

# CARACTERIZAÇÃO DE BIOVIDROS BIOABSORVÍVEIS PARA APLICAÇÃO EM MEDICINA REGENERATIVA

R. Borges<sup>1</sup>, A.C. Da Silva<sup>2</sup>, J. Marchi<sup>1</sup>

1 - Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC (UFABC) Campus Santo André, Santo André, São Paulo, Brasil

2 – Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais (CCTM), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), São Paulo, São Paulo, Brasil

juliana.marchi@ufabc.edu.br

## RESUMO

*Neste trabalho, foram estudadas três composições de vidros bioabsorvíveis com potencial aplicação em medicina regenerativa. Vidros no sistema  $SiO_2 - (37-x)Na_2O - (5+x)CaO$  com 6% de  $P_2O_5$  ( $x = 0, 5$  e  $10$ ) foram obtidos por fusão seguida de super-resfriamento e posterior recozimento. Sua biocompatibilidade foi avaliada por imersão em solução SBF e caracterização da superfície dos vidros após diferentes períodos de imersão. Os vidros foram caracterizados antes e após o ensaio de bioatividade pelas técnicas de difração de raio-x, espectroscopia de infravermelho na transformada de Fourier e microscopia eletrônica de varredura e por estudo de variação de massa. Os resultados obtidos indicam que nestes vidros bioabsorvíveis o mecanismo de bioatividade ocorre, primeiramente, através da formação de uma camada de silicato de cálcio que atua como nucleador de deposição de posterior segunda camada de hidroxiapatita. Também foi verificado que a cinética de nucleação de hidroxiapatita pode ser controlada através da razão Ca/Na.*

Palavras-chave: Biomateriais, Biovidros Bioabsorvíveis, Bioatividade in vitro

## INTRODUÇÃO

Biomateriais são materiais sintéticos ou naturais destinados a tratar, reparar ou substituir tecidos, órgãos ou funções do corpo; podem ser divididos em três classes: biomateriais metálicos, biomateriais poliméricos e biomateriais cerâmicos (que também

podem ser denominados biocerâmicas). As biocerâmicas, quando implantadas em um tecido hospedeiro, podem apresentar três diferentes comportamentos: inertes, bioativos ou bioabsorvíveis<sup>1</sup>.

As cerâmicas bioinertes são caracterizadas por não apresentar uma camada de interação superficial com o tecido adjacente, contudo apresentam boa compatibilidade. Cerâmicas bioativas são caracterizadas por apresentarem ligações químicas com o tecido hospedeiro quando implantadas. Uma biocerâmica é considerada bioabsorvível quando realiza processo de reparação completa dos tecidos, assim fornecendo a qualidade das funções do tecido danificado, ou seja, restaurando completamente a estrutura do tecido ósseo, bem como as funções, as atividades metabólicas e o desempenho biomecânico. As cerâmicas bioabsorvíveis apresentam decomposição química controlada, sendo totalmente reabsorvidas pelo organismo, o que contribui para a diminuição do problema de interface que geralmente ocorre com os biomateriais<sup>1,2</sup>.

Os biovidros são biocerâmicas e podem ser bioativos ou bioabsorvíveis de acordo com a sua composição química; são definidos como vidros designados a provocar respostas fisiológicas específicas, contanto que inclua superfície dos grupos sílica, cálcio e fosfato a um pH alcalino na superfície com os tecidos. Diversas composições de biovidros foram preparados por Hench e colaboradores, sendo o Bioglass® 45S5, com composição 45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% Na<sub>2</sub>O, 24,4% CaO e 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (% em massa) a composição mais estudada<sup>3,4</sup>.

