



**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**

**GLEISON LOPES DA SILVA**

**ESTUDO DA BIOATIVIDADE E AÇÃO ANTIBACTERIANA DE  
VITROCERÂMICAS OBTIDAS POR CRISTALIZAÇÃO CONTROLADA**

**Orientador:** Prof. Dr. Alysson Steimacher

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Franciana Pedrochi

**Imperatriz – MA**

**2020**

GLEISON LOPES DA SILVA

**ESTUDO DA BIOATIVIDADE E AÇÃO ANTIBACTERIANA DE  
VITROCERÂMICAS OBTIDAS POR CRISTALIZAÇÃO CONTROLADA**

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

**Área de concentração:** Ciências Exatas e da Terra

**Orientador:** Prof. Dr. Alysson Steimacher

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Franciana Pedrochi

Imperatriz – MA

2020

GLEISON LOPES DA SILVA

**ESTUDO DA BIOATIVIDADE E AÇÃO ANTIBACTERIANA DE  
VITROCERÂMICAS OBTIDAS POR CRISTALIZAÇÃO CONTROLADA**

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

Área de concentração: Ciências Exatas e da Terra  
Apresentado em: 29/06/2020

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Alysson Steimacher (Orientador)  
UFMA/PPGCM

---

Prof. Dr. Adenilson Oliveira dos Santos  
UFMA/PPGCM

---

Prof. Dr. Gutierrez Rodrigues de Moraes  
UEMASUL

## AGRADECIMENTOS

Agradeço pela possibilidade de acordar diariamente, pela saúde da minha família durante esses anos longe de casa, pelo amor dos meus pais (Risomar e Gilcilene) e dos irmãos (Jeferson e Júnior). A criança que para aprender a ler e escrever precisava passar parte do seu dia em uma canoa e um “pau-de-arara” para chegar na escola, tornou-se um professor que aprendeu sobre política, economia, cultura, arte, história, química, ciências dos materiais e o processo de desenvolver ciência.

A Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais (PPGCM) pela oportunidade de cursar a pós-graduação e aos professores do programa pelas experiências, aulas, troca de conhecimento e o suporte necessário durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos meus colegas de turma: Alexandre, Marina, Sacha, Jéssica, Andreza, Ian e Leonardo, pelas risadas e companheirismo durante as atividades do mestrado. Os discursos observados durante as aulas, atividades nos laboratórios, congressos e nas redes sociais mostraram muito sobre cada um. Levo vocês com admiração, carinho e respeito, acreditando no potencial de todos para desenvolver nossa sociedade enquanto pessoas e pesquisadores.

Ao Prof. Dr. Alysson Steimacher pela orientação, conhecimento compartilhado ao longo da realização deste trabalho, conversas, paciência, pelo exemplo de pesquisador e professor que sempre se encontra disponível aos seus orientandos, deseja saber como estamos, dos resultados, o que ainda precisa ser realizado da pesquisa e estimulando nosso crescimento. Gratidão pela experiência e conhecimento adquirido. A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Franciana Pedrochi pelas orientações, conversas, risadas, cuidados com os animais do prédio, exemplo de professora e pesquisadora, e as oportunidades de aprendizagem. Ao Prof. Dr. Marcio José pelas conversas, risadas, histórias compartilhadas e orientações na disciplina de materiais vítreos e cerâmicos.

Ao laboratório com mais comida e mais risadas do prédio, o LEOF. Foram dois anos de risadas, aprendizagem, jogos e comemorações. Otávio, Floriano, Bernardo, Sacha, Sátya, Laís, Natácia, Natal, Glauco, Ingryd, Brenda, Sara, Max, Taís e Helen, foi muito bacana aprender sobre a ciência dos vidros com vocês.

Aos meus amigos cearenses e colegas de graduação: Carliana Rodrigues, Raychimam Douglas, Jaqueline Lima, João Neto, Ingryd Freitas e Gabriela Saldanha. Grato por ter conhecido e dividido tanto com vocês. Aprendi sobre força, coragem, determinação, importância de ter amigos e especialmente sobre mudar pontos de vista. Hoje dividimos uma

nova realidade, antes sonhada. Isso motiva a realização de novos sonhos e a busca constante por aprendizagem.

A Escola de ensino médio Fenelon Rodrigues Pinheiro (Solonópole – CE) e aos professores que sempre incentivaram meu crescimento. Hoje, além de ex-professores, tenho amigos e colegas de profissão. Caio, Marta, Honorinda, Diana, Alexandre e Germana, obrigado por ensinarem além de Português, Química, Sociologia, História, Filosofia e Física, também tornarem o ensino do conhecimento científico uma ação reflexiva, crítica e humana.

Ao Instituto Federal do Ceará (IFCE – *Campus Quixadá*) pela oportunidade de um ensino público e de qualidade no interior do estado. Agradeço especialmente aos professores doutores Rafael Portela, Silvano Bastos, Cícero Moura, Guilherme Guimarães, Marcus Vinícius e Samuel Pedro por todo apoio e suporte durante o período de graduação, e ao grupo de pesquisa GAMA.

Ao Colégio Valdemar Alcântara (Boa Viagem – CE) pela oportunidade de conhecer tantos jovens inteligentes e aprender durante o período que trabalhei como professor de Química. Grato especialmente a família Teodoro por todo amor e carinho, vocês são pessoas muito especiais. Teo, Lucivanda, Ramon e Priscila, sinto-me honrando pelas conversas, palavras de carinho, cuidado, atenção e apoio de vocês.

Aos meus primos Amanda, Izabel, Pedro, Ernesto e Rogelânia, e aos meus amigos Rayane, Thayane, José Carlos e Aparecida pelas palavras e gestos de carinho, amizade, compreensão e estímulo ao longo dessa jornada. Não é possível mensurar a minha felicidade e realização de tê-los ao meu lado ao longo desses anos.

Aos amigos que fiz no Maranhão, Henrique, Kamila, Emanuela, Euzineti, Tony, Lucas, Patrícia e Maju, vocês foram pessoas que levaram palavras de afeto e carinho, obrigado pela confiança, por cada abraço, especialmente nos momentos de saudades da minha família.

Aos técnicos e servidores da UFMA. Seguranças, pessoal da recepção, funcionários da biblioteca e da limpeza. Especialmente, a Dona Antônia pelas conversas, conselhos e abraços.

Ao Laboratório de Fisiopatologia e Investigações Terapêuticas (LaFIT), ao Prof. Dr. Aramys Reis e ao mestrando Guilherme Fontoura pelos testes de atividade antibacteriana.

Aos órgãos que financiam a pesquisa brasileira, especialmente a CAPES pela bolsa concedida.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a bioatividade e atividade antibacteriana de vitrocerâmicas obtidas por cristalização controlada em função do tempo no sistema vítreo  $59,5\text{B}_2\text{O}_3\text{-}2\text{P}_2\text{O}_5\text{-}9,5\text{CaO}\text{-}19,5\text{Na}_2\text{O}\text{-}9\text{CaF}_2\text{-}0,5\text{Ag}_2\text{O}$  (% em mol). As amostras vítreas foram preparadas pelo método de fusão/resfriamento, cortadas em fatias e posteriormente tratadas com temperatura constante (530 °C) variando o tempo de tratamento térmico: 0, 4, 8, 12, 24 e 36 horas. Os resultados de DTA comprovam alterações na estrutura vítrea, por causa de reduções nos valores de Tx e estabilidade térmica. As medidas de difração de raios-X das amostras antes do tratamento térmico revelaram bandas largas em 29° e 46° (2θ), associadas a vidros boratos. As amostras tratadas termicamente apresentaram picos característicos de fases cristalinas desenvolvidas durante o tratamento térmico ( $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Na}_2\text{B}_8\text{O}_{13}$  e  $\text{Ag}^0$ ). Observou-se que quanto maior o tempo de tratamento térmico, maior o tamanho de cristalito para as fases  $\text{Ag}^0$  e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , e maior o percentual de cristalização das vitrocerâmicas. Os espectros de FTIR comprovaram mudanças na estrutura do vidro, resultante do processo de cristalização controlada. A bioatividade *in vitro* dos materiais foi analisada por imersão SBF durante 7, 14, 21 e 28 dias. Os difratogramas de DRX revelaram a precipitação de Hidroxiapatita e AgCl nas amostras durante imersão em SBF. Os espectros de FTIR apresentaram bandas características da Hidroxiapatita. As medidas de pH revelaram maior taxa de troca iônica entre as amostras cristalizadas, estando associado às mudanças microestruturais na superfície durante o tratamento térmico, alterando a reatividade das vitrocerâmicas e a solubilidade de fases. Os resultados obtidos revelam que as vitrocerâmicas apresentam comportamento bioativo quando imersas em SBF, possuindo capacidade de ligação óssea, mediante formação de Hidroxiapatita em sua superfície. Mesmo após 28 dias de imersão, a prata metálica foi detectada nas amostras 12h, 24h e 36h, o que indica a estabilidade em fluido fisiológico dessa fase cristalina e o potencial comportamento antibacteriano a longo prazo das amostras. O teste de atividade antibacteriana contra a bactérias *E.colli* 6305 mostrou halos de inibição com comprimentos semelhantes entre as amostras tratadas por: 0 h (17 mm), 12 h (17 mm) e 36 h (18 mm), indicando que a cristalização controlada não inibiu a liberação dos íons de  $\text{Ag}^+$ . Portanto, as vitrocerâmicas estudadas possuem potencial para serem utilizadas como biomateriais, em tratamentos ósseos, e inibirem eventuais infecções bacterianas.

**Palavras-chaves:** Biomateriais. Biovidros bioativos. Cristalização controlada. Vitrocerâmica. Propriedade antibacteriana.

## ABSTRACT

This work aimed to study bioactivity and antibacterial activity of glass-ceramics obtained by controlled crystallization as a function of time in the glass system 59,5B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-2P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-9,5CaO-19,5Na<sub>2</sub>O-9CaF<sub>2</sub>-0,5Ag<sub>2</sub>O (% in mol). The glassy samples were prepared by melt-quench method, cut into slices and subsequently treated with constant temperature (530 ° C), varying the heat treatment time: 0, 4, 8, 12, 24 and 36 hours. DTA results prove changes in the glass structure, due to the decrease in T<sub>x</sub> values and thermal stability. X-ray diffraction measurements of the samples before heat treatment revealed broad bands at 29 ° and 46 ° (2θ), associated with borate glasses. Heat-treated samples have characteristic peaks of crystalline phases developed during the heat treatment (CaNa<sub>3</sub>B<sub>5</sub>O<sub>10</sub>, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>B<sub>8</sub>O<sub>13</sub> e Ag<sup>0</sup>). It was observed that the longer heat treatment time, the greater crystallite size for the Ag<sup>0</sup> and Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> phases, and the greater percentage of crystallization of the glass-ceramics. FTIR results presented changes in the borate glass network, resulting from the controlled crystallization process. Bioactivity in vitro of the materials was analyzed by immersion in simulated body fluid (SBF) for 7, 14, 21 and 28 days. XRD diffractograms revealed precipitation of Hydroxyapatite and AgCl in the samples during immersion in SBF. FTIR spectra showed bands characteristic of Hydroxyapatite. pH measurements revealed a higher ion exchange rate among the crystallized samples, being associated with microstructural changes on surface during heat treatment that changing the reactivity of the glass ceramics and phase solubility. The results obtained reveal that the glass-ceramics present a bioactive behavior when immersed in SBF, possessing bone bonding capacity, by forming Hydroxyapatite on its surface. Even after 28 days of immersion, metallic silver was detected in the samples for 12 h, 24 h and 36 h, which indicates the stability in physiological fluid of this crystalline phase and the potential long-term antibacterial behavior of the samples. Antibacterial activity test against *E.colli* 6305 bacteria showed inhibition halos with similar lengths between samples treated by : 0 h (17 mm), 12 h (17 mm) and 36 h (18 mm), indicating that controlled crystallization did not inhibit the release of Ag<sup>+</sup> ions. Therefore, studied glass-ceramics have the potential to be used as biomaterials, in bone treatments, and to inhibit any bacterial infections.

**Keywords:** Biomaterials. Bioactive glasses. Controlled crystallization. Glass-ceramic. Antibacterial property.

## PRODUÇÕES

### Trabalhos apresentados em congressos

1. SILVA, G. L.; PEDROCHI, F.; STEIMACHER, A. ***Study of the bioactivity of glass-ceramics obtained by Controlled crystallization. XVIII Brazilian MRS Meeting***, Balneário Camboriú (SC), 2019.
2. SILVA, G. L.; RODRIGUES, I. F.; PEDROCHI, F.; STEIMACHER, A. ***Synthesis and bioactivity of Ag<sub>2</sub>O doped glass-ceramics. XII BrazgGlass - Brazilian Symposium on Glass and Related Materials***, Lavras (MG), 2019.
3. RODRIGUES, I. F.; SILVA, G. L.; PEDROCHI, F.; STEIMACHER, A. ***Synthesis and study of copper (II) doped bioactive borate glasses. XII BrazgGlass - Brazilian Symposium on Glass and Related Materials***, Lavras (MG), 2019.
4. PEREIRA, S. S. S.; SILVA, G. L.; STEIMACHER, A.; PEDROCHI, F. ***Study of Scaffolds from bioactive glasses and their role in the process of bone regeneration. XII BrazgGlass - Brazilian Symposium on Glass and Related Materials***, Lavras (MG), 2019.
5. GADE, S. D.; SILVA, G. L.; STEIMACHER, A.; PEDROCHI, F. ***Study of composites Hydroxyapatite-Borate Glass bone tissue recovering applications. XII BrazgGlass - Brazilian Symposium on Glass and Related Materials***, Lavras (MG), 2019.

