



SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE VITRO-CERÂMICA DO SISTEMA CaO-MgO-SiO_2 PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA

Mayara R. S. Paiva¹, Agatha M. Misso¹, Olga Z. Higa¹, Tatiana F. Cunha¹, Andrea D. Rodas¹,
Antonio C. F. Silveira², Chieko Yamagata^{1*}

¹Centro e Ciência e Tecnologia de Materiais, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CNEN/SP) Brasil

²Instituto de Física da Universidade de São Paulo (SP), Brasil

*E-mail: yamagata@ipen.br

Resumo: Composição de bio-cerâmica do sistema CaO-MgO-SiO_2 tem sido estudada, devido a sua capacidade de biorreparação e bioatividade em tecido ósseo pela formação de hidroxiapatita (HA) em sua superfície. O material torna-se interessante e importante na área biomédica trazendo novas técnicas de viabilizar a reparação óssea. Neste trabalho, pós precursores de uma composição de vitro-cerâmica do sistema CaO-MgO-SiO_2 foi sintetizada, pelo método sol-gel seguido de precipitação dos hidróxidos de cálcio e magnésio. Foram utilizados como materiais de partida, os óxidos de magnésio e cálcio e solução de silicato de sódio. Os pós obtidos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (SEM), BET, FTIR e DRX. Análise por DRX da amostra cerâmica, sinterizada a 1300°C por 2 h revelou a presença principalmente das fases akermanite ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$), wolastonite (CaSiO_3) principalmente e silicato dicálcio (Ca_2SiO_4) em menor intensidade. Estas fases possuem boas propriedades mecânicas e bioatividade. Teste de cito toxicidade do material cerâmico realizado com células de ovário de hamster chinês (CH) em solução de simulado de plasma sanguíneo (SBF-simulate blood fluid) revelou ser não tóxico. A formação de HA (hidroxiapatita) na superfície do corpo cerâmico foi investigada.

Palavras-chave: síntese, sol-gel, vidro bioativo, hidroxyapatita

1. INTRODUÇÃO

A aplicação da cerâmica na área médica se desenvolveu principalmente nas últimas três décadas, devido a intensas pesquisas relacionadas à biomateriais¹, tais como vidros, hidroxiapatita sinterizada, vitro cerâmicas materiais compósitos etc.. As biocerâmicas têm sido aplicadas no auxílio da regeneração e reconstrução óssea¹. A progressiva deterioração do tecido com a idade é um dos fatores que contribuem para a utilização de materiais sintéticos compatíveis com o tecido humano, aliviando o desconforto causado nessa situação, assim como, um trauma derivado de um acidente, ou até mesmo um indivíduo que apresente uma osteopatia². Estudos mostram que biocerâmicas contendo CaO e SiO_2 podem induzir a formação de hidroxiapatita (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), um composto que apresenta semelhança química e estrutural com a fase mineral dos ossos e dos dentes³. Um material bioativo deve apresentar boas propriedades mecânicas e químicas e biocompatibilidade, além de conduzir à formação e proliferação de células para regeneração do tecido⁴. O material bioativo interage

especificamente com o ambiente fisiológico quando implantado, conduzindo a integração de material no tecido vivo. Esse processo é denominado de bioatividade. No caso das biocerâmicas, a bioatividade pode ser avaliada através do crescimento superficial de uma camada de hidroxiapatita com uma baixa cristalinidade e relacionada à fase mineral dos tecidos ósseos⁵. Pesquisas relatam que a vitrocerâmica do sistema ternário CaO-MgO-SiO₂⁶ apresenta tais propriedades necessárias da biocerâmica, ou seja, conduz ao processo de formação de HA. Prováveis fases cristalinas como diopside (CaMgSi₂O₆), merwinite (Ca₃MgSi₂O₈), akermanite (Ca₂MgSi₂O₇), volasonite (CaSiO₃), e silicato dicálcio (Ca₂SiO₄), deste sistema, cooperam para as condições de bioatividade^{6,7}. Os materiais vitrocerâmicas são particularmente interessantes para aplicação biomédica devido à possibilidade de controlar suas propriedades, tais como, coeficiente de expansão térmica, dureza e resistência à abrasão, através do controle da sua composição⁴.

