journal of Biomedical Materials Research, 2002. p. 301-11.

[60] P. Stoor, E. Soderling, and J.L. Salonen. *Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms*. Acta Odontol Scand, 1998. p. 161-5.

[61] I. Allan, H. Newman, and M. Wilson. *Antibacterial activity of particulate Bioglass against supra- and subgingival bacteria*. Biomaterials, 2001. p. 1683-1687.

[62] B.J. Tai, M.Q. Du, H. Jiang, J.P. Zhong, D.C. Greenspan, and A.E. Clark. *Anti-gingivitis efficacy of a dentifrice containing bioactive glass (NovaMin) particulate*. Journal of Dent Res, 2004. p. 135-8.

[63] O. Lev et al. Analytical Chemistry, v. 67, n. 1, 1995.

[64] I. Strawbridge, P. F. James. *Glass formation from gels: High performance glasses*. High Performance Glasses, Cable, M., Ed. Blackie; Glasgow, 1992

[65] M. Franke. *Desenvolvimento de um compósito de Bisgma/Tegdma e vidro de sílica dopado com prata como material de restauração dental com propriedades antibacteriana*. Universidade Federal de Santa Catarina 2009

[66] J.D. Mackenzie. *Glasses from melts and glasses from gels, a comparison*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1982. p. 1-10.

[67] H. Schmidt. *Chemistry of material preparation by sol-gel process*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1998. p. 51-67.

[68] G.W. Scherer. *Aging and drying of gels*. Journal of Non-Crystalline Solids, v. 100, 1998. p. 77-92.

- [69] B. Gottenbos, H.J.Busscher, H.C. van der Mei. *Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine. Volume 13, 2002. p. 717-722.
- [70] A. Gristina & H.H. Sherk. *Biomaterial-centered infection - Microbial adhesion versus tissue integration*, (re-impresso de Science, Volume 237, 1588-1595, 1987). Clinical Orthopaedics and Related Research. 2004.
- [71] B. Kasemo & J. Lausmaa . *Surface science aspects on inorganic biomaterials*. Crc Critical Reviews in Biocompatibility. 1986. p. 335-380.
- [72] J.R. Pelczar, E.C.S. Chan, N.R. Krieg, D.D. Edwards, M.R.F. Pelczar, *Microbiologia Conceitos e Aplicações*, 1998.
- [73] T. Oku, K. Shiregu, T. Yazawa, T. Ijima, N. Kumakura. *Anti-bacterial and Anti-fungal Glaze Composition for Ceramic Products*. 1998.
- [74] T.J. Berger, J.A. Spadaro, S.E. Chapin, R.O. Becher. *Electrically generated silver ions: quantitative effects on bacterial and mammalian cells*. Antimicrob Agents Chemother, 1976. p. 357–8.
- [75] O. Mockers, D. Deroze, J. Camps. *Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vitro*. Dental Materials, 2002. p. 311-317.
- [76] M. Rai, A. Yadav, A. Gade. *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*. Biotechnology Advances, 2009. p. 76–83.
- [77] A.B. Lansdown. *Silver. 2: Toxicity in mammals and how its products aid wound repair*. J Wound Care, 2002. p.173–7.
- [78] E.D. Deitch, A.A. Marino, T.E. Gillespie, J.A. Albright. *Silver-nylon: a new antimicrobial agent*. Antimicrob Agents Chemother, 1983. p. 356–359.
- [79] R.A. Ersek, D.R. Denton. *Cross-linked silver-impregnated skin for burn wound management*. J Burn Care Rehabil, 1988. p. 476–481.
- [80] G. Zhao & S.E. Stevens. *Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of Escherichia coli to the silver ion*. BioMetals, 1998, p. 27–32.
- [81] W.B. Shelley, E.D. Shelley, V. Burmeister. *Argyria: the intradermal “photograph”, a manifestation of passive photosensitivity*. J Am Acad Dermatol, 1987. p. 211–17.
- [82] S.H. Gulbranson, J.A. Hud, R.C. Hansen. *Argyria following the use of dietary supplements containing colloidal silver protein*. Cutis, 2000. p. 373–376.

- [83] G. Nordberg, L. Gerhardsson. *Silver. In: Handbook on toxicity of inorganic compounds*. New York: Marcel Dekker, 1988. p. 619–624.
- [84] M.C. Fung, D.L. Bowen. *Silver products for medical indications: risk-benefit assessment*. J Toxicol Clin Toxicol, 1996. p. 119-126.
- [85] J. Vogel, P. Wange, S. Knoche, C. Rüssel, Glass Sci. Technol. 2004 p. 77-82.
- [86] G. Orcel, J. Phalippou, L.L. Hench. *Structural changes of silica xerogels during low temperature dehydration* J. Non-Cryst. Solids 1986. p. 114-130.
- [87] A. Balamurugan et al. Materials letter 60. 2006. p. 3752-3757.
- [88] L. Baia, S. Simon. *UV-VIS and TEM assessment of morphological features of silver nanoparticles from phosphate glass matrices*. 2007.