### Patentes depositadas

1. SILVA, L. C. A.; STEIMACHER, A.; PEDROCHI, F.; ALVES, L. C. F.; SILVA, G. L. ***Biomaterial com atividade bacteriostática e bactericida para regeneração óssea e dentária***. Universidade Federal do Maranhão, 2019. Número do processo: BR 10 2019 0216190. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 15/10/2019.
2. NETO, J. G. O.; SILVA, G. L.; QUEIROZ, L. H. S; FRANÇA, J. K. P.; STEIMACHER, A.; PEDROCHI, F.; CARVALHO, J. O.; SANTOS, A. O. ***Sais de Tutton luminescentes do tipo K<sub>2</sub>Ni(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> dopados com íons lantanídeos (Sm, Dy e Tb) para uso em sistemas ópticos emissores de luz visível***. Universidade Federal do Maranhão, 2020. Número do processo: BR 10 2020 011948. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 03/06/2020.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Ilustração do biomaterial em um sistema biológico.....                                                                                                                                                          | 18 |
| <b>Figura 2</b> - Tecido Esquelético de um organismo humano adulto. <b>Fonte:</b> Moore et al, (2013) [65]. .....                                                                                                                 | 19 |
| <b>Figura 3</b> - Obtenção do vidro: volume específico x temperatura. <b>Fonte:</b> Adaptação de Sousa et al, (2004) [86]. .....                                                                                                  | 24 |
| <b>Figura 4</b> - Estrutura de vidros boratos. <b>Fonte:</b> Adaptação de Shelby (2011) [84]. .....                                                                                                                               | 26 |
| <b>Figura 5</b> – Etapas do processo de cristalização. <b>Fonte:</b> Adaptação de Shelby (2011) [84]. ....                                                                                                                        | 29 |
| <b>Figura 6</b> - Cristalização em duas etapas. ....                                                                                                                                                                              | 30 |
| <b>Figura 7</b> – Cristalização em etapa única. ....                                                                                                                                                                              | 30 |
| <b>Figura 8</b> - Análises de DTA dos vidros tratados termicamente. Black-5h, B1-5h, B3-3h e B5-1h. <b>Fonte:</b> Adaptação de Banijamali et al, (2012) [117]. .....                                                              | 35 |
| <b>Figura 9</b> – Difractogramas das vitrocerâmicas Ag0-400 °C, Ag0-600 °C, Ag10-400 °C, Ag10-600 °C e Ag100-800 °C/. <b>Fonte:</b> Adaptação de Kumar et al, (2019) [45]. ....                                                   | 37 |
| <b>Figura 10</b> - Padrões XRD de (a) vidro par Ag-20 e amostra Ag-20 aquecidos a (b) 650 °C, (c) 700 °C, (d) 750 °C, (e) 800 °C e (f) 850 °C por 1 h. <b>Fonte:</b> Adaptação de Taruta et al, (2017) [163]. ....                | 38 |
| <b>Figura 11</b> – Densidade dos vidros fosfatos dopados com Ag <sub>2</sub> O e das vitrocerâmicas preparadas via cristalização controlada. <b>Fonte:</b> Adaptação de Aravindan et al, (2012) [118]. ....                       | 39 |
| <b>Figura 12</b> - Valores de densidade em função da temperatura de tratamento térmico. <b>Fonte:</b> Adaptação de Mubina et al, (2019) [164]. .....                                                                              | 40 |
| <b>Figura 13</b> - Variações no pH na solução de SBF durante imersão das vitrocerâmicas. <b>Fonte:</b> Adaptação de Mubina <i>et al</i> , (2019)[164]. .....                                                                      | 42 |
| <b>Figura 14</b> - Espectros de FTIR antes e depois da imersão em SBF por até 14 dias das amostras V700-4, V775-4 e V975-4. <b>Fonte:</b> Adaptação de Daguno et al, (2012) [29]. ....                                            | 43 |
| <b>Figura 15</b> - Padrões de difração de raios-X do material cristalizado (curva preta) e da Bioglass amorfo (curva cinza), depois da imersão em SBF por 14 dias. <b>Fonte:</b> Adaptação de Pelwinski et al, (2013) [28]. ..... | 44 |
| <b>Figura 16</b> - Resultados dos testes da zona de inibição das vitrocerâmicas contra as bactérias .....                                                                                                                         | 45 |
| <b>Figura 17</b> – Zona de inibição das amostras tratadas em diferentes temperaturas contra .....                                                                                                                                 | 46 |
| <b>Figura 18</b> – Fluxograma das atividades desenvolvidas. ....                                                                                                                                                                  | 47 |
| <b>Figura 19</b> - Rampa utilizada na preparação da amostra vítrea. ....                                                                                                                                                          | 49 |

|                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 20</b> - Rampa utilizada na preparação da amostra vítrea. ....                                                                                                                                                                                     | 49 |
| <b>Figura 21</b> – Representação do fenômeno de difração de raio-X. <b>Fonte:</b> Adaptação de Callister [88]. ....                                                                                                                                          | 51 |
| <b>Figura 22</b> - Padrão de DRX característico de um vidro borato, hidroxiapatita e vitrocerâmica. ....                                                                                                                                                     | 52 |
| <b>Figura 23</b> - Representação do método usado para calcular %IC.....                                                                                                                                                                                      | 54 |
| <b>Figura 24</b> - Amostra base (vidro) e amostras cristalizadas (vitrocerâmicas). ....                                                                                                                                                                      | 59 |
| <b>Figura 25</b> - Tg, Tx e estabilidade térmica (Tx-Tg) das amostras 0 h (vidro), 12 h, 24 h e 36 h. ....                                                                                                                                                   | 60 |
| <b>Figura 26</b> - Difratoformas de raios-X das amostras preparadas: 0 h (vidro), 4h, 8 h, ....                                                                                                                                                              | 62 |
| <b>Figura 27</b> - Percentual de cristalização (% IC) em função do tempo de tratamento térmico..                                                                                                                                                             | 64 |
| <b>Figura 28</b> - Tamanho de cristalito da $Ag^0$ e do $Ca_3(PO_4)_2$ em função do tempo de tratamento térmico. ....                                                                                                                                        | 65 |
| <b>Figura 29</b> - FTIR das amostras cristalizadas (0 h (vidro), 4 h, 8 h, 12 h, 24 h e 36 h).....                                                                                                                                                           | 66 |
| <b>Figura 30</b> - Densidade ( $\rho$ ) e Volume molar ( $V_m$ ) das amostras 0 h (vidro), 12 h, 24 h e 36 h. ....                                                                                                                                           | 68 |
| <b>Figura 31</b> - Medidas do pH da solução de SBF durante 28 dias de imersão das amostras. ....                                                                                                                                                             | 70 |
| <b>Figura 32</b> – (a) Difratoformas da amostra 0 h (vidro) depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. (b) Difratoformas da amostra 0 h (vidro) depois da imersão em SBF na região entre $25^\circ$ e $35^\circ$ ( $2\theta$ ).....                   | 72 |
| <b>Figura 33</b> – (a) Difratoformas da amostra 4 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. (b) Difratoformas da amostra 4 h depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias na região entre $25^\circ$ e $35^\circ$ ( $2\theta$ ).....   | 73 |
| <b>Figura 34</b> – (a) Difratoformas da amostra 8 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. (b) Difratoformas da amostra 8 h depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias na região entre $28^\circ$ e $40^\circ$ ( $2\theta$ ).....   | 74 |
| <b>Figura 35</b> - (a) Difratoformas da amostra 12 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. (b) Difratoformas da amostra 12 h depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias na região entre $28^\circ$ e $40^\circ$ ( $2\theta$ )..... | 74 |
| <b>Figura 36</b> - (a) Difratoformas da amostra 24 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. (b) Difratoformas da amostra 24 h depois da imersão em SBF na região entre $28^\circ$ e $40^\circ$ ( $2\theta$ ).....                         | 76 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 37 – (a)</b> Difrátogramas da amostra 36 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. <b>(b)</b> Difrátogramas da amostra 36 h depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias na região entre 28° e 40° (2θ). .....                                             | 77 |
| <b>Figura 38 – (a)</b> Difrátogramas das amostras 0 h (vidro), 4 h, 8 h, 12 h, 24 h e 36 h depois da imersão em SBF por 28 dias. <b>(b)</b> Difrátogramas das amostras 0 h (vidro), 4 h, 8 h, 12 h, 24 h e 36 h depois da imersão em SBF por 28 dias na região entre 28° e 40° (2θ). ..... | 78 |
| <b>Figura 39 –</b> Espectros de FTIR da amostra 0 h (vidro) antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. ....                                                                                                                                                                 | 80 |
| <b>Figura 40 -</b> Espectros de FTIR da amostra 4 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. ....                                                                                                                                                                         | 81 |
| <b>Figura 41 -</b> Espectros de FTIR da amostra 8 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. ....                                                                                                                                                                         | 82 |
| <b>Figura 42 -</b> Espectros de FTIR da amostra 12 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. ....                                                                                                                                                                        | 83 |
| <b>Figura 43 -</b> Espectros de FTIR da amostra 24 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. ....                                                                                                                                                                        | 83 |
| <b>Figura 44 -</b> Espectros de FTIR da amostra 36 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. ....                                                                                                                                                                        | 84 |
| <b>Figura 45 –</b> Espectros das amostras 0 h (vidro), 4 h, 8 h, 12 h, 24 e 36 h depois da imersão em SBF por 21 dias. ....                                                                                                                                                                | 85 |
| <b>Figura 46 –</b> Ensaio antibacteriano pelo método de difusão em disco de ágar. ....                                                                                                                                                                                                     | 86 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> – Origem, vantagem e desvantagens dos enxertos ósseos. <b>Fonte:</b> Adaptação de Miguel et al, (2013) [70].                                                             | 20 |
| <b>Tabela 2</b> – Vantagens, desvantagens e usos clínicos de biomateriais sintéticos.                                                                                                    | 21 |
| <b>Tabela 3</b> – Definições de vidros presentes na literatura.                                                                                                                          | 23 |
| <b>Tabela 4</b> - Concentrações dos iônicas e pH do plasma sanguíneo e do SBF.                                                                                                           | 25 |
| <b>Tabela 5</b> - Aplicações clínicas e estudos in vitro das vitrocerâmicas mais conhecidas e utilizadas comercialmente. <b>Fonte:</b> Adaptação de Hoppe et al (2017), [124].           | 32 |
| <b>Tabela 6</b> – Temperaturas características obtidas para as amostras com diferentes compostos de prata e tratadas termicamente. <b>Fonte:</b> Adaptação de Valle et al, (2013) [162]. | 36 |
| <b>Tabela 7</b> – Tamanho do cristal em função da temperatura de tratamento térmico. <b>Fonte:</b> Adaptação de Lefebvre et al, (2007) [32].                                             | 41 |
| <b>Tabela 8</b> – Codificação das amostras.                                                                                                                                              | 49 |
| <b>Tabela 9</b> – Ordem, reagente, quantidade, fornecedor e pureza dos reagentes utilizados para preparar SBF.                                                                           | 57 |
| <b>Tabela 10</b> – Dados de Tg, Tx e Tx-Tg para as amostras 0 h (vidro), 12 h, 24 h e 36 h obtidos por DTA.                                                                              | 60 |
| <b>Tabela 11</b> – Número de onda e atribuições no espectro de FTIR da amostra 0 h (vidro).                                                                                              | 67 |
| <b>Tabela 12</b> – Posição e atribuição das bandas e picos identificados nos espectros de FTIR da amostra 0 h (vidro) depois de 7, 14, 21 e 28 dias de imersão.                          | 81 |
| <b>Tabela 13</b> – Comprimentos dos halos de inibição das amostras e dos grupos controle.                                                                                                | 86 |

## SUMÁRIO

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| AGRADECIMENTOS .....                                                       | 4  |
| RESUMO .....                                                               | 5  |
| ABSTRACT .....                                                             | 7  |
| PRODUÇÕES .....                                                            | 8  |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                     | 9  |
| LISTA DE TABELAS .....                                                     | 12 |
| SUMÁRIO.....                                                               | 13 |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                         | 14 |
| 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....                                             | 17 |
| 2.1 Biomateriais.....                                                      | 17 |
| 2.2 Tecido Ósseo e o uso de Biomateriais.....                              | 19 |
| 2.3 Vidros, vidros bioativos e vitrocerâmicas .....                        | 22 |
| 2.3.1 Considerações sobre o estado vítreo.....                             | 22 |
| 2.3.2 Vidros com aplicação biológica: vidros bioativos.....                | 25 |
| 2.3.3 Cristalização controlada e o desenvolvimento de vitrocerâmicas ..... | 28 |
| 2.4 A Prata (Ag) e a sua atividade antibacteriana.....                     | 33 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA .....                                             | 35 |
| 3.1 Análises térmicas .....                                                | 35 |
| 3.2 Cristalização controlada em vidros.....                                | 37 |
| 3.3 Densidade ( $\rho$ ).....                                              | 39 |
| 3.4 Tamanho de cristalito .....                                            | 41 |
| 3.5 Medidas do potencial de Hidrogênio (pH) .....                          | 42 |
| 3.6 Avaliação da bioatividade <i>in vitro</i> .....                        | 43 |
| 3.7 Atividade antibacteriana de vitrocerâmicas bioativas .....             | 45 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....                                                | 47 |
| 4.1 Preparação das amostras (vidro e vitrocerâmicas) .....                 | 47 |

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2 Técnicas de Caracterização .....                                                                            | 50 |
| 4.2.1 Análise térmica diferencial (DTA) .....                                                                   | 50 |
| 4.2.2 Difração de raios-X (DRX) .....                                                                           | 51 |
| 4.2.3 Identificação das fases cristalinas, porcentagem de cristalinidade (% IC) e o tamanho de cristalito ..... | 53 |
| 4.2.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....                                  | 55 |
| 4.2.5 Densidade ( $\rho$ ) e o volume molar ( $vm$ ) .....                                                      | 55 |
| 4.2.6 Bioatividade <i>in vitro</i> .....                                                                        | 56 |
| 4.2.7 Medidas de pH.....                                                                                        | 57 |
| 4.2.8 Atividade antibacteriana .....                                                                            | 58 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                                 | 59 |
| 5.1 Amostras preparadas.....                                                                                    | 59 |
| 5.2 Caracterização das amostras antes da imersão em SBF .....                                                   | 59 |
| 5.2.1 Análise térmica diferencial (DTA) .....                                                                   | 59 |
| 5.2.2 Difração de raios-X, percentual de cristalinidade (%IC) e o tamanho de cristalito .....                   | 61 |
| 5.2.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....                                  | 66 |
| 5.2.4 Densidade ( $\rho$ ) e o Volume molar ( $vm$ ) .....                                                      | 68 |
| 5.3 Caracterização das amostras depois da imersão em SBF .....                                                  | 69 |
| 5.3.1 Medidas de pH.....                                                                                        | 69 |
| 5.3.2 Difração de raios-X .....                                                                                 | 71 |
| 5.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....                                  | 79 |
| 5.4 Atividade antibacteriana .....                                                                              | 86 |
| 6. CONCLUSÃO.....                                                                                               | 88 |
| 7. PERSPECTIVAS .....                                                                                           | 89 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                               | 90 |

## 1. INTRODUÇÃO

Como resultado do conhecimento científico e os avanços tecnológicos, a compreensão da relação entre estrutura e a propriedade possibilitou o desenvolvimento de materiais com propriedades e aplicações específicas buscando solucionar diversos problemas [1,2]. Investigações com o objetivo de compreender o comportamento dos materiais, suas potenciais aplicações biológicas e respostas no organismo humano é alvo de intenso interesse entre os cientistas [3,4].

Os materiais implantados no organismo humano, com o intuito de substituir ou restaurar os tecidos danificados, são denominados de Biomateriais. O comportamento de um material para ser utilizado como implante deve possibilitar o restabelecimento das funções comprometidas, apresentando: tolerância imunológica, propriedades físicas adequadas, compatibilidade com os fluidos e tecidos do organismo [5–7].

Entre os biomateriais, o estudo sobre vidros para uso odontológico e ortopédico têm se destacado desde o século passado, a partir, do trabalho de Larry Hench e o desenvolvimento do *Bioglass*<sup>®</sup> [8]. A resposta biológica dos vidros bioativos é associada ao resultado da reação do material quando imerso em fluidos corporais por meio da formação, em sua superfície, de uma camada de Hidroxiapatita (HA) semelhante ao osso, ocasionando uma forte ligação do biomaterial com o tecido ósseo por interação química, afirmando assim a bioatividade do material [9–11].

A rápida taxa de reação superficial e o forte estabelecimento de uma ligação com o tecido ósseo são propriedades importantes das inúmeras composições de vidros bioativos relatados na literatura. Entretanto, as aplicações desses materiais ainda são limitadas por causa da sua baixa resistência mecânica e tenacidade à fratura o que impede seu uso em suporte de carga mecânica, restringindo sua aplicação comercial na forma de particulados. Um mecanismo para tentar resolver essa desvantagem dos vidros bioativos é preparar vitrocerâmicas pelo processo de cristalização controlada, as quais apresentam dureza e resistência mecânica elevada, e são mais estáveis quando imersas em soluções fisiológicas, comparados aos vidros bases (não cristalizados) [12–14].