As vitrocerâmicas bioativas podem ser obtidas por fusão e resfriamento dos materiais constituintes⁸ ou pelo método sol-gel⁹. Neste último, o processo consiste na síntese de uma rede inorgânica pela mistura de alcóxidos e água na presença de solvente e catalizador, seguida por hidrólise, gelatinização, remoção de resíduos orgânicos e água do gel por tratamento térmico obter a densificação do material vitrocerâmica, na forma de pó ou monólito¹⁰. No processo sol-gel os materiais são preparados em temperaturas relativamente baixas, na faixa de 600-700 °C. Este método apresenta algumas vantagens em relação ao processo por fusão, tais como, o grau de pureza, homogeneidade e facilidade no controle da composição do produto¹¹.

No presente trabalho foi sintetizado pó precursor de vitro-cerâmica do sistema CaO-MgO-SiO₂ pelo método sol gel seguido de precipitação dos hidróxidos de cálcio e magnésio. Foram utilizados como materiais de partida, os óxidos de magnésio e cálcio e solução de silicato de sódio. O pó obtido foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), BET, FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) e DRX. Análise por DRX da amostra cerâmica, sinterizada a 1300 °C por 2 h revelou a presença principalmente das fases akermanite (Ca₂MgSi₂O₇), wolastonite (CaSiO₃) principalmente e silicato dicálcio (Ca₂SiO₄). Teste de cito-toxicidade do material cerâmico realizado com células de ovário de hamster chinês (CH) em solução de simulado de plasma sanguíneo (SBF-simulate blood fluid) revelou ser não tóxico. A formação de HA (hidroxiapatita) na superfície do corpo cerâmico foi investigada pelo teste *in vitro*^{12, 13} de bioatividade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Síntese do pó precursor e sinterização do vitro-cerâmica

Preparou uma solução de silicato de sódio (Na₂SiO₃) por dissolução do reagente grau PA em água destilada. Esta solução foi utilizada como fonte de SiO₄.

Massas estequiométricas de CaO (grau PA) e MgO (grau PA) foram dissolvidas em HCl 6M, para a síntese do vitrocerâmico do sistema CaO-MgO-SiO₂, na composição previamente determinada. A solução clorídrica de Ca²⁺ e Mg²⁺ resultante foi adicionada lentamente à solução de Na₂SiO₃ em constante agitação. Após a total adição a solução da mistura foi deixada em repouso por 24h para a gelatinização da sílica. Após este período, ao gel formado é adicionada a solução de NaOH (grau PA) até obtenção de pH 10, para a precipitação dos hidróxidos de cálcio e magnésio homogeneamente distribuídos no gel de sílica. Em seguida o gel foi filtrado e lavado com água destilada e até o teste negativo para o Cl⁻, seco em estufa a 70°C por 12 horas e calcinado a 600°C por 1 h. O pó obtido, precursor

cerâmico do vitrocerâmico CaO-MgO-SiO₂ foi examinado por MEV, DRX e a área de superfície específica, determinada pelo método BET. A Tab. 1 mostra a composição nominal do vitrocerâmica preparado, designado SN-SMCC-05.

Tabela 1- Composição nominal da vitrocerâmica SN-SMCC-05

Composição	(Mol%)
CaO	43,30
MgO	0,72
SiO ₂	45,98

O pó foi compactado em forma de cilíndrica (pastilha) por pressão uniaxial de 98 Mpa, sinterizado a 1300°C durante 2 horas, com taxa de aquecimento de 5 °C.min⁻¹ e resfriamento natural até a temperatura ambiente, obtendo-se assim o vitrocerâmica.