A bioatividade dos biovidros ocorre por um mecanismo elucidado por Takadama et al.<sup>5</sup>, que consiste, genericamente, em cinco estágios: (I) rápida troca iônica entre íons Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> pertencentes à superfície do material com íons H<sup>+</sup> da solução, ocasionando aumento do pH do meio e formação de grupos silanol (Si-OH); (II) liberação de sílica solúvel do material para a solução na forma Si(OH)<sub>4</sub>, sendo resultado da quebra de ligações siloxano (Si-O-Si) e contínua formação de grupos silanol; (III) policondensação dos grupos silanol formando uma camada porosa rica em sílica na superfície do material exaurida de íons Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>; (IV) aumento da concentração de íons na solução com o passar do tempo, ocorrendo posterior formação de um filme amorfo, rico em Ca<sup>2+</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> na superfície do material, quando o ponto de saturação da solução é alcançado. A alta área superficial da camada rica em sílica age como uma fonte de sítios para a nucleação heterogênea do filme que cresce pela incorporação de mais íons Ca<sup>2+</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> presentes na solução; (V) formação da hidroxiapatita carbonatada na superfície do material em consequência da cristalização do filme amorfo, rico em íons Ca<sup>2+</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, pela incorporação dos ânions OH<sup>-</sup> e CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> presentes na solução. Estas cinco etapas são

conhecidas como estágios de reação da interface dos biovidros<sup>6</sup>.

Neste trabalho, foi estudada a bioatividade de composições de biovidros bioabsorvíveis variando-se a proporção de sódio/cálcio baseado no sistema  $\text{SiO}_2 - (37-x)\text{Na}_2\text{O} - (5+x)\text{CaO}$  com 6% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  ( $x = 0, 5$  e  $10$ ) para potencial aplicação em medicina regenerativa.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Obtenção das amostras

Amostras nas composições  $\text{SiO}_2 - (37-x)\text{Na}_2\text{O} - (5+x)\text{CaO}$  com 6% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  ( $x=0, 5$  e  $10$ , denominadas BG-Na, BG e BG-Ca, respectivamente), foram preparadas a partir de óxido de silício (Casa Americana), hidróxido de sódio (Casa Americana), óxido de cálcio (Casa Americana) e pentóxido de fósforo (VETEC). Os pós foram homogeneizados em almofariz de ágata e acondicionados em cadinho de platina. As amostras foram fundidas em forno elétrico vertical à  $1500^\circ\text{C}/2\text{h}$  sob uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . em atmosfera normal. Após a fusão as amostras foram vertidas em moldes de latão e recozidas à  $500^\circ\text{C}/2\text{h}$ , em forno elétrico tipo mufla, seguido de esfriamento natural.

Após a fusão, as amostras foram cortadas em pastilhas de dimensões aproximadas de  $0,5 \times 0,5 \times 0,1\text{cm}$  com disco de diamante em uma cortadora de alta precisão (ISOMET 4000, Buheler).

### Ensaio de Bioatividade

As amostras foram imersas em 3ml de solução simuladora de fluido corpóreo (SBF) e caracterizadas após 1, 3, 5, 7 e 14 dias de imersão. Durante o ensaio, a solução SBF foi trocada a cada dois dias a fim de otimizar a simulação *in vitro*; as amostras permaneceram em agitação constante de 40rpm, à  $37^\circ\text{C}$ , com  $\text{pH} = 7,25$  em uma incubadora-shaker.

### Caracterização

As amostras foram caracterizadas, antes e depois do ensaio de bioatividade, pelas técnicas de difração de raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho com refletância difusa (DRIFT), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e estudo de variação de massa.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 1 estão apresentados os resultados de difração de raios-X das amostras antes e após o ensaio de bioatividade. É possível verificar um caráter predominantemente amorfo das estruturas dos vidros com alguns picos cristalinos resultantes de fases cristalinas formadas durante os ensaios de bioatividade. Foi observado a presença silicato de cálcio amorfo (JCPDS/ICDD 00-006-0476) em todas as composições, após imersão em solução SBF durante todos os períodos para as composições BG-Na e BG (Figura 1a e 1b, respectivamente) e até 7 dias de imersão para a composição BG-Ca (Figura 1c). A formação desta fase foi anteriormente relatada por Takadama et al.<sup>7</sup> os quais associaram-na como uma etapa intermediária da nucleação de fosfato de cálcio amorfo, pois a camada superficial de silicato de cálcio confere ao vidro uma superfície com carga positiva, que reage com os ânions fosfato da solução SBF, formando fosfato de cálcio amorfo, que posteriormente, cristalizar-se-á em hidroxiapatita. A formação de silicato de cálcio ocorre devido à atração eletrostática dos cátions de cálcio pelas ligações  $\equiv\text{Si-O}^-$  que são resultantes da lixiviação de íons metálicos ou da dissociação iônica dos grupos  $\text{Si-OH}$ <sup>7</sup>. A fase hidroxiapatita (JCPDS/ICDD 00-003-0747) formada sobre as superfície dos vidros foi evidenciada após 3 dias de imersão em solução SBF para a composição BG-Na (Figura 1a) e após 14 dias de imersão para as composições BG e BG-Ca (Figura 1b e 1c, respectivamente).

