



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

LAÍS COSTA ALVES DA SILVA

**ESTUDO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE VIDROS BORATOS
BIOATIVOS DOPADOS COM Ag₂O**

Orientador: Prof. Dr. Alysson Steimacher

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Franciana Pedrochi

LAÍS COSTA ALVES DA SILVA

**ESTUDO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE VIDROS BORATOS
BIOATIVOS DOPADOS COM Ag₂O**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Área de concentração: Ciências Exatas e da Terra

Orientador: Prof. Dr. Alysson Steimacher

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Franciana Pedrochi

Imperatriz – MA
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pela Biblioteca

SILVA, Laís Costa Alves.

Estudo da atividade bactericida de vidros boratos bioativos dopados com Ag₂O / Laís Costa Alves da Silva. – Imperatriz, 2019.

86f.

Orientador: Prof. Dr. Alysson Steimacher.

Dissertação (Mestrado em Ciências de Materiais)-
Universidade Federal do Maranhão, 2019.

1. Bioatividade. 2. Fluorapatita. 3. Hidroxiapatita. 4. Vidros boratos bioativos. 5. Óxido de prata.

Membros da comissão julgadora da defesa da dissertação da aluna **Laís Costa Alves da Silva**, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais (PPGCM).

Imperatriz, 27 de junho de 2019

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Alysson Steimacher (Orientador da candidata)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA/PPGCM

Prof. Dr. Pedro de Freitas Façanha Filho
Universidade Federal do Maranhão – UFMA/PPGCM

Prof. Dr. Gutierrez Rodrigues de Moraes
Universidade Estadual de Maringá – UEM

*Dedico este trabalho à memória da minha mãe Iraildes Costa Alves e dos meus avós
maternos Marinho Dias da Costa e Nair Carvalho Costa.*

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King Jr.

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Guido, por todo amor, compreensão, apoio e ajuda.

À minha filhinha e futura cientista, Ághata.

Aos meus queridos professores e orientadores, Prof. Dr. Alysson Steimacher e Prof^a. Dra. Franciana Pedrochi pela oportunidade de crescimento científico, intelectual, profissional e de vida.

À Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais (PPGCM) por proporcionar os recursos necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores: Dr. Márcio José Barboza, Dr. Adenilson Oliveira dos Santos, Dra. Luzeli M. Silva, Dr. Pedro F. F. Filho, Dr. Paulo Roberto da Silva Ribeiro pelo imenso amor e dedicação à pesquisa científica e ao PPGCM.

Aos meus amigos de longa data Ronaldo Silva e Alexandre Saraiva por todo companheirismo.

A todos os meus amigos do LEOF, Bernardo Rurik, Thiago, Luana, Rachel, Natacy, Suzanny, Floriano, Otávio, Sátya, Natal Jr., Gleyson, Sasha e Thaís.

Aos meus amigos de turma, Larissa, Ellen Karolyne, Marcus, Jéssica, Jefferson, Andira, Edileide, Leonardo, Raychman, João e Emanuella.

Ao Laboratório de Espectroscopia Ótica e Fototérmica (LEOF) onde foram realizadas as sínteses das amostras, as medidas de densidade e de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

À Central Analítica onde foram realizadas as medidas de dureza Vickers dos vidros, o preparo da solução SBF, a incubação das amostras e as medidas do pH da solução.

Ao Laboratório de Difração de Raios-X (LDRX) onde foi realizada a caracterização estrutural por difração de raios-X.

Ao Laboratório de Espectroscopia Raman (LER) onde foi realizada a caracterização vibracional por Espectroscopia Raman.

À Universidade Federal de Maringá (UEM) onde foram realizadas as análises das propriedades antibacterianas e de citotoxicidade das amostras.

À FAPEMA, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

Neste trabalho sintetizamos uma série de vidros boratos que segue a composição $59,5\text{B}_2\text{O}_3 - 2\text{P}_2\text{O}_5 - 9,5\text{CaO} - 9\text{CaF}_2 - (20 - x\text{Na}_2\text{O}) - x\text{Ag}_2\text{O}$, com $x = 0, 0,25, 0,50$ e $0,75 \text{ \%mol}$, e investigamos a influência da adição de prata na estrutura e na bioatividade *in vitro* desses vidros. Para verificar a formação de uma camada bioativa na superfície desses materiais, as amostras foram imersas em um simulador de fluido corporal as quais permaneceram por 3, 7, 14 e 21 dias. Medidas de pH do fluido foram criteriosamente realizadas durante o período de imersão. Em adição, realizaram-se medidas de difração de raios-X, no infravermelho com Transformada de Fourier e de espectroscopia Raman antes e após a imersão em simulador de fluido corporal. A ação antibacteriana das amostras foi avaliada utilizando as respectivas bactérias gram-positiva e gram-negativa, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A citotoxicidade dos vidros foi investigada por meio de ensaios da viabilidade celular de células osteoblásticas MC3T3-E1 em concentração de 100, 400, 700 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de vidro dissolvido. Um aumento da alcalinidade da solução pôde ser verificado com as medidas de pH em função do tempo. Esse acréscimo de alcalinidade do fluido (com um pH inicial de 7,4, similar ao pH do plasma sanguíneo) favorece a dissolução da camada mais externa do vidro e, portanto, sua precipitação em apatita. Picos característicos da formação de hidroxiapatita e de fluorapatita no material foram observados a partir do terceiro dia de imersão. Os espectros Raman e os espectros infravermelho com transformada de Fourier também confirmaram a formação de fases de fluorapatita e hidroxiapatita após imersão dos vidros em simulador de fluido corporal. Os vidros boratos dopados com Ag_2O exibiram melhores propriedades antibacterianas contra os microrganismos testes que o vidro sem adição de Ag_2O . Os testes de citotoxicidade revelaram que as amostras até a concentração de 0,50 $\text{\%mol}$ de Ag_2O não são tóxicas às células osteoblásticas, sendo essas citocompatíveis e de grande potencial para aplicação como biomateriais.

Palavras-chave: Bioatividade. Fluorapatita. Hidroxiapatita. Vidros boratos bioativos. Óxido de prata.

ABSTRACT

Infections triggered by bacteria has been the most common cause of implants failure. Thereby, it is advantageous to impart antibacterial properties to bioactive glasses by means of metals incorporation as the silver to the glass structure. In this present work, the borate glasses series over compositional range in the $59.5\text{B}_2\text{O}_3 - 2\text{P}_2\text{O}_5 - 9.5\text{CaO} - 9\text{CaF}_2 - (20 - x\text{Na}_2\text{O}) - x\text{Ag}_2\text{O}$ system, with $x = 0, 0.25, 0.50$ e 0.75 mol% was synthesized, in order to investigate the silver influence on their structure and bioactive response in simulated body fluid (SBF). The glasses bioactivities were evaluated by SBF solution pH measure which the samples were soaked for 3, 7, 14 and 21 days, by X-ray diffraction technique (XRD), Raman Spectroscopy and FTIR. The antibacterial properties of the glasses were evaluated using gram-positive and gram-negative *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. The cytotoxicity of the borate glass and the silver-containing borate bioactive glass was evaluated *in vitro* from the response of osteoblastic cells MC3T3-E1 in media containing the dissolution products of the glass. pH measure showed an increase of the solution alkalinity. This alkalinity increases further to the dissolution of the outermost layer of the glasses and then its apatite convention. XRD, Raman and FTIR measures were realized before and after immersion in SBF. The XRD patterns revealed that the addition of the Ag_2O did not cause the glasses crystallization, the diffractograms exhibited broad bands it proved their amorphous nature. In 3 days of immersion in SBF, there was crystalline peaks formation what became more intense on twenty-one day of immersion. The Raman spectra exhibited bands at 430 cm^{-1} and 960 cm^{-1} assigns as the fluorapatite and hydroxyapatite formation, respectively. All FTIR spectra exhibited a very intense band at 1042 cm^{-1} also attributed to apatite formation. The obtained results indicated that the Ag_2O until 0.75 mol% did not affect the apatite formation on samples surface. Cytotoxic effects to the osteoblasts culture were found for the borate glass containing 0.75Ag, but not for 0.25 and 0.50 mol % Ag_2O . Ag_2O -doped bioactive glasses presented better antibacterial activities than on the undoped borate glass. The obtained results show that the prepared samples present great potential as biomaterials applications.

Keywords: Bioactivity. Fluorapatite. Hydroxyapatite. Bioactive borate glasses. Silver oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dedo protético descoberto no Egito. Fonte: Adaptado de Brier <i>et al</i> (2015), [37].	3
Figura 2 - Diagrama ternário de Hench para o 45S5. Fonte: Adaptado de Gutierrez <i>et al</i> , (2006) [16].	7
Figura 3 - Valores de pH do SBF em diferentes intervalos de tempo. Fonte: Adaptado de Kamal, (2014) [88].	13
Figura 4 - Variação do pH da solução SBF contendo amostras de vidro boratos dopados com Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni e Cu. Fonte: Adaptado de Kamal e Abdelghany, (2015) [89]	14
Figura 5 - Variação do pH da solução SBF contendo amostras de vidro borossilicatos dopados com prata. Fonte: Adaptado de Wang <i>et al</i> (2015), [90].	14
Figura 6 - DRX para a amostra do vidro Ag-MBG, imersa em solução SBF por 4h, 1d e 4d. Fonte: Adaptado de Ciraldo <i>et al</i> (2018), [91].	15
Figura 7 – Difractogramas das amostras BG-2Ag ₂ O, BG-4Ag ₂ O e BG-6Ag ₂ O após 7 dias de imersão em SBF. Fonte: Adaptado de Sharifianjazi <i>et al</i> (2017), [92].	16
Figura 8 - Espectros de DRX para a amostra BG-1.0Ag antes e após imersão em SBF por 14 e 90 dias e padrão de DRX referência para a hidroxiapatita cristalina. Fonte: Adaptado de Wang <i>et al</i> (2015), [90].	16
Figura 9 - Espectro FTIR para a amostra Ag ₂ .0 antes da imersão na solução SBF. Fonte: Adaptado de Krishnamacharyulu <i>et al</i> , (2018) [93].	17
Figura 10 - Espectros FTIR para a amostra Ag ₂ .0 antes (AI) e depois (DI) da imersão em SBF e espectro FTIR para a Hidroxiapatita (HAp). Fonte: Adaptado de Krishnamacharyulu <i>et al</i> , (2018) [93].	18
Figura 11 - Espectro FTIR das amostras (Base, 0,5 Ag e 1,0 Ag) antes da imersão em solução fosfato. Fonte: Adaptado de El-Batal <i>et al</i> , (2017) [94].	19
Figura 12 - Espectro FTIR espectro das amostras (Base, 0,5 Ag e 1,0 Ag) após a imersão em solução de fosfato durante duas semanas. Fonte: Adaptado de El-Batal <i>et al</i> (2017), [94].	19
Figura 13 - Espectros Raman das amostras C3PB2 antes da imersão (AI) em SBF e C3PB2, C4PB2, C5PB2 após 7 dias de imersão em SBF (DI). Fonte: Adaptado de Saranti <i>et al</i> (2006), [95].	20

Figura 14 – Imagens óptica de células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas por 48 h em meio contendo os vidros BG, BG-0,75Ag, BG-1Ag e BG-2Ag. Fonte: Adaptado de Luo <i>et al</i> (2010), [34].	21
Figura 15 - Medida quantitativa da proliferação celular de células MC3T3-E1 cultivadas em extratos contendo scaffolds de vidros no período de 1, 3 e 7 dias. Controle: sob condições de cultura idêntica, sem que haja vidros dissolvidos. Fonte: Wang <i>et al</i> (2015), [90].	22
Figura 16 – Viabilidade celular da E.coli em função do tempo de incubação em meio contendo 20 mg/ml de vidros de AgBG e BG dissolvidos. Fonte: Balamurugan <i>et al</i> (2008), [96].	23
Figura 17 - Viabilidade das bactérias <i>E.coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> e <i>S.aureus</i> em função da massa dos vidros 45SS, BG e AgBG. Fonte: Adaptado de Bellantone <i>et al</i> (2002), [28].	23
Figura 18 – Fenômeno de difração de raios-X . Fonte: Adaptado de Callister (2016), [98].	27
Figura 19 - Difratômetro Modelo Empyrean da PANalitical (LDRX - UFMA).	28
Figura 20 - Espectrômetro triplo Trivista 557 da Princeton Instrument (LER – UFMA).	30
Figura 21 - Espectrômetro Vertex 70V da Bruker (LEOF – UFMA).	31
Figura 22 - Amostras em banho-maria a 36,5°C.	33
Figura 23 - Vidros boratos com suas respectivas quantidades em %mol de Ag ₂ O.	35
Figura 24 - Amostras dos vidros boratos cortadas em fatias.	35
Figura 25 - Padrão de raios-X das amostras (Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75) antes da imersão em SBF.	36
Figura 26 - Densidade e volume molar das amostras (Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75) em função da concentração de Ag ₂ O.	37
Figura 27 - FTIR das amostras (Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75) antes da imersão em SBF.	37
Figura 28 - Microdureza Vickers para as amostras em função da concentração de Ag ₂ O.	39
Figura 29 - Foto da amostra Ag 0 antes e após imersão em SBF pelo período de 3, 7, 14 e 21 dias respectivamente.	40
Figura 30 - Foto da amostra Ag 0,25 antes e após imersão em SBF pelo período de 3, 7, 14 e 21 dias respectivamente.	40

Figura 31 - Foto da amostra Ag 0,50 antes e após imersão em SBF pelo período de 3, 7, 14 e 21 dias respectivamente.	40
Figura 32 - Foto da amostra Ag 0,75 antes e após imersão em SBF pelo período de 3, 7, 14 e 21 dias respectivamente.	40
Figura 33 - Medidas de pH para as amostras (Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75), durante os 21 dias de imersão em SBF.	41
Figura 34 - Padrão de DRX para a Hidroxiapatita. Fonte: Adaptado de Scott <i>et al</i> (2010), [127].	42
Figura 35 - Padrão de DRX para a Fluorapatita. Fonte: Adaptado de Scott <i>et al</i> (2010), [128]	42
Figura 36 - Padrão de DRX para o cloreto de prata (AgCl). Fonte: Adaptado de Richardson (1988), [129].	43
Figura 37 - Difrátogramas da amostra Base depois da imersão em SBF durante (3,7, 14 e 21 dias).	43
Figura 38 - Difrátogramas da amostra Ag 0,25 depois da imersão em SBF durante (3,7, 14 e 21 dias).	44
Figura 39 - Difrátogramas da amostra Ag 0,50 após a imersão em SBF durante (3,7, 14 e 21 dias).	45
Figura 40 -. Difrátogramas da amostra Ag 0,75 depois da imersão em SBF durante (3,7, 14 e 21 dias).	46
Figura 41 - Difrátogramas das amostras Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75 depois da imersão em SBF durante 21 dias.	47
Figura 42 - Espectro Raman padrão para a HAp. Fonte: Adaptado de Scott <i>et al</i> (2010), [127].	47
Figura 43 - Espectro Raman padrão para a FA. Fonte: Adaptado de Scott <i>et al</i> (2010), [128].	48
Figura 44 - Espectros Raman da amostra Ag 0, antes e após a imersão em SBF.	48
Figura 45 - Espectros Raman da amostra Ag 0,25, antes e após a imersão em SBF. ...	49
Figura 46 - Espectros Raman da amostra Ag 0,50, antes e após a imersão em SBF. ...	50
Figura 47 - Espectros Raman da amostra Ag 0,75, antes e após a imersão em SBF. ...	50
Figura 48 - Espectros Raman das amostras Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75 imersas em SBF por 21 dias.	52
Figura 49 - Padrão de referência para a HAp e FA. Fonte: Adaptado de Montazeri <i>et al</i> (2011), [138].	53

Figura 50 - FTIR das amostras Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75 depois da imersão em SBF durante 21 dias.....	53
Figura 51 - Viabilidade celular de células osteoblásticas MC3T3E1 em função de diferentes concentrações dos vidros sintetizados.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Algumas utilizações de Biomateriais. Fonte: Adaptado de Behera 2014, [38].	3
Tabela 2. Biomateriais em órgãos. Fonte: Adaptada de Behera 2014, [38]... ..	4
Tabela 3. Concentrações iônicas do plasma sanguíneo e de soluções SBFs. Fonte: Adaptado de Kokubo e Takadama 2006, [75].....	9
Tabela 4. Composição (% peso (wt) e % molar (mol) e códigos das amostras sintetizadas).	25
Tabela 5. Temperaturas de fusão e tratamento térmico.....	26
Tabela 6. Atribuições das bandas dos espectros Raman para as amostras Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75, antes e após imersão em SBF nos períodos (3, 7, 14 e 21 dias).. ...	51
Tabela 7. Atribuições das bandas dos espectros FTIR para as amostras (Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75) após imersão em SBF pelo período de 21 dias.....	54
Tabela 8. Resultados de CIM e CBM para os vidros sintetizados..	55

Sumário

Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 – Fundamentação teórica	3
2.1. Biomateriais: uma visão geral	3
2.1.1. Classificação dos Biomateriais	4
2.2. Apatitas	5
2.2.1. Hidroxiapatita	6
2.2.2. Fluorapatita	6
2.3. Vidros Bioativos	7
2.4. SBF (<i>Simulated Body Fluid</i>)	8
2.5. Bioatividade de vidros boratos	9
2.6. O papel da prata na bioatividade de vidros	10
2.7. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)	12
Capítulo 3 – Revisão bibliográfica	13
3.1. Comportamento do pH da solução SBF durante a dissolução de vidros dopados com prata	13
3.2. Análise da bioatividade de vidros dopados com prata por meio da técnica de difração de raios-x (DRX)	15
3.3. Análise da bioatividade de vidros dopados com prata por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	17
3.4. Análise da bioatividade de vidros dopados com prata por Espectroscopia Raman	20
3.5. Análise da citotoxicidade e das propriedades antibacterianas de vidros dopados com Ag₂O	21
Capítulo 4 - Materiais e Métodos	25
4.1. Preparação das Amostras	25
4.2. Técnicas de caracterização	26
4.2.1. Caracterização Estrutural	26
4.2.1.1. Difração de raios-X	26
4.2.1.2. Medida de densidade	28
4.2.1.3. Espectroscopia Raman	29
4.2.1.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	30
4.2.2. Propriedades mecânicas	31
4.2.2.1. Microdureza Vickers	31
4.2.3. Bioatividade	32
4.2.3.1. Testes <i>in vitro</i> em SBF	32

4.2.3.2	<i>Medidas de pH da solução SBF</i>	33
4.2.3.3	<i>Análise da atividade de citotoxicidade dos vidros sintetizados</i>	33
4.2.3.4	<i>Análise da atividade antibacteriana dos vidros sintetizados</i>	34
Capítulo 5 – Resultados e Discussão		35
5.1	Propriedades físicas das amostras antes da imersão em SBF	35
5.1.1	Difração de raios-X (DRX)	35
5.1.2	Densidade e volume molar	36
5.1.3	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	37
5.1.4	Microdureza Vickers	38
5.2	Propriedades físicas das amostras depois da imersão em SBF	39
5.2.1	Análise da bioatividade das amostras tratadas em SBF	39
5.2.2	Medidas de pH	41
5.2.3	Difração de raios X após imersão das amostras em SBF	42
5.2.4	Espectroscopia Raman das amostras antes e após imersão em SBF	47
5.2.5	Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier	52
5.3.	Análise das propriedades antibacterianas e de citotoxicidade das amostras. ..	55
5.3.1	Atividade antibacteriana das amostras estudadas	55
5.3.2	Atividade de células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas em meio contendo os vidros estudados.	55
6	CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS		58

Capítulo 1 - Introdução

Os avanços científicos e tecnológicos contribuem significativamente para o aumento da expectativa de vida da população. Danos nos tecidos e doenças degenerativas estão entre os problemas de saúde mais frequentes, que podem levar à falência dos órgãos e à morte [1]. Diante disto, a busca por materiais capazes de reparar tecidos lesionados é contínua [2]. Todavia, esses materiais devem apresentar desempenho biológico satisfatório em sua aplicação particular [3–7]. E, considerando a complexidade dos órgãos humanos, os biomateriais devem preferencialmente apresentarem biocompatibilidade e bioatividade [8–10]. Os biomateriais são todos os materiais sintéticos ou naturais utilizados como substitutos ou reparadores de tecidos vivos [3–7].

A utilização dos vidros como biomaterial surgiu com o desenvolvimento do *Bioglass*[®] 45S5 ($45\text{SiO}_2\text{-}6\text{P}_2\text{O}_5\text{-}24,5\text{CaO-}24,5\text{NaO}_2$, %peso) por Larry L. Hench, no final da década de 60 [11]. A partir de então, numerosos estudos de síntese, processamento e aplicações de vidros bioativos, na engenharia de tecidos, vem sendo realizados [1,12,13]. Quando um vidro bioativo é imerso em solução aquosa de fosfato, como, por exemplo, fluidos corpóreos simulados, ocorrem reações de trocas iônicas entre a superfície do vidro e a solução. Esse processo é responsável pela formação de uma camada biologicamente ativa de hidroxiapatita carbonatada na superfície do vidro. Devido à similaridade com a fase mineral do osso, a hidroxiapatita promove a atividade osteoblástica e consequentemente a osteointegração [3,14,15].

Diferente dos materiais metálicos, os vidros bioativos não necessitam ser substituídos após o implante [16], porque proporcionam restituição do tecido ósseo lesionado. Como exemplo, podem ser utilizados na reparação de válvulas cardíacas e no tratamento de tumores [17].

A composição química dos vidros bioativos tem um papel significativo na determinação de suas propriedades [1]. A maioria dos vidros bioativos estudado tem a sílica como principal formadora de rede vítrea [18–21]. Esses materiais vítreos apresentam potencialidades de aplicações na biomedicina, porém, possuem baixa taxa de solubilidade, o que limita a compatibilidade com tecidos biológicos [18]. Desse modo, compostos boratos que também são formadores da rede vítrea estão sendo muito estudados atualmente [22,23]. Os vidros boratos mostram-se mais bioativos que os silicatos porque possuem maior taxa de conversão em HAp [22,24–26].

Um dos maiores problemas na interação entre o biomaterial e o organismo é a infecção bacteriana, pois pode provocar efeitos negativos como falha de regeneração de tecidos, a necessidade de cirurgia extra, hospitalização prolongada e até a morte [1,27]. A incorporação de elementos metálicos específicos, tal como a prata (Ag), à estrutura dos vidros bioativos, pode levar à liberação dessas espécies em ambiente biológico e induzir propriedades antibacterianas [20,27,28].

Recentemente, alguns trabalhos têm sido voltados para o estudo dos efeitos bioativos, bactericidas e citotóxicos de vidros bioativos dopados com prata [27–29], cujas propriedades antibacterianas são conhecidas há muito tempo [30]. Na forma iônica, a prata exibe ação antibacteriana e antiviral [31–35]. Mostra-se ainda vantajosa em relação ao uso de antibióticos, devido à quebra de resistência de microrganismos patógenos [30]. A adição de Ag_2O aos vidros bioativos ajuda a minimizar riscos de contaminações microbianas por meio da potencial atividade bactericida de íons Ag^+ [27]. Assim, este trabalho teve como objetivo, realizar a síntese e caracterização de vidros boratos investigando a influência da concentração de Ag_2O , nas propriedades físicas, na bioatividade, *in vitro*, incluindo a formação de apatita, citotoxicidade e propriedades antibacterianas desses materiais.

Capítulo 2 – Fundamentação teórica

2.1. Biomateriais: uma visão geral

A história dos biomateriais não é recente. A aplicação desses dispositivos no reparo ou substituição de partes do corpo remonta a antiguidade. Os egípcios, por exemplo, adaptavam peças de madeira para substituírem algum membro amputado. Cientistas da universidade de Manchester pesquisaram acerca do dedão do pé, feito de madeira e couro, de uma múmia encontrada no Egito, no intuito de descobrir se esse artefato realmente servia de prótese e auxiliava o caminhar. O objeto data de 950 a 710 a.C [36].



Figura 1 - Dedo protético descoberto no Egito. **Fonte:** Adaptado de Brier *et al* (2015), [37].

Com o passar dos séculos, os biomateriais foram aperfeiçoados e os avanços das técnicas cirúrgicas e de métodos de esterilização proporcionaram a aplicação desses materiais de muitas maneiras. De acordo com estimativas, há cerca de 300 mil tipos de biomateriais que podem exercer diversas funções no organismo [6]. A Tabela 1 descreve alguns exemplos e funções de biomateriais. Na Tabela 2 encontram-se descritos exemplos da utilização de biomateriais em diferentes partes do corpo humano.

Tabela 1. Algumas utilizações de Biomateriais. **Fonte:** Adaptada de Behera 2014, [37].

Funções	Exemplos
Substitutos de partes doentes ou danificadas	Artroplastia de quadril, máquina de diálise renal;
Auxiliares	Suturas, placas ósseas e parafusos;
Melhoradores de funções	Marcapassos cardíacos, lentes intraoculares;
Corretores de anormalidades funcionais	Marcapassos cardíacos;
Corretores estéticos	Mamoplastia de aumento;

Tabela 2. Biomateriais em órgãos. **Fonte:** Adaptada de Behera 2014, [37].