2.2 Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada por meio de metodologia quantitativa. O ensaio se baseia na determinação de células viáveis após a exposição da população celular a diversas concentrações do extrato obtido a partir da incubação das amostras em meio de cultura celular RPMI (Gibco[®]) sem soro a 37° C por 24 h.

A análise da quantidade de células viáveis foi realizada por metodologia colorimétrica, pela incorporação de corante supravital e um agente acoplador de elétrons (MTS/PMS) e posterior leitura em espectrofotômetro a 490 nm. A quantidade de corante incorporada pela população celular é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura.

A relação entre a concentração do extrato e a quantidade de células viáveis resultou em curva dose-resposta e o parâmetro utilizado para avaliação da citotoxicidade é calculado pela concentração do extrato que matou 50 % das células expostas (Concentração Inibitória – CI_{50%}).

2.3 Teste de bioatividade em SBF (*Simulated Body Fluids*)

A solução de SBF foi preparada de acordo com o procedimento descrito por Kokubo¹⁴. Nesta solução as concentrações dos íons da solução são similares ao do plasma do sangue humano. A pastilha do vitrocerâmica sinterizada foi submetida à solução de SBF (pH = 7,4) à 37°C por 7 e 12 dias. A relação da área de superfície para o volume da solução de SBF foi de 0,2 cm². mL⁻¹. Após o tempo de imersão, as pastilhas foram retiradas e lavadas três vezes com água *Milli-Q*, seguindo por secagem durante 24 horas a temperatura 70 °C. As mudanças estruturais e morfológicas de superfície das amostras submetidas à solução de SBF foram analisadas por , MEV e FTIR.

A Fig. 1 mostra o fluxograma das etapas de síntese e processamento.