Para ocorrer o fenômeno de cristalização controlada, o vidro base necessita possuir em sua composição um agente nucleante e ser submetido a tratamento térmico na zona de transição vítrea; durante esse fenômeno o vidro perde parcialmente sua natureza amorfa e passar adquirir uma microestrutura cristalina [15–20]. Os agentes de nucleação são metais na forma iônica

quando presente na composição química de um vidro e por meio de tratamento térmico, induzem a cristalização de uma microestrutura. Embora a cristalização controlada melhore as propriedades mecânicas dos vidros, são necessários estudos da bioatividade, pois ela pode ser modificada em função do desenvolvimento de fases cristalinas [21–23]. Alguns autores abordam que a cristalização controlada diminui a cinética de reação (troca iônica entre a superfície da amostra e os íons da solução fisiológica), mas não inibe a precipitação de hidroxiapatita, mesmo em vitrocerâmicas com altos percentuais de cristalinidade [24–27]. A cristalização do *Bioglass*® por exemplo, não inibiu, durante teste *in vitro*, a precipitação de HA [28].

Para explicar o comportamento bioativo e biomecânico de vitrocerâmicas e compará-las as amostras de vidro base, diversos parâmetros como o percentual de cristalinidade, teor de vidro residual, morfologia e tamanho dos cristais (microestrutura), e solubilidade das fases desenvolvidas na matriz vítrea, podem ser utilizados [29–35]. Um interesse potencial nas aplicações biomédicas de vitrocerâmicas é a possibilidade das propriedades mecânicas [23,29] e bioativas [28,36,37] do vidro base ser melhorada em função do teor percentual e a natureza das fases cristalinas desenvolvidas.

Ceravital®, Cerabone® e Bioverit® são exemplos de vitrocerâmicas já desenvolvidas por meio do processo de cristalização controlada, usando como vidro base vidros silicatos de composições similares ao *Bioglass*®, que mesmo após o desenvolvimento de fases cristalinas, possuem capacidade de interagir com o organismo [28,36,38].

O mecanismo de bioatividade e ligação óssea de vidros e vitrocerâmicas já foi extensivamente estudado, apesar disso um dos problemas relacionados à interação biomaterial-organismo são as infecções bacterianas, elas têm sido uma das principais razões de falhas de implantes ósseos [39,40]. Durante o implante do biomaterial, podem ocorrer infecções, devido a falhas no procedimento cirúrgico ou infecção hospitalar, gerando a necessidade de um novo procedimento cirúrgico, perda do dispositivo implantando, amputações ou até mesmo morte dos pacientes, em caso mais grave.

Nesse sentido, biomateriais com propriedades antibacterianas têm estimulado investigações da comunidade científica [41–43]. A capacidade de matar ou inibir o crescimento de bactérias em materiais vítreos e vitrocerâmicos ocorre devido à presença, em sua composição, dos denominados agentes antimicrobianos, como Prata (Ag), Cobre (Cu) e Zinco (Zn), por exemplo [44–47].

Íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ), presentes em meio fisiológico, promovem a morte celular de bactérias. Portanto, a presença de Ag em biomateriais, representa uma possibilidade de inibir infecções bacterianas. Tal fato pode aumentar o tempo de vida do implante e sua eficácia no processo de recuperação tecidual. Além disso, a Ag é um agente modificador da rede vítrea, atuando como agente nucleante durante o tratamento térmico [48–50].

Neste contexto, essa pesquisa tem como objetivo preparar materiais vitrocerâmicos obtidos por cristalização controlada em função do tempo de tratamento térmico no sistema vítreo  $59,5\text{B}_2\text{O}_3\text{-}2\text{P}_2\text{O}_5\text{-}9,5\text{CaO}\text{-}19,5\text{Na}_2\text{O}\text{-}9\text{CaF}_2\text{-}0,5\text{Ag}_2\text{O}$  (% em mol), caracterizar sua bioatividade *in vitro*, atividade antibacteriana e avaliar citotoxicidade. O estudo busca compreender a influência da microestrutura cristalina, desenvolvida mediante cristalização controlada, nas propriedades térmicas, estruturais e mecânicas nas vitrocerâmicas desenvolvidas, bem como nas propriedades bioativas e antibacterianas destes materiais.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Biomateriais

O uso de materiais acompanha o desenvolvimento científico e tecnológico da sociedade, possuindo relação direta com a habilidade de produzir e manipular materiais, buscando satisfazer as necessidades e proporcionar conforto à sobrevivência da espécie humana. A relação entre as propriedades/características dos materiais e suas estruturas em níveis atômicos e moleculares é uma conquista recente, o que possibilitou o desenvolvimento de inúmeros materiais com propriedades cada vez mais específicas, com o objetivo de solucionar diversos problemas [2,3,51]. Nesse contexto, investigações buscando preparar, caracterizar e compreender o comportamento dos materiais, suas potenciais aplicações biológicas e respostas no organismo humano é alvo de intenso interesse pela comunidade científica [4].

Por definição, os biomateriais são materiais implantados no organismo humano, de origem natural ou sintética, com o objetivo de substituir ou complementar os tecidos biológicos com suas funções comprometidas [52,53]. A história dos biomateriais, tendo como critério a evolução de suas propriedades, é didaticamente dividida em três momentos ou três gerações [6,10,17]. Na primeira geração, o objetivo era conseguir materiais capazes de substituir algum tecido danificado e prover suporte mecânico sem nenhuma reação biológica adversa ao organismo - geração dos materiais bioinertes. O aço inoxidável, ligas de Cobalto-Cromo (Co-Cr), ligas de Titânio (Ti), Zircônia ( $ZrO_2$ ), Alumina ( $\alpha-Al_2O_3$ ), Silicone e Polietileno (PE) são exemplos de alguns materiais investigados nessa primeira geração [8,54].

O foco da segunda geração tornou-se aumentar o tempo de vida útil do implante, por meio da sua interação com o tecido hospedeiro, sendo então a geração de materiais bioativos. Vidros bioativos, vitrocerâmicas bioativas, cerâmicas de fosfatos de cálcio, hidrogéis e polímeros biodegradáveis são exemplos de materiais desenvolvidos nesse momento [6,17].

Atualmente, na terceira geração, a área em destaque é a Engenharia de Tecidos [55,56], cujo objetivo de estudo tem sido o desenvolvimento de materiais que além de substituir, tenham a capacidade de regenerar os tecidos e órgãos danificados com o passar do tempo. Portanto, o objetivo atual é o desenvolvimento de materiais bioativos e biodegradáveis capazes de estimularem o processo de recuperação tecidual em nível celular específico. Exemplos desses materiais são as peles artificiais, cimentos ósseos, cartilagens, *scaffolds* e o revestimento das superfícies de implantes metálicos.

Independentemente da forma de uso, o biomaterial permanecerá em contato com os fluidos biológicos, devendo apresentar propriedades que justifiquem as exigências da sua aplicação com finalidade específica [56]. As características mais importantes que influenciam a escolha de um biomaterial, como representado na Figura 1, são biocompatibilidade, exigências físicas e exigências químicas.

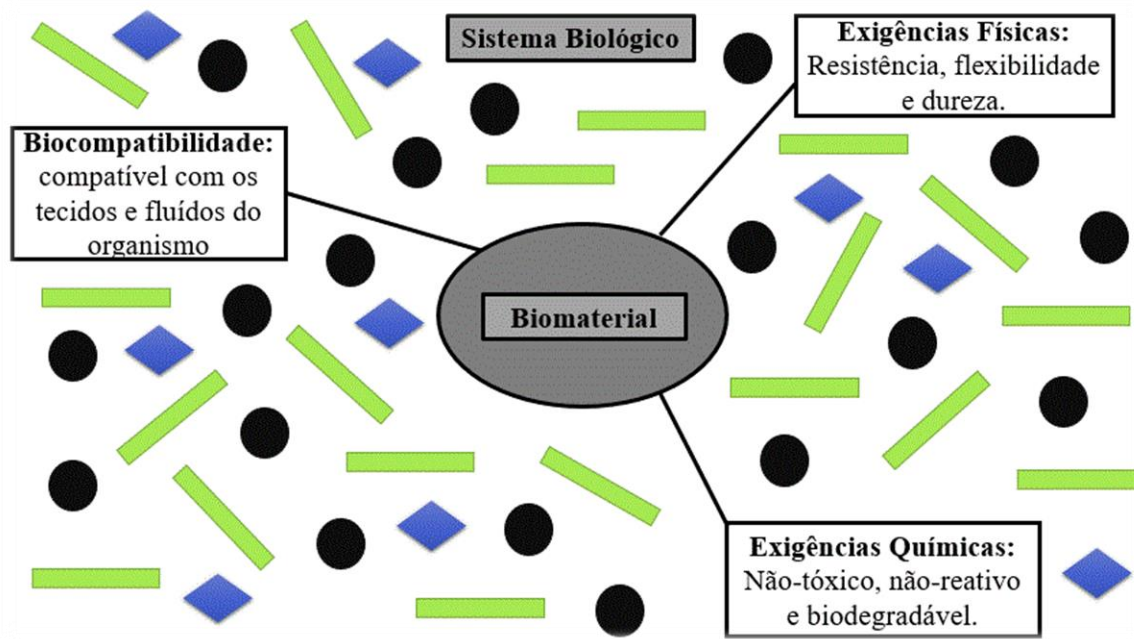


**Figura 1** – Ilustração do biomaterial em um sistema biológico.  
**Fonte:** Adaptação Brown e LeMay, (2005) [57].

Os organismos vivos apresentam um conjunto complexo de proteções contra invasores. O corpo humano é capaz de avaliar se um objeto é do próprio organismo ou se é um objeto estranho. O material implantado necessita resistir ao ataque do sistema biológico sem sofrer degradação ou perda da função almejada e não liberar substâncias nocivas, na mesma medida em que o organismo não deve sofrer problemas físicos ou químicos pela presença do implante [57–59].

Nessa perspectiva, independente da aplicação desejada, para os biomateriais é esperado que não proporcionem reações adversas e toxicidade, estimulem a adesão e proliferação celular, apresentem comportamento biomecânico (área de superfície, porosidade, dureza, cristalinidade e encaixe anatômico), químico (composição, troca iônica e densidade) e contribuam para a interação implante-tecido, favorecendo os processos regenerativos teciduais. Esses são alguns parâmetros utilizados para avaliar a biocompatibilidade do biomaterial, ou seja, comportamento celular após contato com o implante [4,52,60,61].

## 2.2 Tecido Ósseo e o uso de Biomateriais

O tecido esquelético de um organismo humano adulto, representado na Figura 2, possui 206 ossos, variando em tamanhos e formas. Cartilagens, tendões, esqueleto e ligamentos também fazem parte desse sistema. Entre as suas funções, ele sustenta o corpo, ajuda no deslocamento, atua como fonte reserva de minerais, produção de células sanguíneas e proteção dos órgãos internos [62,63].

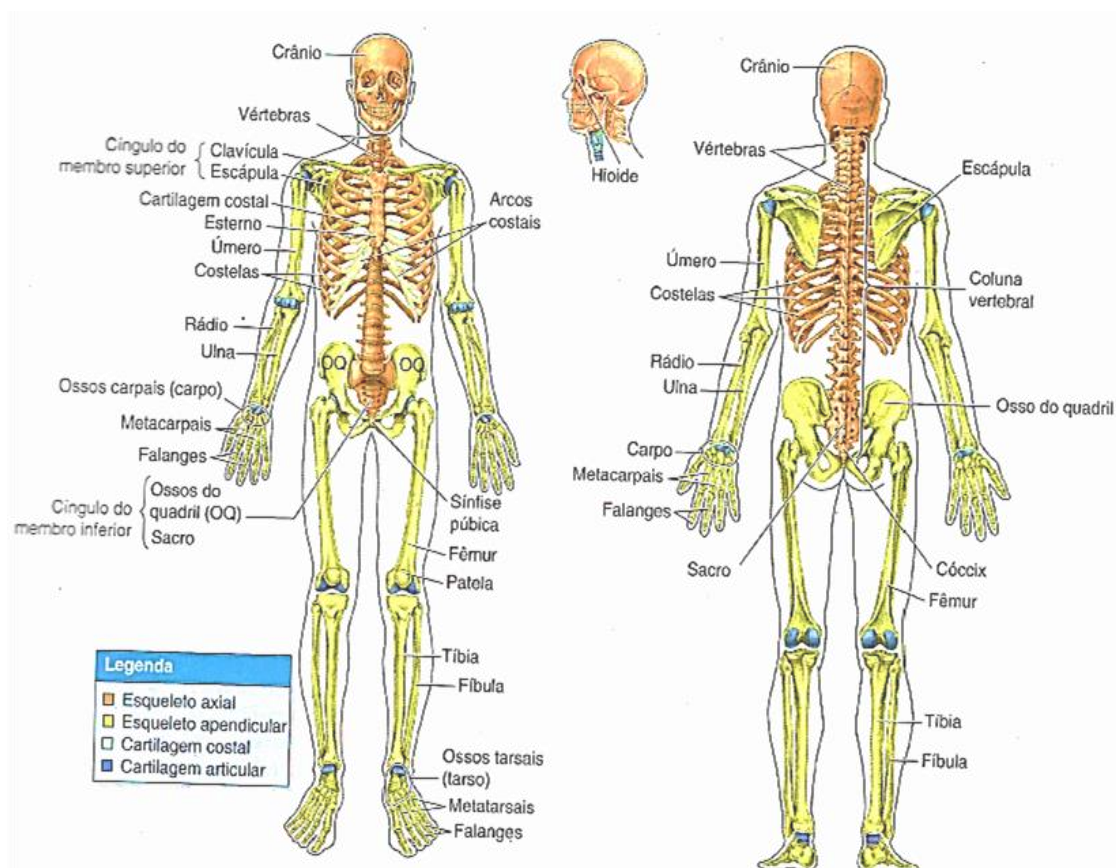


**Figura 2** - Tecido Esquelético de um organismo humano adulto. **Fonte:** Moore *et al*, (2013) [64].

Em sua composição química [65], o osso é formado por uma fase inorgânica, composta principalmente de Hidroxiapatita (HA), substâncias orgânicas (colágeno, proteínas, lipídeos, peptídeos etc.), células (osteócitos, osteoblastos e osteoclastos) e água. Organizado na forma de cristais, íons de Cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e Hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), compõem a estrutura da HA  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ .

Os ossos são estruturas dinâmicas, seu metabolismo constante possibilita o crescimento e a remodelação óssea ao longo de toda vida [66,67]. Apesar da sua intensa atividade, os ossos se

regeneram em casos de pequenas fraturas por meio de interação celular, em casos de lesões ósseas mais severas e com perda de massa óssea, existe a necessidade de reparação/substituição tecidual [68]. Isso ocorre por meio do uso de enxertos, ou seja, retirada de um fragmento ósseo de um local para ser implantado no local que se pretende reparar/tratar [69]. Conforme a origem do osso enxertado, os enxertos ósseos são classificados em autoenxertos, aloenxertos e xenoenxertos. A Tabela 1 apresenta algumas informações sobre os tipos de enxertos.