Órgãos	Exemplos
Coração	Marcapassos, válvulas cardíacas artificial, coração artificial;
Pulmão	Máquina de oxigênio;
Olho	Lente intraocular;
Ouvido	Implante de cóclea;
Ossos	Placas ósseas, hastes intramedulares;
Rins	Máquina de diálise renal, bexiga artificial.

Para que um material seja utilizado em aplicações biomédicas, ele deve necessariamente ser biocompatível [8–11,38]. A biocompatibilidade é a capacidade de um material sintético ser compatível com órgãos ou tecidos vivos. Diante disto, após o implante, o biomaterial não poderá induzir nenhuma reação adversa ao organismo. Propriedades mecânicas, como resistência à fraturas, flexibilidade e elasticidade, também são características importantes de um biomaterial biologicamente ativo. Além disso, deve-se considerar também resistência do material à corrosão [39–42].

Os materiais implantáveis podem apresentar toxicidade quando ocorre morte celular na região que recebeu o implante. Quando um material é bioativo as células saudáveis que estão ao seu redor se multiplicam, ocorrendo assim, sua substituição por tecido vivo [43].

2.1.1. Classificação dos Biomateriais

Os biomateriais são divididos em dois grupos, sendo eles: naturais e sintéticos. Os biomateriais naturais são dispositivos de origem animal ou vegetal que apresentam similaridades aos componentes do corpo humano [2,37,41]. Os biomateriais sintéticos são classificados de acordo com suas composições químicas. Dividem-se em: metais, cerâmicos/vítreos, polímeros e compósitos [31].

Por apresentarem elevado desempenho mecânico, resistência à fadiga e à fratura, os materiais metálicos são amplamente utilizados como componentes estruturais para a fixação de fraturas e na substituição parcial ou total de tecidos rígidos [6]. Na odontologia, os metais são aplicados principalmente na fabricação de aparelhos e implantes ortodônticos [44]. Embora as ligas metálicas sejam produzidas em larga escala com finalidade médica, poucas são biocompatíveis. Esses materiais além de

sofrerem desgastes com o passar do tempo, são susceptíveis à corrosão o que ocasiona a liberação de íons nocivos ao organismo [45]. As ligas mais utilizadas para fins médicos e odontológicos são: as ligas de titânio, cobalto-cromo, níquel e os aços inoxidáveis [6].

Os vidros bioativos e as biocerâmicas geralmente são bem aceitas pelo organismo, porque apresentam características similares aos componentes minerais do osso. Esses dois tipos de materiais, possuem alto grau de biocompatibilidade com o meio fisiológico e com tecidos rígidos, o que favorece a osteointegração. No entanto, o uso das biocerâmicas e dos vidros bioativos em aplicações que requerem grande quantidade de carga pode ser desfavorável por apresentarem rigidez e fragilidade [46].

Os biomateriais poliméricos também encontram uma gama de aplicações na medicina e na odontologia [47–49]. Podendo ser utilizados tanto em aplicações temporárias (suturas), quanto em aplicações permanentes (componentes para órgãos, enxertos, cirurgias plásticas e odontológicas) [37,50]. As vantagens do emprego de polímeros como materiais bioativos são: apresentam excelente ductilidade e flexibilidade, baixa densidade e resistência à corrosão, custo de produção relativamente pequeno e facilidade de fabricação [31]. As desvantagens são: degradação (quando exposto a meios fisiológicos) e baixa resistência mecânica. A degradação de um material polimérico com o passar do tempo pode torná-los biologicamente tóxico [51].

Os biocompósitos são compostos de dois ou mais tipos de materiais diferentes, como por exemplo, metal e cerâmica e/ou polímero e cerâmica [52]. Essa combinação tem por finalidade aproveitar as propriedades de cada um, ampliando o espectro de aplicabilidade [52]. As principais aplicações dos compósitos na medicina são: próteses, dispositivos para fixação de fraturas e cimentos ósseos, entre outros. Como vantagens, os compósitos apresentam resistência à corrosão, elevada força de tensão e biocompatibilidade. Uma das principais desvantagens exibida por essa biocerâmica é a sua fragilidade [52,53].

2.2. Apatitas

A apatita é uma espécie de cerâmica de fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH},\text{F},\text{Cl})_2$ que pertence à família dos fosfatos [54]. Naturalmente, é encontrada em rochas ígneas, metamórficas e sedimentares, sendo um dos minerais mais abundantes da crosta terrestre [54]. Além disso, é o componente principal dos ossos e do esmalte dos dentes

componente principal dos ossos e do esmalte dos dentes. As apatitas mais comuns são a hidroxiapatita e fluoroapatita e encontram diversas aplicações da medicina ortopédica e odontologia [54].

2.2.1. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HAp) é uma cerâmica bioativa de fosfato de cálcio que possui morfologia e composição muito semelhante ao tecido ósseo humano. Representa cerca de 30 a 70% da massa dos dentes e ossos. De formulação química $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ e composição teórica de 39,68 % em peso de cálcio (Ca) e 18,45% em peso de fósforo (P), a HAp difere de outros compostos de fosfatos de cálcio porque exibe elevada taxa de estabilidade em fluidos corpóreos. Possui uma estrutura cristalina hexagonal, grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$, dimensões da célula unitária $a = b = 9,42\text{\AA}$ e $c = 6,88\text{\AA}$ [55–57].

Por apresentar bioatividade, biocompatibilidade e ser um material osteocondutor, a hidroxiapatita sintética é bastante utilizada na biomedicina como enxertos e revestimentos para promover o crescimento ósseo em implante protéticos [58]. Possui também elevada habilidade de absorção ou adsorção de moléculas, o que a torna um suporte de alta qualidade para atuar no controle de liberação de medicamentos para tratamento de tumores ósseos. [55,56,59].

2.2.2. Fluorapatita

A fluorapatita ou fluoroapatita (FA), assim como a hidroxiapatita é uma cerâmica de fosfato de cálcio de fórmula química $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$ e nomenclatura fluorofosfato de cálcio. Possui estrutura cristalina hexagonal, grupo espacial $\text{P6}_3/\text{m}$ e dimensões $a = b = 9,3684\text{\AA}$ e $c = 6,8841\text{\AA}$ [60]. É encontrada em variadas concentrações na dentição de tubarões e outros peixes. Está presente também nos dentes humano que foram expostos a íons de flúor por meio da fluoretação da água ou do creme dental [61]. Com um pH crítico de 4,5 a fluorapatita possui propriedades bacteriostáticas atuando no combate da *Streptococcus mutans*, bactéria responsável pela cárie dentária [48]. Estudos prévios, mostram que a FA, em sua forma pura, possui excelente estabilidade química e biocompatibilidade similar à HAp, no que condiz a atividade de osteointegração. A liberação de F^- ajuda a proliferação e a diferenciação de células osteoblásticas [62,63].

2.3. Vidros Bioativos

O primeiro vidro bioativo, conhecido como *Bioglass*® 45S5, foi sintetizado por Larry Hench, professor da Universidade da Flórida, entre o final da década de 60 e início da década de 70 [3,15,64]. Esse vidro apresentava em sua composição: 45% sílica (SiO_2), 24,5% óxido de cálcio (CaO), 24,5% óxido de sódio (Na_2O) e 6% pentóxido de sódio (P_2O_5), em %wt [11]. Tal composição foi selecionada para fornecer grande quantidade de CaO com uma pequena quantidade de P_2O_5 à matriz Na_2O - SiO_2 [11,65]. O diagrama ternário de Hench, Figura 2, esboça o comportamento biológico dos vidros silicatos em função da composição.

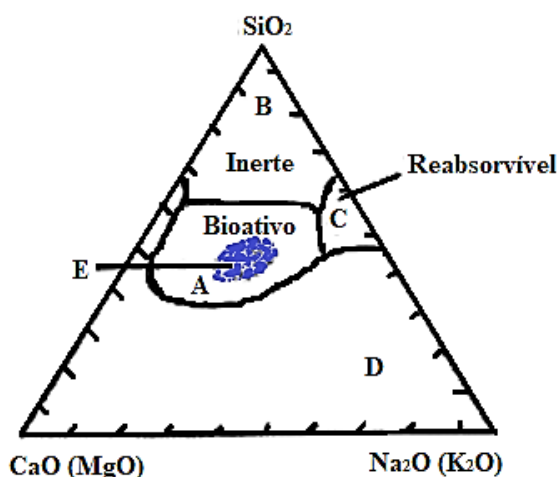


Figura 2 - Diagrama ternário de Hench para o 45S5. **Fonte:** Adaptado de Gutierrez *et al*, (2006) [16].

Segundo esse diagrama, vidros pertencentes à zona A estabelecem união com o osso; os vidros da região B tem comportamento bioinerte, ou seja, não há ligação ou rejeição com o tecido hospedeiro; em C encontram-se os que são reabsorvíveis; aqueles que pertencem a D não tem interesse biomédico; na região E estão as composições que possuem maior índice de bioatividade, ligam-se tanto aos tecidos ósseos quanto aos tecidos moles [11,16,17].

O nome biovidro é utilizado apenas para o *Bioglass*® 45S5 e não como um termo geral para outros tipos de vidros bioativos [21]. Para a realização de testes *in vitro*, o 45S5 era imerso em solução de água destilada tamponada com tris-hidroximetil-amino-metano e ácido clorídrico com pH de 7,25 a uma temperatura de 37 °C. Esses testes mostraram que em um breve intervalo de tempo, ocorria uma reação superficial no 45S5 que era composta de múltiplos estágios resultando na formação de uma camada de

apatita de hidróxi-carbonato biologicamente ativa. Após análises foi constatada que essa fase apresentava grande similaridade estrutural e química à estrutura mineral óssea [66]. Já os testes *in vivo*, demonstraram que a regeneração óssea produzida pelo *Bioglass*[®] 45S5 era mais rápida e de maior qualidade se comparada com a hidróxiapatita sintética [66,67].

O primeiro uso cirúrgico bem sucedido do *Bioglass*[®] 45S5 foi em substituição aos ossículos do ouvido médio (situado entre a membrana do tímpano e as estruturas do ouvido interno) para tratamento da perda auditiva condutiva [11]. Após o implante, o biovidro é dissolvido em ambientes fisiológicos e ativa os genes que controlam a osteogênese, o que favorece a produção e o crescimento de ossos naturais por meio da formação de uma camada de hidróxicarbonato de apatita carbonatada, HCA [23].

O desenvolvimento do *Bioglass*[®] 45S5 permitiu o avanço de pesquisas e sínteses de outros tipos de vidros, com diferentes formulações, para diferentes aplicações na medicina [23,64,68–70]. Atualmente os vidros bioativos basicamente dividem-se em três grupos: os silicatos (baseados em SiO₂) que inclui o 45S5; os boratos (baseados em B₂O₃) e os fosfatos (baseados em P₂O₅) [68]. Os vidros bioativos apresentam vantagens em relação aos outros tipos de biomateriais porque possuem rápida taxa de reação superficial. Entretanto, exibem desvantagens como baixa tenacidade à fratura e fraqueza mecânica [66].

2.4. SBF (*Simulated Body Fluid*)

Um material é bioativo quando ocorrer, após o implante, a formação de uma camada de hidróxiapatita em sua superfície [71]. Essa camada de HAp irá promover forte ligação entre o tecido ósseo e o material implantado. A bioatividade e o tempo para que ocorra interação entre o implante e o tecido ósseo são inversamente proporcionais, ou seja, quanto maior for a bioatividade do material, menor é o tempo de adesão do organismo ao implante [71].

Para avaliar as mudanças superficiais que ocorrem em vidros ou cerâmicas bioativas, no início dos anos 90, Kokubo juntamente com seus colaboradores desenvolveram um simulador de fluido corpóreo, acelular, denominado SBF, do Inglês *Simulated Body Fluid*, que apresentava concentrações iônicas e de pH próximos aos do plasma sanguíneo [72,73]. Os testes *in vitro* de bioatividade realizados com o SBF apresentavam grandes similaridades com os testes *in vivo* feitos em cobaias. Diante

disto, a utilização dessa substância permitiu a diminuição do número de animais sacrificados [71].

A Tabela 3 apresenta a comparação das composições químicas entre o plasma sanguíneo e a solução SBF de Kokubo e Takadama. Além de formulações corrigidas e revisadas de SBFs propostas por outros pesquisadores [74].

Tabela 3 - Concentrações iônicas do plasma sanguíneo e de soluções SBFs. **Fonte:** Adaptado de Kokubo e Takadama 2006, [74].

	Concentração iônica (mmol)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma Sanguíneo Humano	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF Original	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0,5
SBF Corrigido (c-SBF)	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
SBF Revisado (r-SBF)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

De acordo com a Tabela 3, as concentrações iônicas do plasma sanguíneo e do r-SBF são similares. Já o SBF original e o c-SBF são ricos em íons Cl⁻ e pobres em HCO₃ [74].

Para que a solução SBF seja preparada, certos cuidados devem ser seguidos. Os recipientes de preparo devem ser todos de plástico, sem ranhuras e de superfície lisa. Recipientes de plástico que apresentem ranhuras, podem induzir a precipitação de HAp resultando em um falso positivo. Além disso, a presença de contaminantes ou o mau preparo da solução pode inutilizá-la [71].

2.5. Bioatividade de vidros boratos

Até a descoberta da capacidade de um material vítreo promover atividade de osteocondução por meio de sua bioatividade, nenhum outro material sintético demonstrava-se suficientemente bioativo para formar ligação óssea sem que apresentasse qualquer tipo de reação contrária ao corpo humano [17]. Nos últimos anos, as pesquisas voltadas para os vidros bioativos buscam desenvolver materiais que, além de possuírem excelentes propriedades bioativas, possuam também taxas de degradação controlada [18]. Os resultados de alguns estudos mostraram que o *Bioglass*® 45S5, quando em contato com fluidos corpóreos, exibe taxa de conversão em apatita lenta e incompleta. Diante dessas limitações, vários outros tipos de vidros bioativos com

diferentes composições químicas vêm sendo pesquisados, entre eles estão os vidros a base de boro cujo principal formador de rede é o B_2O_3 em vez de SiO_2 [18,75].

O papel do boro ainda não é bem conhecido na dieta humana, entretanto, esse elemento exerce importantes funções nos processos da vida, como por exemplo, na embriogênese, no crescimento e na manutenção dos ossos, no sistema imunológico e nas habilidades psicomotoras [76]. Os vidros boratos possuem elevada bioatividade devido a sua baixa durabilidade química e taxas de dissolução rápida. Com isso, apresentam maior facilidade de conversão em hidroxiapatita que os vidros silicatos bioativos. Além disso, apresentam efeitos osteogênicos, permitindo a adesão celular (osteoblastos), o crescimento, regeneração e a manutenção dos ossos [13,68,77,78].

Algumas pesquisas, mostram que a substituição parcial ou total de SiO_2 por B_2O_3 eleva a capacidade dos vidros bioativos de promoverem regeneração óssea e os tornam mais susceptíveis à dopagem com outros elementos, tais como Zn, Cu, F, Sr, Mn e Ag [79].

2.6. O papel da prata na bioatividade de vidros

Por muito tempo acreditou-se que nenhum tipo de material metálico poderia ligar-se ao osso e promover atividades bioativas [80]. Entretanto, os resultados de pesquisas realizadas com titânio mostraram que esse metal possui elevada habilidade de formar ligação óssea, estabelecendo osteointegração. Desde então, estudos envolvendo a adição de metais aos componentes dos vidros bioativos tornaram-se corriqueiros [80].

Os materiais para implantes fabricados exclusivamente de metal, como, por exemplo, as próteses de titânio, possuem boa integridade estrutural, porém apresentam tempo de vida relativamente baixo. Além disso, podem acarretar a formação de tecido fibroso sobre o implante ocasionando a movimentação da prótese e como consequência disto reações inflamatórias [80].

Os vidros bioativos são materiais prósperos no que se diz respeito à aplicação de implantes dentários e de ossos, porém não possuem força e dureza suficientes, o que exclui a possibilidade de uso de implantes unicamente de vidro [16]. Desse modo, um material vítreo cuja finalidade seja a utilização como implante deve, necessariamente, possuir características de bom desempenho físico e compatibilidade química. De acordo com Troczynski [81], a adição em pequenas quantidades de certos metais de transição,

tais como, Cu, Zn, Fe, Ti, Au e Ag aos vidros bioativos eleva a performance mecânica do vidro (dureza e fadiga) por meio da dispersão de partículas metálicas.

Desenvolver um vidro bioativo, que além da capacidade mecânica, apresente combinações de propriedades como bioatividade, biocompatibilidade, elevada atividade osteogênica e habilidade de combater infecções, por meio da liberação de agentes antibacterianos, tornou-se um desafio no campo da engenharia de tecidos [9]. Para reduzir a incidência de infecções pós-operatória, muitos pesquisadores buscam desenvolver materiais que contenham substâncias antibacterianas, já que certos tipos de agentes bacterianos possuem elevada habilidade e rapidez de se colonizarem na superfície de biomateriais, aumentando substancialmente os riscos de infecções. Entre tais substâncias antibacterianas encontra-se a prata, cujos efeitos oligodinâmicos e a atividade antibacteriana são conhecidos desde a antiguidade [9,45,82].

O mecanismo do efeito antibacteriano da prata ainda não é completamente conhecido [1,9]. Mas, sabe-se que a liberação de íons de Ag^+ é responsável pela ação antimicrobiana desse metal [22,32]. Estudos prévios mostram que a propriedade antibacteriana da prata está associada à condensação e inibição do DNA e RNA bacteriano devido à ligação de íons Ag^+ com essas moléculas [83,84].

Feng *et al* [9], investigou por meio de microscopia eletrônica combinada com microanálises de raios-X, o mecanismo de inibição de íons para as bactérias: Gram-negativa *Escherichia coli* (*E. coli*) e Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Nas observações feitas por Feng *et al*, foi constatado certa distinção entre o mecanismo de atuação dos íons de Ag^+ nessas duas bactérias. A *S.aureus* possui um sistema de defesa muito mais forte que a *E.coli*, pois sua parede celular é constituída de uma espessa camada de peptidoglicano, uma espécie de polímero formado por aminoácidos e açúcares, cuja função é proteger o citoplasma [9]. Desse modo, a parede celular mais espessa protege o meio interno da penetração dos íons de Ag^+ [9].

Embora a liberação de prata a partir da estrutura do vidro seja um fator desejável para induzir efeitos antibacterianos, altas concentrações iônicas desse metal podem induzir efeitos citotóxico ao organismo [1]. Portanto, é necessário encontrar uma janela de concentração de Ag que promova a atividade antibacteriana e que não seja tóxica às células [1,32,85]. De acordo com Chernousova [32], enquanto um range de concentração de Ag de 0,1-20 mg/L é eficaz contra organismos unicelulares, um range de concentração ao redor de 1-10mg/L induz efeitos citotóxicos às células eucarióticas.

Dependendo do tipo de microrganismo ou célula, esses valores podem ser diferentes, ou seja, mudando o ambiente biológico tais valores podem sofrer variação [32].

Vidros com baixas concentrações de Ag^+ também podem apresentar toxicidade devido à substituição de íons de Na^+ da superfície do vidro por íons de Ag^+ [1,86]. Além disso, a precipitação de cristais de AgCl que podem ocorrer quando a solução entra em contato com fluidos corpóreos podem induzir efeitos citotóxicos às células osteoblásticas [1,86]. Luo *et al* [34], em seu trabalho, mostrou que a incorporação de 0,75 e 1% de Ag_2O em peso a vidros boratos não produziu nenhum efeito tóxico às células osteoblásticas e fibroblásticas. No entanto, vidros dopados com 2% em peso de Ag_2O apresentaram toxicidade [34].

2.7. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a mais baixa concentração de um composto antimicrobiano que irá inibir visivelmente o crescimento de certo tipo de microrganismo após um período de incubação, que geralmente é de 24 horas. Já a concentração bactericida mínima (CBM) é a concentração mais baixa de agente antimicrobiano que irá “matar” o microrganismo [87]. Portanto, a CIM e a CBM são dois importantes parâmetros para determinar as propriedades bacteriostática e bactericida de um material, respectivamente [1]. As CIMs são usadas pelos laboratórios de diagnóstico principalmente para confirmar a resistência, mas na maioria das vezes como uma ferramenta de pesquisa para determinar a atividade *in vitro* de novos antimicrobianos [87].

Capítulo 3 – Revisão bibliográfica

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica objetivando traçar um quadro conceitual e teórico, que possibilitará a discussão dos dados obtidos nesta pesquisa.

3.1. Comportamento do pH da solução SBF durante a dissolução de vidros dopados com prata

Nos últimos anos, vários estudos sobre uma ampla variedade de sistemas vítreos dopados com prata estão sendo reportados na literatura. O grande grau de interesse nesses materiais é motivado por suas inúmeras aplicações como biomateriais. Kamal [88], analisa a bioatividade, *in vitro*, de uma série de vidros boratos dopados com 0, 1, 2, 4 e 10% de Ag_2O , em peso. Os resultados das medidas de pH em função do tempo de imersão das amostras vítreas em SBF, estão exibidos na Figura 3.

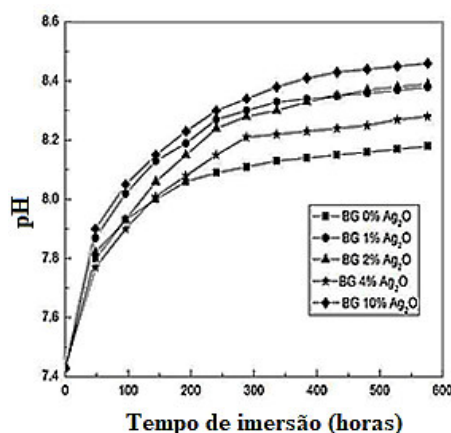


Figura 3 - Valores de pH do SBF em diferentes intervalos de tempo. **Fonte:** Adaptado de Kamal (2014), [88].

Por meio dos resultados, verifica-se que durante o período de imersão, o comportamento neutro-alcalino do pH do SBF é análogo para todas as amostras. No intervalo de 0 a 50 h, os valores de pH aumentaram linearmente, tendendo à saturação

no decorrer do período de imersão. Esse aumento da alcalinidade é devido ao sistema de troca iônica de íons alcalinos da superfície dos vidros com os íons H^+ , H_3O^+ e OH^- da solução.

Em outro trabalho, Kamal *et al* [89], avalia o comportamento do pH de soluções SBF durante o período de imersão de vidros pertencentes ao sistema B_2O_3 - Na_2O - CaO - P_2O_5 dopados com 2%, em peso, de Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni e Cu. A Figura 4, exibe o gráfico de pH da solução SBF durante o período de imersão dos vidros. Observa-se também um aumento linear até aproximadamente o décimo dia de imersão e a partir de então os valores tornam-se constates, o que indica a saturação do fluido.

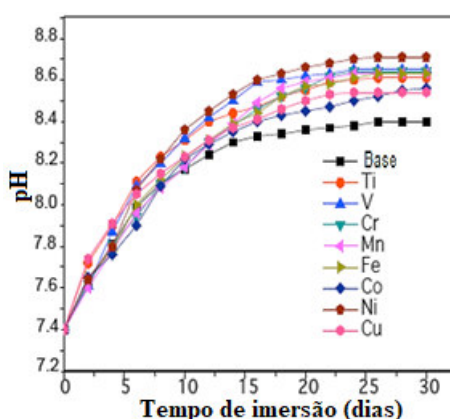


Figura 4 - Variação do pH da solução SBF contendo amostras de vidro boratos dopados com Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni e Cu. **Fonte:** Adaptado de Kamal e Abdelghany (2015), [89].

Wang *et al* [90], investigou o comportamento do pH da solução SBF durante o período de sessenta dias de imersão de vidros borossilicatos sem adição de Ag (BG) e com 0,05, 0,5 e 1% Ag_2O , em peso de Ag_2O . A Figura 5 apresenta o gráfico do pH do SBF em função do tempo de imersão dos vidros estudados.

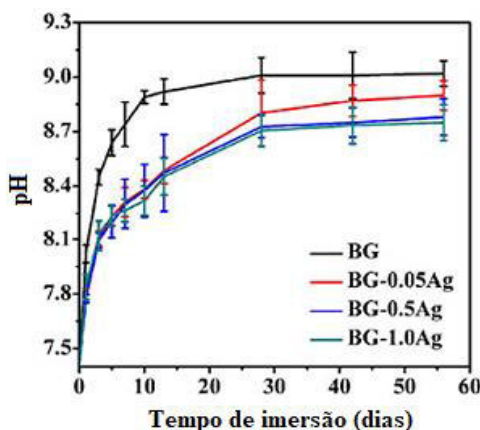


Figura 5 - Variação do pH da solução SBF contendo amostras de vidro borossilicatos dopados com prata. **Fonte:** Adaptado de Wang *et al* (2015), [90].

Nas duas primeiras semanas de imersão, o pH cresce linearmente e tende à saturação a partir da segunda semana. Deste modo, conclui-se que há uma maior atividade de trocas iônicas entre os íons alcalinos pertencentes à rede do vidro bioativo e os íons presentes no fluido nas primeiras semanas de imersão.