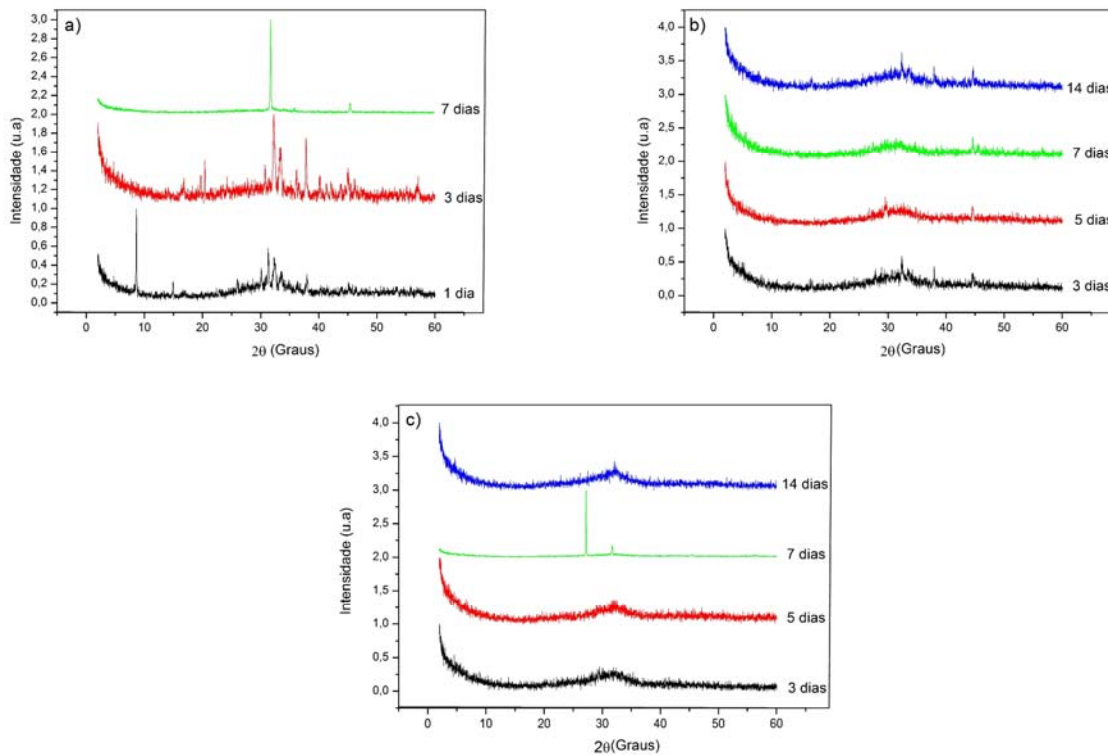
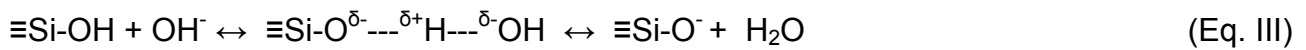
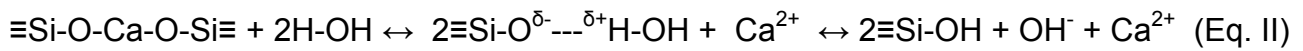


Figura 1 – Difratomogramas de raios-X das amostras após diferentes períodos de imersão em solução SBF das composições de biovidros: (a):BG-Na; (b):BG; (c):BG-Ca.