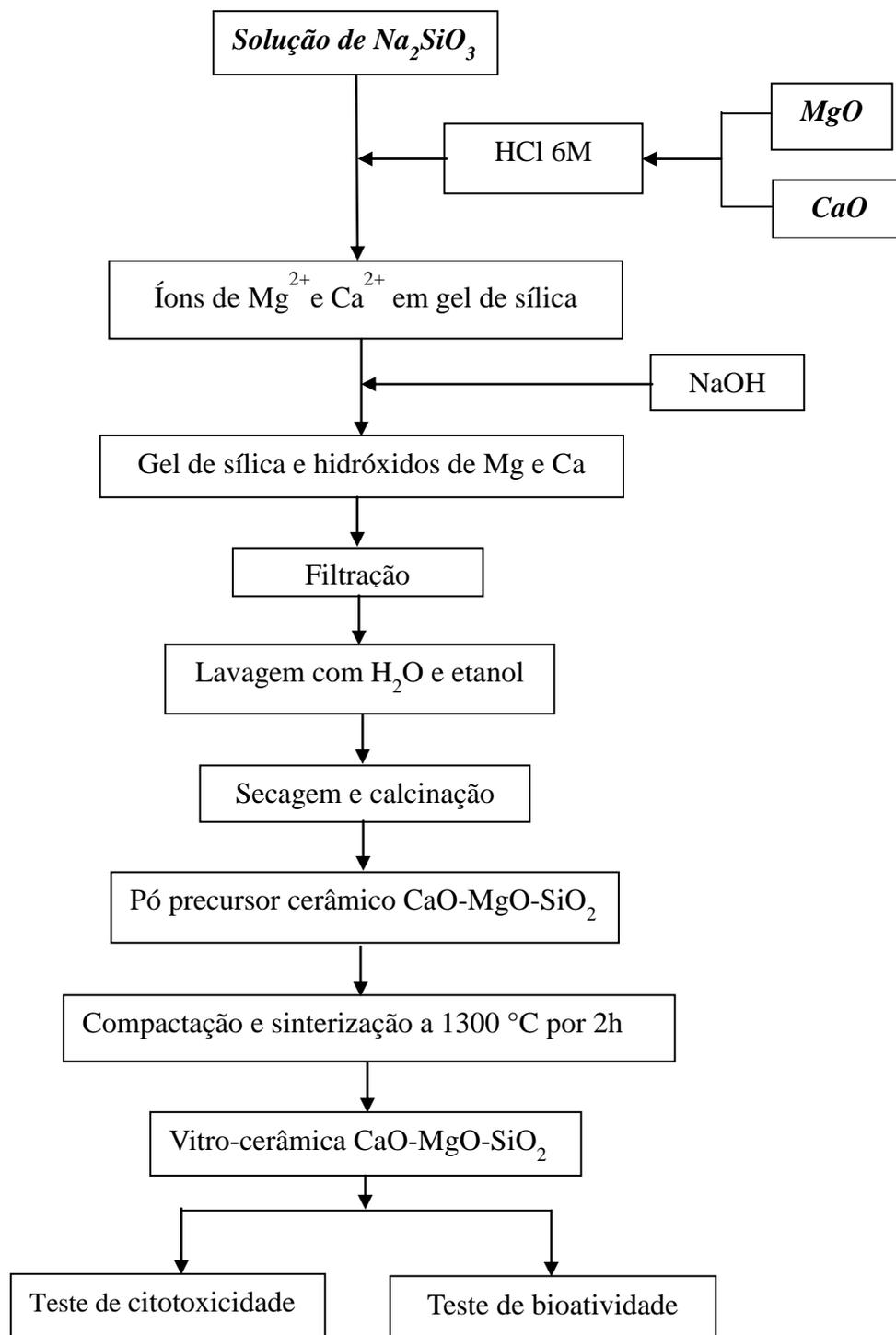


Figura 1 – Fluxograma do processo de síntese e processamento do pó para obtenção do vitro-cerâmica do sistema CaO-MgO-SiO₂, amostra SN-SMCC-05

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Fig. 1 é mostrada a micrografia obtida por MEV do pó cerâmico sintetizado e calcinado 600 °C por 1h. Observam-se aglomerados de partículas de morfologia arredondada com distribuição homogênea de tamanhos submicrométricos. A área de superfície específica desta amostra, determinado pelo método BET foi de 46.50 m².g⁻¹. O valor razoavelmente alto da área de superfície específica indica que o pó possui alta reatividade.

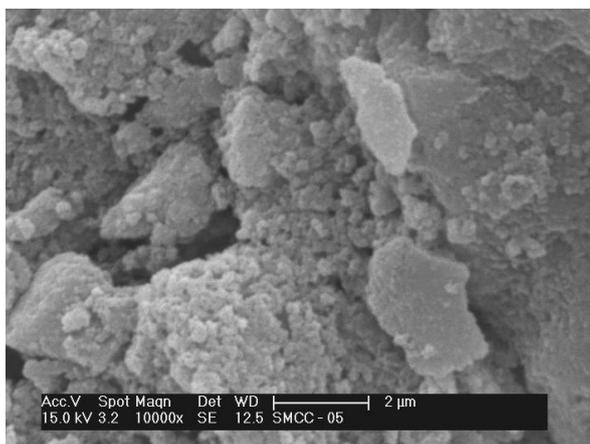


Figura 1 - Micrografia obtida por MEV da amostra sintetizada calcinada a 600 °C por 1h

A Fig. 2 mostra o padrão de DRX do vitro-cerâmica do sistema CaO-MgO-SiO₂, amostra SN-SMCC-05 sinterizado a 1300 °C por 2h. Observa-se a presença principalmente das fases cristalinas arkemanite, wollastonite e em menor intensidade o silicato dicálcio.