3.2. Análise da bioatividade de vidros dopados com prata por meio da técnica de difração de raios-x (DRX)

Ciraldo *et al* [91], investigou pela técnica de DRX a conversão, em hidroxiapatita, de um vidro silicato pertencente ao sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ dopado com 0,8%, em mol, de Ag_2O . A Figura 6 exibe os difratogramas para a amostra nomeada Ag-MBG, após imersão em SBF durante 4 h, 1 e 3 dias.

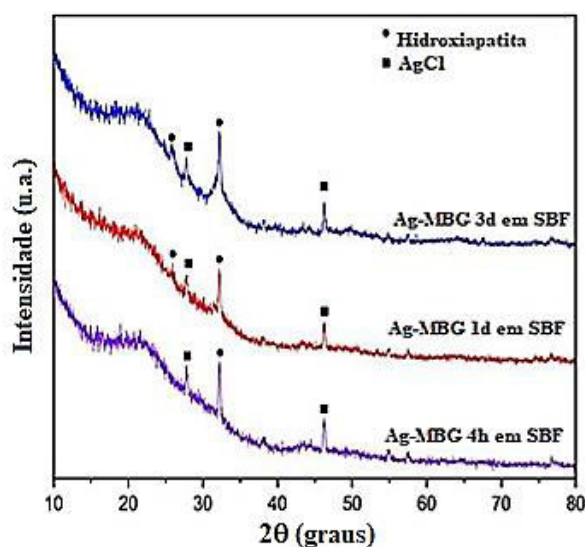


Figura 6 - DRX para a amostra do vidro Ag-MBG, imersa em solução SBF por 4h, 1d e 4d. **Fonte:** Adaptado de Ciraldo *et al* (2018), [91].

Os picos estreitos localizados ao redor de 28° e 46° , presentes em todos os difratogramas, estão associados ao AgCl devido à reação de íons de Ag^+ liberados do vidro com íons Cl^- do SBF. Os picos presentes em 26° e 32° são atribuídos à conversão do material em HAp.

Em outro trabalho, Sharifianjazi *et al* [92] investigou os efeitos da adição de 2, 4 e 6 mol% de Ag_2O na bioatividade de vidros pertencentes ao sistema $\text{SiO}_2\text{ - CaO - P}_2\text{O}_5$. Os difratogramas dessas amostras após 7 dias de imersão em SBF estão exibidos na Figura 7. Observa-se que o aumento da dopagem de Ag_2O favoreceu o incremento na

intensidade e na quantidade de picos relativos à prata. Isso se deve, ao aumento de prata metálica na estrutura do vidro. Verifica-se ainda que os picos de hidroxiapatita sofrem decréscimo da BG-2Ag₂O à BG-6Ag₂O.

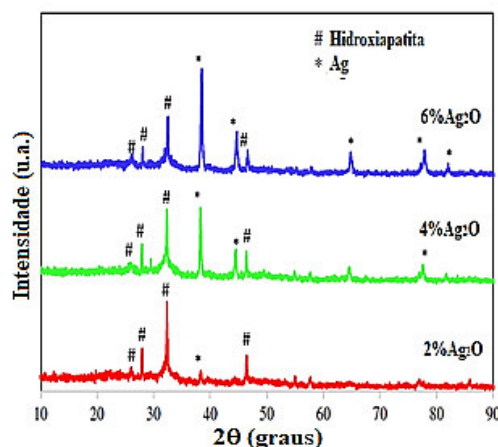


Figura 7– Difratomogramas das amostras BG-2Ag₂O, BG-4Ag₂O e BG-6Ag₂O após 7 dias de imersão em SBF. **Fonte:** Adaptado de Sharifianjazi *et al* (2017), [92].

Wang *et al* [90], demonstra por meio de DRX que a adição de uma baixa quantidade de Ag₂O não afetou a formação de apatita (hidroxiapatita) em vidros borossilicatos. Na Figura 8 são mostrados os espectros de raios-X para uma amostra denominada BG-1Ag dopada com 1% em peso de Ag₂O no período pré-imersão (0 dias) e pós-imersão (14 e 90 dias).

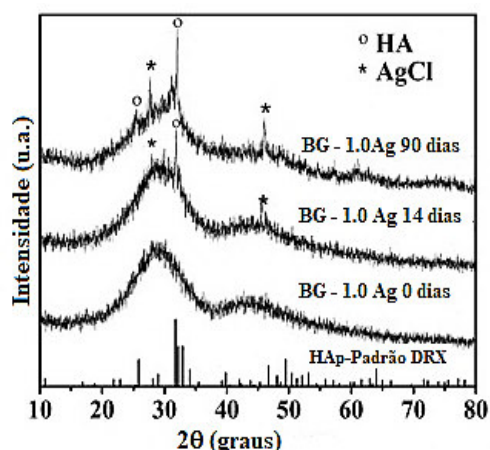


Figura 8 - Espectros de DRX para a amostra BG-1.0Ag antes e após imersão em SBF por 14 e 90 dias e padrão de DRX referência para a hidroxiapatita cristalina. **Fonte:** Adaptado de Wang *et al* (2015), [90].

De acordo com o padrão de referência de DRX para HAp, os espectros das amostras BG-1.0Ag imersas na solução SBF por 14 dias e 90 dias, indicam a conversão do vidro em HAp. Os pequenos picos localizados em 28° e 46° são correspondentes ao AgCl.

3.3. Análise da bioatividade de vidros dopados com prata por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Por meio da técnica de FTIR, Krishnamacharyulu *et al* [93], examinou a influência da variação de uma pequena quantidade (2 %mol) de Ag_2O na bioatividade do vidro pertencente ao sistema B_2O_3 - SiO_2 - P_2O_5 - Na_2O - CaO . A Figura 9 apresenta o espectro FTIR (modo transmitância, entre a faixa de 400 a 4000 cm^{-1}) e as atribuições das bandas, antes da imersão do vidro em SBF.

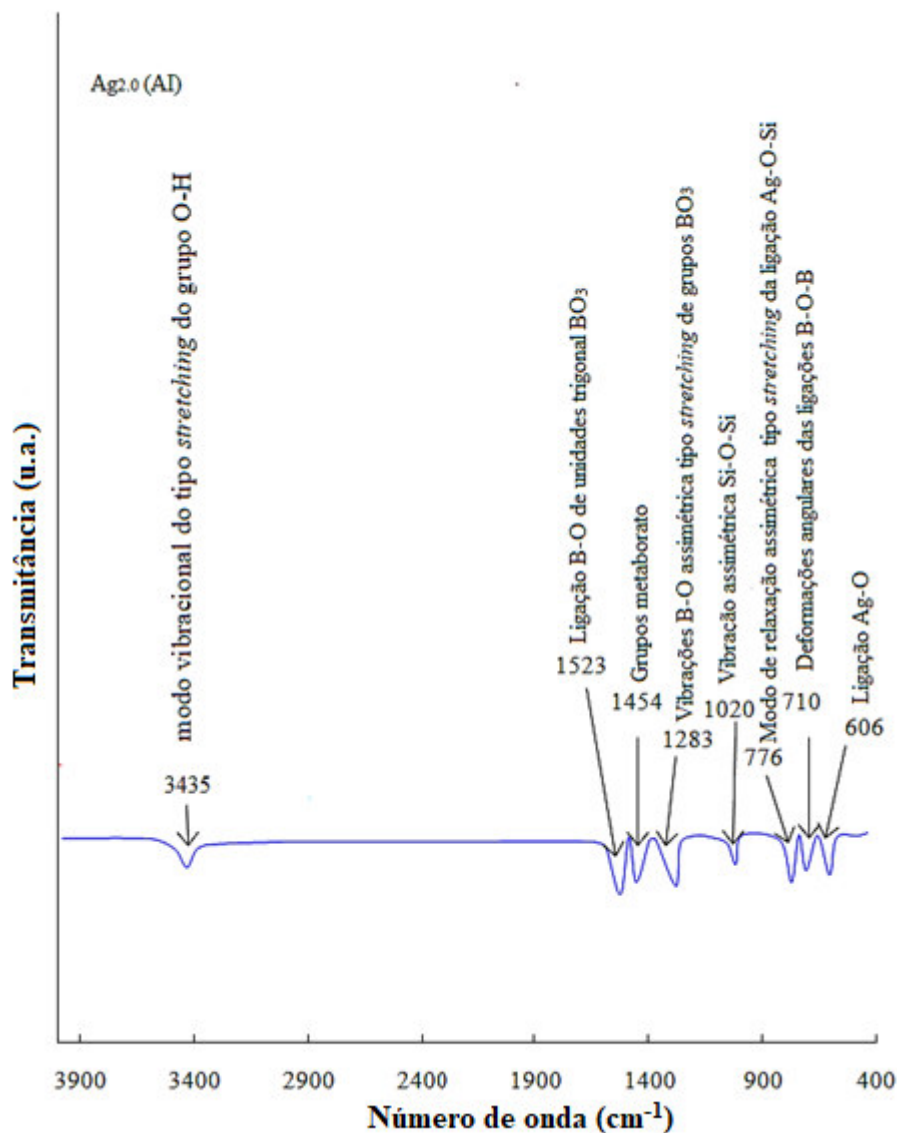


Figura 9 - Espectro FTIR para a amostra Ag2.0 antes da imersão na solução SBF. **Fonte:** Adaptado de Krishnamacharyulu *et al*, (2018) [93].

A Figura 10 compara os espectros FTIR antes e após a imersão da amostra em SBF e exibe o padrão FTIR para a HAp. Observa-se o desaparecimento das bandas 710 cm^{-1} , 776 cm^{-1} , 1286 cm^{-1} e 1454 cm^{-1} presentes no espectro FTIR da amostra antes da

imersão em SBF. A intensa banda em torno de 1022 cm^{-1} , após a imersão, pode ser descrita como a superposição da banda vibracional pertencente ao *stretching* em grupos PO_4 (pertencentes a HAp) com bandas de unidades BO_4 do vidro. A banda em 606 cm^{-1} , correspondente às vibrações Ag-O, sofre um incremento em sua intensidade. Esse fenômeno pode ser explicado, como uma superposição de bandas vibracionais P-O do tipo *bending* em unidades PO_4 e vibrações Ag-O. As bandas em 1420 cm^{-1} e 1637 cm^{-1} , exibidas no espectro FTIR após imersão das amostras em SBF são atribuídas à ressonância C-O em grupos funcionais CO_3^{2-} , indicando a formação de hidroxiapatita carbonatada na superfície do material. A intensa banda em 3435 cm^{-1} é devido ao modo vibracional do tipo *stretching* do grupo O-H.

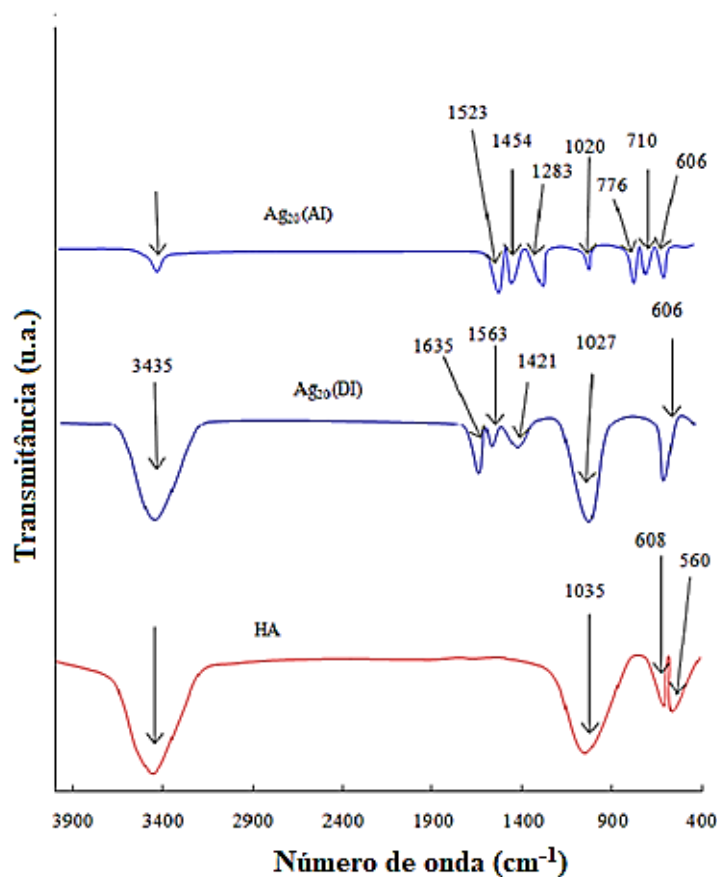


Figura 10- Espectros FTIR para a amostra Ag2.0 antes (AI) e depois (DI) da imersão em SBF e espectro FTIR para a Hidroxiapatita (HAp). **Fonte:** Adaptado de Krishnamacharyulu *et al.*, (2018) [93].

El-Batal *et al* [94] verificou, por meio de espectroscopia FTIR, a influência da adição de 0,5% e 1%, em peso, de AgNO_3 na bioatividade de vidros pertencentes ao sistema $\text{B}_2\text{O}_3\text{-Na}_2\text{O-CaO}$. As análises foram realizadas antes e após imersão das amostras vítreas em solução de fosfato durante duas semanas. A Figura 11 apresenta os

espectros FTIR para as amostras (Base, 0,5Ag e 1,0Ag) antes do tratamento em solução fosfato. Os espectros mostram três bandas bem definidas na região espectral compreendida entre 400-1600 cm^{-1} que são características de vidros boratos. Associa-se a banda de centro em 3446 cm^{-1} às vibrações OH da água ou grupos BOH.

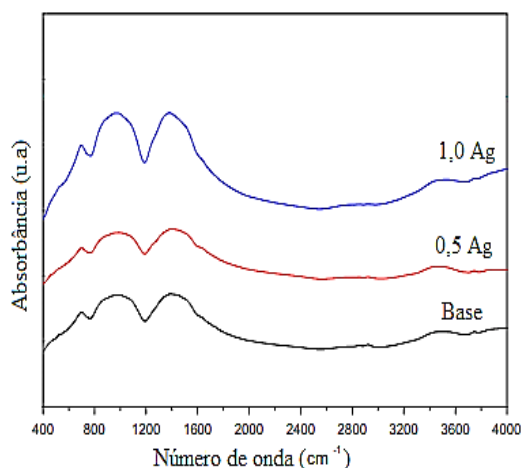


Figura 11 - Espectro FTIR das amostras (Base, 0,5 Ag e 1,0 Ag) antes da imersão em solução fosfato.

Fonte: Adaptado de El-Batal *et al* (2017), [94].

Na Figura 12 são apresentados os espectros FTIR após imersão das amostras em solução fosfato por um período de duas semanas. Comparando as Figuras 11 e 12 observam-se a ocorrência de alterações espectrais para todas as amostras no período pós-imersão. Segundo o autor, o aparecimento dos picos ao redor de 580-600 cm^{-1} e 685-710 cm^{-1} indicam a presença de HAp devido às reações entre íons de cálcio do vidro com a solução fosfato.

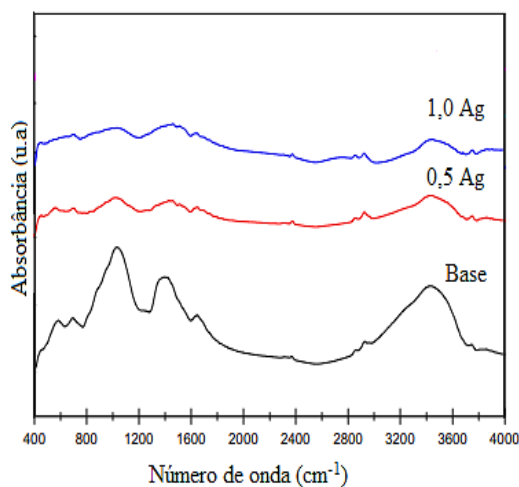


Figura 12 - Espectro FTIR das amostras (Base, 0,5 Ag e 1,0 Ag) após a imersão em solução de fosfato durante duas semanas. **Fonte:** Adaptado de El-Batal *et al* (2017), [94].

3.4 Análise da bioatividade de vidros dopados com prata por Espectroscopia Raman

Saranti *et al* [95], investigou por meio de Espectroscopia Raman a bioatividade de uma série de vidros cálcio borofosfato, após imersão em SBF por 7 dias. Esses vidros foram nomeados: C3PB2 de composição 60CaO - 20P₂O₅ - 20B₂O₃; C4PB2 de composição 64CaO - 20 B₂O₃ e C5PB2 de composição 66,7CaO - 13,3P₂O₅ - 20B₂O₅, todos em %mol. A Figura 13 mostra o espectro Raman desses vidros antes (amostra C3PB2) e após imersão na solução SBF. Para fins de comparação, o espectro Raman da Hidroxiapatita cristalina (HAp) também é exibido.

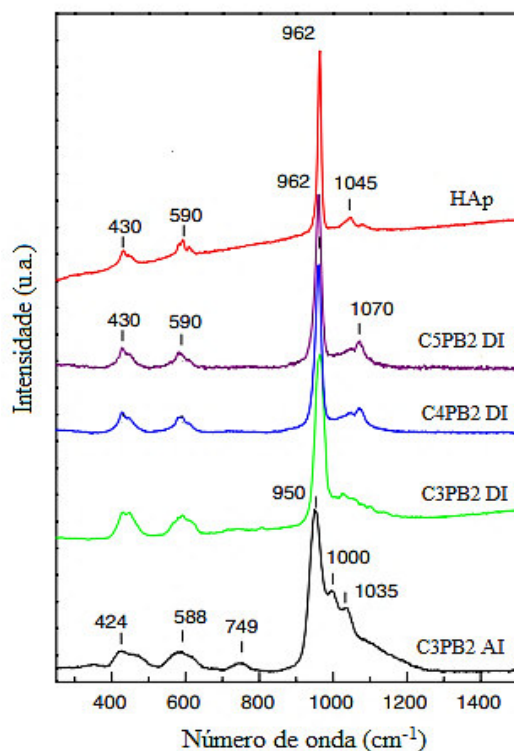


Figura 13 - Espectros Raman das amostras C3PB2 antes da imersão (AI) em SBF e C3PB2, C4PB2, C5PB2 após 7 dias de imersão em SBF (DI). **Fonte:** Adaptado de Saranti *et al* (2006), [95].

O espectro Raman do vidro C3PB2 antes da imersão em SBF é composto, em sua maioria por bandas atribuídas às vibrações de unidades fosfato: orto (950 cm⁻¹) e piro (749 cm⁻¹, 1035 cm⁻¹). As bandas localizadas em 424 cm⁻¹ e 588 cm⁻¹ podem ser atribuídas às vibrações tetraédricas de unidades fosfatos. O ombro localizado em 1000 cm⁻¹ é resultado de vibrações de unidades piro e/ou ortofosfato juntamente com átomos de boro. Todos os vidros, após imersão em SBF, apresentam espectros Raman

diferentes daqueles antes da imersão, indicando a ocorrência de mudanças estruturais significativas na superfície desses materiais. Verifica-se que, após a imersão, os espectros Raman desses vidros são dominados por uma banda muito intensa em 962 cm^{-1} que corresponde ao estiramento simétrico do PO_4 tetraédrico, ligação P-O, para a HAp. Além desta, observa-se a presença de três bandas menos intensas em 430 cm^{-1} , 590 cm^{-1} e 1070 cm^{-1} que também são atribuídas à formação de apatita nas superfícies desses vidros.

3.5. Análise da citotoxicidade e das propriedades antibacterianas de vidros dopados com Ag_2O

Luo *et al* [34] mostrou em seu trabalho que a incorporação de 0,75 e 1% em peso de Ag_2O a vidros boratos não produziu nenhum efeito tóxico às células osteoblásticas e fibroblásticas de ratos. No entanto, vidros dopados com 2% em peso de Ag_2O apresentaram toxicidade. Na Figura 14 estão apresentadas as imagens da morfologia de células osteoblásticas MC3TE-E1 cultivadas por 48 h em meio contendo esses vidros dissolvidos. De acordo com o autor houve um aumento no quantitativo dessas células para os meios contendo dissolução dos vidros sem adição de Ag, com 0,75 e 1% em peso, de Ag. Entretanto, houve um decréscimo considerável da quantidade de células na presença de meio contendo 2% de Ag (d).

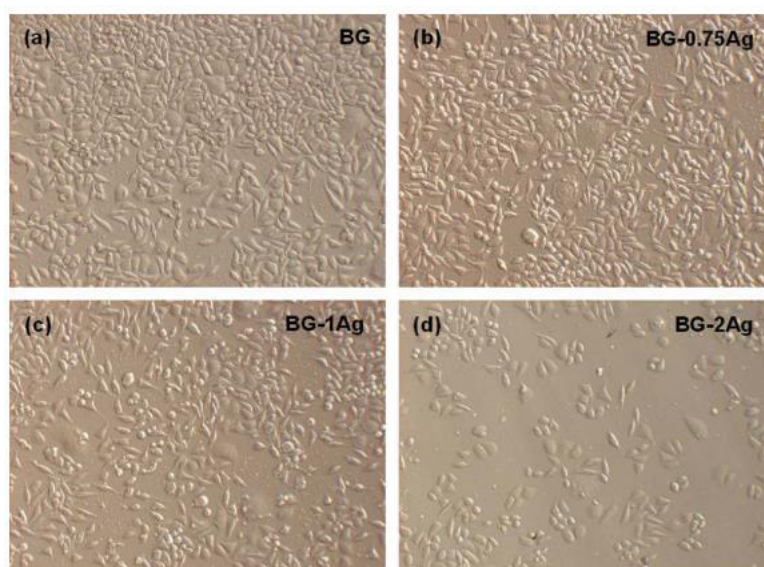


Figura 14 – Imagens de células osteoblásticas MC3T3-E1, obtidas por microscópio óptico, cultivadas por 48 h em meio contendo os vidros BG, BG-0,75Ag, BG-1Ag e BG-2Ag. **Fonte:** Adaptado de Luo *et al* (2010), [34].

Wang juntamente com seus colaboradores [90], avaliaram os efeitos de scaffolds de vidros borosilicatos com quantidades variadas de Ag_2O (0-1,0% em peso) na viabilidade celular de células pré-osteoblásticas murina MC3T3-E1 que foram cultivadas em extratos contendo os scaffolds dissolvidos. A Figura 15 mostra os resultados do ensaio de proliferação dessas células. Para cada grupo, o crescimento celular aumentou com tempo de incubação (1 a 7 dias), entretanto não houve diferença significativa entre os grupos com erro aproximado de 0,05. Isso indica que a adição de Ag não provocou nenhum efeito tóxico à proliferação celular.

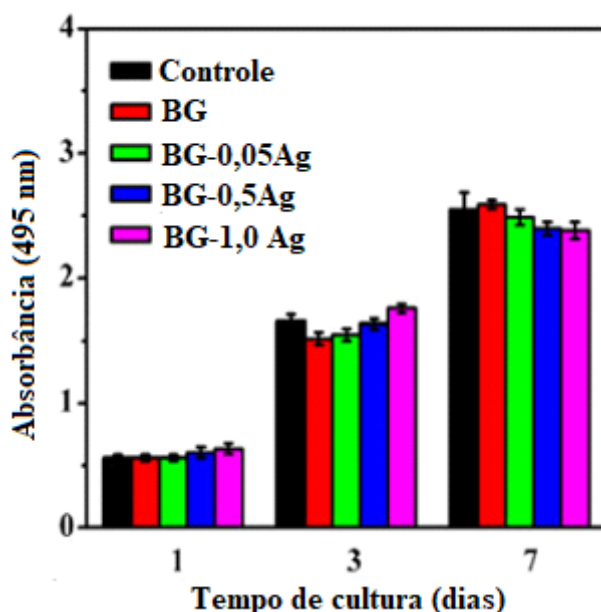


Figura 15 - Medida quantitativa da proliferação celular de células MC3T3-E1 cultivadas em extratos contendo scaffolds de vidros no período de 1, 3 e 7 dias. Controle: sob condições de cultura idêntica, sem que haja vidros dissolvidos. **Fonte:** Wang *et al* (2015), [90].

No trabalho de Balamurugan *et al* [96] foi avaliado a atividade antibacteriana de um vidro silicato, sem a adição de Ag_2O (BG), e de um outro vidro de mesma composição, porém com a adição de 5% em mol de Ag_2O (AgBG). Nesse trabalho utilizou-se como microrganismo teste a bactéria *E. coli*. A Figura 16 mostra os resultados da viabilidade celular da *E. coli* em função do tempo de incubação em meio contendo uma concentração de 20mg/ml de AgBG. Após 4 h, a viabilidade celular foi significativamente reduzida e depois de 24h a viabilidade celular estava abaixo do limite de detecção. Já o vidro BG não teve nenhum efeito na viabilidade celular da *E. coli*. O autor atribuiu exclusivamente a ação antibacteriana do vidro AgBG a liberação de íons Ag^+ da matriz vítrea.