**Tabela 1** – Origem, vantagem e desvantagens dos enxertos ósseos. **Fonte:** Adaptação de Miguel *et al*, (2013) [69].

| <b>Informações</b>  | <b>Tipos de Enxertos</b>                                                    |                                                                                             |                                                                                              |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     | <b>Autoenxertos</b>                                                         | <b>Aloenxertos</b>                                                                          | <b>Xenoenxertos</b>                                                                          |
| <b>Origem</b>       | Próprio indivíduo.                                                          | Doador da mesma espécie.                                                                    | Outros animais.                                                                              |
| <b>Vantagens</b>    | Biocompatibilidade, menores chances de rejeição, propriedades osteogênicas. | Maior quantidade de enxerto (banco de ossos).                                               | Maior quantidade de enxerto (banco de ossos).                                                |
| <b>Desvantagens</b> | Área doadora limitada. Procedimento cirúrgico adicional.                    | Reações imunológicas, risco de transmissão de doenças, tratamento prévio, desproteinização. | Reações imunológicas e risco de transmissão de doenças, tratamento prévio, desproteinização. |

No caso dos autoenxertos, o processo cirúrgico compreende duas regiões operatórias – uma receptora e uma doadora. Se tratando de um osso do mesmo organismo a chance de rejeição ou infecção é menor, ele também é o único tipo de enxerto capaz de viabilizar células ósseas vivas para proliferação de células no processo de osteogênese. Porém, esse procedimento é limitado pela quantidade de tecido que necessita ser retirada para restauração da área danificada [3,70]. Para serem utilizados, os aloenxertos e os xenoenxertos, passam por tratamentos (congelamentos e desidratações) com o intuito de tratar eventuais reações imunológicas. Entretanto, isso reduz seu potencial osteoindutor, limitando sua aplicação [71].

Perante as limitações apresentadas pelos enxertos ósseos e buscando superá-las, surge uma nova classe de enxertos, os alopáticos ou biomateriais sintéticos. Eles podem ser classificados como biometais, biocompósitos, biopolímeros, biocerâmicas e biovidros, tendo como critério de classificação sua composição química, e abrangem uma ampla faixa de aplicações clínicas [72]. A Tabela 2 compara as vantagens, desvantagens e usos clínicos dos biomateriais sintéticos.

**Tabela 2** – Vantagens, desvantagens e usos clínicos de biomateriais sintéticos.

**Fonte:** Adaptação de Kawachi *et al*, (2000) [72].

| <b>Biomaterial</b>                                                                                                                        | <b>Vantagens</b>                                                                            | <b>Desvantagens</b>                                                    | <b>Aplicações</b>                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Polímeros</b><br>Polietileno, PTFE<br>Poliéster<br>Poliuretano<br>PMMA, Silicone                                                       | Elasticidade, fácil produção, baixa densidade, boa compatibilidade                          | Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo             | Suturas, artérias, veias, maxilofacial (nariz, mandíbula, dente), cimento, tendão artificial, oftalmologia                                                |
| <b>Metais e Ligas</b><br>Aço inoxidável<br>Liga de Titânio<br>Liga de Cobalto-Cromo                                                       | Alta força de tensão, alta resistência ao desgaste, energia de deformação alta              | Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, alta densidade | Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios, hastes), implantes dentários                                                                          |
| <b>Cerâmicas e Vidros</b><br>Alumina, Zircônia<br>Carbono<br>Fosfatos de Cálcio<br>Porcelana<br>Vidros Bioativos                          | Boa compatibilidade, resistência à corrosão, inércia, alta resistência à compressão         | Baixa força de tensão, baixa elasticidade, alta densidade              | Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traqueias artificiais                                                                        |
| <b>Compósitos</b><br>Fibra de carbono-resina termofixa<br>Fibra de carbono-termoplástico<br>Carbono-carbono<br>Fosfato de cálcio-colágeno | Boa compatibilidade, inércia química, alta resistência à compressão, resistência à corrosão | Dificuldade de fabricação                                              | Válvula cardíaca artificial (carbono ou grafite pirolítico), implantes de juntas do joelho (fibra de carbono reforçada com polietileno de alta densidade) |

Nos últimos cinquenta anos, como resultado das modificações demográficas e sociais, aumento na expectativa da vida humana, padrão de vida e custo econômico, houve um aumento na área de biomateriais, tanto em pesquisas, como no desenvolvimento e uso comercial de produtos [73–75]. Isso gerou/gera um impacto positivo na qualidade de vida das pessoas, entendendo que tecidos e órgãos com suas funções comprometidas geram dores, traumas psicológicos e sociais, além de comprometer o desenvolvimento de atividades básicas [76]. Contudo, avanços buscando desenvolver dispositivos biomédicos de acesso à larga escala, novas composições, resolução das desvantagens apresentadas na Tabela 2 e potencializar interação implante-tecido ainda são necessários [77].

Dentre os biomateriais sintéticos, os vidros com aplicação biológica, denominados de vidros bioativos, apresentam elevada bioatividade, são biodegradáveis em meio fisiológico, atuando na maturação e regeneração do tecido ósseo [78–80].

## 2.3 Vidros, vidros bioativos e vitrocerâmicas

### 2.3.1 Considerações sobre o estado vítreo

Segundo Alves, Gimenes e Mazali [81], o naturalista romano Plínio, em sua enciclopédia *Naturalis historia*, concede aos Fenícios o descobrimento do método de fabricação do vidro, e revelam também que eles dedicaram bastante tempo buscando compreender e reproduzir o fato observado, até a fabricação de peças para uso. Por volta de 7000 anos a.C., quando as embarcações fenícias ancoravam na costa do que hoje corresponde ao território da Síria, os fenícios prepararam fogões utilizando blocos de salitre na areia da praia. Decorrido algum tempo, observou-se o surgimento de uma substância líquida e brilhante que escorria na areia e se solidificava rapidamente.

Uma complementação aos fatos relatados anteriormente é apresentada na obra *Introduction to glass science and technology*, da autoria de Shelby [82]. Ele menciona que o vidro obtido resultaria de uma associação entre o sal marinho (Cloreto de Sódio – NaCl), Óxido de Cálcio (CaO) presente em ossos que possivelmente se encontravam em pequenos pedaços na madeira utilizada sobre a areia (Óxido de Sílica – SiO<sub>2</sub>). Essa associação reduziu o ponto de fusão, formando a substância que escorria e solidificava, que hoje se conhece como o vidro.

Nos últimos três séculos, acontecimentos importantes marcaram a fabricação e a aplicação dos vidros, por exemplo, o entendimento de como ocorre a formação do vidro, papel que alguns íons desenvolvem na rede vítrea, teorias cinéticas, teorias estruturais, composição e propriedades, isso só foi possível devido aos avanços na química e na física [81].

A teoria estrutural dos vidros proposta por Zachariasen [14], em 1932, no seu trabalho *The Atomic Arrangement in Glass*, menciona que os materiais vítreos, diferentemente dos materiais cristalinos, possuem ordenação atômica de curto alcance, ou seja, não apresentam um arranjo periódico tridimensional de longo alcance, caracterizando o seu estado amorfo. Outros cientistas ainda intrigados e buscando compreender o estado vítreo, apresentaram definições após Zachariasen, tornando a definição de vidro uma pauta constante da comunidade científica. Algumas definições na construção do conceito de vidro dos últimos 30 anos são apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3** – Definições de vidros presentes na literatura.  
**Fonte:** Adaptação de Alves *et al*, (2001) [81] e Zanotto e Mauro, (2017) [83].

| Autor (ano)            | Definição                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Elliott (1990)         | “Vidros são materiais amorfos que não possuem ordem translacional a longo alcance (periodicidade), característica de um cristal. Os termos amorfo e sólido não-cristalino são sinônimos nesta definição. Um vidro é um sólido amorfo que exhibe uma transição vítrea.”                                                              |
| Varshneya (1994)       | “Vidro é um sólido que tem a estrutura do tipo de um líquido, um sólido “não-cristalino” ou simplesmente um sólido amorfo, considerando a característica de amorfo como uma descrição da desordem atômica, evidenciada pela técnica de difração de raios-X.”                                                                        |
| Shelby (1997)          | “Vidro é um sólido amorfo com ausência completa de ordem a longo alcance e periodicidade, exibindo uma região de transição vítrea. Qualquer material, inorgânico, orgânico ou metal, formado por qualquer técnica, que exhibe um fenômeno de transição vítrea é um vidro.”                                                          |
| Zanotto e Mauro (2017) | “O vidro é um estado da matéria condensada fora do equilíbrio termodinâmico, não cristalino, que exhibe uma transição vítrea. As estruturas dos vidros são semelhantes às dos líquidos super-resfriados (LRS) e relaxam espontaneamente em direção ao estado de LRS. Seu destino, para tempos infinitamente longos, é cristalizar.” |

Perante essas definições e o consenso da comunidade científica, o vidro pode ser definido, atualmente, como um sólido que não apresenta estrutura ordenada, ou seja, ausência de simetria e periodicidade na forma como se encontram os átomos presentes na constituição da rede vítrea, e apresentam também o fenômeno de transição vítrea ( $T_g$ ) [83].

A técnica tradicional mais utilizada para preparar vidros é o método de fusão/resfriamento, na qual, os reagentes são misturados, fundidos em altas temperaturas, e posteriormente o fundido é resfriado rapidamente. Durante a fusão, o arranjo estrutural da massa fundida apresenta semelhanças com o estado líquido [81]. Entretanto, dependendo da taxa de resfriamento, o arranjo estrutural e o volume específico podem ser alterados, como representado na Figura 3.

Na Figura 3, qualquer material acima da temperatura de fusão ( $T_f$ ) encontra-se no estado líquido. Mediante resfriamento lento e gradual, ocorre uma redução no volume específico desse material, até o ponto  $T_f$ . Abaixo dessa temperatura, dependendo da taxa de resfriamento, duas trajetórias são possíveis, a obtenção de um cristal, mediante o processo de cristalização, ou do vidro, abaixo da  $T_g$ . Com a redução da temperatura em uma taxa de resfriamento lenta (linha de cor vermelha) ocorre o processo de cristalização. Durante esse processo, as unidades estruturais se orientam, desenvolvendo simetria e periodicidade, características dos sistemas cristalinos, obtendo ao final do resfriamento o cristal [84].

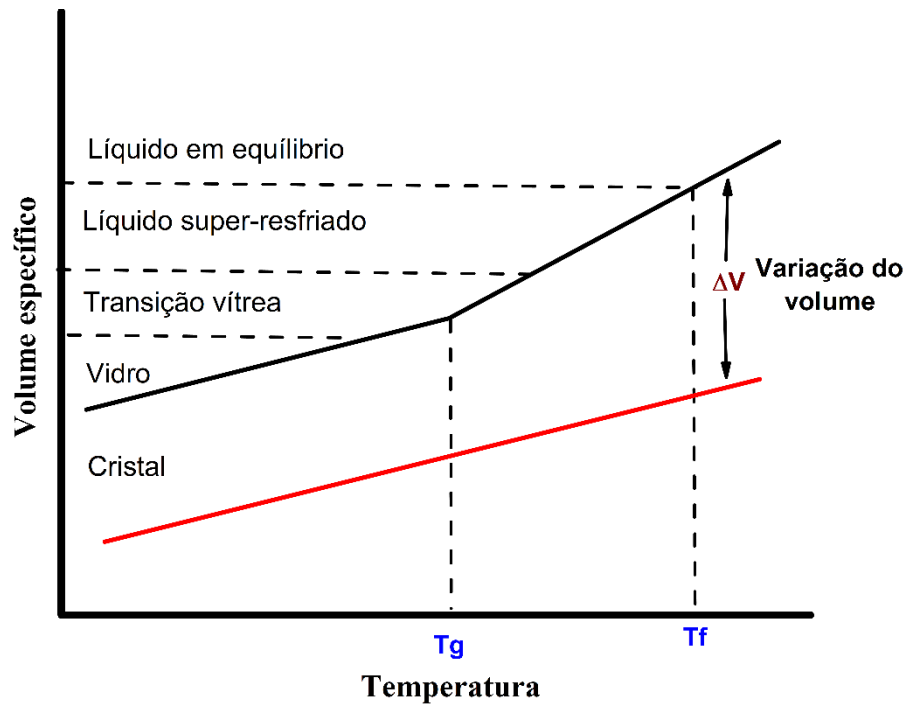


**Figura 3** - Obtenção do vidro: volume específico x temperatura. **Fonte:** Adaptação de Sousa et al, (2004) [84].

Se a taxa de resfriamento for rápida (linha de cor preta), não haverá tempo para ocorrer a cristalização e um estado metaestável será formado, denominado de líquido super-resfriado. Durante esse resfriamento, as moléculas apresentam uma menor mobilidade, até o momento em que não é mais possível rearranjo atômico característico daquele volume e temperatura. Ao final desse resfriamento, depois da curva de transição, o material obtido é um sólido com organização estrutural semelhante ao estado líquido, caracterizado como o estado vítreo [81].

A  $T_g$  pode ser verificada no gráfico como uma redução na inclinação da reta de cor preta, é definida como um intervalo de temperaturas e não um ponto específico. Nessa região não ocorre transformação, como na  $T_f$ , o que acontece é uma alteração da viscosidade em função da temperatura. Abaixo da  $T_g$ , as características de rearranjo atômico e fluidez são perdidas, prevalecendo um sólido com estrutura não-cristalina, o vidro [82].

Atualmente, depois de alcançada a compreensão sobre os processos de formação e preparação dos vidros, eles se destacam devido a sua versatilidade e inúmeras aplicações (uso doméstico, industrial, biomédico, construção civil, se encontram no laboratório, dispositivos de comunicação, segurança e proteção) [81].

### 2.3.2 Vidros com aplicação biológica: vidros bioativos

Buscando um material capaz de substituir de forma apropriada os ossos fraturados dos soldados que chegavam da Guerra do Vietnã, e estavam tendo seus braços ou pernas amputados por causa da rejeição dos implantes, Larry Hench e seus colegas [8], iniciaram as suas pesquisas e desenvolveram um vidro de composição química  $45\text{SiO}_2\text{-}24,5\text{Na}_2\text{O-}24,5\text{CaO-}6\text{P}_2\text{O}_5$  (% em massa), denominado de 45S5. Verificou-se que esse material era capaz de interagir com o tecido ósseo de ratos, de forma que após o implante e interação não era possível separação, se não mediante quebra. Posteriormente, esse vidro foi patenteado e denominado de *Bioglass®*.

Inúmeras composições de vidros com potencial para aplicação na Ortopédica e Odontológica já são relatados [85–87]. Os principais sendo silicatos, fosfatos e boratos, tendo como formador da rede vítrea a sílica, o fósforo e o boro, respectivamente. O *Bioglass®* e as outras composições são classificadas como bioativos pelo fato de provocarem uma resposta biológica específica no tecido almejado durante o processo de implante. A bioatividade desses vidros é associada a formação de uma camada de hidroxiapatita em sua superfície, quando imersas em fluido corporal, que devido a sua semelhança química com o tecido ósseo, interagem e estabelecem uma ligação com este [88–90].

Os íons que são liberados durante a degradação dos vidros bioativos, quando absorvidos por células osteoblásticas, estimulam os genes que auxiliam na proliferação e diferenciação celular. Portanto, os vidros bioativos, atuam nos processos de osseointegração (estabelecendo uma ligação com o osso já existente) e osteocondução (induzindo o crescimento de um novo tecido ósseo na sua superfície) [11,80,91].