Na Figura 2 estão apresentados os resultados de Espectroscopia de Infravermelho na Transformada de Fourier com Refletância Difusa. A vibração de ligações Si-O-Si em picos próximos à  $440-460\text{cm}^{-1}$  pode ser observada em todas as composições e em todos os períodos; por outro lado, vibrações de ligações do tipo Silicato de Metais observada com picos entre  $950-1070\text{cm}^{-1}$  são observadas até 1 dia após imersão em solução SBF para a composição BG-Na (Figura 2a) e em todos os períodos para as composições BG e BG-Ca (Figura 2b e 2c, respectivamente). Após 1 dia de imersão para as composições BG (Figura 2b) e BG-Ca (Figura 2c) e após 3 dias de imersão para a composição BG-Na (Figura 2a) é observada a formação de ligações Si-O([NB],[Q2]), com picos em  $950\text{cm}^{-1}$ . Os períodos em que são observadas as ligações Si-O-Si e Si-O([NB],[Q2]) indicam que há a quebra das ligações Si-O-Na e Si-O-Ca através de reações de hidratação, o que leva a

formação de ligações Si-O<sup>-</sup>. Estes mecanismos pode ser ilustrado pelas reações parciais apresentadas nas Equações I - IV:



O oxigênio ligado ao metal sofre uma reação de substituição através da formação de uma ligação de hidrogênio com uma molécula de água, ocasionando a quebra da ligação iônica e liberação do metal (Eq. I e II). Há, portanto, a formação um composto intermediário de oxigênio não-ponte estabilizado por ligação de hidrogênio com uma molécula de água e posterior reação de hidratação, formando silanol. No entanto, a hidratação de ligações Si-O ocorre em equilíbrio químico, ocasionando a desprotonação do silanol, formando Si-O<sup>-</sup> (Eq. III).

A ligação química Si-O<sup>-</sup> tem valência negativa e pode, então, reagir com cátions da solução SBF e formar compostos silicatos de metais. Como evidenciado nos difratogramas de raio-X das amostras após o teste de bioatividade (Figura 1), a formação de silicato de cálcio poderia ser explicada por este mecanismo, como demonstrado na Eq. IV.

As ligações P-O vítreo, com picos entre 550-560cm<sup>-1</sup>, foram identificadas em todas as composições e em todos os períodos de imersão observados. As ligações P-O cristalino 500-530 e 600-610cm<sup>-1</sup>, que indicam a eminência de cristalização do filme amorfo de fosfato de cálcio depositado na superfície do vidro (etapa V), foram observadas em todas as composições somente após 3 dias de imersão em solução SBF. Este fato sugere que há a lixiviação dos íons fosfato para a solução SBF (etapa III), que após saturação em solução, em três dias de imersão, ocorre a deposição de um filme amorfo (etapa IV) que é parcialmente cristalizado (etapa V).