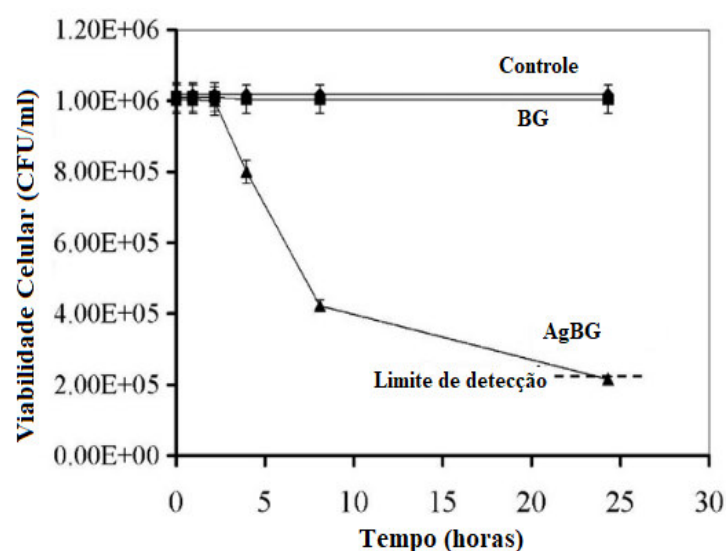


Figura 16 – Viabilidade celular da *E. coli* em função do tempo de incubação em meio contendo 20 mg/ml de vidros de AgBG e BG dissolvidos. **Fonte:** Balamurugan *et al* (2008), [96].

Bellantone *et al* [28], em seu trabalho, investigou e comparou as propriedades antibacterianas de três vidros bioativos: o 45S5 Bioglass, um vidro silicato dopado Ag_2O (2% em peso) (AgBG) e um vidro silicato sem adição de Ag_2O (BG). *E. coli* (-), *P. aeruginosa* (-) e *S. aureus* (+) foram utilizadas na investigação. A Figura 17 mostra os resultados da viabilidade celular dos três microrganismos em função da massa dos vidros durante 20 h de incubação.

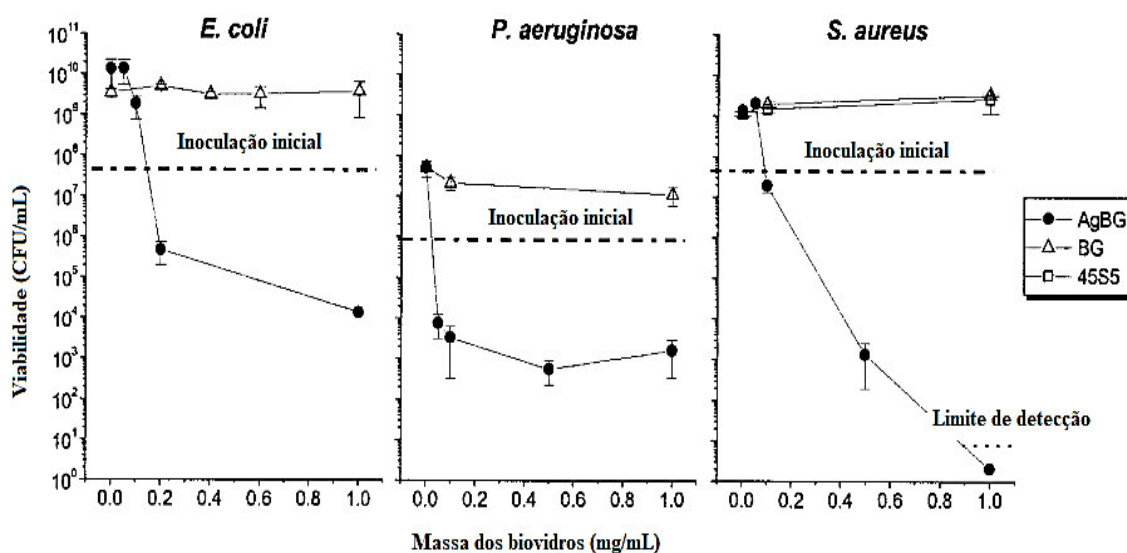


Figura 17 - Viabilidade das bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* em função da massa dos vidros 45SS, BG e AgBG. **Fonte:** Adaptado de Bellantone *et al* (2002), [28].

De acordo com o autor, a linha de inoculação inicial foi estimada para detectar o CIM das amostras, valores abaixo da linha de inoculação indicam a capacidade bacteriostática do material. Assim, as concentrações de AgBG utilizadas exibiram um efeito bacteriostático em concentrações semelhantes para cada uma das bactérias sob investigação. A amostra BG e o 45S5 Bioglass não tiveram efeitos bacteriostáticos sob a viabilidade de nenhuma das bactérias testadas.

Capítulo 4 - Materiais e Métodos

4.1. Preparação das Amostras

Os vidros do sistema cálcio-borato foram sintetizados na Unidade de Preparação e Caracterização de Materiais da Universidade Federal do Maranhão – Campus Imperatriz, nos Laboratórios de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (LEOF). Os reagentes utilizados para a síntese das amostras foram: trióxido de boro (B_2O_3), pentóxido de fósforo (P_2O_5), carbonato de cálcio ($CaCO_3$), carbonato de sódio (Na_2CO_3), fluoreto de cálcio (CaF_2) e óxido de prata (Ag_2O) todos da marca Sigma-Aldrich (pureza >99,98%). Na composição dessas amostras, os reagentes B_2O_3 , P_2O_5 , CaO , CaF_2 foram mantidos constantes, enquanto Na_2O e Ag_2O foram variados de 20-19,25 e 0-0,75 mol%, respectivamente. As codificações dos vidros e suas composições em % molar (mol) e % peso estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição (% peso (wt) e % molar (mol) e códigos das amostras sintetizadas).

Amostras	B ₂ O ₃ (%)		P ₂ O ₅ (%)		CaO(%)		Na ₂ O(%)		CaF ₂ (%)		Ag ₂ O (%)	
	mol	wt	mol	wt	mol	wt	mol	wt	mol	wt	mol	Wt
Base(Ag0)	59,5	60,02	2,0	4,11	9,5	7,71	20,0	17,96	9,0	10,18	0,0	0
Ag 0,25	59,5	59,65	2,0	4,08	9,5	7,67	19,75	17,96	9,0	10,11	0,25	0,83
Ag 0,50	59,5	59,29	2,0	4,06	9,5	7,62	19,5	17,30	9,0	10,05	0,50	1,65
Ag 0,75	59,5	58,93	2,0	4,03	9,5	7,58	19,25	16,97	9,0	9,99	0,75	2,47

Inicialmente, realizou-se a pesagem do carbonato de cálcio ($CaCO_3$) em uma balança analítica, modelo AUW220D da SHIMADZU. Logo em seguida, o $CaCO_3$ foi colocado em um cadinho de platina e levado a um forno de atmosfera a ar (marca JUNG) a 900 °C para a realização da calcinação, processo que consiste na perda de gás carbônico (CO_2) e obtenção de óxido de cálcio (CaO). Após esse processo, o CaO foi adicionado aos outros componentes e misturados em um almofariz de ágata. Depois, essa massa homogeneizada foi transferida para um cadinho de platina e levada ao forno para que ocorresse a fusão da mistura.

A massa fundida foi vertida em um molde de aço inoxidável aquecido previamente a uma temperatura abaixo da temperatura de transição vítrea (T_g). Após esse processo, realizou-se o tratamento térmico na amostra, por 4 horas, para a redução de tensões causadas por choque térmico. A Tabela 5 mostra as temperaturas de fusão e

de tratamento térmico das amostras. Depois de sintetizados, os vidros foram cortados em uma cortadeira com serra diamantada e então polidos para serem caracterizados.

Tabela 5 - Temperaturas de Fusão e tratamento térmico.

Amostra	Temperatura de Fusão (°C)	Temperatura de tratamento térmico (°C)
Ag 0	1150°C	450°C
Ag 0,25	1150°C	450°C
Ag 0,50	1150°C	450°C
Ag 0,75	1200°C	450°C

4.2. Técnicas de caracterização

As técnicas de caracterização foram executadas em três etapas. Na primeira etapa (antes da imersão em SBF) foram realizadas medidas de análise estrutural dos vidros, por meio das medidas de: difração de raios-X (DRX); densidade (ρ), pelo Princípio de Arquimedes; e vibracionais por Espectroscopia Raman e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

Na segunda etapa, após a imersão das amostras em SBF, foram feitas medidas de DRX, de espectroscopia Raman e de FTIR, objetivando avaliar o crescimento de apatita na superfície das amostras. Além dessas análises, realizaram-se medidas de pH da solução SBF durante todo o período de imersão das amostras.

Na terceira etapa, realizaram-se as análises de atividade antibacteriana dos vidros, utilizando as bactérias *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922) e os testes de citotoxicidade utilizando células osteoblásticas MC3T3-E1.

4.2.1. Caracterização Estrutural

4.2.1.1 Difração de raios-X

A difratometria de raios-X consiste em uma das principais técnicas de caracterização microestrutural utilizada para a detecção de fases cristalinas de materiais [97]. Por apresentarem desordenamento atômico de longo alcance em sua estrutura, todos os vidros são caracterizados como sólidos amorfos [98]. Portanto, os padrões de DRX desses materiais exibem bandas largas e de baixo ângulo. Nos materiais

cristalinos, como por exemplo a HAp, o arranjo dos átomos ocorre de forma regular, obedecendo à determinada orientação no retículo cristalino. Assim, seus difratogramas apresentam picos de difração estreitos e intensos [53]. Quando um feixe de raios-X incide sobre uma amostra, ele pode sofrer espalhamento elástico sem que ocorra perda ou dispersão de energia dos elétrons. Nesse caso, quando um fóton colide com um elétron, sua trajetória é alterada, entretanto, a energia e a fase do fóton incidente são mantidas [97]. Um material que possui estrutura cristalina apresenta espaçamento atômico da ordem do comprimento de onda dos raios-X incidentes [99]. A condição necessária para que haja difração (interferência construtiva) é expressa pela condição conhecida como Lei de Bragg (equação 1) [97,100].

Considerando dois planos de átomos, paralelos, A–A' e B–B' (Figura 18), em que d é a distância interplanar, θ é o ângulo de incidência dos raios-X, λ é o comprimento de onda da radiação incidente, se um raio incidente (1), em fase, toca na camada atômica superior no ponto P e um segundo feixe (2) continua até que é espalhado para o átomo Q na segunda camada, para que esses raios continuem se propagando em fase, o segundo raio terá que viajar uma distância $SQ + QT$, que deverá ser um múltiplo inteiro de λ . Aplicando trigonometria básica em um dos triângulos retângulo, obtém-se a Lei de Bragg denotada pela Equação 1 [97,98,100]. Neste caso, n é a ordem de reflexão que assume qualquer número inteiro. A Lei de Bragg é satisfeita quando os raios são espalhados em fase ocorrendo interferência construtiva (fenômeno da difração) [97].

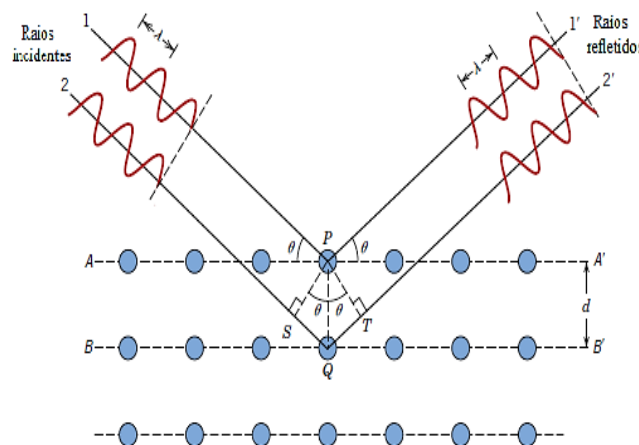


Figura 18 – Fenômeno de difração de raios-X . **Fonte:** Adaptado de Callister (2016), [98].

$$n\lambda = \overline{SQ} + \overline{QT} \quad (1)$$

Neste trabalho, utilizou-se a técnica de difração de raios-X para dois fins: confirmar a natureza amorfa das amostras antes da imersão em SBF e examinar o crescimento da camada de apatita na superfície dessas amostras após a imersão em SBF. As medidas foram realizadas pelo Prof. Dr. Adenilson Oliveira dos Santos no Laboratório de Difração de Raios-X (LDRX) da UPCM. O equipamento utilizado foi o Empyrean da marca Panalytical, Figura 19, de geometria parafocal Bragg-Brentano, com varredura angular entre 10° e 60° (2θ), com passo de 0,02 em 2 segundos.



Figura 19 - Difratômetro Modelo Empyrean da PANalytical (LDRX - UFMA).

4.2.1.2 Medida de densidade

A densidade dos sólidos é uma das propriedades físicas mais simples que podem ser medidas. Por meio dessa técnica, é possível obter informações importantes acerca da estrutura do material [101]. A densidade dos vidros depende quase que inteiramente de sua composição química, assim, ela é utilizada para analisar as mudanças estruturais decorrentes da adição ou da substituição de dopantes. Outro parâmetro importante, diretamente ligado à distribuição espacial dos íons pertencentes à estrutura dos vidros, é o volume molar. Variações no volume molar indicam mudanças estruturais relacionadas à formação ou modificação na rede vítrea [101,102].

Neste trabalho, as medidas de densidade e de volume molar dos vidros, foram realizadas com base no princípio de Arquimedes. O cálculo da densidade ρ é obtido empregando a Equação 2.

$$\rho = \left(\frac{m_c}{m_c - m_{Ap}} \right) \rho_L \quad (2)$$

Em que m_c é a massa da amostra, em ar, m_{Ap} é a massa aparente da amostra, em água, e ρ_L a densidade do líquido. O cálculo do volume molar dos vidros (V_m) foi obtido por meio da Equação 3:

$$V_m = \frac{M}{\rho} \quad (3)$$

Neste caso, M é a massa molecular da amostra e ρ a sua densidade. A unidade de volume é o grama por centímetro cúbico (g/cm^3). As medidas de densidade dos vidros foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (LEOF) da UPCM, utilizando uma balança analítica modelo AUW220D da marca SHIMADZU com precisão de 0,01 mg, considerando o valor da densidade da água $\rho = 0,99707 \text{ g/cm}^3$ a 25°C.

4.2.1.3 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica espectroscópica utilizada para obter informações sobre a composição química, geometria e ligação molecular de uma espécie a ser estudada [103]. Nesta técnica, uma pequena área de uma amostra é iluminada com um feixe de radiação monocromática de baixa potência. Quando os fótons provenientes dessa radiação eletromagnética interagem com as moléculas do material, eles sofrem espalhamento em todas as direções, sendo que uma pequena parte desses fótons é inelasticamente espalhada, ou seja, sua frequência (ou comprimento de onda) é diferente daquela radiação incidente. Deste modo, os fótons espalhados inelasticamente “trazem” a informação da vibração molecular. Cada espécie química fornece um espectro Raman que é como sua impressão digital [104,105].

A espectroscopia Raman é uma ferramenta importante para avaliar materiais biológicos. A deposição de hidroxiapatita em ossos e dentes, por exemplo, pode ser explorada por meio dessa técnica [106]. Atualmente, ela é bastante utilizada na caracterização de materiais vítreos. Entretanto, como nenhum vidro possui arranjos atômicos periódicos e de longo alcance, as análises vibracionais nesses materiais não é

direta. Diante disto, não há nenhuma teoria combinada de vibração para explicar todos os aspectos vibracionais em materiais que apresentem desordem de simetria em sua estrutura. Com relação aos vidros borato, é difícil fornecer um parecer à interpretação teórica relacionada aos seus espectros Raman. Contudo, é possível obter informações da presença de certas unidades estruturais por meio da comparação de espectros Raman desses vidros com componentes boratos, cuja estrutura cristalina já é conhecida [107,108].

Para este trabalho, as medidas de espectroscopia Raman foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Raman (LER) da UPCM, no qual, utilizou-se um espectrômetro triplo Trivista 557 da *Princeton Instruments* (Figura 20), que possui um dispositivo de carga acoplada (*Charge-Coupled Device* - *CCD*) resfriado termoeletricamente por efeito Peltier. O espectrômetro possui um laser de hélio-neônio de comprimento de onda do feixe monocromático de 632,8 nm (comprimento de onda da radiação monocromática na região espectral do vermelho) que incidi sobre o vidro, que é ajustado em um porta amostra cilíndrico de vidro de forma a obter a melhor focalização do feixe. A coleta dos espectros Raman foi feita no intervalo espectral de 20 cm^{-1} até 1500 cm^{-1} , com 10 acumulações e tempo de aquisição de 60s, com precisão de 2 cm^{-1} .



Figura 20 - Espectrômetro triplo Trivista 557 da Princeton Instrument (LER – UFMA).

4.2.1.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de absorção no infravermelho tem origem quando a radiação eletromagnética que incide sobre a amostra possui uma componente com frequência similar à de uma transição entre dois níveis vibracionais das moléculas. Geralmente as vibrações moleculares dos átomos ocorrem na mesma região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho. É válido ressaltar que a absorção de radiação é proporcional à concentração da unidade molecular que constitui o material. O

espectro infravermelho possibilita a identificação dos compostos por sua identidade vibracional, ou seja, suas vibrações moleculares características [109,110]. A intensidade de radiação absorvida pode ser expressa em termos de transmitância (T), Equação 4, ou absorbância (A), Equação 5, sendo que a primeira é obtida pela razão entre a intensidade incidente (I_0) e a transmitida (I) [110].

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

$$A = -\log_{10} T \quad (5)$$

Neste trabalho, as análises FTIR foram realizadas para verificar a bioatividade das amostras, complementando os resultados obtidos com a espectroscopia Raman. Para a execução das medidas, utilizou-se o pó das amostras tratadas em SBF, as quais foram misturadas com Brometo de Potássio – KBr (na proporção de 1% de amostra em pastilhas de 20 mg) e prensadas para formar pastilhas. A obtenção dos espectros ocorreu no modo de análise absorção, com número de varreduras igual a 16, resolução de 4 cm^{-1} , entre a faixa de 400 a 4000 cm^{-1} . Todas as etapas foram executadas no Laboratório de Espectroscopia Óptica (LEOF) da UPCM. Para as medidas FTIR utilizou-se um espectrômetro da marca Bruker modelo Vertex 70V (Figura 21).



Figura 21 - Espectrômetro Vertex 70V da Bruker (LEOF – UFMA).

4.2.2. Propriedades mecânicas

4.2.2.1 Microdureza Vickers

A dureza pode ser definida como a resistência à penetração de um material por outro material. Quanto maior a dureza mais resistente é um material [111]. O teste de microdureza Vickers é um método utilizado para a medição de dureza em regiões muito pequenas de um corpo de prova. Esse método consiste na penetração de um material por uma pirâmide de diamante de base quadrada que possui ângulo de 136° entre suas faces opostas [98].

Para a realização dos testes de microdureza Vickers as fatias dos vidros receberam um polimento óptico para retirar arranhões presentes em suas superfícies. As medidas foram feitas na Central Analítica da UPCM da Universidade Federal do Maranhão, usando um microdurômetro (Shimadzu, HMV-G20). Foram feitas quatro impressões Vickers na superfície de cada amostra, aplicando uma carga de indentação de 250 mN com tempo fixado em 3 segundo. Os valores de microdureza Vickers são obtidos por meio da Equação 6:

$$HV = A \frac{P}{d^2} \quad (6)$$

HV é a dureza Vickers, A é uma constante igual a 1854,5 que leva em consideração a geometria do indentador de diamante de base quadrada, P é a carga aplicada em kg e d é o comprimento médio da diagonal em mm. Os valores de microdureza são convertidos de kgf/mm² para MPa, multiplicando-se por um valor constante de 9,8 [27,112].

4.2.3. Bioatividade

4.2.3.1 Testes *in vitro* em SBF

Um material é bioativo quando ocorrer, após o implante, a formação de uma camada de hidroxiapatita em sua superfície. Essa camada de HAp irá promover forte ligação entre o tecido ósseo e o material implantado [71].

Neste trabalho, a solução SBF foi preparada de acordo com as etapas descritas por Kokubo e Takadama, em que, todos os critérios propostos foram seguidos [74]. Antes da imersão das amostras em SBF, elas foram fatiadas em uma cortadeira de disco diamantado e polidas com uma lixa de granulometria nº600, para a formação de ranhuras nas faces do material. Esse processo é importante porque promove um aumento na superfície de contato das amostras com a solução. Em seguida, os vidros foram presos verticalmente em um suporte de polipropileno, imersos no interior de tubos também de polipropileno e fundo no formato cônico, contendo 25 ml de SBF. Depois, os tubos contendo as amostras, foram colocados em um banho-maria a 36,5°C onde permaneceram por 3, 7, 14 e 21 dias, Figura 22. Durante esse período, o pH da solução foi criteriosamente verificado.



Figura 22 - Amostras em banho-maria a 36,5°C.

4.2.3.2 Medidas de pH da solução SBF

O pH (potencial hidrogeniônico) é comumente utilizado para medir a concentração iônica de hidrogênio em soluções aquosas [113,114]. A conversão de vidros em hidroxiapatita está diretamente ligada às alterações que ocorrem nas concentrações iônicas de soluções aquosas. Estas alterações implicam no acréscimo do pH da solução [115].

Para esse trabalho, os valores de pH foram obtidos utilizando um pHmetro microprocessado de bancada – PG1800 da marca Gehaka, com precisão de pH 0,01. Para a realização das medidas, o pHmetro era previamente calibrado com solução tampão.

4.2.3.3 Análise da atividade de citotoxicidade dos vidros sintetizados

A avaliação da atividade citotóxica dos vidros boratos foi realizada utilizando células osteoblásticas MC3T3-E1. As células foram suspensas em Meio Mínimo de Eagle (α -MEM, SIGMA, Alemanha) na proporção de $1,0 \times 10^6$ células/mL, acrescidos de 10% de soro fetal bovino (FBS, GIBCO), e então, em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 μ L do meio em cada poço e incubados por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. As amostras vítreas foram diluídas (1, 0,7, 0,4 e 0,1 mg/mL), adicionadas à monocamada de células e incubadas por 24 h nas mesmas condições. Após a incubação, 50 μ L de solução de MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) foram adicionados a 2 mg/mL. A placa foi incubada durante 4 horas a 37 °C com 5% de CO₂ (protegido da luz) e adicionados 150 μ L de DMSO. A leitura foi realizada num leitor de microplacas (BIO-TEK Power Wave XS) a 570 nm. Os testes de citotoxicidade foram realizados na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

4.2.3.4 Análise da atividade antibacteriana dos vidros sintetizados

Os microrganismos utilizados para avaliar a atividade antibacteriana dos vidros boratos foram: *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922), bactérias mais comuns causadoras de infecções relacionadas à cirurgia [1,28,32,84]. Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), cada grupo de bactérias foram examinadas em diluições de série dupla das amostras, em caldo Mueller-Hinton (caldo MH) com base em suspensão bacteriana padronizada de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. As suspensões de inóculo foram diluídas (1:10) em caldo MH para obter uma suspensão bacteriana de $1,5 \times 10^7$ CFU/mL. O intervalo de diluição em série foi de 1000 μ g/mL a 3,9 μ g/mL. Volumes de 5 μ L da suspensão bacteriana (107 UFC/mL) foram adicionados a cada poço. As microplacas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 24h. A CIM foi definida como a menor concentração das amostras que inibiram completamente o crescimento das cepas. A concentração bactericida mínima (CBM) das amostras também foi avaliada. 10 μ L de CIM foram adicionados em placas de petri contendo caldo MH. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A leitura do ensaio foi verificada por meio do crescimento bacteriano. Os valores de CBM foram definidos como a menor concentração de cada amostra que evita o crescimento microbiano nas placas. Todos os testes foram realizados três vezes para cada amostra. As análises da

atividade antibacteriana bacteriana foram realizadas na Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados e discussão das análises e dos dados experimentais obtidos neste trabalho. A Figura 23 apresenta as amostras sintetizadas em suas respectivas concentrações em %mol de Ag_2O . A Figura 24 exhibe essas mesmas amostras cortadas em fatias.

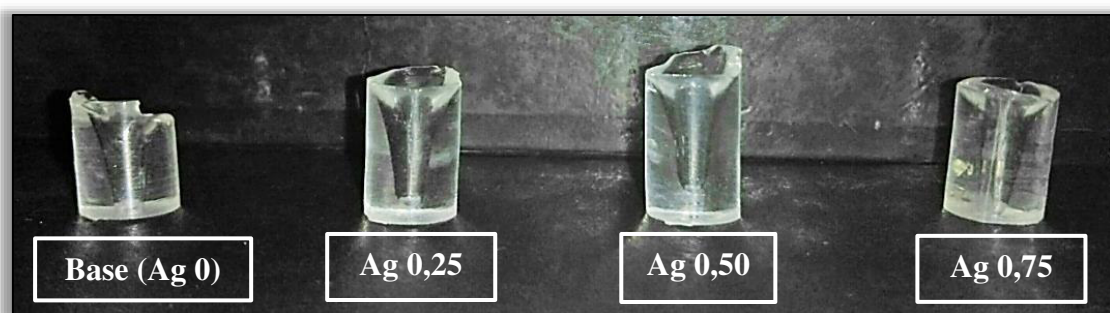


Figura 23 - Vidros boratos com suas respectivas quantidades em %mol de Ag_2O .