Com o intuito de estudar a bioatividade *in vitro* dos biomateriais, algumas soluções salinas que simulam o fluido corporal foram desenvolvidas. Kokubo e Takadama [90] criaram um fluido acelular que simula as concentrações inorgânicas e o pH do plasma sanguíneo humano, denominada de *Simulated Body Fluid* (SBF). A Tabela 4 apresenta a composição iônica e o pH do plasma sanguíneo humano e da solução de SBF.

**Tabela 4** - Concentrações dos iônicos e pH do plasma sanguíneo e do SBF.

Fonte: Adaptação de Kokubo e Takadama, (2006) [90].

| Íon              | Na <sup>+</sup> | K <sup>+</sup> | Mg <sup>+</sup> | Ca <sup>2+</sup> | Cl <sup>-</sup> | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | pH      |
|------------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------|
| Plasma sanguíneo | 142,0           | 5,0            | 1,5             | 2,5              | 103,0           | 27,0                          | 1,0                            | 0,5                           | 7,2-7,4 |
| SBF              | 142,0           | 5,0            | 1,5             | 2,5              | 147,8           | 4,2                           | 1,0                            | 0,5                           | 7,4     |

Observa-se pela Tabela 4, que a solução de SBF apresenta maior concentração de íons  $\text{Cl}^-$  e menor concentração de íons  $\text{HCO}_3^-$ , quando comparada com o plasma sanguíneo. Tentando corrigir essas concentrações, Oyane, em 2003, preparou uma nova solução de SBF, denominado SBF revisado (r-SBF). Contudo, houve precipitação do  $\text{CaCO}_3$  na solução de r-SBF, supersaturando a solução, inviabilizando seu uso [90]. O uso dessa solução nos testes de bioatividade *in vitro* apresenta resultados similares com os testes *in vivo*, além de ser um teste de baixo custo, utilizar equipamentos simples e reduzir o número de animais mortos que são utilizados como cobaias.

Os vidros silicatos, um exemplo é o *Bioglass®*, quando imersos em SBF, apresentam uma taxa de conversão em HA lenta e incompleta, devido a formação em sua superfície, de uma camada rica em sílica-gel durante sua degradação em meio biológico, dificultando sua solubilidade. Nesse contexto, outras composições químicas de vidros para aplicação biológica têm sido pesquisadas. Os vidros boratos se destacam devido a sua elevada bioatividade, sua baixa durabilidade química e taxa de dissolução rápida, e aumento no pH da solução, apresentando maior facilidade na taxa de conversão em HA, quando comparados aos vidros silicatos bioativos [92–94]. O boro também desempenha papel favorável no crescimento ósseo [95].

Vidros boratos são formados por grupos trigonais planares  $[\text{BO}_3]$ , organizados na forma de anéis de boroxol. Estruturas fora do anel são considerados grupos trigonais isolados, denominado pontes de oxigênio [82]. A Figura 4 apresenta a estrutura presente em vidros boratos. Diferente dos vidros silicatos e fosfatos, a adição de óxido modificadores, quando introduzidos na composição dos vidros boratos não resulta em quebras das pontes de oxigênio, pelo contrário, ocorre mudança de coordenação dos grupos  $[\text{BO}_3]$  para grupos tetraédricos  $[\text{BO}_4]^-$ , carregado negativamente com um cátion modificador para equilibrar a carga.

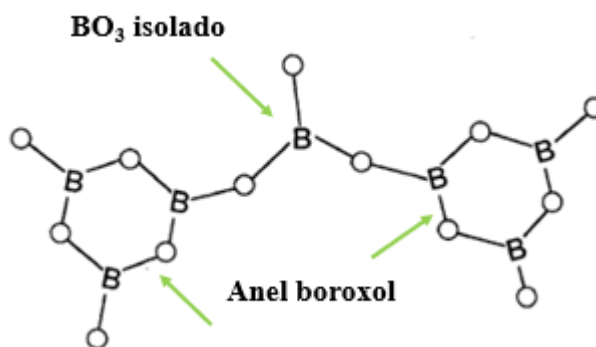


**Figura 4** - Estrutura de vidros boratos. **Fonte:** Adaptação de Shelby (2011) [82].

Hench *et al* [20] elaboraram um mecanismo básico de três etapas para formação de hidroxiapatita, quando o vidro silicato bioativo entra em contato com fluídos fisiológicos, são elas: troca iônica, dissolução e precipitação. Todas elas colaboram para degradação do vidro em ambiente fisiológico, e variam com o pH da solução, proporção área da amostra e volume do fluido, e lixiviação seletiva.

Inicialmente, ocorre uma rápida troca iônica entre íons de metais alcalinos e alcalinos terrosos (presentes na composição do vidro) com cátions de solução ( $H^+$  ou  $OH^-$ ). A sílica solúvel, mediante hidratação e quebra da ligação Si-O-Si, se dissolve na forma de  $Si(OH)_4$  e forma os grupos silanóis. Posteriormente, ocorre a condensação e a repolimerização de uma camada rica em sílica na superfície do vidro bioativo lixiviado (camada de sílica-gel). Por fim, a migração dos íons  $Ca^{2+}$  e  $PO_4^{3-}$  na camada rica em sílica forma uma camada de fosfato de cálcio amorfo, passando o período de imersão, essa se cristaliza em HA, afirmando a bioatividade das amostras [96].

Por sua vez, as etapas de degradação e formação de HA em vidros boratos são semelhantes ao mecanismo dos vidros silicatos. Entretanto, ocorre duas diferenças: os vidros boratos não apresentam a capacidade de se repolimerizar e formar camadas de borato gel, e a degradação dos vidros boratos, hidratação e hidrólise da rede vítrea acontece de forma simultânea [86,97].

Como resultado das pesquisas realizadas nos últimos 40 anos, os vidros bioativos já possuem usos clínicos, em enchimentos ósseos, revestimento de superfícies metálicas, produção de *scaffolds*, cimentos, ionômeros de vidro, cremes dentais e compósitos, tratamento de feridas e queimaduras [78,85,98–100].

Apesar de apresentarem elevada bioatividade, as aplicações dos vidros bioativos ainda são limitadas por causa da sua baixa resistência mecânica e tenacidade à fratura o que impede seu uso em suporte de carga mecânica e limita seu uso na forma de particulado [101–103]. Almejando implantes estruturais, por exemplo, os vidros são materiais frágeis quando comparados as ligas metálicas bioativas, tornando seu uso inviável para tal aplicações, especialmente de ossos densos. Uma solução para essa desvantagem é preparar materiais vitrocerâmicos via cristalização controlada [19].

### 2.3.3 Cristalização controlada e o desenvolvimento de vitrocerâmicas

A cristalização de um vidro, processo também chamado de desvitrificação, pode ocorrer de forma natural, ainda durante o processo de síntese do vidro ou por meio de tratamentos térmicos controlados, depois que o material é preparado. No primeiro caso, a cristalização é tratada como um defeito, resultando em reações indesejáveis na produção dos vidros. No segundo caso, quando controlada, ela é utilizada na obtenção de uma nova classe de materiais, as vitrocerâmicas [104,105].

A expressão cristalização controlada refere-se ao trabalho para controlar, por meio de tratamento térmico controlado, o desenvolvimento de uma microestrutura e as propriedades do material desenvolvido. As fases desenvolvidas apresentam características físicas ou químicas diferentes da fase original. As propriedades elétricas, ópticas, magnéticas e mecânicas do vidro podem ser potencializadas após o tratamento térmico. Para realizar esses tratamentos térmicos, uma das condições necessárias é conhecer a temperatura de transição vítrea [15,106,107].

A descoberta dos materiais vitrocerâmicos por cristalização controlada é atribuída ao pesquisador norte-americano, Donald Stookey. Nos finais dos anos 50, durante seus estudos com vidros fotocromáticos que apresentavam cristais de prata em sua composição, ele acabou esquecendo um par de lentes dentro de um forno, que passou a noite ligado. Pela manhã, Donald observou que as lentes estavam totalmente opacas. Portanto, houve a transformação de um novo material, que ele denominou de vitrocerâmica. No cenário científico, após estudos buscando compreender a relação entre composição dos vidros e o mecanismo de cristalização, a descoberta de Donald representa um progresso na ciência dos materiais vítreos e cerâmicos com microestrutura e propriedades desejadas [108].

Definidas como materiais parcialmente cristalizados, obtidas por cristalização controlada dos vidros precursores, as vitrocerâmicas possuem uma microestrutura composta por uma ou mais fases cristalinas e uma porcentagem de vidro residual [19,97,109]. Acima da  $T_g$  e abaixo da  $T_f$ , a rede vítrea aumenta sua viscosidade, possibilitando sua difusão e rearranjos atômicos, passando do estado sólido não-cristalino, adquirindo o estado de menor energia, o estado cristalino. Os fatores que influenciam a cristalização controlada são a composição química do vidro e os parâmetros do tratamento térmico (tempo, temperatura e taxa de aquecimento) [108,109].

O desenvolvimento dessa microestrutura corresponde a uma transição de fases que envolve as etapas de nucleação e o crescimento de cristais. Durante o tratamento térmico, como resultado das agitações térmicas e flutuações estruturais, ocorre o surgimento de grãos que induzirão o desenvolvimento de regiões ordenadas. Eles necessitam atingir um tamanho crítico, por meio da qual será desenvolvida uma nova fase cristalina, chamado de núcleo. O surgimento desses núcleos é a característica principal da etapa de nucleação [82,110,111].

Dependendo do local de surgimento do núcleo, a nucleação pode ser classificada como superficial (caso se formem na superfície) ou volumétrica (caso os núcleos se desenvolvam no volume da matriz). Essa última ainda pode ser dividida em duas, nucleação homogênea (quando a formação dos núcleos não apresenta nenhum sítio preferencial) e nucleação heterogênea (quando a nucleação ocorre em locais específicos, pela presença de imperfeições ou impurezas). Após o desenvolvimento e o crescimento dos núcleos até o tamanho crítico, a nucleação continuará ocorrendo de forma simultânea ao crescimento da fase cristalina. [82,110,111]. Essa classificação é apresentada na Figura 5.

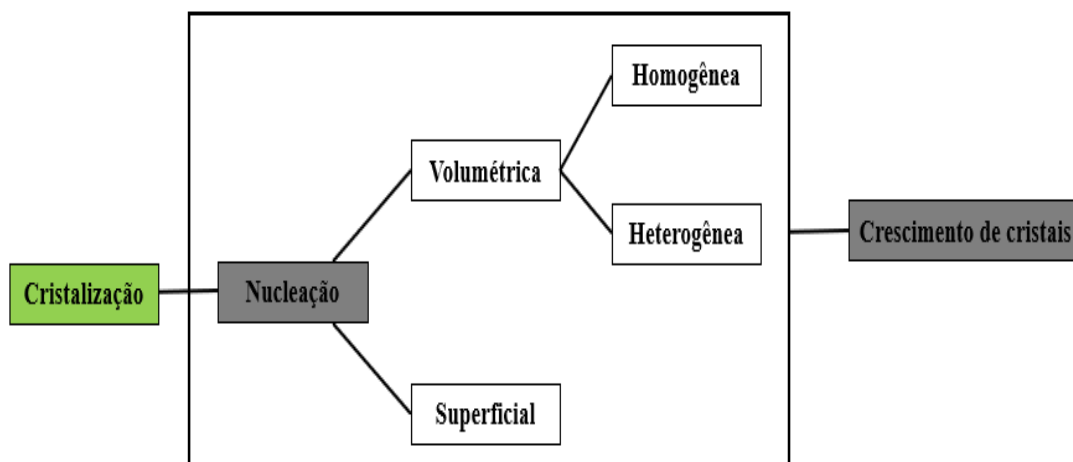


**Figura 5** – Etapas do processo de cristalização. **Fonte:** Adaptação de Shelby (2011) [82].

Para que a nucleação ocorra é necessária a adição de agentes nucleantes. Eles são metais, quando presentes na composição do vidro e por meio do tratamento térmico, induzem a separação de fases [105,112]. Exemplos desses metais são a Pt, Ag, Au e Cu. O óxido de prata atua como um modificador de rede, gerando pontos de descontinuidade reticular durante o tratamento térmico. Os íons de  $\text{Ag}^+$  enfraquecem as ligações estruturais na rede vítrea, facilitando sua cristalização e diminuindo a viscosidade do vidro [113,114].

A cristalização pode ser realizada por meio de duas ou de uma etapa. No primeiro caso, exibido na Figura 6, o vidro é tratado em uma temperatura suficiente para a formação dos núcleos, e posteriormente ao crescimento desses núcleos outro tratamento é realizado para o crescimento dos cristais, logo duas rampas. No outro caso, Figura 7, o tratamento de nucleação e crescimento de cristais são realizados juntos, em uma única rampa [15,108].

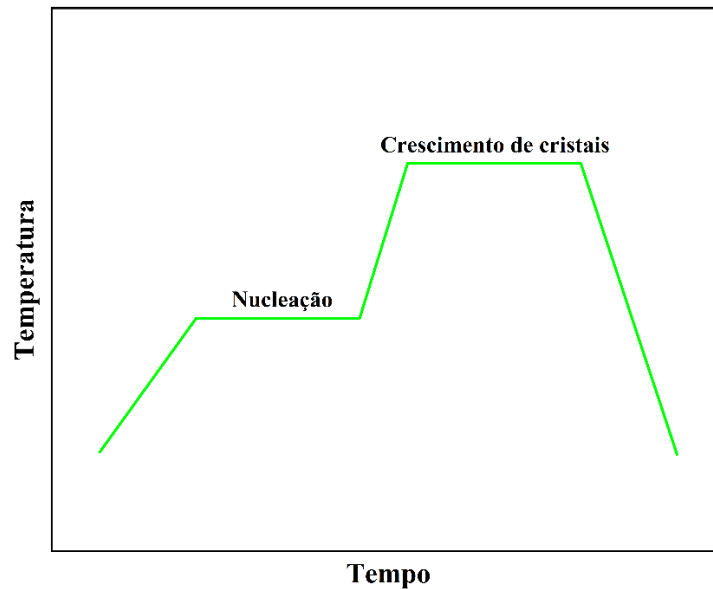


**Figura 6** - Cristalização em duas etapas.

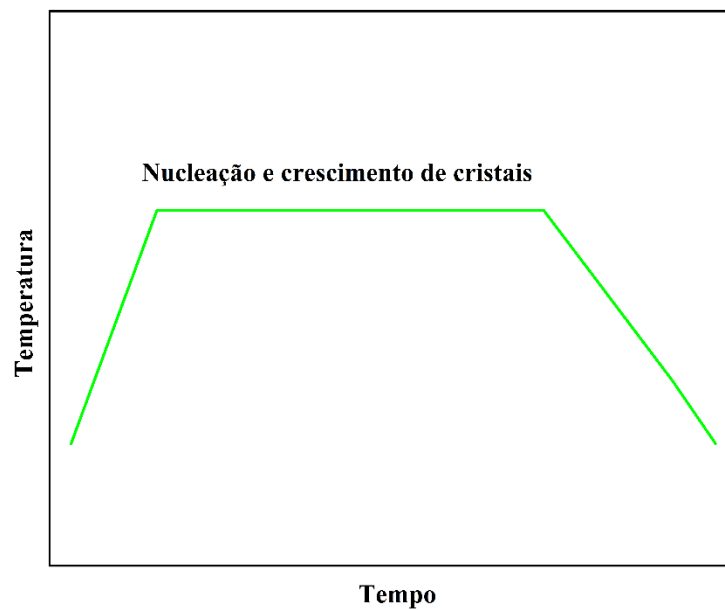


**Figura 7** – Cristalização em etapa única.

A relevância e o interesse por materiais vitrocerâmicos nas últimas décadas tem se destacado devido ao volume de trabalhos publicados e patentes registradas, em nível mundial [109,115]. As vitrocerâmicas são aplicadas na medicina, odontologia, óptica, eletrônica, uso doméstico e industrial [116]. Em relação as propriedades mecânicas, as vitrocerâmicas, quando comparadas aos vidros bases e apresentam boa resistência mecânica e tenacidade à fratura, e são mais estáveis quando imersas em soluções fisiológicas [117,118].