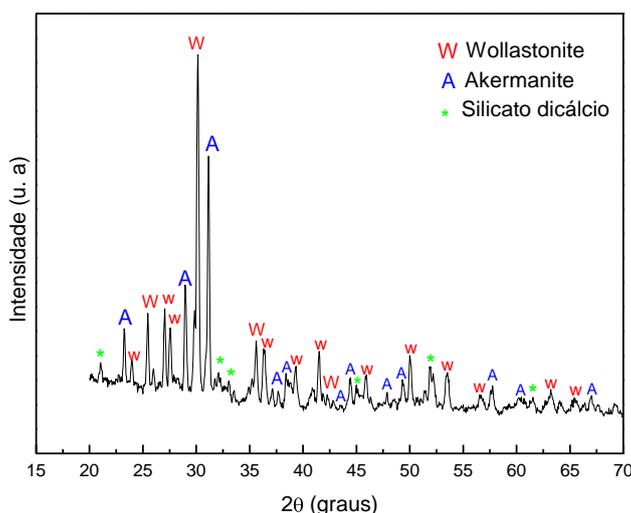


Figura 2 - DRX do vitro-cerâmica do sistema CaO-MgO-SiO₂, amostra SN-SMCC-05 sinterizado a 1300 °C por 2h.

A Fig.3 mostra o gráfico da curva dose-resposta da viabilidade celular em função da concentração dos extratos do controle negativo (Alumina), do controle positivo (Fenol 0,5%) e da amostra de vitro-cerâmica sinterizada a B (SN-SMCC-05).

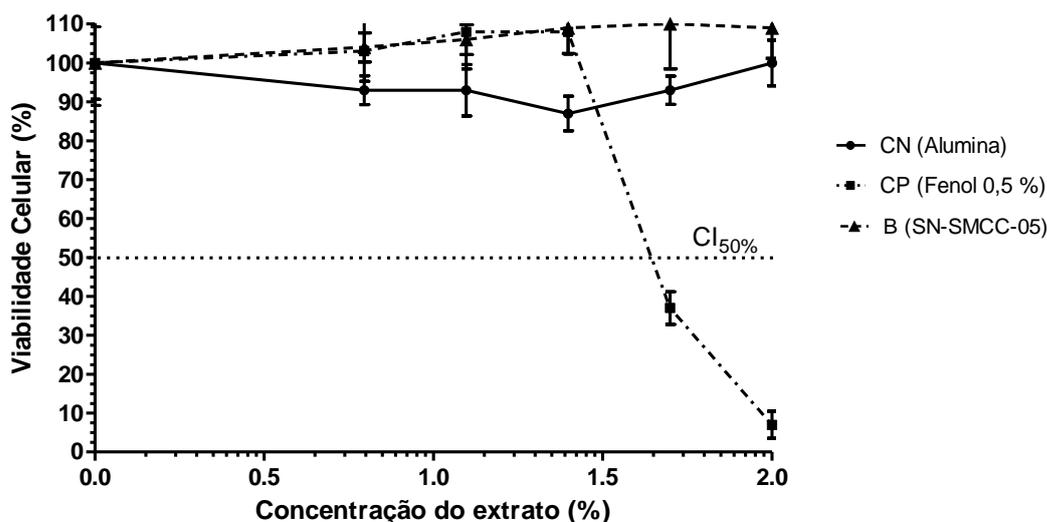


Figura 3 - Viabilidade celular em função de diferentes concentrações dos extratos do controle negativo (CN), do controle positivo (CP) e da amostra B (SN-SMCC-05).

De acordo com ISO 10993-5, quando a viabilidade celular do extrato é maior que 70%, pode ser considerado não citotóxico. Na Fig. 3 pode-se observar que a amostra SN-SMCC-05 não apresentou redução na viabilidade celular em nenhuma das concentrações do extrato. Esse resultado indica a não citotoxicidade desta amostra.

Na Fig. 4 é apresentada a micrografia obtida por MEV, da superfície da amostra de SN-SMCC-05 sinterizada, antes de ser submetido ao teste de bioatividade.