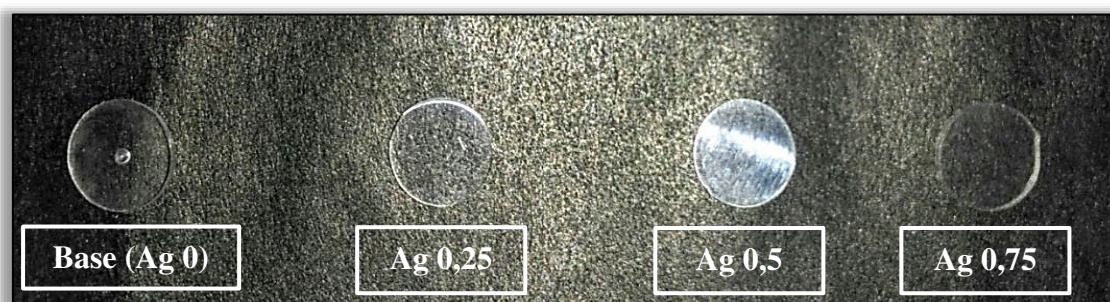


Figura 24 - Amostras dos vidros boratos cortadas em fatias.

A adição de prata não induziu nenhuma coloração aos vidros. Todas as amostras apresentaram transparência e sem a presença de cristalitos visíveis.

5.1 Propriedades físicas das amostras antes da imersão em SBF

5.1.1 Difração de raios-X (DRX)

A Figura 25 apresenta o padrão de difração de raios-X das amostras antes da imersão em SBF:

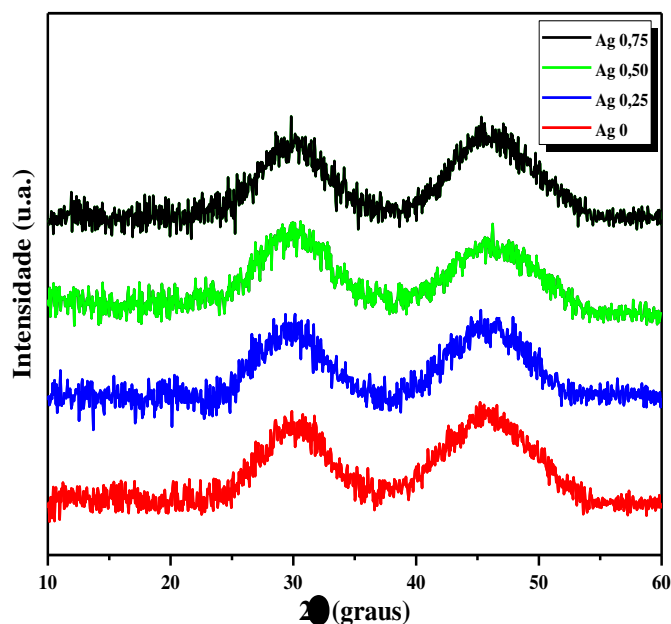


Figura 25 - Padrão de raios-X das amostras (Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,5 e Ag 0,75) antes da imersão em SBF.

Observa-se que a incorporação de Ag_2O não induziu a cristalização dos vidros. Os difratogramas exibidos na Figura 25 confirmam a natureza amorfa dos espécimes. As duas bandas largas centradas em aproximadamente $2\theta = 29^\circ$ e $2\theta = 47^\circ$ são características de vidros boratos [76].

5.1.2 Densidade e volume molar

Na Figura 22, é apresentado o gráfico da densidade e do volume molar em função de Ag_2O . Observou-se que não houve variação significativa nem na densidade e nem no volume molar das amostras com a substituição do Na_2O por Ag_2O até a concentração de 0,75% molar de Ag_2O .

Em humanos, a densidade mineral óssea total estimada para homens é de 3,88 g/cm^2 para mulheres - 2,90 g/cm^2 [116]. Valores aproximados dos resultados de densidade encontrados para os vidros sintetizados.

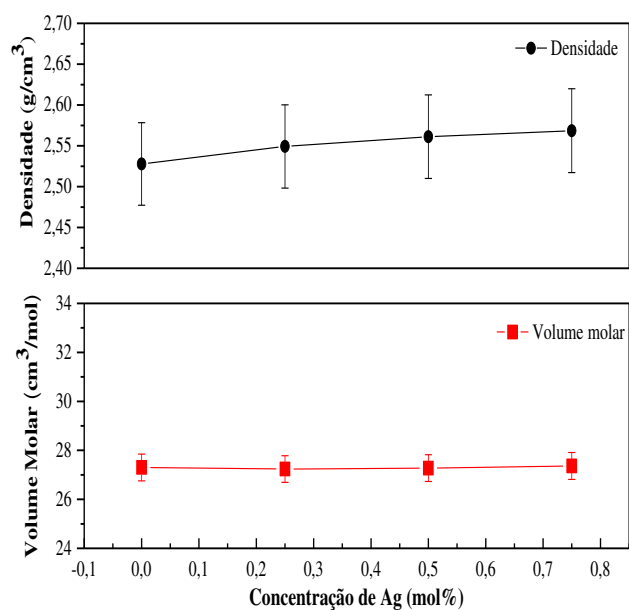


Figura 26 - Densidade e volume molar das amostras (Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75) em função da concentração de Ag_2O .

5.1.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 27, são apresentados os espectros FTIR dos vidros boratos antes da imersão em SBF.

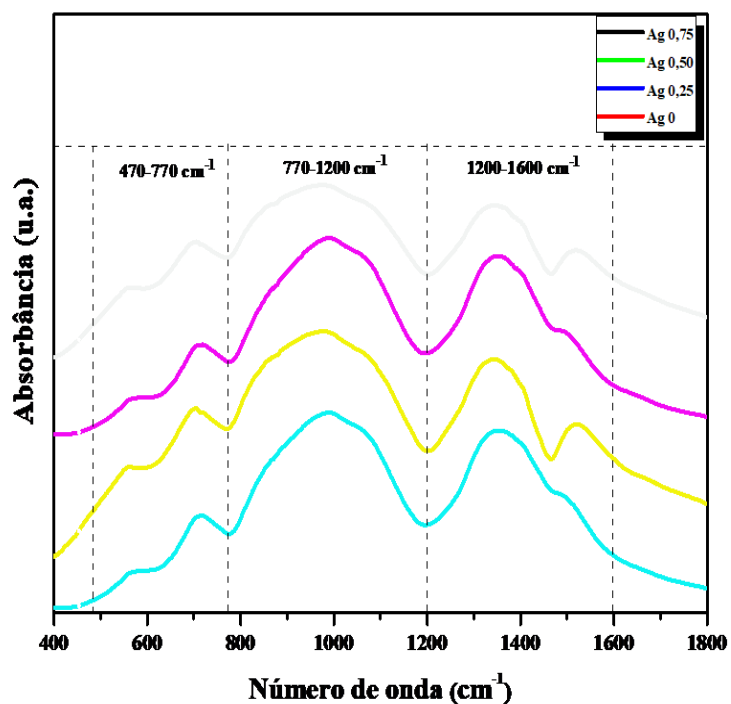


Figura 27 - FTIR das amostras (Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75) antes da imersão em SBF.

Como mostra a Figura 27, a espectroscopia FTIR para os vidros boratos apresentaram modos vibracionais em três regiões:

- O primeiro grupo de bandas ocorre na região $470 - 770 \text{ cm}^{-1}$ sendo atribuída às vibrações do tipo flexão de segmentos boratos [76,117–120];
- O segundo grupo de bandas que ocorre na região $770 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ é caracterizado como vibrações do tipo *stretching* de grupos estruturais tetraédricos BO_4 tais como grupos diboratos, triboratos, tetraboratos e pentaboratos [76,117–120];
- A região espectral compreendida entre 1200 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} é atribuída às vibrações do tipo *stretching* em ligações B-O de unidades trigonais BO_3 tais como grupos de anéis metaborato, piroborato e ortoborato [76,117–120].

Na primeira região espectral estão presentes duas bandas de absorção: o pico centrado em 550 cm^{-1} é devido a modos internos do íon PO_4^{3-} [88]; a banda com centro em aproximadamente 700 cm^{-1} pertence aos grupos BO_3 [94,121,122]. Na segunda região há uma banda larga com centro em 980 cm^{-1} atribuída às vibrações do tipo *stretching* de grupos estruturais tetraédricos BO_4 tais como grupos diboratos, triboratos, tetraboratos e pentaboratos [76,117–119]. A terceira região espectral apresenta duas bandas: uma centrada em 1349 cm^{-1} que é devido às vibrações B-O tipo *stretching* em unidades trigonal BO_3 para anéis metaborato e grupos piroborato e ortoborato [123,124] e outra com centro em 1520 cm^{-1} atribuída à relaxação assimétrica tipo *stretching* em ligações B-O de unidades trigonais BO_3 .

5.1.4 Microdureza Vickers

Os valores de microdureza Vickers obtidos para as amostras vítreas Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75 são apresentados na Figura 28.

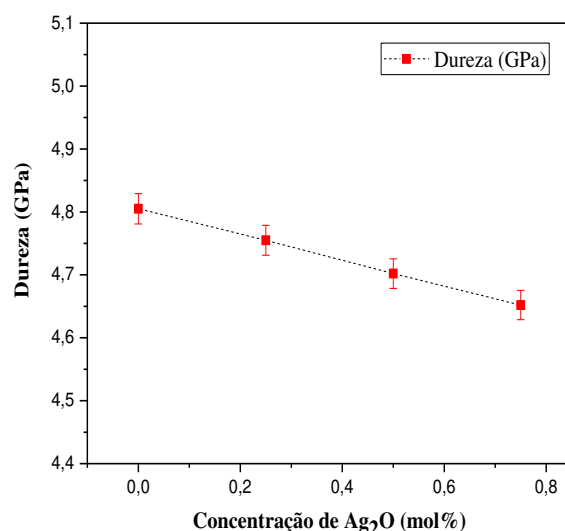


Figura 28 - Microdureza Vickers para as amostras em função da concentração de Ag_2O .

Observa-se que houve um decréscimo nos resultados de dureza Vickers com o aumento na concentração de Ag_2O . Os dados de dureza Vickers variaram de 4,75 a 4,65 GPa para as amostras Base e Ag 0,75. Os valores de dureza de vidros fosfatos dopados com Ag_2O no trabalho de Aravindan *et al* [125], também revelaram um decréscimo com o acréscimo do conteúdo de Ag_2O . De acordo com o autor, o óxido de prata que é um modificador de rede, provoca uma disrupção da estrutura do vidro e como consequência gera um decréscimo nas forças de ligações existentes na estrutura do vidro [125]. Os resultados de dureza encontrados neste trabalho estão de acordo com os valores para a dureza de vidros óxidos, entre 2 e 8 GPa [111]. Além disso, os valores encontrados se aproximam aos valores de dureza para os esmalte do dente humano que é de aproximadamente $4,88 \pm 0,35$ GPa [126].

5.2 Propriedades físicas das amostras depois da imersão em SBF

5.2.1 Análise da bioatividade das amostras tratadas em SBF

Após o preparo do SBF, os vidros boratos que já estavam fatiados foram imersos em na solução contidas em tubos de polipropileno, e levados ao banho-maria à temperatura de $36,5^\circ\text{C}$, os quais permaneceram por 3, 7, 14 ou 21 dias. Durante todo o período foram realizadas as medidas de pH do SBF, um dos critérios de análise de bioatividade. A partir do terceiro dia de imersão, foi possível verificar leve camada esbranquiçada na superfície das amostras. No vigésimo primeiro dia, as amostras

apresentavam-se completamente brancas e com uma crosta grossa sobre a sua superfície, como é possível verificar nas Figuras 29, 30, 31 e 32. Para analisar o crescimento de apatita na superfície dos vidros foram realizadas medidas de DRX, espectroscopia Raman e FTIR.



Figura 29 - Foto da amostra Ag 0 antes e após imersão em SBF pelo período de 3, 7, 14 e 21 dias respectivamente.

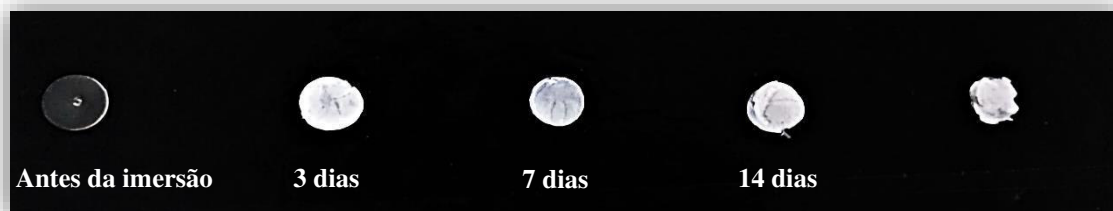


Figura 30 - Foto da amostra Ag 0,25 antes e após imersão em SBF pelo período de 3, 7, 14 e 21 dias respectivamente.



Figura 31 - Foto da amostra Ag 0,50 antes e após imersão em SBF pelo período de 3, 7, 14 e 21 dias respectivamente.



Figura 32 - Foto da amostra Ag 0,75 antes e após imersão em SBF pelo período de 3, 7, 14 e 21 dias respectivamente.

5.2.2 Medidas de pH

A conversão do material vítreo em apatita está diretamente associada às alterações que ocorrem no pH do SBF durante o período de imersão dos vidros [88]. Diante disto, é importante acompanhar as mudanças que ocorrem na solução por meio de medidas do pH. Neste trabalho essas medidas foram realizadas ao longo dos vinte e um dias de imersão.

A Figura 33, ilustra o gráfico com os valores do pH da solução SBF em função da quantidade de dias em que as amostras permaneceram imersas. Verifica-se que o pH inicial da solução era de 7,40, para todas as amostras imersas. Entretanto, no decorrer dos 21 dias de imersão, o pH variou de 7,40 à 8,36 para a amostra Base (Ag 0); de 7,40 até 8,27 para a amostra Ag 0,25; entre 7,40 e 8,35 para a amostra Ag 0,50 e 7,40 até 8,29 para a amostra Ag 0,75.

Como pode ser visto, o pH da solução em função do tempo, apresenta um comportamento exponencial, sendo análogo para todas as amostras preparadas (Fig. 33). As soluções SBF tornaram-se rapidamente mais alcalinas a partir do primeiro dia de imersão, aumentando linearmente até a segunda semana de imersão. Após a segunda semana, há uma tendência dos valores de pH do fluido SBF ser constante. Resultados similares foram encontrados na literatura para vidros silicatos, borossilicatos e boratos, imersos em SBF [18,88–90].

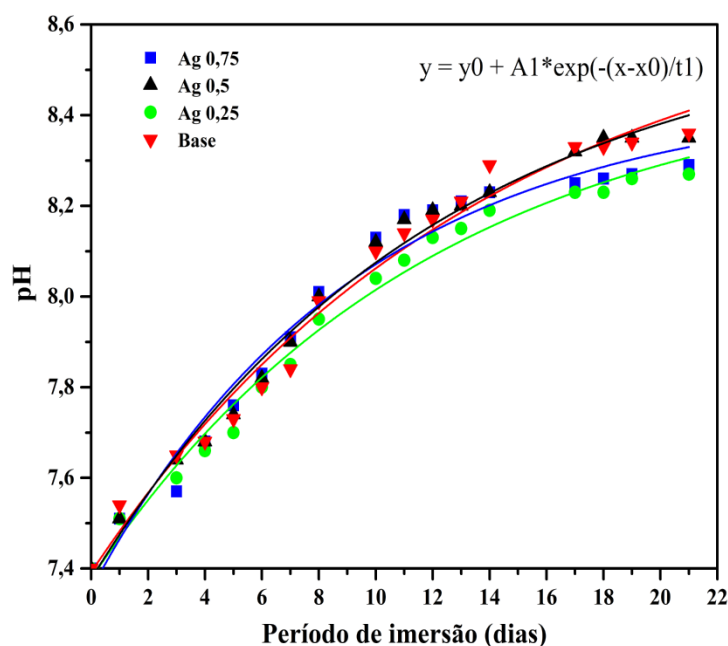


Figura 33 - Medidas de pH para as amostras (Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75), durante os 21 dias de imersão em SBF.

As variações que ocorrem nos valores de pH da solução durante o período de imersão das amostras, podem estar associadas a trocas das espécies OH^- , H^+ e H_3O^+ do SBF com íons alcalinos (Na^+ e Ca^{2+}) pertencentes à rede vítrea. Esse processo de troca favorece o aumento do pH da solução e contribui para a dissolução parcial da camada mais externa do vidro e conseqüentemente a precipitação em apatita [88,90,127].

5.2.3 Difração de raios X após imersão das amostras em SBF

As Figuras 37, 38, 39 e 40 exibem os respectivos difratogramas das amostras Base, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75 antes e após o tratamento em SBF durante 3, 7, 14 e 21 dias de imersão. E, para fins de comparação com os difratogramas obtidos, as Figuras 34, 35 e 36 ilustram os padrões de DRX para a hidroxiapatita, fluorapatita e para o cloreto de prata AgCl, respectivamente.

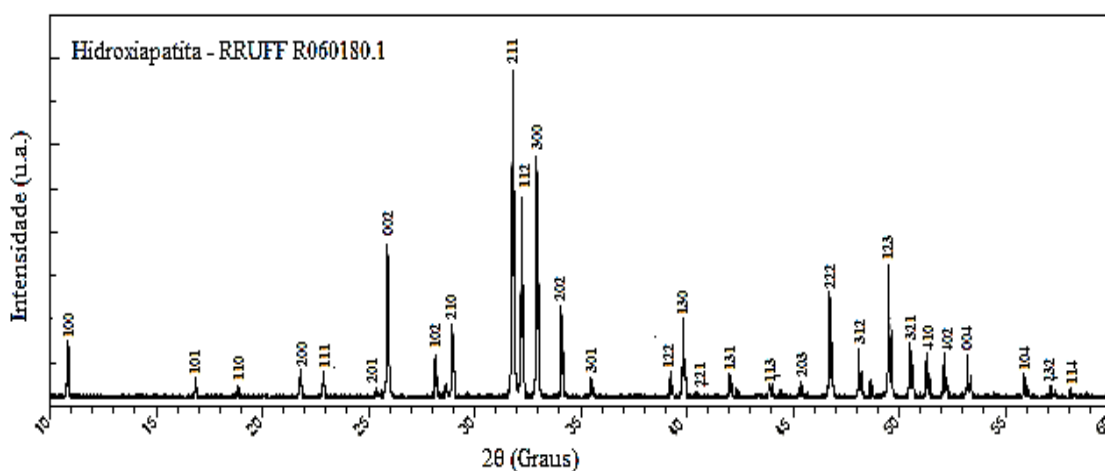


Figura 34 - Padrão de DRX para a Hidroxiapatita. **Fonte:** Adaptado de Scott *et al* (2010), [127].

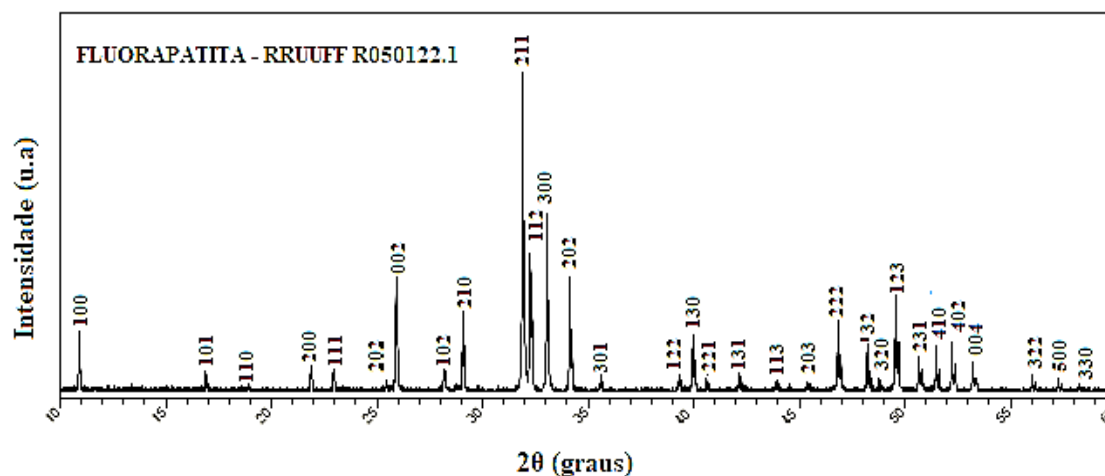


Figura 35 - Padrão de DRX para a Fluorapatita. **Fonte:** Adaptado de Scott *et al* (2010), [128]

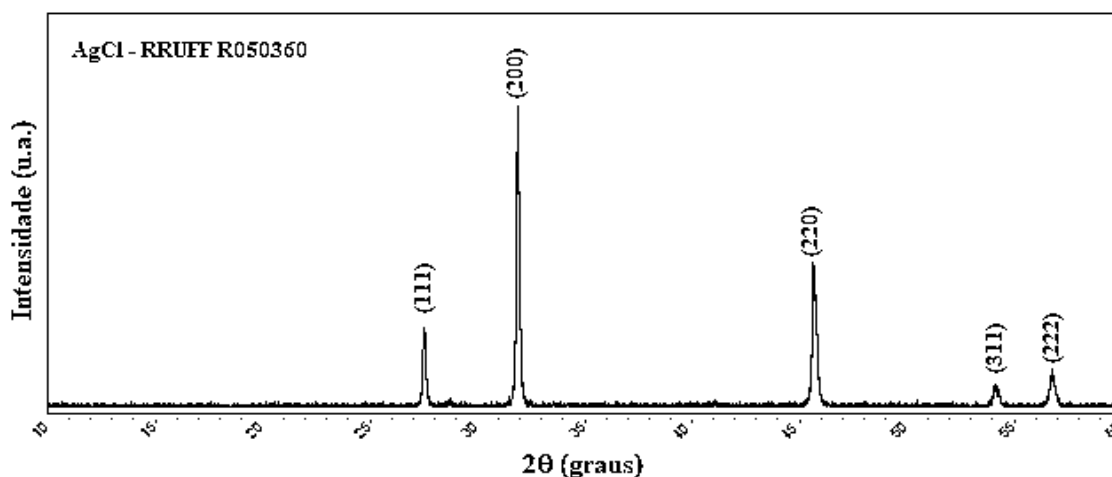


Figura 36 - Padrão de DRX para o cloreto de prata (AgCl). **Fonte:** Adaptado de Richardson (1988), [129].

Para a amostra Ag 0 (sem adição de Ag_2O), Figura 37, não foram observados picos característicos da formação de apatita no difratograma referente ao terceiro dia de imersão. Para o sétimo e décimo quarto dia, há presença de dois picos que indicam a formação de apatita, em $31,60^\circ$ e $45,07^\circ$, como planos cristalográficos (112) e (203), respectivamente. A intensidade do pico em $31,60^\circ$ no difratograma correspondente ao vigésimo primeiro dia é significativamente aumentada. Além disso, há o aparecimento de um pico em $28,39^\circ$ (210) que também está associado à apatita.

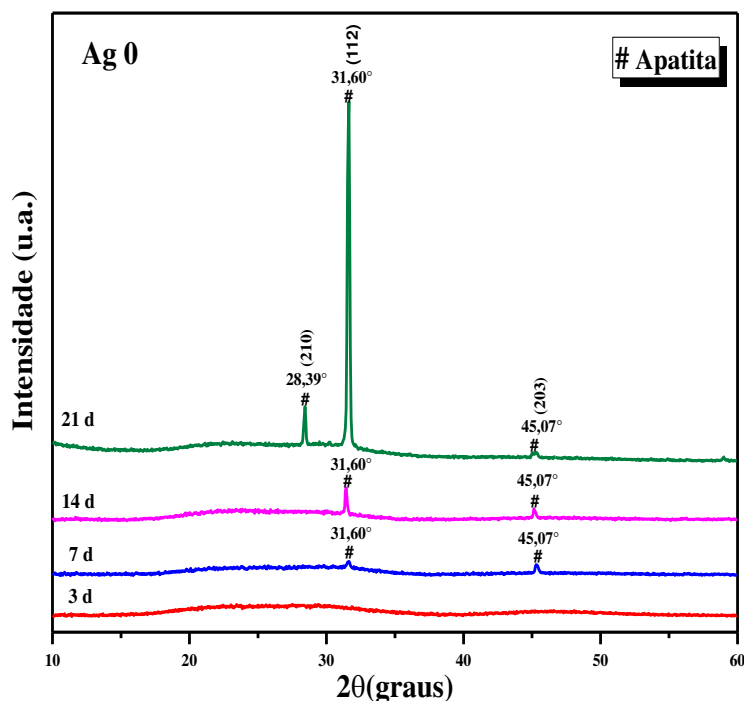


Figura 37 - Difratogramas da amostra Ag 0 depois da imersão em SBF durante (3,7, 14 e 21 dias).