Embora a cristalização controlada melhore as propriedades mecânicas, são necessários estudos na bioatividade, pois ela pode ser modificada em função do desenvolvimento de fases cristalinas [21–23]. Alguns autores abordam que a cristalização controlada diminui a cinética de reação (troca iônica entre a superfície da amostra e os íons da solução fisiológica), mas não inibe a precipitação de hidroxiapatita, mesmo em vitrocerâmicas com altos percentuais de cristalinidade [24–27]. Sobre a cristalização do *Bioglass®*, Plewinski *et al* [28] afirmou que ela não inibiu a precipitação de HA nas superfícies de vitrocerâmicas durante testes *in vitro*.

Para explicar o comportamento bioativo e biomecânico de vitrocerâmicas e compará-las as amostras de vidro base, diversos parâmetros como o percentual de cristalinidade, teor de vidro residual, total de fases desenvolvidas, morfologia e tamanho dos cristais (microestrutura), e solubilidade das fases desenvolvidas na matriz vítrea, podem ser utilizados [29–35]. Um interesse potencial nas aplicações biomédicas de vitrocerâmicas é a possibilidade das propriedades mecânicas [23,29] e bioativas [28,36,37] do vidro base ser melhorada em função do teor percentual e a natureza das fases cristalinas desenvolvidas.

Kokubo *et al* [119] em 1982, relataram o desenvolvimento da vitrocerâmica Apatite-Wollastonite (W/A), de alta resistência mecânica e com capacidade se ligar ao osso. Ela foi patenteada, denominada Cerabone®, sendo utilizada comercialmente em enchimentos ósseos, na produção de próteses e substituição de vértebras [33,120]. Na Tabela 5 são apresentadas as composições, estudos *in vitro* e aplicações de algumas vitrocerâmicas comerciais.

As vitrocerâmicas comerciais apresentadas na Tabela 5, são exemplos de sistemas vítreos silicatos, que mesmo após o desenvolvimento de fases cristalinas por meio do processo de cristalização controlada, ainda são bioativas.

**Tabela 5** - Aplicações clínicas e estudos *in vitro* das vitrocerâmicas mais conhecidas e utilizadas comercialmente. **Fonte:** Adaptação de Hoppe *et al* (2017), [120].

| Nome comercial | Estudos <i>in vivo</i>                                                                                                     | Aplicações Clínicas                                                                                                 |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Biosilicate®   | Defeitos ósseos em tíbias de ratos.                                                                                        | Tratamento de hipersensibilidade dentária,<br>Substituição da cadeia ossicular da orelha média. Implantes orbitais. |
| Bioverit®      | Substituição da cadeia ossicular da orelha média.<br>Implantes dentários.<br>Próteses de substituição da cadeia ossicular. | Restrições na estrutura óssea da região crânio-mandibular. Cirurgia reconstrutiva do assoalho orbital ósseo.        |
| Ceravital®     | Tecido subcutâneo,<br>Implante de orelha média                                                                             | Cirurgia timpanoplastia<br>Próteses ossiculares.                                                                    |
| Cerabone®      | Defeitos ósseos de tamanho crítico.                                                                                        | Implantes dentários e defeitos periodontais.<br>Próteses e espaçadores intervertebrais.                             |

No Brasil, um grupo de pesquisadores do Laboratório de Materiais Vítreos na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) coordenado pelo Prof. Dr. Edgar Dutra Zanotto e com a colaboração do Prof. Dr. Larry Hench, desenvolveram uma vitrocerâmica bioativa, utilizando um vidro base com composição similar ao *Bioglass®* 45S5, que apresenta melhores propriedades mecânicas e o mesmo mecanismo de bioatividade. O material desenvolvido, foi patenteado e denominado de Biosilicato®, caracterizada por ser uma vitrocerâmica com percentual de cristalinidade elevado e comportamento bioativo [12,108].

Outro problema relacionado à interação biomaterial-organismo são as infecções bacterianas, elas têm sido uma das principais razões de falhas em transplantes ósseos [39,40]. A Ag além de atuar como agente nucleante, também apresenta propriedades antibacterianas. Sendo uma das estratégias da Engenharia de Tecidos, o desenvolvimento de vitrocerâmica dopadas com Ag que apresentem comportamento bioativo e antimicrobiano [121].

## 2.4 A Prata (Ag) e a sua atividade antibacteriana

Acredita-se que o terceiro metal descoberto e manipulado pelo homem foi a prata (Ag), antecedida pelo ouro e o cobre. Na forma metálica, ela foi utilizada na produção de moedas, joias, talheres e na conservação de alimentos e água. Seu nome deve-se ao brilho característico e o seu símbolo químico Ag é por causa do seu nome em latim (*Argentum*, que significa brilhante). Ela se encontra no bloco d da Tabela Periódica, seu número atômico é 47, localizada no grupo 11º, 5º período ( $4d^{10} 5s^1$ ), classificado como metal de transição e apresenta dois isótopos naturais e estáveis ( $Ag^{107}$  e  $Ag^{109}$ ) [122,123]. No organismo humano, a prata não é um metal traço encontrado naturalmente e não apresenta valor nutricional [124].

A Ag apresenta três estados de oxidação:  $Ag^+$ ,  $Ag^{2+}$  e  $Ag^{3+}$ , a prata metálica é denotada como  $Ag^0$ . Entre os estados de oxidação, os cátions  $Ag^+$  são altamente reativos e estáveis, enquanto os outros dois também possuem alta reatividade, porém apresentam tempo de vida curto.  $Ag^0$  não apresenta atividade bacteriana, também não interage com os tecidos biológicos, caso não seja ionizada. Quando presente em água e/ou fluidos biológicos, os compostos de prata são ionizados e liberam prata na forma iônica [124–126].

A atividade antibacteriana ou efeito oligodinâmico dos íons  $Ag^+$  foi relatado por Herodot [127] no século XIX, e outros metais em sua forma iônica, como Cobre (Cu) e Zinco (Zn) também apresentam atividade antibacteriana [44–47]. Ela pode ser explicada por meio da ligação que esses íons estabelecem com ânions e proteínas presentes nos receptores das superfícies celulares de bactérias e fungos. A  $Ag^+$  atua como um ácido de Lewis, estabelecendo ligação com os grupos doadores de elétrons presentes em biomoléculas, contendo Enxofre (S), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N) [128].

Apesar de se reconhecer a atividade antimicrobiana da prata ionizada, não existe um consenso, entre os cientistas, do mecanismo de como ocorre a morte das bactérias. Ao total, quatro hipóteses foram desenvolvidas [129–131]. Para todas elas, a ligação da prata à membrana celular com absorção intracelular é o passo inicial, posteriormente, a concentração considerada letal é atingida, ocasionando a morte da célula bacteriana [126].

O primeiro mecanismo implica na inibição de enzimas mediante interação química com o íon de prata, havendo o bloqueio do sistema de elétrons das bactérias e a morte da célula bacteriana [132–134].

O segundo mecanismo ocorre mediante interação e quebra da membrana celular. A parede celular bacteriana, na sua superfície, é composta de cargas catiônicas e aniônicas. A

prata iônica se liga, mediante interação eletrostática, à porção aniônica da parede celular. Isso pode ocasionar a quebra da membrana, inibir o movimento da célula e a passagem de nutrientes, ocasionando a morte da bactéria [129].

O terceiro mecanismo está relacionado a ligação dos íons  $\text{Ag}^+$  com a estrutura do DNA da célula bacteriana (o material genético das bactérias não se encontra no núcleo, é disperso no citoplasma). Os íons interagem com os pares de bases guanina-citosina e adenina-timina, resultando na mutação do DNA, finalizando com a morte da célula bacteriana [129].

No último mecanismo, a morte da célula bacteriana ocorre pelos radicais livres de prata. Os íons de  $\text{Ag}^+$  se ligam a inúmeros aminoácidos da célula, formando um complexo organometálico. Se a ligação entre a prata e o complexo for rompida, um radical livre de prata será formado dentro da célula. Elas podem se acumular dentro da célula, prejudicando a cadeia de transporte de elétrons, inativando o material genético bacteriano, rompendo a parede celular e causando a morte celular [135,136].

Atualmente a prata é muito utilizada na desinfecção, nos revestimentos, em ligas dentárias, *sprays* para evitar maus odores causados pelo suor, cosméticos, vestuário, bandagens, creme de sulfadiazina de prata e instrumentos médicos para prevenir infecções [137].

No caso dos biomateriais, durante o implante podem ocorrer infecções hospitalares, associadas as falhas do procedimento cirúrgico ou contaminação de microrganismos presentes no ambiente hospitalar, gerando a necessidade de um novo procedimento cirúrgico, perda do dispositivo implantado, amputações ou até mesmo morte dos pacientes, em caso mais grave. Inúmeras pesquisas já relatadas estudam a atividade antibacteriana de vidros e vitrocerâmicos bioativas, quando apresentam a prata em sua composição [46,138,147–156,139–146]. Portanto, a presença de Ag em biomateriais, representa uma possibilidade de tratar infecções bacterianas. Tal fato pode aumentar o tempo de vida útil do implante e sua eficácia no processo de recuperação tecidual [154–157].

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Análises térmicas

Banijamali *et al* [113] estudaram a cristalização controlada em vidros  $19\text{CaO}-9\text{Al}_2\text{O}_3-11,5\text{TiO}_2-60,5\text{P}_2\text{O}_5-\text{XAg}$  ( $X=0,1,3$  e  $5\%$  em massa), e investigaram o papel dos estados iônicos e metálico da prata. As amostras, em função da concentração de prata, foram chamadas de blank, B1, B3 e B5, respectivamente. A redução dos íons  $\text{Ag}^+$  para  $\text{Ag}^0$  foi realizada mediante tratamento térmico em  $500^\circ\text{C}$ , em atmosfera de hidrogênio, por diferentes tempos.

Os testes realizados demonstraram que os vidros com maiores concentrações de Ag, necessitavam de menos tempos para ser cristalizados. Portanto, os vidros B5, B3 e B1 foram tratados termicamente por 1 h, 3 h e 5 h, respectivamente. Os termogramas de análise térmica diferencial das vitrocerâmicas preparadas por Banijamali e seus colegas são apresentados na Figura 8.

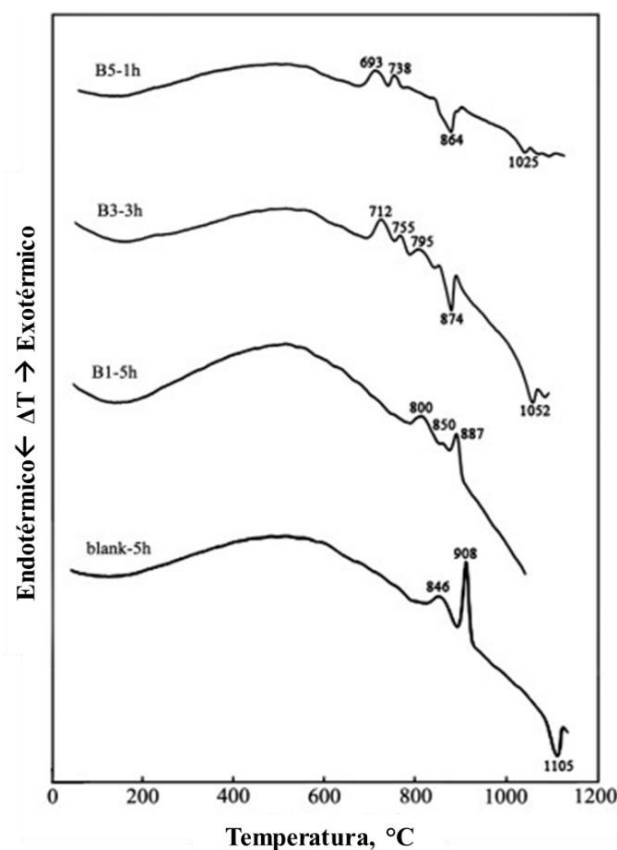


**Figura 8** - Análises de DTA dos vidros tratados termicamente. Black-5h, B1-5h, B3-3h e B5-1h. **Fonte:** Adaptação de Banijamali *et al*, (2012) [113].

Mediante os termogramas obtidos, os autores observaram uma redução nas temperaturas de cristalização e na intensidade dos picos das amostras cristalizadas e dopadas com prata, quando comparadas ao vidro base cristalizado.

Valle *et al* [158] estudaram a influência de 5% em mol do cloreto, nitrato e óxido de prata na preparação de vitrocerâmicas em vidros óxidos de metais pesados. Duas series de amostras foram preparadas, uma tratada termicamente por 5 h, outra por 10 h, ambas em 480 °C. As temperaturas dos eventos térmicos obtidas por meio da calorimetria exploratória diferencial, das amostras relatadas, são apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6** – Temperaturas características obtidas para as amostras com diferentes compostos de prata e tratadas termicamente. **Fonte:** Adaptação de Valle *et al*, (2013) [158].

| Compostos         | Amostras base |     |       | Tratadas (480 °C/5h) |     |       | Tratadas (480 °C/10h) |     |       |
|-------------------|---------------|-----|-------|----------------------|-----|-------|-----------------------|-----|-------|
|                   | Tg            | Tx  | Tx-Tg | Tg                   | Tx  | Tg-Tx | Tg                    | Tx  | Tg-Tx |
| Sem prata         | 459           | 579 | 120   | -                    | -   | -     | -                     | -   | -     |
| Ag <sub>2</sub> O | 463           | -   | > 137 | 437                  | 579 | 141   | 438                   | 580 | 142   |
| AgO               | 447           | -   | > 169 | 437                  | 579 | 142   | 438                   | 575 | 137   |
| AgNO <sub>3</sub> | 442           | 554 | 113   | 433                  | 533 | 90    | 442                   | 532 | 90    |
| AgCl              | 444           | 559 | 118   | 441                  | 530 | 89    | 438                   | 532 | 94    |

Os autores observaram, para as amostras não tratadas que a incorporação de diferentes compostos de prata, ocasiona um aumento no valor da Tg quando o Ag<sub>2</sub>O é adicionado, e para os vidros contendo AgCl e AgNO<sub>3</sub>, a estabilidade térmica aumenta. Para as amostras tratadas, Tx e a estabilidade térmica de todas as amostras diminuem. Entretanto, o aumento do tempo de tratamento térmico, para 10 h, não altera de forma significativa os valores de temperaturas das amostras tratadas por 5 h.

### 3.2 Cristalização controlada em vidros

Kumar *et al* [45] desenvolveram vidros com composição química  $45,8\text{SiO}_2\text{-}45,5\text{CaO-}4\text{B}_2\text{O}_3\text{-}X\text{Ag}_2\text{O}$  ( $X= 0$  e  $10\%$  em mol), e as amostras foram denominadas Ag0 e Ag10. As vitrocerâmicas foram preparadas mediante tratamento térmico em 400, 600 e 800 °C, durante duas horas, e designadas como Ag0-400 °C, Ag0-600 °C, Ag10-400 °C, Ag10-600 °C e Ag10-800 °C. Os difratogramas das amostras desenvolvidas no trabalho de Kumar e seus colegas são apresentados na Figura 9.