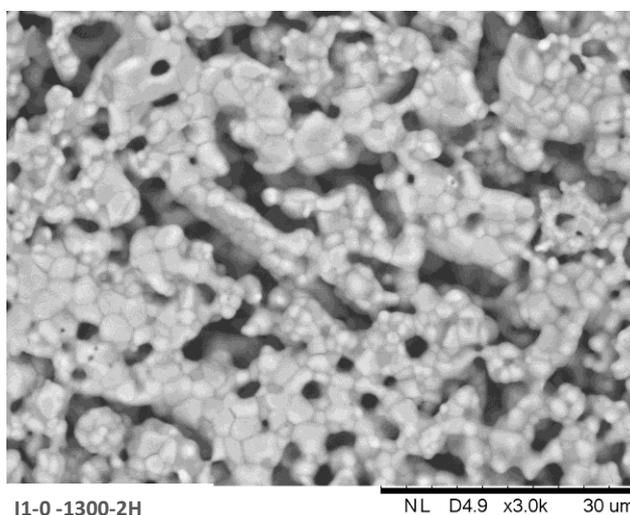


Figura 4 - Micrografia obtida por MEV da superfície da amostra de SN-SMCC-05 sinterizada antes de ser submetido ao teste de bioatividade.

Nota-se que a microestrutura da superfície é altamente porosa, com poros de diversos tamanhos e morfologias. Os grãos cristalinos conectados apresentam tamanhos abaixo de $6\mu\text{m}$ no seu maior comprimento.

A Fig. 5 mostra micrografias obtidas por MEV da superfície das amostras de SN-SMCC-05 submetidas a teste de bioatividade, pela imersão em SBF, por períodos de 7 e 12 dias.

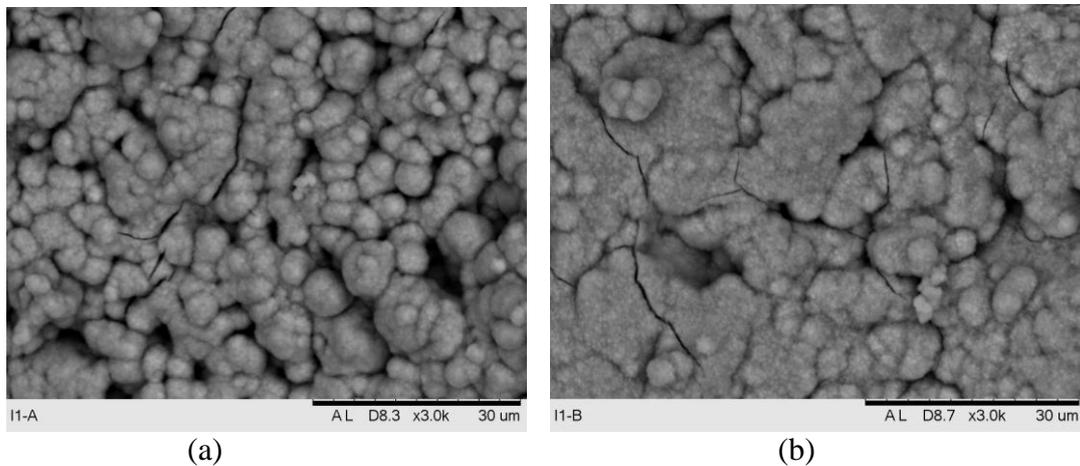


Figura 5 - Micrografias obtidas por MEV da superfície das amostras de SN-SMCC-05 submetidas a teste de bioatividade, pela imersão em SBF, por períodos de 6 (a) e 12 dias (b)

Comparando-se as micrografias de superfície apresentadas na Fig. 4 e Fig. 5 a , verifica-se os poros da primeira foram preenchidas com precipitados de morfologia arredondada, o que pode indicar o desenvolvimento de hidroxiapatita na superfície da amostra após 7 dias de imersão em SBF. Na micrografia apresentada na Fig. 5 b, pode-se verificar que os precipitados são maiores em relação aos observados anteriormente na Fig. 5 a. O crescimento dos precipitados se deve muito provavelmente ao maior tempo (12 dias) de imersão da amostra mostrada na Fig. 5 b.