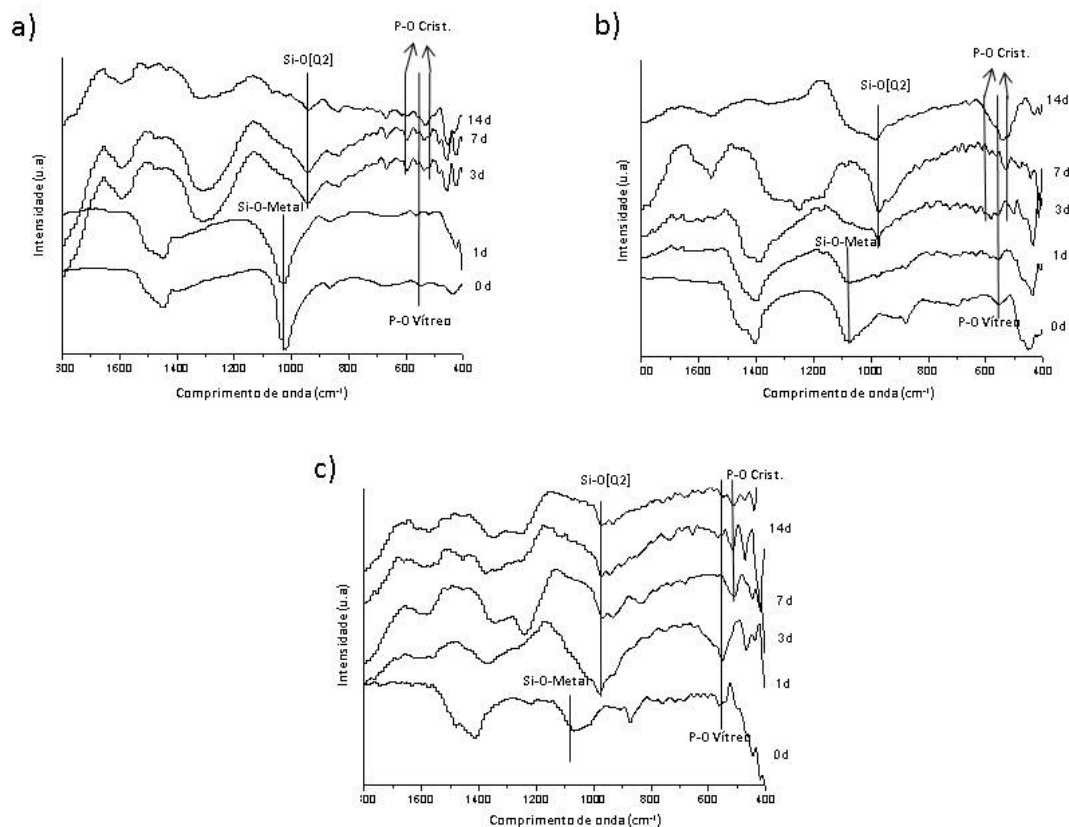


Figura 2: Espectros de infravermelho (DRIFT?) das diferentes composições de biovidros antes e após imersão em solução SBF. (a):BG-Na; (b):BG; (c):BG-Ca

A variação de massa das três composições de biovidros durante o ensaio de bioatividade está representada na Figura 3. Observa-se que a composição BG-Na (Figura 3a) apresenta um pico máximo de variação de massa após 1 dia de imersão em solução SBF com uma posterior variação de massa negativa, enquanto que as composições BG e BG-Ca (Figura 3b e 3c, respectivamente) apresentam uma variação de massa positiva, com um pico de massa máxima após 7 dias de imersão em solução SBF. A compreensão deste fato pode estar associada à dois fenômenos distintos: a degradação dos vidros e a deposição de fosfato de cálcio amorfo e íons cálcio (que formam os silicatos de cálcio) na superfície vítrea. Os picos máximos indicados nos gráficos indicam que, até o período do pico ocorre a deposição e a estabilização da deposição da camada amorfa de fosfato de cálcio e silicato de cálcio e, após o período correspondente do pico, a degradação vítrea passa a ser o fenômeno predominante, havendo uma variação negativa de massa. Na

composição BG-Na (Figura 3a) ocorre uma rápida deposição de fosfato de cálcio e silicato de cálcio, enquanto que na composição BG e BG-Ca a deposição superficial de silicato de sódio e fosfato de cálcio ocorre mais lentamente. A maior degradação química dos vidros da composição BG-Na pode ser explicada através maior quantidade de íons de sódio presente nestes vidros, os quais aumentam a quantidade de ligações de oxigênio não-ponte que, por serem monovalentes, tornam a estrutura dos vidros menos coesa em relação ao cálcio que é bivalente e pode unir-se com dois oxigênios não-ponte. Esta estrutura vítrea menos coesa pode facilitar os mecanismo de degradação da rede vítrea<sup>8</sup>.