Para a amostra Ag 0,25 (Figura 38), verifica-se que o difratograma correspondente ao terceiro dia de imersão não apresentou picos, o que indica a não formação de apatita na superfície do material. Para o ensaio de 7 dias, é possível identificar picos estreitos em $2\theta = 26^\circ$, $2\theta = 27,87^\circ$, $2\theta = 29^\circ$, $2\theta = 32,18^\circ$ com planos cristalográficos (102), (210), (112) e (222), respectivamente, que são associados à formação de apatitas na superfície do vidro [128,129]. O pico em $2\theta = 46,33^\circ$ pode estar relacionado à formação de AgCl devido a liberação de íons Ag^+ da superfície do vidro que reagiram com íons Cl^- da solução SBF [90–92]. Para o ensaio de 14 dias, podem ser observados o surgimento de dois picos em $2\theta = 54,71^\circ$ e $2\theta = 57,49^\circ$ que correspondem ao precipitado de AgCl. Para a amostra imersa por 21 dias, visualiza-se a presença de dois novos picos em 25° e $41,5^\circ$ que são pertencentes às apatitas HAp e FA [128,129].

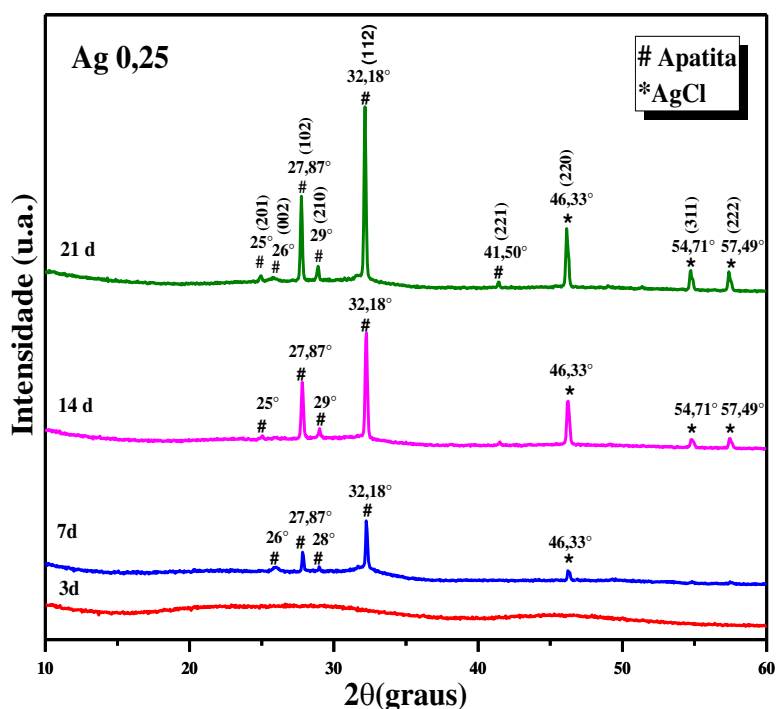


Figura 38 - Difratogramas da amostra Ag 0,25 depois da imersão em SBF durante (3,7, 14 e 21 dias).

Na Figura 39 encontram-se os difratogramas para a amostra Ag 0,50 após o tratamento em SBF. Para o terceiro dia de imersão, os picos em $25,10^\circ$ [201], $27,87^\circ$ [102], $29,03^\circ$ [210], $32,32^\circ$ [112], $41,58^\circ$ [131] indicam a formação de apatita, coincidindo com o padrão de DRX para a HAp e FA exibidos nas Figuras 34 e 35. Os picos em $46,34^\circ$ [222], $54,87^\circ$ [104] e $57,49^\circ$ [313] pertencem ao AgCl. Nota-se, que os difratogramas referentes aos períodos 7, 14 e 21 dias mantiveram os mesmos picos do ensaio de três dias. Os ensaios de 3, 7 e 14 apresentam similaridades entre as

intensidades dos picos. Para o ensaio de 21 dias, os picos $32,32^\circ$ [112], $46,34^\circ$ [222], $54,87^\circ$ [104] e $57,49^\circ$ [313] aparecem mais intensos.

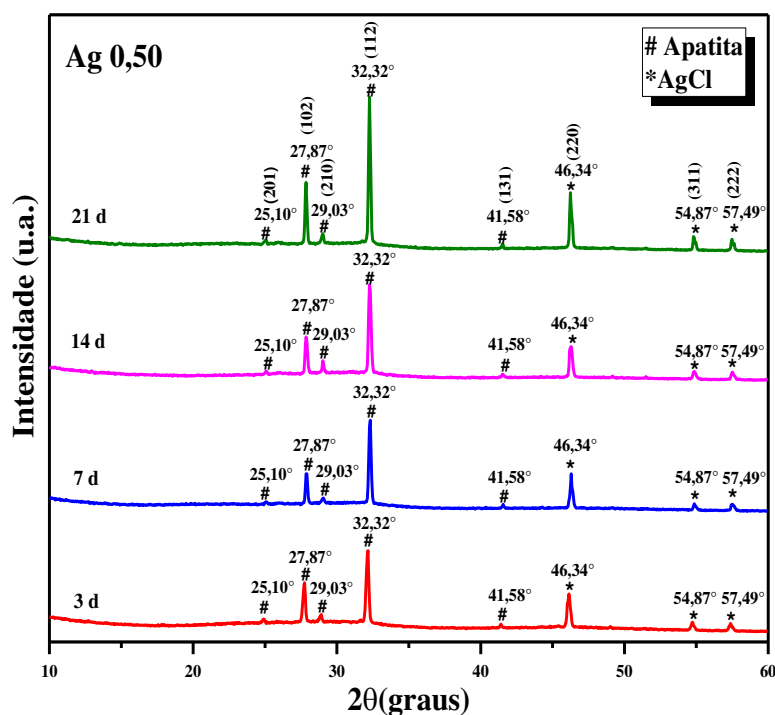


Figura 39 - Difractogramas da amostra Ag 0,50 após a imersão em SBF durante (3,7, 14 e 21 dias).

O difratograma relativo ao terceiro dia de imersão da amostra Ag 0,75 (Figura 40), apresenta picos e planos em $25,01^\circ$, $27,81^\circ$ [102], $32,32^\circ$ [112] e $46,34^\circ$ [222] que são menos intensos que os picos da amostra Ag 0,50 para o mesmo período. Para os períodos de 7, 14 e 21 de imersão na solução SBF, a amostra Ag 0,75, apresenta similaridade à amostra Ag 0,50 em termos de quantidades de picos para o mesmo período.

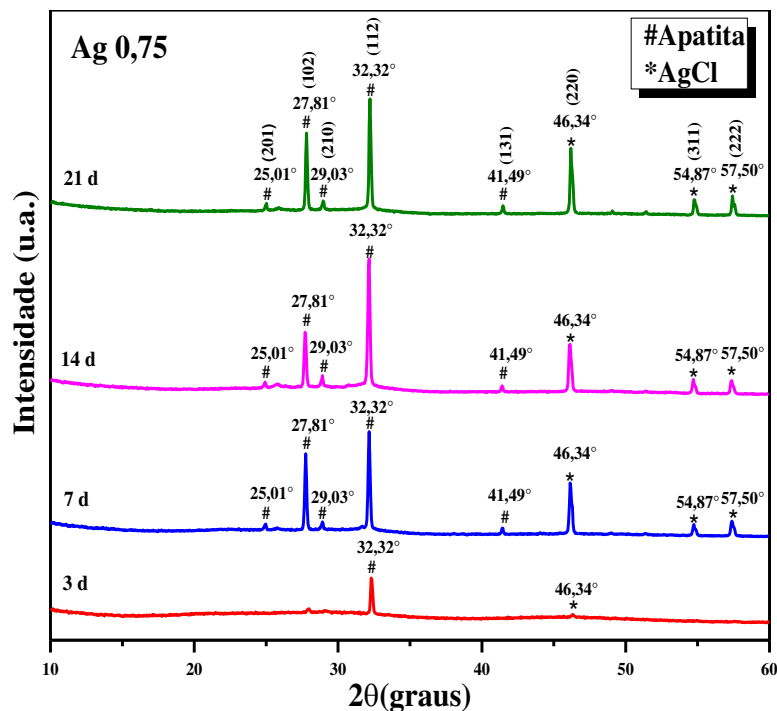


Figura 40 -. Difratomogramas da amostra Ag 0,75 depois da imersão em SBF durante (3,7, 14 e 21 dias).

A Figura 41 apresenta os difratogramas de todas as amostras imersas em SBF durante 21 dias. Constata-se que a adição de Ag_2O nas quantidades 0,25, 0,50 e 0,75% mol à base vítrea não afetou a formação de apatita na superfície dos vidros, havendo mais picos de apatita nos vidros dopados com Ag que a amostra não dopada. De acordo com Bellantone *et al* [130], a liberação de íons Ag em fluidos biológicos pode facilitar a formação da camada HAp por meio da redução das concentrações de íons cálcio e fosfato que são necessários para a precipitação de Hap [130]. Resultados similares foram obtidos por alguns autores ao examinarem a influência de pequenas quantidades de prata, até 2% mol na bioatividade de vidros boratos e silicatos [90,93]. Além disso, observa-se que a intensidade dos picos de AgCl é levemente aumentada com o acréscimo de Ag_2O , estando de acordo com a literatura [90–92].

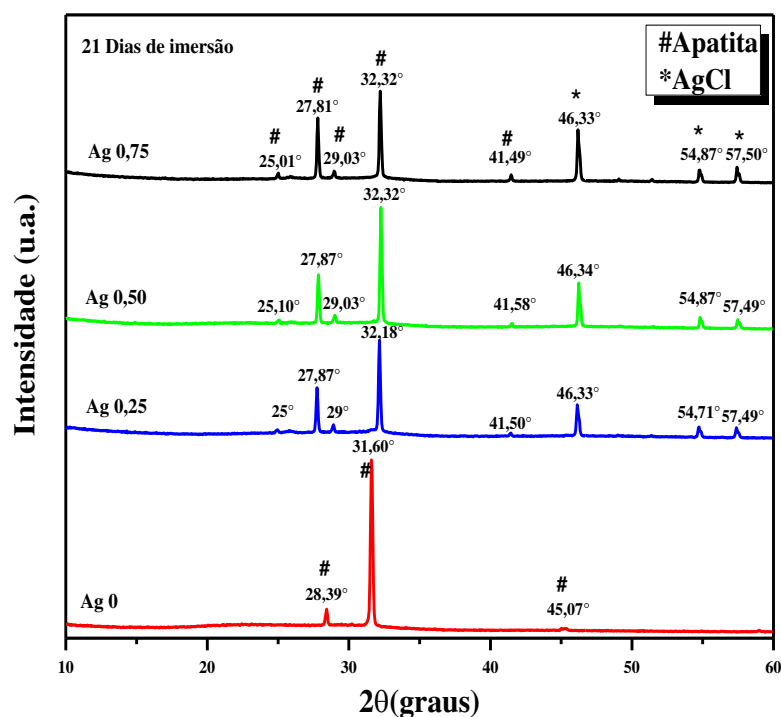


Figura 41 - Difratomogramas das amostras (Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75) depois da imersão em SBF durante 21 dias.

5.2.4 Espectroscopia Raman das amostras antes e após imersão em SBF

A fim de verificar a formação tanto de HAp quanto de FA na superfície do material vítreo, realizaram-se as medidas de espectroscopia Raman das amostras Base, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75, antes e após a imersão em SBF nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias. As Figuras 42 e 43 apresentam os espectros Raman padrão para a HAp e FA, respectivamente.

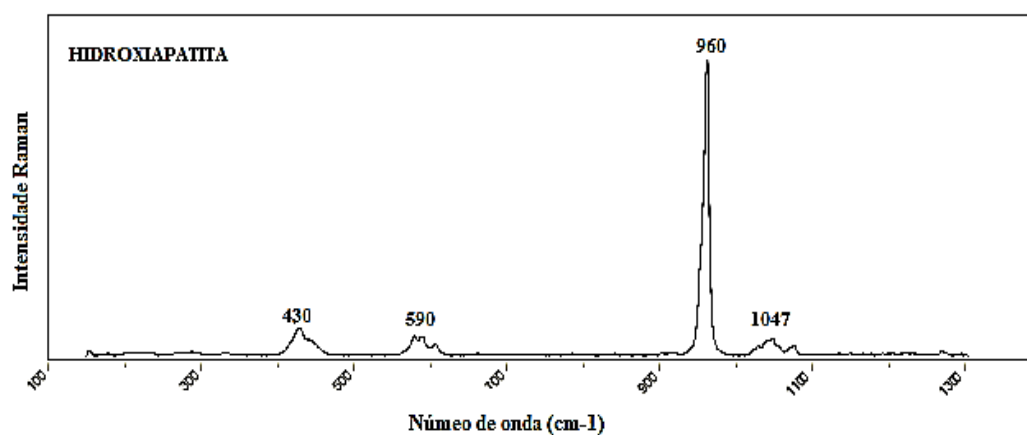


Figura 42 - Espectro Raman padrão para a HAp. Fonte: Adaptado de Scott *et al* (2010), [127].

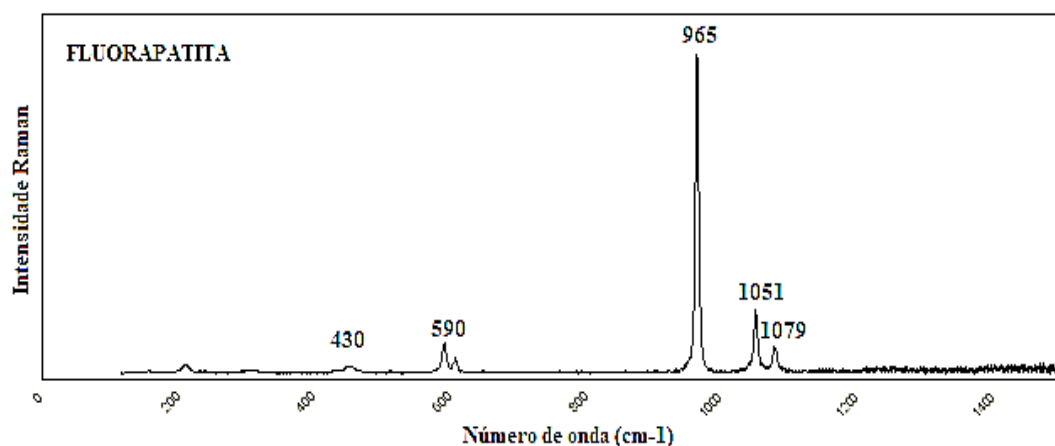


Figura 43 - Espectro Raman padrão para a FA. **Fonte:** Adaptado de Scott *et al* (2010), [128].

A Figura 44 apresenta os espectros Raman da amostra Ag 0. A Tabela 8 descreve as posições das bandas espectrais e suas respectivas atribuições para esta amostra.

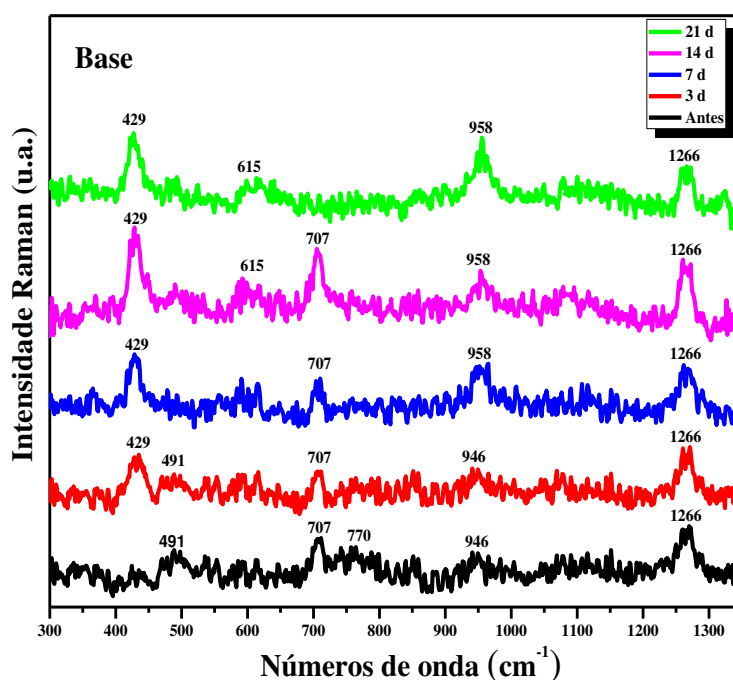


Figura 44 - Espectros Raman da amostra Ag 0, antes e após a imersão em SBF.

Como pode ser observado na Figura 44, o espectro da amostra Ag 0 antes da imersão em SBF apresenta cinco bandas. As bandas localizadas em aproximadamente 491, 770 e 946 cm⁻¹ caracterizam-se como estruturas BO₄ comumente encontradas em vidros boratos [107,131,132]. A banda em torno de 707 cm⁻¹ pode estar associada ao estiramento simétrico P-O-P em espécies tetraédricas ligadas por duas pontes de

oxigênio [75] e está também presente nos espécimes tratados em SBF durante 3, 7 e 14 dias. A banda em 1266 cm^{-1} é atribuída a vibrações de unidades piroboratos [107,118].

Do terceiro até o vigésimo primeiro dia de imersão em SBF verifica-se o aparecimento de uma banda intensa em 429 cm^{-1} que de acordo com a literatura é característica da formação de FA [133–135]. Nos espectros referentes ao décimo quarto dia e vigésimo primeiro dia de imersão, uma banda de baixa intensidade em 614 cm^{-1} é observada. Essa banda também indica indícios de formação de FA na superfície da amostra [133]. Para os períodos de imersão de 7, 14 e 21 dias, verifica-se uma banda em 958 cm^{-1} . Esta banda, que apresenta similaridades com a banda exibida no padrão Raman para a HAp, Figura 42, sobrepõe a banda 946 cm^{-1} presente no vidro antes da imersão e no terceiro dia de imersão em SBF. Esse comportamento confirma que a partir do sétimo dia de imersão em SBF houve conversão da superfície da amostra Base em HA [95,133–136].

As Figuras 45, 46 e 47 apresentam os espectros Raman das amostras Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75 respectivamente. A Tabela 7 descreve resumidamente as posições das bandas espectrais e suas identificações.

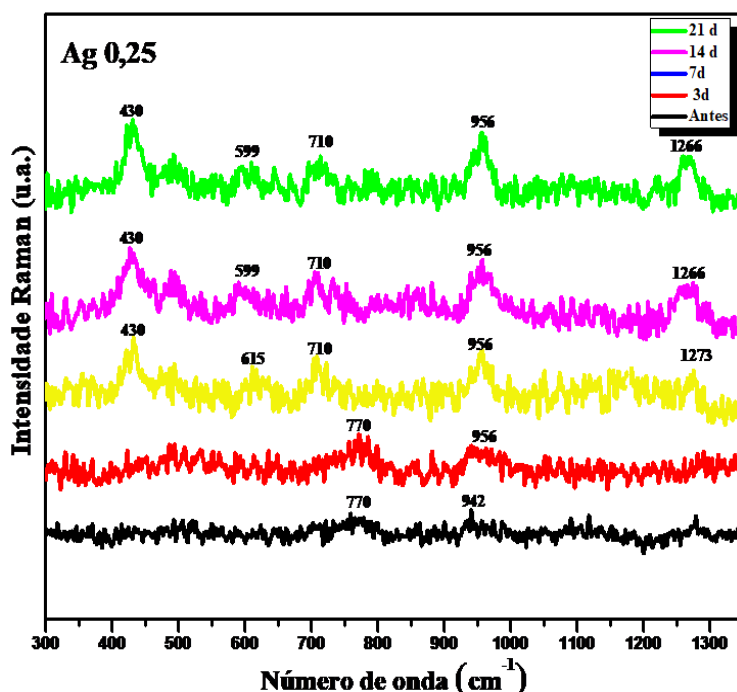


Figura 45 - Espectros Raman da amostra Ag 0,25, antes e após a imersão em SBF.

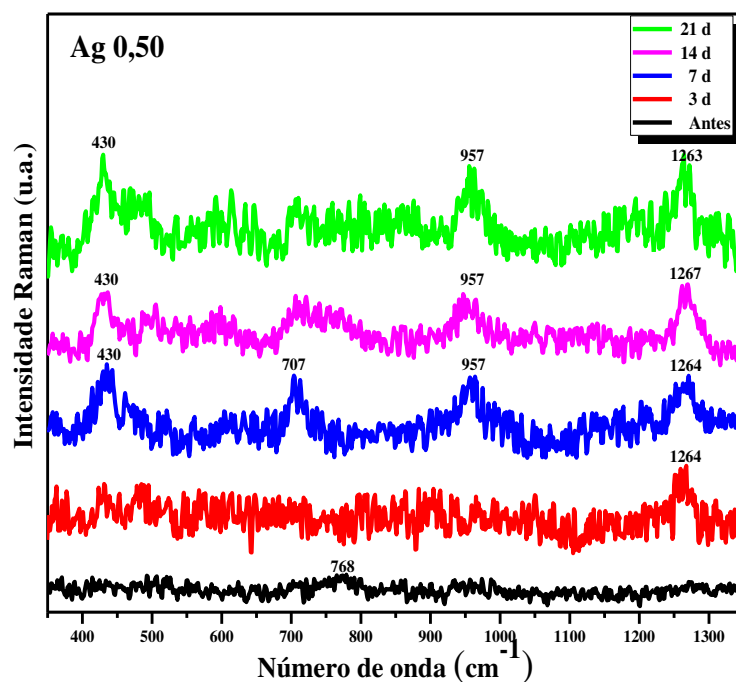


Figura 46 - Espectros Raman da amostra Ag 0,50, antes e após a imersão em SBF.

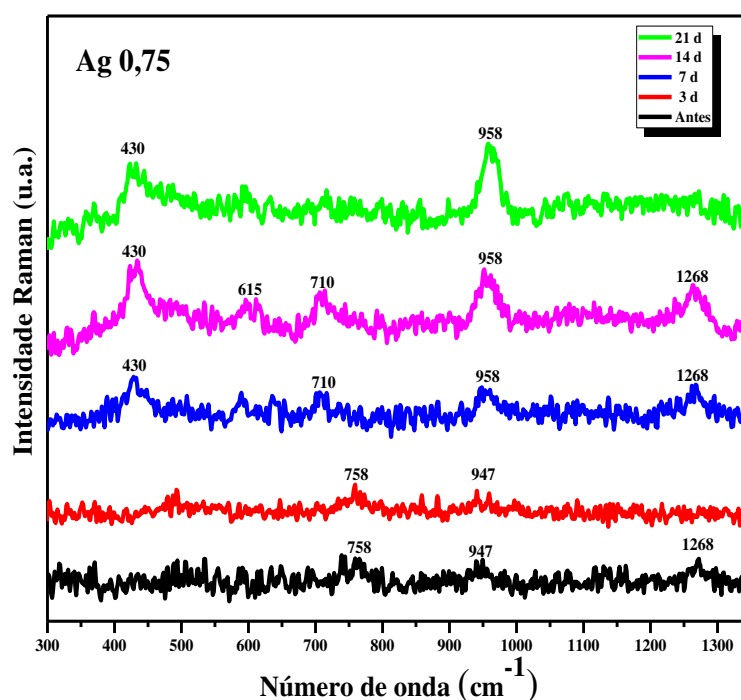


Figura 47 - Espectros Raman da amostra Ag 0,75, antes e após a imersão em SBF.

O espectro Raman da amostra Ag 0,25, imersa em SBF por 3 dias, apresenta bandas em 700 cm⁻¹ (característica de estruturas BO₄ em vidros boratos) e em 956 cm⁻¹ (característica da formação de HAp). Para este mesmo período, as amostras Ag 0,50 e Ag 0,75 não apresentaram bandas características de HAp e FA. A única banda presente

no espectro da Ag 0,50 pode ser atribuída a vibrações de grupos piroboratos ligados ao P-O. Os espectros referentes ao período de 7 dias de imersão para as três amostras contendo Ag₂O, apresentam bandas em 430 cm⁻¹ característica da formação de FA e em aproximadamente 956 cm⁻¹ que é atribuída à HAp.

Para o período de 14 dias de imersão, os espectros das amostras Ag 0,25 e Ag 0,75 apresentaram a banda localizada em 615 cm⁻¹ também atribuída à FA. Comparando os espectros de 14 e 21 dias de imersão, não houve alteração na quantidade de banda para a amostra Ag 0,25. Para as amostras Ag 0,50 e Ag 0,75 duas bandas características das apatitas HAp e FA são observadas em 430 e 958 cm⁻¹, respectivamente.

Tabela 6. Atribuições das bandas dos espectros Raman para as amostras Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75, antes e após imersão em SBF nos períodos (3, 7, 14 e 21 dias).