Na Fig. 6 são mostrados os espectros de FTIR das amostras de SN-SMCC-05, sinterizada e submetidas a teste de bioatividade, pela imersão em SBF, por períodos de 7 e 12 dias.

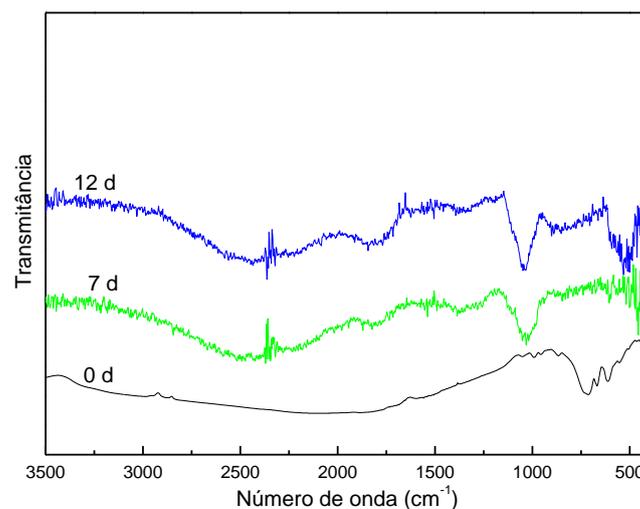


Figura 6 – Espectros de FTIR das amostras de SN-SMCC-05 sinterizada e submetidas a teste de bioatividade, pela imersão em SBF, por períodos de 7 e 12 dias.

Os espectros de FTIR mostrados na Fig. 6 podem confirmam as observações e comentários feitos da Fig. 6, pois apresentam bandas características de PO_4^{3-} da hidroxiapatita¹⁵: nas faixas de 568-600 e de 1030-1090 cm^{-1} .

4. CONCLUSÕES

Um método novo de síntese, combinando a técnica de sol gel e precipitação, foi apresentado para obtenção de vitrocerâmica do sistema CaO-MgO-SiO_2 , para aplicação biomédica. No presente trabalho foi utilizado silicato de sódio como fonte de sílica, em substituição ao TEOS (tetraetilortosilicato), normalmente empregado. Como o silicato de sódio é mais barato, o método proposto é promissor. O teste de citotoxicidade revelou que o material obtido no trabalho pode ser considerado não citotóxico. Espectros de FTIR mostraram que o material é bioativo, pela formação de hidroxiapatita na sua superfície após 7 dias de imersão em SBF.

REFERÊNCIAS

- 1- Hench, L., **Bioceramics**. Department of Materials, Imperial College of Science, Technology, and Medicine, University of London, London, Journal of the American Ceramic Society, Hench, Vol. 81, No. 7, 1998
- 2- Chen, X., Ou, J., Wei, Y., Huang, Z., Kang, Y., Yin, G. **Effect of MgO contents on the mechanical properties and biological performances of bioceramics in the MgO–CaO–SiO₂ system**. College of Materials Science and Engineering, Sichuan, 1463–1471, 2010
- 3- Fook, A.C.B.M., Aparecida, A.H., Fook, M.V.L. **Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea**. Revista Matéria, v. 15, n. 3, pp. 392 – 399, 2010
- 4- Chen, X., Liao, X., Huang, Z., You, P., Chen, C., Kang, Y., Yin, G. **Synthesis and characterization of novel multiphase bioactive glass ceramics in the CaO-MgO-SiO₂ system**. College of Materials Science and Engineering, Sichuan University, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: Applied Biomaterials, V. 93B (1), 194-202, 2010
- 5- Vallet-Regí, M., Balas, F. **Silica Materials for Medical Applications**. Bentham Science Publishers Ltd., The Open Biomedical Engineering Journal, Volume 2 1874-1207/08, 2008
- 6- Agathopoulos, S.; Tulyaganov, D.U.; Ventura, J.M.G.; Kannan, S.; Saranti, A.; Karakassides, M.A.; Ferreira, J.M.F. **Structural analysis and devitrification of glasses based on the CaO-MgO-SiO₂ system with B₂O₃, Na₂O, CaF₂ and P₂O₅ additives**. J Non- Cryst Solids, 52:322–328, 2006
- 7- He Q., Shi J. **Mesoporous sílica nanoparticle based nano delivery systems: syntesis, controlled drug release and delivery, pharmacokinetics and biocompatibility**. J. Mat. Chem., 21, 5845, 2011
- 8- Hiroko, H.; Toru, N.; Shou Y.; Norihisa K. **Fundamental Study on Relation between Elution of Calcium from System CaO-MgO-SiO₂ Synthesis in Pseudo Body Fluid and Apatite Deposition for Incipient Dentin Caries Treatment**. Bull. Material Science, Vol. 34, No. 5, 1151–1155, 2011