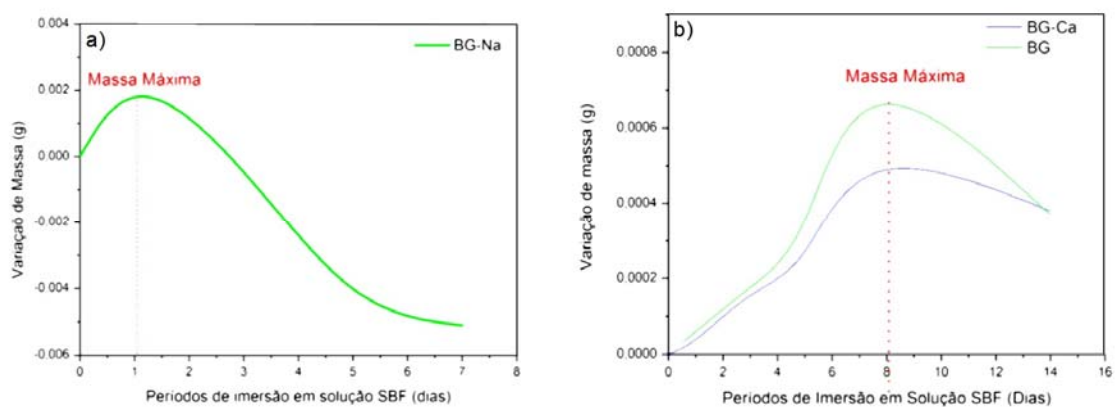


Figura 3: Variação de massa das composições (a) BG-Na e (b) BG e BG-Na após diferentes períodos de imersão em solução SBF

As microscopias eletrônicas de varredura das três composições antes e após imersão em solução SBF estão apresentadas na Figura 4. As Figuras 4a, 4d e 4g são as referentes às micrografias das composições BG-Na, BG e BG-Ca, respectivamente, antes do ensaio de bioatividade. As figuras 4b, 4e e 4h são referentes às micrografias das composições nos períodos do ensaio de bioatividade que há a deposição de massa máxima, ou seja, após 1 dia para a composição BG-Na e após 7 dias para as composições BG e BG-Ca. É possível observar a camada superficial de silicato de cálcio na superfície do vidro da composição BG-Na, evidenciada pela formação de cristais pontiagudos, enquanto que para as composições BG e BG-Ca é possível observar a



deposição de fosfato de cálcio na superfície vítrea. As Figuras 4c, 4f e 4i correspondem às micrografias da composição BG-Na após 5 dias de imersão em solução SBF e das composições BG e BG-Ca, respectivamente, após 14 dias de imersão. A composição BG-Na apresenta a nucleação de fosfato de cálcio sobre a superfície de silicato de cálcio (Figura 4c). Também é possível observar uma camada sólida de hidroxiapatita sobre a superfície da composição BG-Ca (Figura 4i).