Posição das bandas (cm ⁻¹)	Atribuições Raman	Referências
429,430	Degeneração dupla do PO ₄ , flexão P-O para HAp e FA.	[133–135]
491	Vibrações do tipo stretching (B-O-B) em unidades BO ₄ .	[107]
599, 615	Degeneração tripla do PO ₄ (ligação O-P-O), para a FA.	[133]
707, 710	Estiramento simétrico P–O–P em unidades PO ₄ .	[75]
758, 770	Estiramento simétrico B-O de unidades BO ₄ tetraédrico e anéis triborato, tetraborato ou pentaborato.	[107]
942, 947	Estiramento B-O de BO ₄ ⁻ em grupos diboratos.	[137]
956,958	Estiramento simétrico do PO ₄ tetraédrico (ligação P-O) para a HAp.	[95,133–136]
1266-1273	Vibrações de grupos piroboratos ligados ao P-O.	[107,118]

A Figura 47 apresenta os espectros Raman das quatro amostras, imersas em SBF por 21 dias.

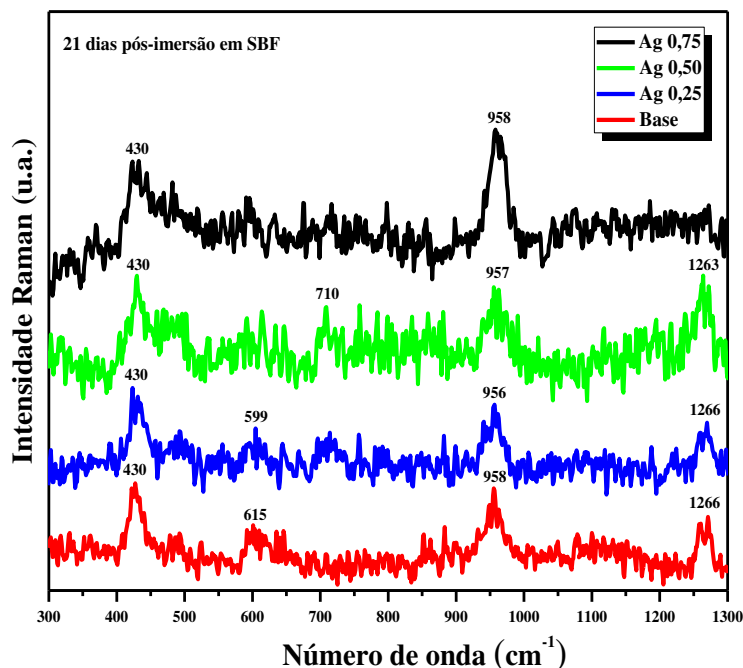


Figura 48 - Espectros Raman das amostras Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75 imersas em SBF por 21 dias.

De acordo com os dados exibidos na Figura 48 para o vigésimo primeiro dia de imersão, todos os espectros Raman das amostras sintetizadas apresentaram bandas em aproximadamente 430 cm^{-1} e 960 cm^{-1} que são bandas características de HA e FA [128,129]. Os resultados obtidos na espectroscopia Raman evidenciaram a formação dessas duas apatitas na superfície das amostras sintetizadas, confirmando os resultados de DRX.

5.2.5 Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier

Para verificar a evolução do processo de formação de hidroxiapatita e de fluorapatita na superfície das amostras, a técnica FTIR foi realizada após os 21 dias de imersão dos vidros em SBF, Figura 50. Na Figura 49 encontra-se um padrão de referência [138], modo transmitância, para a HAp e FA.

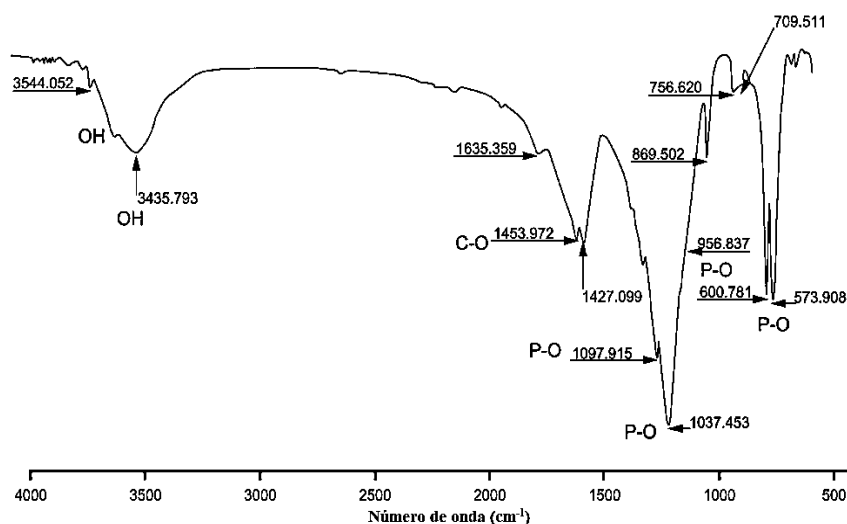


Figura 49 - Padrão de referência para a HAp e FA. **Fonte:** Adaptado de Montazeri *et al* (2011), [138].

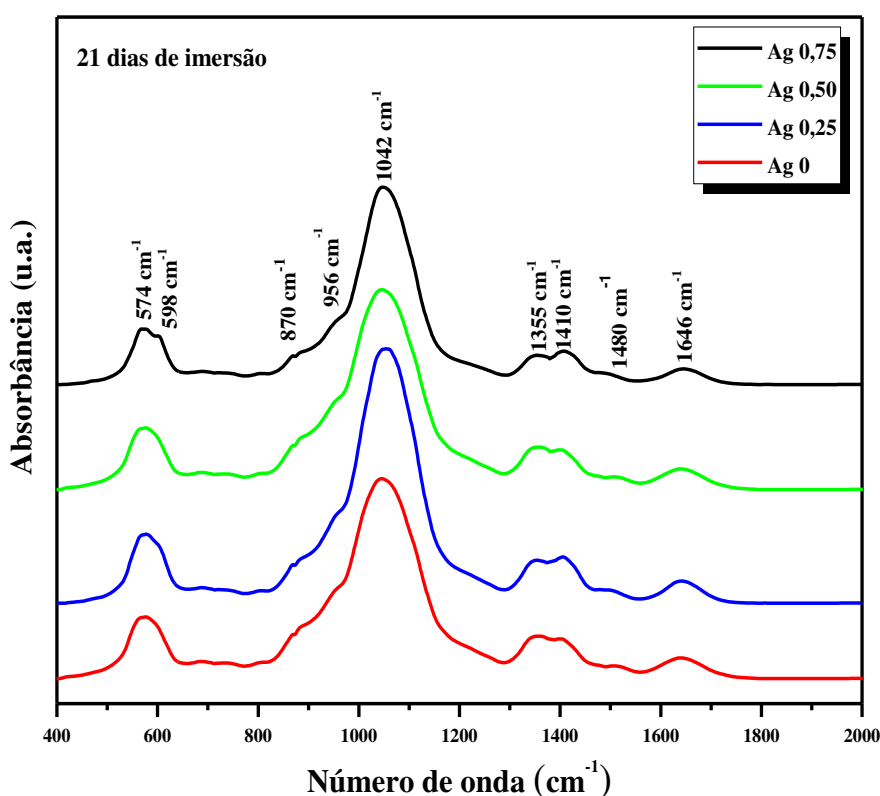


Figura 50 - FTIR das amostras Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75 depois da imersão em SBF durante 21 dias.

Na primeira região, há a presença de uma banda com dois picos pouco intensos, centrados em aproximadamente 574 cm^{-1} e 598 cm^{-1} . Essa banda indica a formação de hidroxiapatita [77,119,139,140], sendo atribuída à ressonância P-O no grupo PO_4 [77]. A intensa banda com pico centrado em aproximadamente 1042 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico da ligação P-O no grupo PO_4 [141,142], sendo característica tanto da hidroxiapatita [106] quanto da Fluorapatita [138]. Os ombros localizados em

870 cm^{-1} e em 956 cm^{-1} podem estar relacionados ao grupo PO_4^{3-} , sendo característicos da presença de fluorapatita e fluorohidroxiapatita [138]. O pico localizado em 1410 cm^{-1} pertence à ressonância da ligação C-O em CO_3^{2-} [77,143,144]. Já o pico centrado em 1646 cm^{-1} é associado ao grupo OH da banda da água [49,73].

A Tabela 9 identifica as bandas FTIR das amostras e suas respectivas atribuições.

Tabela 7. Atribuições das bandas dos espectros FTIR para as amostras (Ag 0, Ag 0,25, Ag 0,50 e Ag 0,75) após imersão em SBF pelo período de 21 dias.

Centro das bandas (cm^{-1})	Atribuições FTIR	Referências
574, 598	Ressonância P-O no grupo PO_4 para a HA.	[77,93,119,139,140]
876, 956, 1042	Estiramento assimétrico da ligação P-O do grupo PO_4 para a HA e FA.	[89,138,141]
1355	Vibrações B-O tipo <i>stretching</i> em unidades trigonal BO_3 para anéis metaborato e grupos piroborato e ortoborato.	[123,124]
1410,1480	Ressonância do C-O.	[77,138,143,144]
1646	Grupo OH^- da banda da água.	[49,73]

Comparando as bandas FTIR das amostras após imersão em SBF, verifica-se que não houve alteração no formato das bandas devido ao aumento da concentração de Ag_2O , estando de acordo com a literatura [88].

5.3. Análise das propriedades antibacterianas e de citotoxicidade das amostras

5.3.1. Atividade antibacteriana das amostras estudadas

Os resultados de CIM e de CBM dos vidros sintetizados neste trabalho estão apresentados na Tabela 10. As amostras Ag 0,50 e Ag 0,75 exibiram efeito bactericida sob a *E.coli* e bacteriostático sob a *S.aureus*. A amostra Ag 0,25 é bacteriostática, porém não é bactericida sob nenhuma das bactérias. O vidro sem adição de Ag₂O (Ag 0) apresentou efeito bacteriostático sob a bactéria *E.coli*, entretanto não exibiu efeitos sob a *S.aureus*.

Ainda que os dados de CIM e CBM mostrem que todas as amostras sintetizadas apresentam alguma atividade antibacteriana sob ambos os microrganismos testados, nenhum dos vidros sintetizados exibiu efeito bactericida sob a *S.aureus*. Tal fato deve-se à existência de uma camada de peptidoglicano, uma espécie de polímero constituído por aminoácidos e açúcares que origina a parede celular exterior dessa bactéria conferindo-lhe resistência [9,26,84].

Tabela 8. Resultados de CIM e CBM para os vidros sintetizados.

<i>E. coli</i> (-)25922				<i>S. aureus</i> (+) 25923		
Vidro	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)		Vidro	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
Ag 0	1000	>1000		Ag 0	>1000	>1000
Ag 0,25	500	1000		Ag 0,25	500	>1000
Ag 0,50	250	250		Ag 0,50	250	>1000
Ag 0,75	250	250		Ag 0,75	500	>1000

5.3.2. Atividade de células osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas em meio contendo os vidros estudados.

A Figura 51 apresenta o gráfico da viabilidade de osteoblastos MC3T3-E1 em função de diferentes concentrações de cada vidro em análise. Para as concentrações de 100 µg/mL, verificou-se que os vidros Ag 0, Ag 0,25 e Ag 0,50 não são tóxicos. Para essas concentrações a viabilidade celular está acima do valor de controle celular que é de 100%. Por outro lado, a amostra Ag 0,75 mostrou-se tóxica às células osteoblásticas, que apresentaram viabilidade celular em torno de 88% quando comparada com o controle. De acordo Kaur *et al* [70], um composto é tóxico quando a viabilidade celular está abaixo de 90%. Para as concentrações de 400, 700 e 1000 µg/mL, nenhuma das

amostras apresentou toxicidade às células osteoblásticas. Observa-se que em 1000 $\mu\text{g/mL}$ houve um aumento da viabilidade celular para a amostra Ag 0,25 e um decréscimo significativo da viabilidade celular para as amostras Ag 0 e Ag0,50.

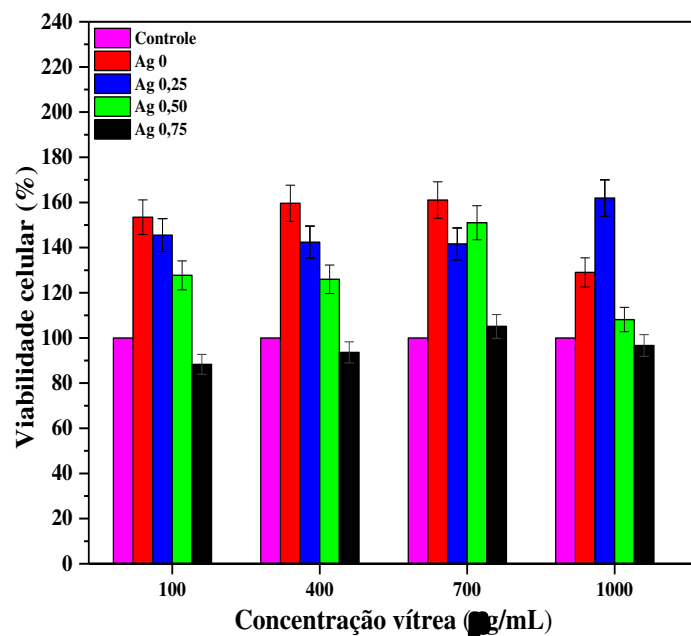


Figura 51 - Viabilidade celular de células osteoblásticas MC3T3E1 em função de diferentes concentrações dos vidros sintetizados.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho investigou-se a influência da adição de 0,25, 0,50 e 0,75% mol, de Ag_2O nas propriedades físicas, na bioatividade, na citocompatibilidade e nas propriedades antibacterianas de vidros boratos, sintetizados pelo método melt-quenching. Em termos de propriedades físicas, os resultados de densidade, volume molar e microdureza não apresentaram mudanças significativas, indicando que a adição de Ag_2O nas concentrações citadas, não alterou significativamente a estrutura dos vidros. Os difratogramas obtidos por meio da técnica de DRX mostraram que não houve a cristalização das amostras vítreas com o aumento do conteúdo de prata, até 0,75%mol. Os testes de pH da solução SBF em que os vidros estavam imersos durante 3, 7, 14 e 21 dias revelaram um aumento da alcalinidade desta solução, indicando a conversão dos vidros em apatita. As análises de DRX realizadas após a imersão em SBF, demonstraram a formação de picos que são característicos aos padrões de DRX para a hidroxiapatita e fluoroapatita, encontrados na literatura. As análises de espectroscopia Raman e de FTIR confirmaram os resultados de DRX, mostrando que a adição de Ag_2O não influenciou a formação de apatita na superfície desses das amostras. Os testes de citotoxicidade, *in vitro*, realizados com células osteoblásticas, mostraram que todos os vidros, exceto a amostra com 0,75 %mol para uma concentração de 1000 mg/mL, não apresentaram toxicidade. As análises de atividade antibacteriana dos vidros analisados revelaram que as amostras com 0,50 e 0,75 %mol de Ag_2O foram bactericidas contra a *E.coli* e bacteriostáticas contra a *S. aureus*. A amostra com concentração de 0,25 %mol de Ag_2O , mostrou-se bacteriostática aos dois microrganismos. Já a amostra Ag 0 foi bacteriostática contra a *E.coli*, porém não demonstrou nenhuma propriedade bacteriana contra a *S.aureus*. Os resultados obtidos indicam que os vidros sintetizados neste trabalho apresentam grandes potencialidades de aplicações como biomateriais.

REFERÊNCIAS

- [1] M. Diba, A.R. Boccaccini, Silver-containing bioactive glasses for tissue engineering applications, Woodhead Publishing Limited, 2014.
doi:10.1533/9780857099051.2.177.
- [2] M. Saini, Implant biomaterials: A comprehensive review, *World J. Clin. Cases.* 3 (2015) 52–57. doi:10.12998/wjcc.v3.i1.52.
- [3] G. Kaur, O.P. Pandey, K. Singh, D. Homa, B. Scott, G. Pickrell, A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 102 (2014) 254–274. doi:10.1002/jbm.a.34690.
- [4] J.M. Anderson, Biological Responses To Materials, *Annu. Rev. Mater. Res.* 31 (2001) 81–110. doi:10.1146/annurev.matsci.31.1.81.
- [5] S.K. Bhullar, N.L. Lala, S. Ramkrishna, Smart biomaterials - A review, *Rev. Adv. Mater. Sci.* 40 (2015) 303–314.
- [6] N. Patel, P. Gohil, A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance, *Int. J. Emerg. Technol. Adv. Eng.* 2 (2012) 91–101.
- [7] S. Gangadoo, J. Chapman, Emerging biomaterials and strategies for medical applications: a review, *Mater. Technol.* 30 (2015) B3–B7.
doi:10.1179/1753555714Y.0000000206.
- [8] C. Marambio-Jones, E.M. V. Hoek, A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *J. Nanoparticle Res.* 12 (2010) 1531–1551. doi:10.1007/s11051-010-9900-y.
- [9] Q.L. Feng, J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, J.O. Kim, A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *J. Biomed. Mater. Res.* 52 (2000) 662–668.
doi:10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::aid-jbm10>3.0.co;2-3.
- [10] R.B.-K. Wakshlak, R. Pedahzur, D. Avnir, Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the “zombies” effect, *Sci. Rep.* 5 (2015) 9555. doi:10.1038/srep09555.
- [11] L.L. Hench, The story of Bioglass, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 967–978. doi:10.1007/s10856-006-0432-z.
- [12] J.R. Jones, Acta Biomaterialia Review of bioactive glass : From Hench to hybrids, *Acta Biomater.* 9 (2013) 4457–4486. doi:10.1016/j.actbio.2012.08.023.
- [13] W.-T. Jiaa, Q. Fub, W.-H. Huangc, C.-Q. Zhanga, R. Mohamed, Comparison of borate bioactive glass and calcium sulfate as implants for the local delivery of

- teicoplanin in the treatment of MRSA-induced osteomyelitis in a rabbit model
Wei-Tao Jia, *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (2015) 7571–7580.
doi:10.1128/AAC.00196-15.
- [14] J. Hum, A.R. Boccaccini, Bioactive glasses as carriers for bioactive molecules and therapeutic drugs: A review, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (2012) 2317–2333. doi:10.1007/s10856-012-4580-z.
- [15] Y.C. Fredholm, N. Karpukhina, D.S. Brauer, J.R. Jones, R. V Law, R.G. Hill, Influence of strontium for calcium substitution in bioactive glasses on degradation, ion release and apatite formation., *J. R. Soc. Interface.* 9 (2012) 880–9. doi:10.1098/rsif.2011.0387.
- [16] M. Gutierrez, M.A. Lopes, N. Hussain, A.T. Cabral, L. Almeida, J.D. Santos, Substitutos Ósseos Conceitos Gerais e Estado Actual, *ArqMed.* 19 (2006) 153–162. http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0871-34132005000300004&lng=pt&nrm=i&tlng=en.
- [17] R.L. Siqueira, E.D. Zanotto, Biosilicato ® : Histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade, *Quim. Nov.* 34 (2011) 1231–1241. doi:10.1590/S0100-40422011000700023.
- [18] Q. Fu, M.N. Rahaman, H. Fu, X. Liu, Silicate , borosilicate , and borate bioactive glass scaffolds with controllable degradation rate for bone tissue engineering applications . I . Preparation and in vitro degradation, *J. Biomed. Mater. Res.* 95A (2010) 164–171. doi:10.1002/jbm.a.32824.
- [19] A. Akademi, On the bioactivity of silicate glass *, 129 (1991) 145–151.
- [20] A. Hoppe, N.S. Güldal, A.R. Boccaccini, Biomaterials A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, *Biomaterials.* 32 (2011) 2757–2774. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.004.
- [21] M. Navarro, T. Serra, Biomimetic mineralization of ceramics and glasses, Elsevier Ltd., 2016. doi:10.1016/B978-1-78242-338-6.00011-9.
- [22] K. Magyari, C. Gruian, B. Varga, R. Ciceo-Lucacel, T. Radu, H.-J. Steinhoff, G. Váró, V. Simon, L. Baia, Addressing the optimal silver content in bioactive glass systems in terms of BSA adsorption, *J. Mater. Chem. B.* 2 (2014) 5799–5808. doi:10.1039/C4TB00733F.
- [23] M.N. Rahaman, D.E. Day, B.S. Bal, Q. Fu, S.B. Jung, L.F. Bonewald, A.P. Tomsia, Acta Biomaterialia Bioactive glass in tissue engineering, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2355–2373. doi:10.1016/j.actbio.2011.03.016.

- [24] O.O. Ige, L.E. Umoru, S. Aribio, Natural Products: A Minefield of Biomaterials, *ISRN Mater. Sci.* 2012 (2012) 1–20. doi:10.5402/2012/983062.
- [25] J.R. Swathy, M.U. Sankar, A. Chaudhary, S. Aigal, Anshup, T. Pradeep, Antimicrobial silver: An unprecedented anion effect, *Sci. Rep.* 4 (2014) 7161. doi:10.1038/srep07161.
- [26] W.K. Jung, H.C. Koo, K.W. Kim, S. Shin, S.H. Kim, Y.H. Park, Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 2171–2178. doi:10.1128/AEM.02001-07.
- [27] G. Rajkumar, M. Rajkumar, V. Rajendran, S. Aravindan, Influence of Ag₂O in Physico-Chemical Properties and HAp Precipitation on Phosphate-Based Glasses ‡, *J. Am. Ceram. Soc.* 2925 (2011) 2918–2925. doi:10.1111/j.1551-2916.2011.04725.x.
- [28] O.B. Glass, M. Bellantone, H.D. Williams, L.L. Hench, M. Bellantone, H.D. Williams, L.L. Hench, Broad-Spectrum Bactericidal Activity of Ag₂O Broad-Spectrum Bactericidal Activity of Ag₂O-Doped Bioactive Glass, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 1940–1945. doi:10.1128/AAC.46.6.1940.
- [29] J.J. Blaker, S.N. Nazhat, A.R. Boccaccini, Development and characterisation of silver-doped bioactive glass-coated sutures for tissue engineering and wound healing applications, *Biomaterials.* 25 (2004) 1319–1329. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.08.007.
- [30] Y.F. Goh, A.Z. Alshemary, M. Akram, M.R. Abdul Kadir, R. Hussain, Bioactive Glass: An In-Vitro Comparative Study of Doping with Nanoscale Copper and Silver Particles, *Int. J. Appl. Glas. Sci.* 5 (2014) 255–266. doi:10.1111/ijag.12061.
- [31] A.L.R. Pires, A.C.K. Bierhalz, Â.M. Moraes, Biomaterials: Types, Applications, and Market, *Quim. Nova.* 38 (2015) 957–971. doi:10.5935/0100-4042.20150094.
- [32] S. Chernousova, M. Epple, Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 52 (2013) 1636–1653. doi:10.1002/anie.201205923.
- [33] G. Mulley, A.T.A. Jenkins, N.R. Waterfield, Inactivation of the antibacterial and cytotoxic properties of silver ions by biologically relevant compounds, *PLoS One.* 9 (2014) 2–10. doi:10.1371/journal.pone.0094409.
- [34] S.H. Luo, W. Xiao, X.J. Wei, W.T. Jia, C.Q. Zhang, W.H. Huang, D.X. Jin, M.N.