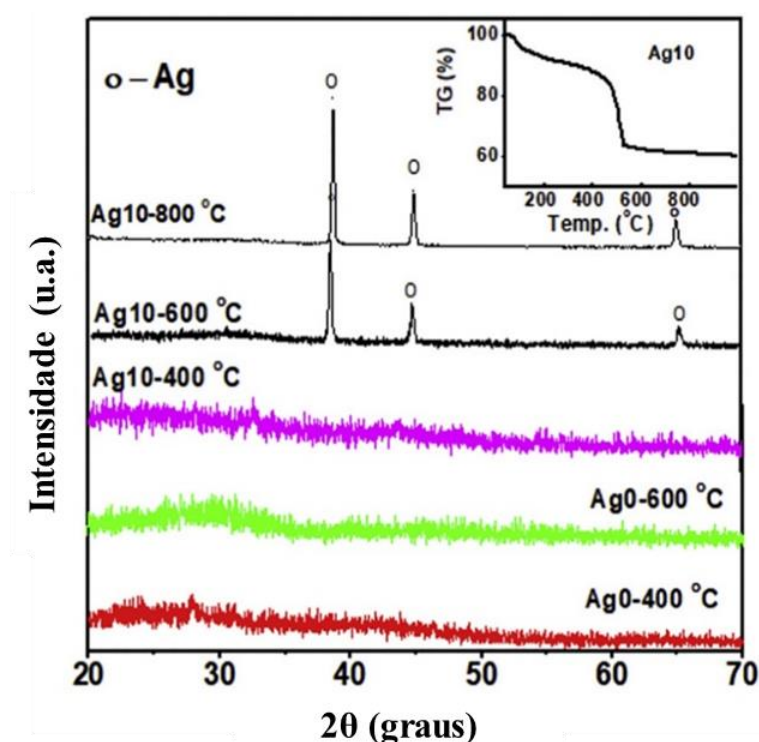


**Figura 9** – Difratogramas das vitrocerâmicas Ag0-400 °C, Ag0-600 °C, Ag10-400 °C, Ag10-600 °C e Ag10-800 °C/. **Fonte:** Adaptação de Kumar *et al*, (2019) [45].

Mediante os difratogramas, observaram que as amostras Ag0-400 °C, Ag0-600 °C e Ag10-400 °C revelam um padrão de difração característico de materiais amorfos. Nas amostras Ag10-600 °C e Ag10-800 °C verificaram o surgimento de três picos característicos da prata metálica, e um aumento na intensidade desses picos com o aumento da temperatura de tratamento térmico.

Taruta *et al* [159] pesquisaram a formação de nanopartículas de Ag em vitrocerâmicas transparentes. A composição do vidro utilizado foi  $70,4\text{Li}_{1,5}\text{Mg}_3\text{AlSi}_{4,5}\text{O}_{13,25}\text{F}_2 - 29,6\text{MgF}_2$  (% em mol).  $\text{Ag}_2\text{O}$  nas concentrações de 0, 1,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 % em mol foram adicionados ao vidro base. Para obtenção das vitrocerâmicas, os vidros foram tratados em 600, 650, 700, 750, 800 e 850 °C, durante uma hora. Os padrões de difração de raios-X da amostra com 20% em mol de  $\text{Ag}_2\text{O}$  (Ag-20) e das vitrocerâmicas obtidos no estudo são exibidos na Figura 10. Analisando os difratogramas, eles detectaram prata metálica nas amostras com as maiores temperaturas de tratamento térmico.

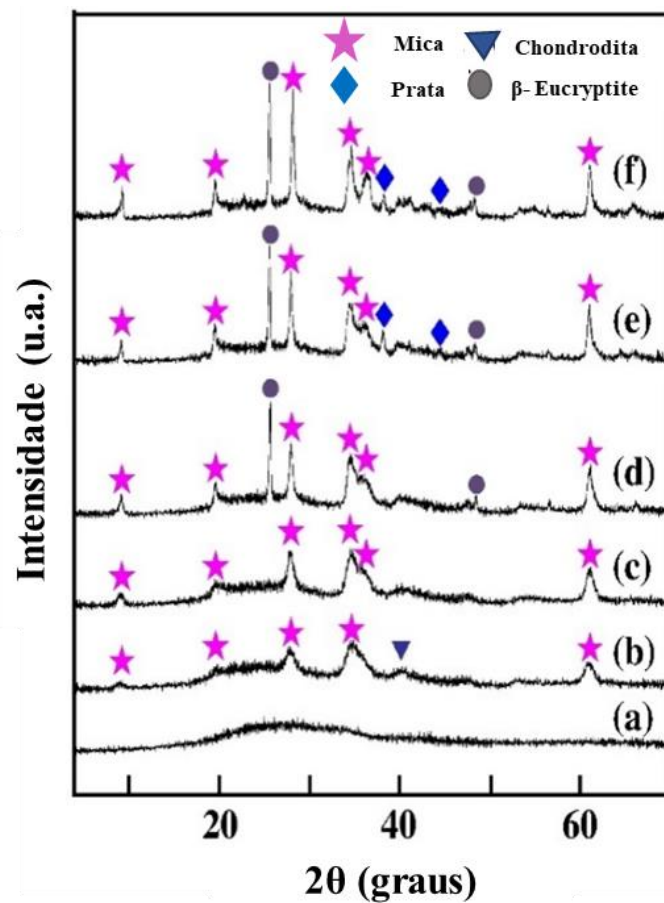


**Figura 10** - Padrões XRD de (a) vidro par Ag-20 e amostra Ag-20 aquecidos a (b) 650 °C, (c) 700 °C, (d) 750 °C, (e) 800 °C e (f) 850 °C por 1 h. **Fonte:** Adaptação de Taruta et al, (2017) [159].

### 3.3 Densidade ( $\rho$ )

Aravindan *et al* [114] buscando entender como a incorporação da prata influencia a alteração das propriedades estruturais e térmicas em vidro base, prepararam uma série de vidros fosfatos de composição química  $45\text{P}_2\text{O}_5-(40-X)\text{CaO}-15\text{Na}_2\text{O}-X\text{Ag}_2\text{O}$  ( $X = 0, 3, 6, 8, 10$  e  $12$ , % em mol) e estudaram as alterações em suas propriedades, mediante incorporação da prata, antes e depois dos tratamentos térmicos. As densidades, dos vidros e das vitrocerâmicas, foram determinadas utilizando o princípio de Arquimedes, e os resultados são apresentados na Figura 11.

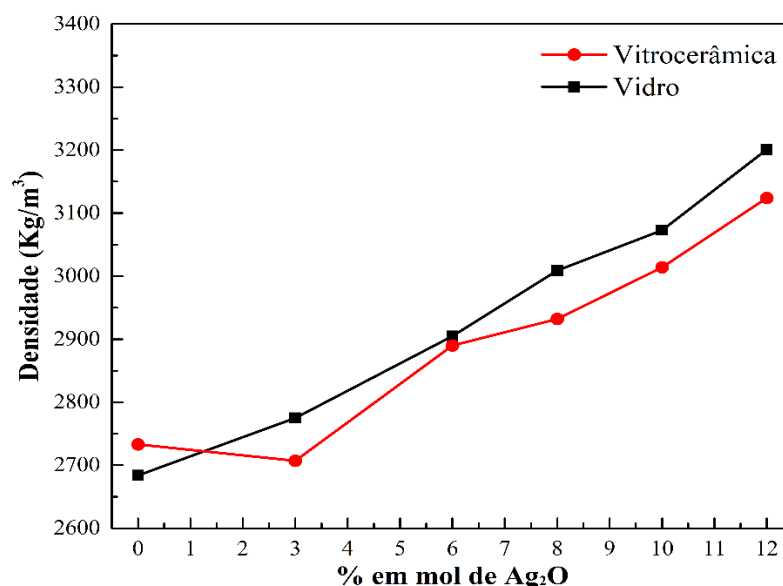


**Figura 11** – Densidade dos vidros fosfatos dopados com  $\text{Ag}_2\text{O}$  e das vitrocerâmicas preparadas via cristalização controlada. **Fonte:** Adaptação de Aravindan *et al*, (2012) [114].

Aravindan e seus colegas observaram que a densidade dos vidros aumentou, de forma linear, de  $2684$  para  $3201 \text{ kg/m}^3$ , para as amostras com 0 e 12 % em mol de  $\text{Ag}_2\text{O}$ , respectivamente. Resultados similares foram observados para as vitrocerâmicas, variação de  $2733$  (0 % em mol de  $\text{Ag}_2\text{O}$ ) a  $3124 \text{ kg/m}^3$  (12 % em mol de  $\text{Ag}_2\text{O}$ ). Portanto, a densidade aumentou com a adição de  $\text{Ag}_2\text{O}$ , nas amostras vítreas e vitrocerâmicas. Os autores mencionam que durante o processo de cristalização controlada, ocorre a precipitação de fases cristalinas, na rede vítrea, que alteram a estrutura do vidro original. Essas fases cristalinas alteram a densidade e o comportamento mecânico do vidro, isso ocorre devido à mudança na composição do vidro e a compactação da estrutura vítrea.

A densidade das amostras vitrocerâmicas preparadas por Mubina *et al* [160], utilizando o sistema  $50\text{SiO}_2\text{-}26\text{Na}_2\text{O-}20\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5$  (% em mol ), tratadas por 24 horas em 100, 300, 500, 700 e 900 °C, foram determinadas pelo método de Arquimedes. Os autores observaram uma variação na densidade em função das temperaturas de tratamento térmico, representada na Figura 12. O tratamento térmico resultou no aumento da densidade, no estudo isso foi associado ao rearranjo de grãos na estrutura do material, aumento da difusão atômica e a formação de cristais.

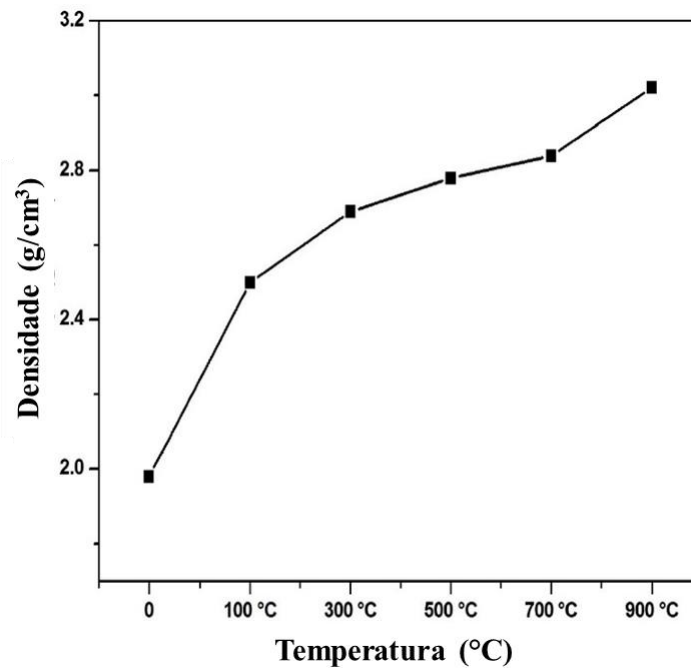


**Figura 12** - Valores de densidade em função da temperatura de tratamento térmico. **Fonte:** Adaptação de Mubina *et al*, (2019) [160].

### 3.4 Tamanho de cristalito

Lefebvre *et al* [32] pesquisaram as transformações estruturais no *Bioglass*® mediante tratamento térmicos no intervalo de temperaturas entre 650- 950 °C. O tamanho de cristalito da fase principal,  $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ , em diferentes temperaturas foi estimada pela Equação de Scherrer. Os resultados encontrados no trabalho, exibidos na Tabela 7, revelam que o tamanho do cristal varia de 18 a 41 nm entre 650 a 950 °C, respectivamente, mostrando que ocorreu um aumento médio no tamanho dos cristais com o aumento da temperatura de tratamento térmico.

**Tabela 7** – Tamanho do cristal em função da temperatura de tratamento térmico. **Fonte:** Adaptação de Lefebvre *et al*, (2007) [32].

| Temperatura (°C)           | 650 | 750 | 800 | 850 | 950 |
|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tamanho de cristalito (nm) | 18  | 15  | 36  | 35  | 41  |

Kumar *et al* [45] também usaram a equação de Scherrer para calcularem o tamanho médio do cristalito da prata metálica, desenvolvida durante tratamento térmico, em 600 °C/2h e 800 °C/2h, no sistema vítreo 45,8SiO<sub>2</sub>-45,5CaO-4B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-10Ag<sub>2</sub>O (% em mol). O tamanho do cristalito variou de 28 nm a 39 nm para as amostras tratadas em 600 °C e 800 °C, respectivamente. O aumento na intensidade do pico característicos da prata metálica pode ser associado, conforme os autores, ao aumento no tamanho de cristalito da prata metálica em função da das temperaturas de tratamento térmico.

Sharma *et al* [107] desenvolveram vitrocerâmicas usando um vidro de composição química 25SiO<sub>2</sub>-(50-X)CaO-15P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-8Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-2ZnO-XAg (X = 0, 2 e 4 % em mol) e analisaram as propriedades estruturais, magnéticas e antibacteriana. O tratamento térmico foi realizado em 800 °C, durante seis horas. A Ag foi adicionada na forma de nitrato, e segundo os autores, ela induziu a nucleação e o crescimento de cristais, tornando os picos de difração mais nítidos, implicando em uma melhor cristalização. Calcularam o tamanho de cristalito usando o pico característico do óxido de ferro pela equação de Scherrer, e foram estimados entre 30 e 35 nm, para as amostras com 2 e 4 % em mol de Ag, respectivamente.

### 3.5 Medidas do potencial de Hidrogênio (pH)

Baghbani *et al* [39] prepararam vitrocerâmicas bioativas do sistema vítreo  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$  (% em mol), com diferentes concentrações de Zn (2 e 5%) e Ag (0 e 0,5%). As amostras foram denominadas como  $\text{Zn}_5\text{-Ag}_0$ ,  $\text{Zn}_2\text{-Ag}_{0,5}$ ,  $\text{Zn}_5\text{-Ag}_{0,5}$ . A bioatividade *in vitro* foi estudada utilizando a solução de SBF, e o pH foi monitorado durante 1, 7, 14 e 21 dias. Segundo os autores, o pH aumentou em função do tempo de imersão, o que implica que há trocas iônicas entre as amostras e a solução de SBF.

Mubina *et al* [160] sintetizaram uma vitrocerâmica bioativa mesoporosa utilizando o sistema  $50\text{SiO}_2\text{-}26\text{Na}_2\text{O-}20\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5$  (% em mol), tratada 24 horas em diferentes temperaturas: 100, 300, 500, 700 e 900 °C. Durante imersão em SBF para avaliação da bioatividade *in vitro*, o pH foi medido pelos autores e são apresentados na Figura 13.