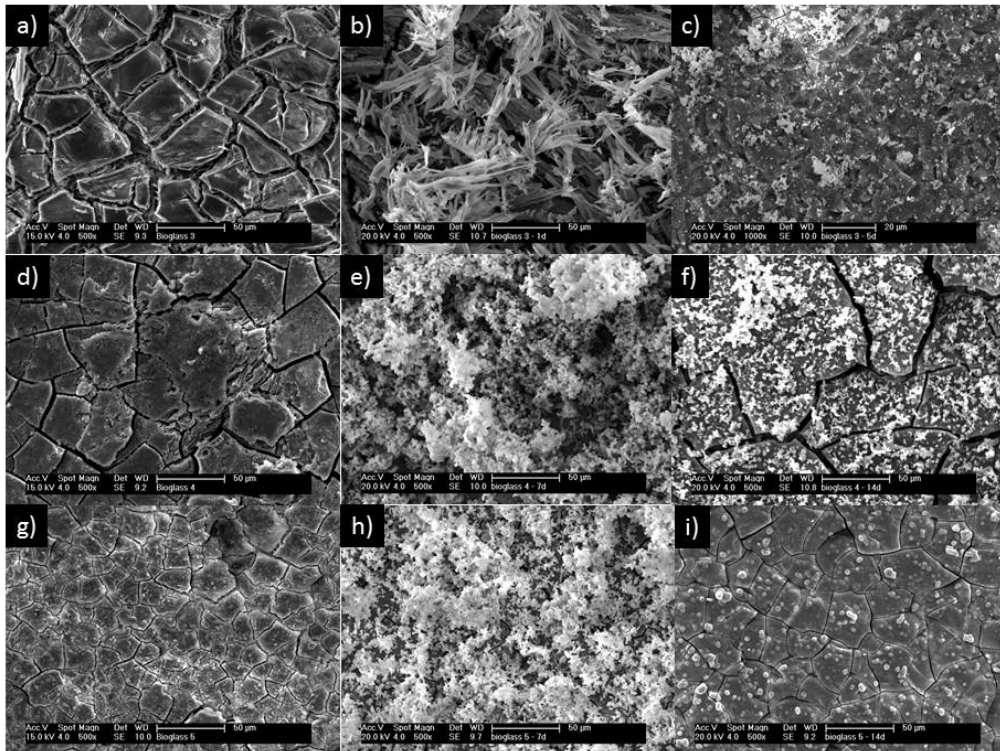


Figura 4: Micrografias eletrônicas de varredura das diferentes composições antes e após diferentes períodos de imersão em solução SBF. Superfície dos vidros antes do ensaio de bioatividade: (a) BG-Na, (d) BG e (g) BG-Ca. (b) Superfície após 1 dia de imersão da composição BG-Na. Superfície após 7 dias de imersão em solução SBF: composições (e) BG e (h) BG-Ca. (c) Superfície da composição BG-Na após 5 dias de imersão. Superfície após 14 dias de imersão: composições (f) BG e (i) BG-Ca.

Observou-se neste mecanismo de nucleação, que além das cinco etapas propostas por Takadama et al há indícios uma etapa intermediária, entre a policondensação dos silanois da superfície rica em íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (etapa III) e a deposição de fosfato de cálcio (etapa IV), que foram interpretados como a nucleação de uma camada com carga

parcialmente positiva de silicato de sódio que favorece a deposição de fosfato de cálcio, como indicado nos difratogramas de raios-X das amostras após os ensaios de bioatividade. A nucleação de hidroxiapatita, por outro lado, ocorre concomitantemente a este evento, justificando a coexistência de ligações P-O amorfo e P-O cristalino, bem como a coexistência das fases de silicato de sódio e hidroxiapatita na composição BG-Na. Ou seja, a lixiviação de íons fosfato e de íons de metais alcalinos e alcalinos terrosos (sódio e cálcio), a nucleação de silicato de sódio e a deposição de fosfato de cálcio são fenômenos que ocorrem concomitantemente e de forma contínua, diferentemente do mecanismo proposto por Kokubo, em que as etapas são subsequentes. O fato de estas etapas serem concomitantes dificulta a nucleação de hidroxiapatita, devido a instabilidade de cargas na superfície, o que também explica a difícil detecção de hidroxiapatita nos difratogramas de raios-X após 14 dias de imersão para as composições BG e BG-Ca, mesmo sendo detectado ligações P-O cristalino após três dias de imersão destas composições em solução SBF.

A diferença entre as três composições está no fato de que a cinética de formação da camada superficial de hidroxiapatita é diferente para cada composição. Esta cinética de formação, por outro lado, está associada à taxa de degradação dos vidros. Aparentemente, a maior quantidade de sódio na estrutura dos vidros favorece sua maior dissolução química, através dos mecanismos apresentados na Eq. I. A maior dissolução química dos vidros resulta em uma maior liberação de sódio na solução SBF, que por sua vez favorece a nucleação de silicato de cálcio, por deslocar o equilíbrio químico a Eq. I e da Eq. III para a formação de ligações  $\equiv\text{Si-O}^-$  na superfície vítrea. Havendo uma maior nucleação de silicato de cálcio, há uma maior deposição de fosfato de cálcio na superfície vítrea, favorecendo uma maior cinética de cristalização deste fosfato de cálcio em hidroxiapatita para três dias após o ensaio em solução SBF, como observado para a composição BG-Na. No entanto, a degradação química destes vidros é rápida, o que diminui sua durabilidade química e reduz sua aplicação como material para regeneração óssea, por exemplo, por não apresentar durabilidade suficiente para ser metabolizado pelo organismo ou para que haja um novo crescimento ósseo durante este período<sup>9</sup>.