- Rahaman, D.E. Day, In vitro evaluation of cytotoxicity of silver-containing borate bioactive glass, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 95 B (2010) 441–448. doi:10.1002/jbm.b.31735.
- [35] B. Le Ouay, F. Stellacci, Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight, *Nano Today*. 10 (2015) 339–354. doi:10.1016/j.nantod.2015.04.002.
- [36] B.O.B. Brier, P. Vinh, M. Schuster, H. Mayforth, A Radiologic Study of an Ancient Egyptian Mummy with a Prosthetic Toe, 1058 (2015) 1047–1058. doi:10.1002/ar.23135.
- [37] A. Behera, Classification of Biomaterials used in Medicine Classification of Biomaterials used in Medicine, *Int. J. Adv. Appl. Sci.* 1 (2012) 125–129. <https://www.researchgate.net/publication/259240254>.
- [38] F. Papadimitrakopoulos, D. Ph, D.J. Burgess, D. Ph, A Review of the Biocompatibility of Implantable Devices: Current Challenges to Overcome Foreign Body Response, *J. Diabetes Sci. Technol.* 2 (2008) 1003–1015. doi:10.1177/193229680800200610.
- [39] J. Autian, D. Ph, Toxicological Evaluation of Biornaterials : Primary Acute Toxicity Screening Program, *Artif. Organs.* 1 (1977) 53–57. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.1977.tb00968.x>.
- [40] R.K. Tekade, R. Maheshwari, N.K. Jain, Toxicity of nanostructured biomaterials, Elsevier Ltd., 2018. doi:10.1016/B978-0-08-100716-7.00027-1.
- [41] P. Taylor, S. Bhat, A. Kumar, Biomaterials and bioengineering tomorrow ' s healthcare, (2013) 37–41. doi:10.4161/biom.24717.
- [42] F.J.O. Brien, Biomaterials & scaffolds Every day thousands of surgical procedures are performed to replace, *Mater. Today*. 14 (2011) 88–95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [43] M.M. Stevens, Biomaterials for bone tissue engineering, *Mater. Today*. 11 (2008) 18–25. doi:10.1016/S1369-7021(08)70086-5.
- [44] C.-J. Hwang, J.-S. Shin, J.-Y. Cha, Metal release from simulated fixed orthodontic appliances, *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 120 (2001) 383–391. doi:10.1067/mod.2001.117911.
- [45] P. Taylor, M. Ribeiro, F.J. Monteiro, M.P. Ferraz, M. Ribeiro, F.J. Monteiro, M.P. Ferraz, studying bacterial-material interactions Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in

- studying bacterial-material interactions, *Biomater.* 2:4 (2012) 176–194.
doi:10.4161/biom.22905.
- [46] L.L. Hench, *Bioceramics : From Concept to Clinic*, *J. Am. Ceram. Soc.* 74 (1991) 1487–1510. doi:10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x.
- [47] H. Press, *Applications of Polymer Nanofibers in Biomedicine and Biotechnology*, 125 (2005) 147–157.
- [48] Q. Wei, N. Deng, J. Guo, J. Deng, *Synthetic Polymers for Biomedical Applications*, 2018 (2018).
- [49] B.D. Ulery, L.S. Nair, C.T. Laurencin, *Biomedical Applications of Biodegradable Polymers*, *J. Polym. Phys.* 49 (2011) 832–864.
doi:10.1002/polb.22259.
- [50] L. Brito Rodrigues, *Biomaterials applications in orthopaedics*, *Estud. Tecnológicos Em Eng.* 9 (2013) 63–76. doi:10.4013/ete.2013.92.02.
- [51] D.S. Kohane, R. Langer, *Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering*, *Pediatr. Res. Copyr.* 63 (2008) 487–491. doi:10.1203/01.pdr.0000305937.26105.e7.
- [52] T. Gurunathan, S. Mohanty, S.K. Nayak, *A Review of the Recent Developments in Biocomposites Based on Natural Fibres and Their Application Perspectives*, *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* 77 (2015) 1–25.
doi:doi.org/10.1016/j.compositesa.2015.06.007.
- [53] M. Vallet-regí, M. Vallet-regí, *Ceramics for medical applications*, *R. Soc. Chem. Trans.* (2001) 97–108. doi:10.1039/b007852m.
- [54] T. Duminis, S. Shahid, R.G. Hill, A. Candida, M. Rodrigues, T. Duminis, *Apatite Glass-Ceramics : A Review*, *Front. Mater.* 3 (2017) 1–15.
doi:10.3389/fmats.2016.00059.
- [55] A. Shavandi, A.E.A. Bekhit, Z. Sun, A. Ali, *A review of synthesis methods , properties and use of hydroxyapatite as a substitute of bone*, *J. Biomimetics, Biomater. Biomed. Eng. Vol.* 25 (2015) 98–117.
doi:10.4028/www.scientific.net/JBBBE.25.98.
- [56] S.J. Kalita, A. Bhardwaj, H.A. Bhatt, *Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering*, *Mater. Sci. Eng.* 27 (2007) 441–449.
doi:10.1016/j.msec.2006.05.018.
- [57] M. Mathew, S. Takagi, *Structures of Biological Minerals in Dental Research*, *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 106 (2001) 1035–1044. doi:10.6028/jres.106.054.
- [58] A. Szcze, L. Ho, E. Chibowski, *Synthesis of hydroxyapatite for biomedical*

- applications, *Adv. Colloid Interface Sci.* 249 (2017) 321–330.
doi:10.1016/j.cis.2017.04.007.
- [59] M.P. Ferraz, F.J. Monteiro, C.M. Manuel, Hydroxyapatite nanoparticles : A review of, *J. Appl. Biomater. Biomech.* 2 (2004) 74–80.
doi:https://doi.org/10.1177/228080000400200202.
- [60] N. Leroy, E. Bres, Structure and substitutions in fluorapatite, *Eur. Cells Mater.* 2 (2001) 36–48. doi:10.22203/eCM.v002a05.
- [61] M. Wei, J.H. Evans, Synthesis and characterization of hydroxyapatite , fluoride-substituted hydroxyapatite and fluorapatite, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 4 (2003) 311–320. doi:10.1023/A:1022975730730.
- [62] H. Chen, K. Sun, Z. Tang, R. V Law, J.F. Mansfield, A. Czajka-jakubowska, B.H. Clarkson, Synthesis of Fluorapatite Nanorods and Nanowires by Direct Precipitation from Solution 2006, *Cryst. Growth Des.* 6 (2006) 1504–1508.
doi:10.1021/cg0600086.
- [63] C.J. Tredwin, A.M. Young, J.C. Knowles, Hydroxyapatite , fluor-hydroxyapatite and fluorapatite produced via the sol – gel method : dissolution behaviour and biological properties after crystallisation, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29 (2013) 47–53. doi:10.1007/s10856-013-5050-y.
- [64] L. Gerhardt, A.R. Boccaccini, Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Materials (Basel)*. 3 (2010) 3867–3910.
doi:10.3390/ma3073867.
- [65] V. Krishnan, T. Lakshmi, Bioglass : A novel biocompatible innovation, *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 4 (2013) 78–83. doi:10.4103/2231-4040.111523.
- [66] J.R. Jones, D.S. Brauer, D.C. Greenspan, S. Consulting, B. Court, S. Augustine, Bioglass and Bioactive Glasses and Their Impact on Healthcare, *Int. J. OfApplied Glas. Sci.* 434 (2016) 423–434. doi:10.1111/ijag.12252.
- [67] F.H. ElBatal, M.A. Ouis, H.A. ElBatal, Comparative studies on the bioactivity of some borate glasses and glass-ceramics from the two systems: Na₂O-CaO-B₂O₃ and NaF-CaF₂-B₂O₃, *Ceram. Int.* (2015). doi:10.1016/j.ceramint.2016.02.037.
- [68] F. Baino, G. Novajra, V. Miguez-pacheco, A.R. Boccaccini, C. Vitale-brovarone, Bioactive glasses : Special applications outside the skeletal system, *J. Non. Cryst. Solids.* (2015). doi:10.1016/j.jnoncrysol.2015.02.015.
- [69] F. Baino, C. Vitale-brovarone, Review Three-dimensional glass-derived scaffolds for bone tissue engineering : Current trends and forecasts for the future, *J.*

- Biomed. Mater. Res. 97A (2011) 514–535. doi:10.1002/jbm.a.33072.
- [70] G. Kaur, G. Pickrell, G. Kimsawatde, D. Homa, H.A. Allbee, N. Sriranganathan, Synthesis, cytotoxicity, and hydroxyapatite formation in 27-Tris-SBF for sol-gel based CaO-P₂O₅-SiO₂-B₂O₃-ZnO bioactive glasses, *Sci. Rep.* 4 (2014) 1–14. doi:10.1038/srep04392.
- [71] K. Bastos Mundstock, A.P. Novais de Oliveira, D. Hotza, S.O. Rogero, Avaliação da biocompatibilidade de vidro e vitrocerâmica do sistema SNCP (SiO₂-Na₂O-P₂O₅), *Quim. Nov.* 35 (2012) 665–670. doi:10.1590/S0100-40422012000400002.
- [72] T. Kokubo, Bioactive glass ceramics: properties and applications, *Biomaterials.* 12 (1991) 155–163. doi:10.1016/0142-9612(91)90194-F.
- [73] T. Kokubo, H. Takadama, Simulated Body Fluid (SBF) as a Standard Tool to Test the Bioactivity of Implants, *Handb. Biominer. Biol. Asp. Struct. Form.* 3 (2008) 97–109. doi:10.1002/9783527619443.ch51.
- [74] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials.* 27 (2006) 2907–2915. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [75] I.J. Hidi, G. Melinte, R. Stefan, M. Bindea, L. Baia, The study of the structure and bioactivity of the B₂O₃ • Na₂O • P₂O₅ system, *J. Raman Spectrosc.* 44 (2013) 1187–1194. doi:10.1002/jrs.4330.
- [76] H.B. Pan, X.L. Zhao, X. Zhang, K.B. Zhang, L.C. Li, Z.Y. Li, W.M. Lam, W.W. Lu, D.P. Wang, H. Huang, K.L. Lin, J. Chang, Strontium borate glass : potential biomaterial for bone regeneration Strontium borate glass : potential biomaterial for bone regeneration, *J. R. Soc. Interface.* 7 (2010) 1025–1031. doi:10.1098/rsif.2009.0504.
- [77] W. Huang, D.E. Day, K. Kittiratanapiboon, M.N. Rahaman, Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 583–596. doi:10.1007/s10856-006-9220-z.
- [78] R.F. Brown, M.N. Rahaman, A.B. Dwilewicz, W. Huang, D.E. Day, Y. Li, B.S. Bal, Effect of borate glass composition on its conversion to hydroxyapatite and on the proliferation of MC3T3-E1 cells, *J. Biomed. Mater. Res.* 88A (2008) 392–499. doi:10.1002/jbm.a.31679.
- [79] D.E. Day, In Vitro Bioactive Characteristics of Borate-Based Glasses with

- Controllable Degradation Behavior, *J. Am. Ceram. Soc.* 90 (2007) 303–306.
doi:10.1111/j.1551-2916.2006.01358.x.
- [80] T. Kokubo, S. Yamaguchi, Novel bioactive materials developed by SBF evaluation: Surface-modified Ti metal and its alloys, *Acta Biomater.* 44 (2016).
doi:10.1016/j.actbio.2016.08.013.
- [81] T.B. Troczynski, P.S. Nicholson, Fracture Mechanics of Titanium/Bioactive Glass-Ceramic Particulate Composites, *J. Am. Ceram. Soc.* 74 (1991) 1803–1806. doi:10.1111/j.1151-2916.1991.tb07791.x.
- [82] J.L. Clement, P.S. Jarrett, Antibacterial silver, *Met. Based. Drugs.* 1 (1994) 467–82. doi:10.1155/MBD.1994.467.
- [83] M. Rai, A. Yadav, A. Gade, Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 76–83.
doi:10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.
- [84] S. Naseri, W.C. Lepry, V.B. Maisuria, N. Tufenkji, S.N. Nazhat, Development and characterization of silver-doped sol-gel-derived borate glasses with antibacterial activity, *J. Non. Cryst. Solids.* 505 (2019) 438–446.
doi:10.1016/j.jnoncrysol.2018.11.026.
- [85] M. Miola, E. Vern, C. Vitale-brovarone, F. Baino, Antibacterial Bioglass-Derived Scaffolds : Innovative Synthesis Approach and Characterization, 247 (2016) 238–247. doi:10.1111/ijag.12209.
- [86] S. Di Nunzio, M. Bosetti, P. Appendino, C.V. Brovarone, E. Verne, G. Maina, M. Cannas, Surface characterization of silver-doped bioactive glass, 26 (2005) 5111–5119. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.01.038.
- [87] J.M. Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations, *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (2001) 5–16. doi:doi:10.1093/jac/48.suppl_1.5.
- [88] H. Kamal, Structure and Physical Properties of Silver Borate Bioactive Glasses, *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 5 (2014) 822–832.
[https://www.rjpbcs.com/pdf/2014_5\(5\)/\[118\].pdf](https://www.rjpbcs.com/pdf/2014_5(5)/[118].pdf).
- [89] H. Kamal, A.M. Abdelghany, Effect of Transition Metal Addition in the Bioactivity of Borate Bioglass Dental Effect of Transition Metal Addition in the Bioactivity of Borate Bioglass Dental Materials, *J. Dent.* 3 (2015) 11–21.
doi:10.12974/2311-8695.2015.03.01.3.
- [90] H. Wang, Evaluation of three-dimensional silver-doped borate bioactive glass scaffolds for bone repair : Biodegradability , biocompatibility , and antibacterial

- activity, *J. Mater. Res.* 30 (2015) 2722–2735. doi:10.1557/jmr.2015.243.
- [91] F.E. Ciraldo, L. Liverani, A.R. Boccaccini, Synthesis and Characterization of Silver-Doped Mesoporous Bioactive Glass and Its Applications in Conjunction with Electrospinning, *Materials (Basel)*. 11 (2018) 692. doi:10.3390/ma11050692.
- [92] F. Sharifianjazi, N. Parvin, M. Tahriri, Synthesis and characteristics of sol-gel bioactive SiO₂-P₂O₅-CaO-Ag₂O glasses, *J. Non. Cryst. Solids*. 476 (2017) 108–113. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2017.09.035.
- [93] N. Krishnamacharyulu, G. Jagan Mohini, G. Sahaya Baskaran, V. Ravi Kumar, N. Veeraiah, Investigation on silver doped B₂O₃– SiO₂– P₂O₅– Na₂O – CaO bioglass system for biomedical applications, *J. Alloys Compd.* 734 (2018) 318–328. doi:10.1016/j.jallcom.2017.10.271.
- [94] F.H. El-Batal, A.A. El-Kheshen, G.T. El-Bassyouni, A.A.A. El Aty, In Vitro Bioactivity Behavior of some Borate Glasses and their Glass-Ceramic Derivatives Containing Zn²⁺, Ag⁺ or Cu²⁺ by Immersion in Phosphate Solution and their Anti-Microbial Activity, *Silicon*. 10 (2017) 943–957. doi:10.1007/s12633-017-9552-y.
- [95] A. Saranti, I. Koutselas, M.A. Karakassides, Bioactive glasses in the system CaO-B₂O₃-P₂O₅: Preparation, structural study and in vitro evaluation, *J. Non. Cryst. Solids*. 352 (2006) 390–398. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2006.01.042.
- [96] A. Balamurugan, G. Balossier, S. Pina, J. Faure, An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol – gel derived silver-incorporated bioglass system, *Dent. Mater.* 24 (2008) 1343–1351. doi:10.1016/j.dental.2008.02.015.
- [97] C. Kittel, *Introduction to Solid State Physics*, 8^a, John Wiley & Sons, Hoboken, 2005.
- [98] W.D. Callister JR, D.G. Rethwisch, *Materials Science and Engineering: An Introduction*, 9th ed., John Wiley & Sons, Hoboken, 2016.
- [99] D. Gobbo, L, *Aplicação da difração de raios X e método de Rietveld no estudo do cimento Portland*, USP, 2009. doi:10.11606/T.44.2009.tde-23072009-144653.
- [100] J. Seto, P.A. Romero, *Shaping it up: Design and Engineering of Biominerals and Crystalline Materials from the Bottom Up*, 2015. doi:10.1016/B978-1-78242-338-6.00002-8.
- [101] S. Inaba, S. Fujino, Empirical Equation for Calculating the Density of Oxide Glasses, *J. Am. Ceram. Soc.* 93 (2010) 217–220. doi:10.1111/j.1551-

2916.2009.03363.x.

- [102] U. Chanshetti, DENSITY AND MOLAR VOLUME STUDIES OF PHOSPHATE GLASSES †, *Physics, Chem. Technol.* 9 (2011) 29–36. doi:10.2298/FUPCT1101029C.
- [103] N. Otingher, Raman spectroscopy : techniques and applications in the life sciences, *Adv. Opt. Photonics.* 9 (2017) 315–428. doi:10.1364/AOP.9.000315.
- [104] G.S. Bumbrah, R.M. Sharma, Raman spectroscopy – Basic principle , instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse, *Egypt. J. FORENSIC Sci.* 6 (2015) 209–215. doi:10.1016/j.ejfs.2015.06.001.
- [105] E.D.W.V.B.F. Zhu, L.D.B.S. Ma, L.A.N.K.J. Jalkanen, A combined theoretical and experimental study of the structure and vibrational absorption , vibrational circular dichroism , Raman and Raman optical activity spectra of the L -histidine zwitterion, *Theor. Chem. Acc.* 119 (2008) 155–176. doi:10.1007/s00214-007-0276-8.
- [106] M.A. Walters, Y.C. Lang, N.C. Blumenthal, R.Z. Legeros, I.L.A. Konsker, A Raman and Infrared Spectroscopic Investigation of Biological Hydroxyapatite, *J. Inorg. Biochem.* 39 (1990) 193–200. doi:10.1016/0162-0134(90)84002-7.
- [107] B.N. Meera, J. Ramakrishna, Raman spectral studies of borate glasses, *J. Non-Crystalline Solids* 159. 159 (1993) 1–21. doi:10.1016/0022-3093(93)91277-A.
- [108] W.L. KONIJNENDIJK, J.M. STEVELS, THE STRUCTURE OF BORATE GLASSES STUDIED BY RAMAN SCATTERING, *J. Non-Crystalline Solids* 18. 18 (1975) 307–331. doi:10.1016/0022-3093(75)90137-4.
- [109] S. Aeta, N. Ireland, K. Avenue, High-pressure effects on organic liquids . Production and infrared spectra of single crystals *, *Spectrochim. Acta.* 21 (1986) 1183–1188. doi:10.1016/0371-1951(65)80201-6.
- [110] J.S. Gaffney, N.A. Marley, D.E. Jones, Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy, *Charact. Mater.* (2012) 1104–1135. doi:10.1002/0471266965.com107.pub2.
- [111] J.E. Shelby, Introduction to Glass Science and Technology, Second, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005. doi:10.1039/9781847551160.
- [112] S.N. Salama, H. Darwish, H.A. Abo-Mosallam, Crystallization and properties of glasses based on diopside-Ca-Tschermak's-fluorapatite system, *J. Eur. Ceram. Soc.* 25 (2005) 1133–1142. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2004.04.025.

- [113] R.P. Buck, S. Rondinini, A.K. Covington, F.G.K. Baucke, C.M.A. Brett, M.F. Camoes, M.J.T. Milton, T. Mussini, R. Naumann, K.W. Pratt, P. Spitzer, G.S. Wilson, Measurement of pH. Definition, standards, and procedures (IUPAC Recommendations 2002), *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 2169–2200.
doi:10.1351/pac200274112169.
- [114] R.J. Myers, One-Hundred Years of pH, *J. Chem. Educ.* 87 (2010) 2009–2011.
doi:10.1021/ed800002c.
- [115] Y. Chou, W. Chiou, Y. Xu, J.C.Y. Dunn, B.M. Wu, The effect of pH on the structural evolution of accelerated biomimetic apatite, *Biomaterials*. 25 (2004) 5323–5331. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.12.037.
- [116] R.A. Boileau, Advances in body composition assessment., *Cad. Saúde Pública*. 9 (1993) S116–S117. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1993000500016.
- [117] Manupriya, K.S. Thind, G. Sharma, V. Rajendran, K. Singh, A.V.G. Devi, S. Aravindan, Structural and acoustic investigations of calcium borate glasses, *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.* 203 (2006) 2356–2364.
doi:10.1002/pssa.200622140.
- [118] R. Ciceo-lucacel, I. Ardelean, FT-IR and Raman study of silver lead borate-based glasses, *J. Non. Cryst. Solids*. 353 (2007) 2020–2024.
doi:10.1016/j.jnoncrysol.2007.01.066.
- [119] M. Ouis, A. Abdelghany, H. ElBatal, Corrosion mechanism and bioactivity of borate glasses analogue to Hench’s bioglass, *Process. Appl. Ceram.* 6 (2012) 141–149. doi:10.2298/PAC1203141O.
- [120] F. Margha, A. Abdelghany, Bone bonding ability of some borate bio-glasses and their corresponding glass-ceramic derivatives, *Process. Appl. Ceram.* 6 (2012) 183–192. doi:10.2298/PAC1204183M.
- [121] S.G. Motke, S.P. Yawale, S.S. Yawale, Infrared spectra of zinc doped lead borate glasses, *Bull. Mater. Sci.* 25 (2002) 75–78. doi:10.1007/BF02704599.
- [122] C. Gautam, A.K. Yadav, A.K. Singh, A Review on Infrared Spectroscopy of Borate Glasses with Effects of Different Additives, *ISRN Ceram.* 2012 (2012) 1–17. doi:10.5402/2012/428497.
- [123] R. Kaur, S. Singh, O.P. Pandey, FTIR structural investigation of gamma irradiated BaO-Na₂O-B₂O₃-SiO₂ glasses, *Phys. B Condens. Matter*. 407 (2012) 4765–4769. doi:10.1016/j.physb.2012.08.031.
- [124] Manupriya, K.S. Thind, G. Sharma, K. Singh, V. Rajendran, S. Aravindan,

- Soluble borate glasses: In vitro analysis, *J. Am. Ceram. Soc.* 90 (2007) 467–471. doi:10.1111/j.1551-2916.2006.01449.x.
- [125] S. Aravindan, V. Rajendran, N. Rajendran, Influence of Ag₂O on crystallisation and structural modifications of phosphate glasses, *Phase Transitions*. 85 (2012) 630–649. doi:10.1080/01411594.2011.639013.
- [126] E. Mahoney, A. Holt, M. Swain, N. Kilpatrick, The hardness and modulus of elasticity of primary molar teeth : an ultra-micro-indentation study, *J. Dent.* 28 (2000) 589–594. doi:doi:10.1016/s0300-5712(00)00043-9.
- [127] M. Cerruti, D. Greenspan, K. Powers, Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass 45S5, *Biomaterials*. 26 (2005) 1665–1674. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.07.009.
- [128] S. Scott, B. Jenkins, J. Dagenais, R. Currier, Hydroxylapatite R060180, *RRuff.INFO.2*. (2010) 1–17. <http://rruff.info/Apatite/R060180>.
- [129] B. S.Scott, J.D. Jenkins, C. R, Fluorapatite R050122, *RRuff.INFO.2*. (2010) 1–17. <http://rruff.info/fluorapatite/R050122>.
- [130] M. Bellantone, N.J. Coleman, L.L. Hench, Bacteriostatic action of a novel four-component bioactive glass, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 484–490. doi:[https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20000905\)51:3<484::AID-JBM24>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20000905)51:3<484::AID-JBM24>3.0.CO;2-4).
- [131] D. Maniu, T. Iliescu, I. Ardelean, S. Cinta-pinزارu, N. Tarcea, W. Kiefer, Raman study on B₂O₃ – CaO glasses, *J. Mol. Struct.* 653 (2003) 485–488. doi:10.1016/S0022-2860(03)00129-7.
- [132] E.I. Kamitsos, G.D. Chryssikos, Borate glass structure by Raman and infrared spectroscopies, *J. Mol. Struct.* 247 (1991) 1–16. doi:10.1016/0022-2860(91)87058-P.
- [133] S. Ecole, N. Supe, Infrared and Raman microspectrometry study of fluor-fluor-hydroxy and hydroxy-apatite powders, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 8. 8 (1991) 271–276. doi:10.1023/A:1018504126866.
- [134] P.E. Timchenko, E. V Timchenko, E. V Pisareva, M.Y. Vlasov, N.A. Red'kin, O.O. Frolov, Spectral analysis of allogeneic hydroxyapatite powders Spectral analysis of allogeneic hydroxyapatite powders, *J. Phys. Conf. Ser.* 784 (2017) 1–8. doi:10.1088/1742-6596/755/1/011001.
- [135] C.S. Ciobanu, F. Massuyeau, L.V. Constantin, D. Predoi, Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100 ° C,

- Nanoscale Res. Lett. 6 (2011) 2–9. doi:10.1186/1556-276X-6-613.
- [136] C.B. Badiel, E.E. Berry, Spectra structure correlations in hydroxy and fluorapatite, *Spectrochim. Acta*. 22 (1966) 1407–1416. doi:10.1016/0371-1951(66)80133-9.
- [137] D. Maniua, T. Iliescu, I. Ardelean, S. Cinta-Pinzaru, N. Tarcea, W. Kiefer, Raman study on B₂O₃-CaO glasses, *J. Mol. Struct.* 651–653 (2003) 485–488. doi:10.1016/S0022-2860(03)00129-7.
- [138] N. Montazeri, R. Jahandideh, E. Biazar, Synthesis of fluorapatite-hydroxyapatite nanoparticles and toxicity investigations., *Int. J. Nanomedicine*. 6 (2011) 197–201. doi:10.2147/IJN.S15461.
- [139] A.M. Abdelghany, M.A. Ouis, M.A. Azooz, H.A. Elbatal, G.T. El-Bassyouni, Role of SrO on the bioactivity behavior of some ternary borate glasses and their glass ceramic derivatives, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 152 (2016) 126–133. doi:10.1016/j.saa.2015.07.072.
- [140] M.A. Marzouk, F.H. ElBatal, N.A. Ghoneim, In vitro bioactivity behavior of modified multicomponent borate glasses containing dopants of - Ag₂O , CuO , C, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 124 (2018) 1–12. doi:10.1007/s00339-017-1526-9.
- [141] J.H. Kim, S.H. Kim, H.K. Kim, T. Akaike, S.C. Kim, Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods, *J. Biomed. Mater. Res.* 62 (2002) 600–612. doi:10.1002/jbm.10280.
- [142] M.-G. Ma, Hierarchically nanostructured hydroxyapatite: hydrothermal synthesis, morphology control, growth mechanism, and biological activity, *Int. J. Nanomedicine*. 7 (2012) 1781–1791. doi:10.2147/IJN.S29884.
- [143] X. Han, D.E. Day, Reaction of sodium calcium borate glasses to form hydroxyapatite, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18 (2007) 1837–1847. doi:10.1007/s10856-007-3053-2.
- [144] I. Rehman, W. Bonfield, Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 8 (1997) 1–4. doi:10.1023/A:1018570213546.
- [145] L.C.F. Alves, Estudo da influência do fluoreto de cálcio na bioatividade de vidros boratos, Universidade Federal do Maranhão, 2017. <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/tede/1939>.