- 9- Xiaoming, L.; Hongyang, Z.; Guangfu, Y.; Zhongbing, H.; Yadong, Y.; Xianchun, C. **In vitro bioactivity and cytocompatibility of tricalcium silicate**. Vol 34, No. 5, 1151-1155, 2011
- 10- Li, R.; Clark, A.E.; Hench, L.L.; **An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing**, J Appl Biomater. Winter;2(4):231-9, 1991
- 11- Raímila, A.; Balas, F.; Vallet-Regí, M. **Synthesis Routes for Bioactive Sol-Gel Glasses:Alkoxides versus Nitrates**. Chemical Material 14, 542-548, 2002
- 12- Wu, C.; Chang, J.; Ni, S. ; Wang, J.; **In vitro bioactivity of akermanite ceramics**, Biom. Mater Res. A, 76 (1), 73-80, 2006
- 13- Liu, X., Ding, C.; Chu, P. K., **Mechanism of apatite formation on wolastonite coatings in simulated body fluids**, Biomaterials, 25(10), 177-1761, 2004
- 14- Kokubo, T. ; Takadama, H., **How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?**, Biomaterials, 27(15), 2907-2915, 2006
- 15- Ślószarczyk, A.; Paszkiewicz, Z.; Paluszkiewicz, C.; **FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods**, J. Mol. Struct. 3, 657-661, 2005

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CaO-MgO-SiO₂ GLASS-CERAMIC SYSTEM FOR BIOMEDICAL APPLICATION

Mayara R. S. Paiva¹, Agatha M. Misso¹, Olga Z. Higa¹, Tatiana F. Cunha¹, Andrea D. Rodas¹,
Antonio C. F. Silveira², Chieko Yamagata^{1*}

¹Centro e Ciência e Tecnologia de Materiais, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CNEN/SP) Brasil

²Instituto de Física da Universidade de São Paulo (SP), Brasil

*E-mail: yamagata@ipen.br

Abstract: Compositions of glass-ceramic of CaO-MgO-SiO₂ system have been studied due to its high capacity of bio-reparation and bioactivity on bone tissue surface by hydroxyapatite (HA) formation. The material becomes interesting and important for medical applications allowing new techniques for bone repair. In this work a glass-ceramic composition of CaO-MgO-SiO₂ system was synthesized by sol-gel method followed by precipitation of Ca and Mg hydroxides. Magnesium and calcium oxides and sodium silicate solution were used as starting materials. The obtained powders were characterized by SEM, BET, FTIR and XRD. Results of XRD of the glass-ceramic sample sintered at 1300 °C for 2 h revealed the presence mainly of akermanite (Ca₂MgSi₂O₇), wolastonite (CaSiO₃) and dicalcium silicate (Ca₂SiO₄) in minor intensity. Those crystalline phases have good mechanical proprieties and bioactivity. The cytotoxicity test of the ceramic material was performed with Chinese hamster ovarian cells; in simulate blood fluid (SBF) solution, revealed to be nontoxic. The formation of HA on the surface of the ceramic body was investigated.

Keywords: synthesis, sol-gel, bioactive glass-ceramic, hydroxyapatite