Por outro lado, uma maior quantidade de íons cálcio na estrutura vítrea, como nas

composições BG e BG-Ca que apresentam comportamento semelhante, confere uma menor degradação química do vidro, formando uma superfície estável, porém a menor lixiviação de íons de sódio dificulta a nucleação de hidroxiapatita, retardando sua formação para 14 dias após imersão em solução SBF. Por fim, pode-se inferir que através da variação da relação sódio/cálcio, é possível controlar a taxa de degradação química de vidros bioabsorvíveis e modificar sua cinética de nucleação de hidroxiapatita.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que as composições estudadas de vidros bioabsorvíveis apresentam a nucleação superficial de silicato de sódio como agente nucleador de hidroxiapatita e a cinética de bioatividade pode ser controlada através da relação sódio/cálcio. Todas as composições de estudo demonstraram bioatividade através da formação de hidroxiapatita sobre a superfície, demonstrando serem potenciais cerâmicas para uso em medicina regenerativa.

## AGRADECIMENTOS

Os autores ao Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CCTM/IPEN) pela disponibilização do laboratório para a realização dos ensaios de fusão e infraestrutura para as caracterizações; a Universidade Federal do ABC (UFABC) pela disponibilização do Laboratório de Biologia I para a realização dos ensaios de bioatividade; e a FAPESP, CNPq e UFABC pelo apoio financeiro.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 – Gross, K. ; Bioceramics – An Overview Including Calcium Phosphates, Hydroxyapatite, Alumina, Zirconia and Pyrolytic Carbon; AzoM, 2002.
- 2 –Willians, D.F. On the mechanism of biocompatibility. Biomaterials. 29, 2941-2953, 2008
- 3 - Hench, L.L. Biomaterials: An Interfacial Approach, Academic Press, NY, 1982.
- 4 – CarterC.B.; Norton, M.G. Ceramic Materials, Science and Engineering. 1.ed. Springer,

p.640-642. 2007.

5 - Takadama, H., Hashimoto, M., Mizuno, M., Kokubo, T. Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. Phosphorus Research Bulletin, v. 17, n.1, p. 119-125, 2004.

6 - Kokubo T. Bioceramics and their clinical applications. Boca Raton: CRC Press, 2008.

7 - Takadama, H., H.M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura. Mechanism of biomineralization of apatite on Sodium Silicate Glass: TEM-EDS study in vitro. Chem Mater. 13, 1108-1113, 2001.

8 – Tilocca, A; Comarck, A.N. The initial stage of bioglass dissolution: a Car-Parrinello molecular-dynamic study of the glass-water interface. Pro. R. Soc. A. v. 467, 2011.

9 – Tulyaganov, D.U.; Markhkamov, M.E; Urazbaev, A.; Ferreira., J.M.F.. Synthesis, processing and characterization of bioactive glass composition for bone regeneration. Ceramics International. v.39, p.2519-2526, 2013

## **CHARACTERIZATION OF RESORBABLE BIOGLASS FOR REGENERATIVE MEDICINE APPLICATIONS**

### **ABSTRACT**

*In this work, three compositions of resorbable glasses with potential applications in regenerative medicine were studied and characterized. Glass in the system  $\text{SiO}_2 - (37-x) \text{Na}_2\text{O} - (5+x)\text{CaO}$  with 6% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  ( $x = 0, 5$  e  $10$ ) were obtained by fusion/cooling and annealing. The biocompatibility of the samples was evaluated by immersion in SBF solution during different periods and characterization of the glass surface. The glasses were characterized before and after the bioactivity test by x-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electronic microscopy e mass variation measurements. The obtained results indicate that, the bioactivity mechanism in resorbable glasses occurs, firstly, through a calcium silicate layer formation, that acts as a nucleation of hydroxyapatite layer. Also the hydroxyapatite nucleation kinetic can be controlled by the Ca/Na ratio.*

Key words: Biomaterials, bioglass, in vitro biocompatibility