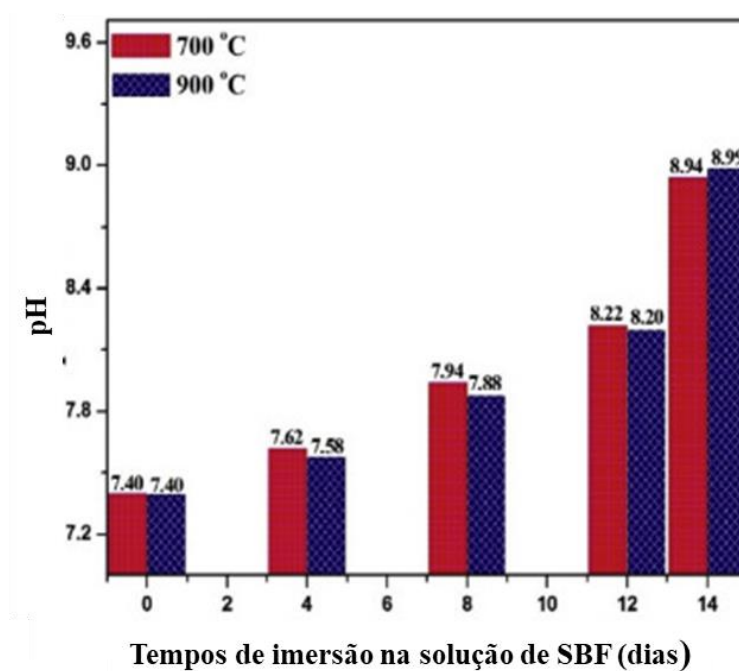


**Figura 13** - Variações no pH na solução de SBF durante imersão das vitrocerâmicas. **Fonte:** Adaptação de Mubina *et al*, (2019)[160].

As alterações nos valores de pH em função do tempo de imersão, conforme Mubina e seus colegas, exibem uma certa semelhança e são relacionadas a presença das fases cristalinas que surgem após o tratamento térmico ( $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$  e  $\text{Na}_3\text{Ca}(\text{SiO}_3)(\text{PO}_4)$ ). O aumento do pH é associado ao resultado das trocas iônicas entre os prótons presentes na solução de SBF e cátions presentes nas amostras ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{Si}^{4+}$ ).

### 3.6 Avaliação da bioatividade *in vitro*

A bioatividade *in vitro* das vitrocerâmicas desenvolvidas por Daguno *et al* [29], mediante cristalização controlada do vidro de composição química  $2,75(3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5)\text{-}30\text{SiO}_2\text{-}17,25\text{MgO}$  (% em massa) em 700, 775 e 975 °C por 4 h foi avaliada por imersão em SBF durante 14 dias. As amostras foram denominadas V700-4, V775-4 e V975-4. Os espectros de FTIR das amostras obtidos após imersão são apresentados na Figura 14.

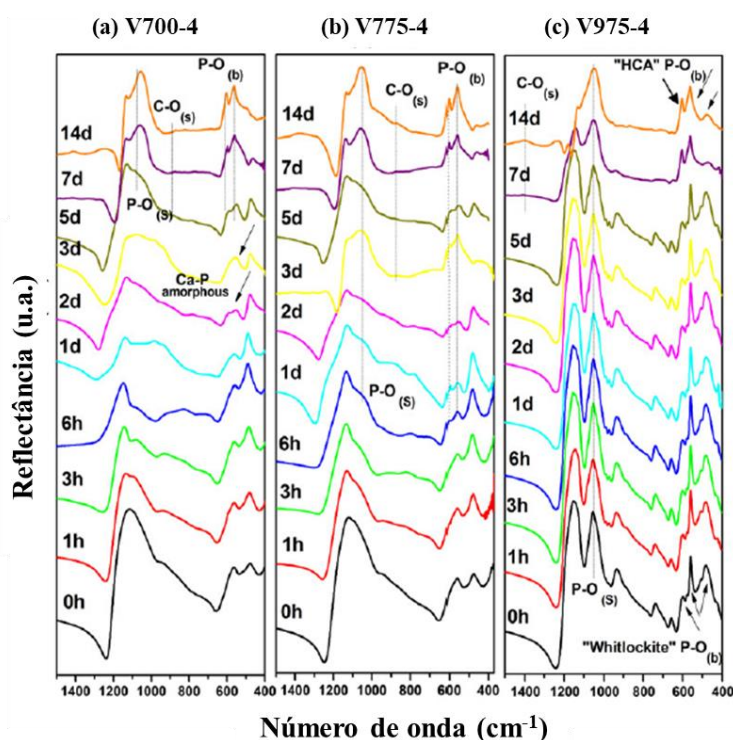


**Figura 14** - Espectros de FTIR antes e depois da imersão em SBF por até 14 dias das amostras V700-4, V775-4 e V975-4. **Fonte:** Adaptação de Daguno *et al*, (2012) [29].

Daguno e seus colegas, analisando os espectros, relatam que as bandas e picos são modificados em função do tempo de imersão, quando comparadas com as amostras antes da imersão (0 h), e a precipitação de hidroxiapatita ocorre em tempos diferentes. Na amostra V700-4, inicialmente, ocorre a formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfa (Ca-P), e no 5º dia a formação de HA tem início. Para a vitrocerâmica V775-4, o desenvolvimento de HA ocorre no 1º dia. No 7º dia, os picos característicos dos íons fosfatos e carbonatos já são identificados no espectro, os autores associam esse comportamento a fase *Whitlockite*. A amostra V975-4 demonstrou ser quimicamente mais resistente, pois somente no 14º dia de imersão durante o estudo que os autores identificaram bandas características da HA.

Pelwinski *et al* [28] desenvolveram uma vitrocerâmica usando como vidro base o *Bioglass*®. Após o tratamento térmico (1000 °C/1h), observou-se o desenvolvimento da fase cristalina  $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ . A bioatividade *in vitro* foi realizada utilizando a solução de SBF, e os difratogramas obtidos das amostras (vidro e vitrocerâmica) depois da imersão e são apresentados na Figura 15.

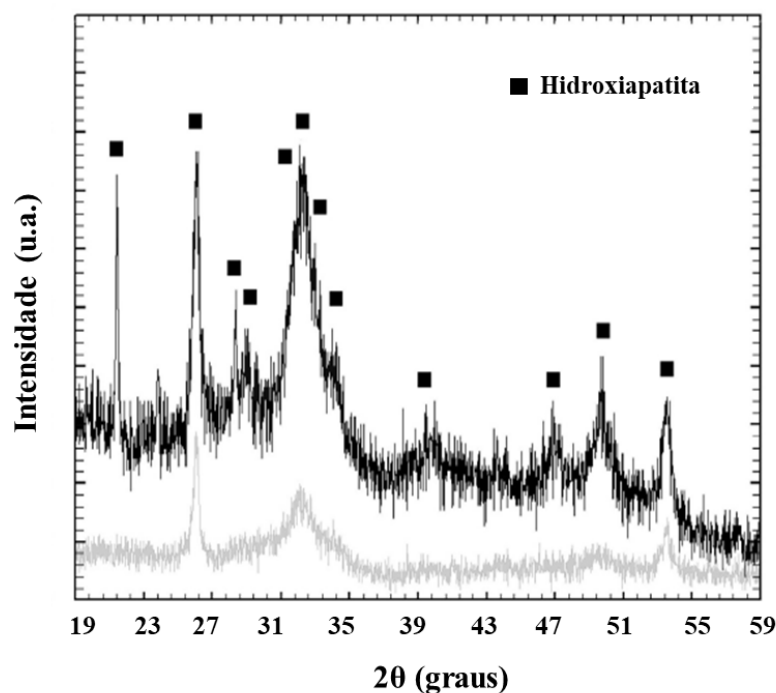


**Figura 15** - Padrões de difração de raios-X do material cristalizado (curva preta) e da *Bioglass* amorfo (curva cinza), depois da imersão em SBF por 14 dias. **Fonte:** Adaptação de Pelwinski *et al*, (2013) [28].

Após 14 dias de imersão, os autores detectaram que o desenvolvimento de fases cristalinas durante o tratamento térmico não tem efeito inibidor na formação de HA, pois picos característicos da HA são verificados em ambos os difratogramas, e em maior intensidade e quantidade na amostra cristalizada. Portanto, a cristalização melhorou o desenvolvimento de HA na amostra cristalizada.

### 3.7 Atividade antibacteriana de vitrocerâmicas bioativas

Mariappan e Ranga [40] estudaram a influência de nanopartículas de prata na atividade antibacteriana de vitrocerâmicas, utilizando como vidro base um vidro de composição,  $50\text{SiO}_2\text{-}40\text{CaO}\text{-(}10\text{-X)P}_2\text{O}_5\text{-XAg}_2\text{O}$  ( $X= 0, 2, 4$  e  $6\%$  em mol), nomeadas como Ag0, Ag2, Ag4 e Ag6. As amostras foram tratadas termicamente em  $600\text{ }^\circ\text{C}/3\text{ h}$ . O teste antibacteriano foi realizado pelo ensaio de difusão em ágar modificado por 24 h, contra as bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), e os resultados obtidos são apresentados na Figura 16.

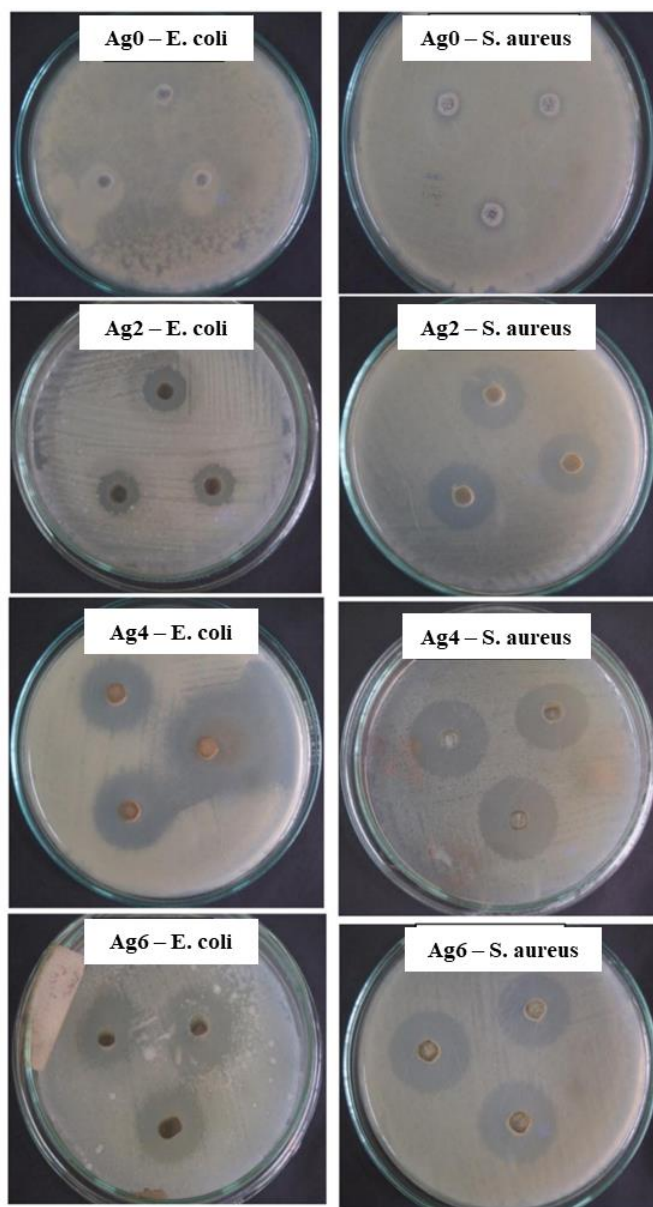


**Figura 16** - Resultados dos testes da zona de inibição das vitrocerâmicas contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, após 24 horas. **Fonte:** Adaptação de Mariappan e Ranga, (2017) [40].

Os autores observaram que a mostra sem prata (Ag0) não apresenta propriedades antibacteriana. Por sua vez, as amostras Ag2, Ag4 e Ag6, revelam efeitos antibacterianos. A zona de inibição bacteriana ou halo bacteriano, apresentam comportamento semelhante em função da adição de Ag<sub>2</sub>O. Contra a *E.coli*, ele aumenta de  $9,3 \pm 0,2$  mm (Ag2) para  $21,0 \pm 0,2$  mm (Ag4) e diminui para  $19,3 \pm 0,2$  mm (Ag6), e contra a *S. aureus* ele também aumenta de  $16,0 \pm 0,2$  mm (Ag2) para  $20,0 \pm 0,2$  mm (Ag4) e diminui para  $19,0 \pm 0,2$  mm (Ag6).

O comportamento antibacteriano das vitrocerâmicas, desenvolvidas por Kumar *et al* [45], mediante tratamento térmico em 400 °C/2h e 600 °C/2h, de vidros com composição 45,8SiO<sub>2</sub>-45,5CaO-4B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-10Ag<sub>2</sub>O (% em mol), foi investigado contra quatro bactérias (*E.coli*, *S. aureus*, *P.Monas* e *C.albicans*). Eles comprovam a atividade antibacteriana das amostras estudadas por meio teste antibacteriano em meio de ágar. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 17.

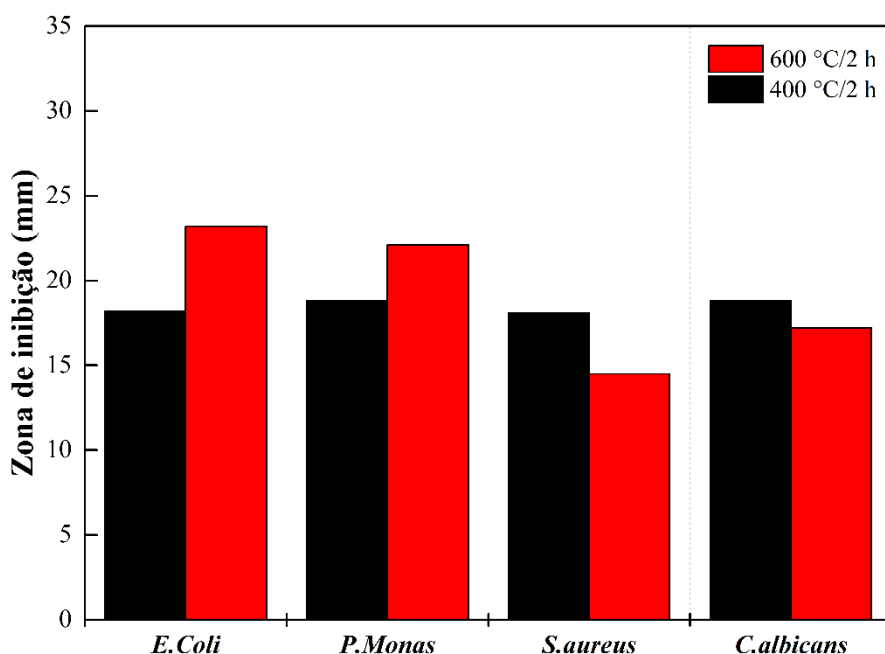


**Figura 17** – Zona de inibição das amostras tratadas em diferentes temperaturas contra *E.coli*, *S. aureus*, *P.Monas* e *C.albicans*. **Fonte:** Adaptação de Kumar *et al*, (2019) [45].

Conforme os autores defendem [40,45], os íons de prata, quando liberados no ágar durante o teste, entram em contato com células bacterianas podem interromper sua atividade intracelular, desativando proteínas e inibindo a replicação do material genético, por exemplo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os procedimentos adotados para a preparação das amostras e as técnicas de caracterizações utilizadas. A Figura 18 apresenta um fluxograma resumindo os procedimentos metodológicos adotados nessa pesquisa. Após preparadas, as amostras foram caracterizadas usando medidas de análises térmicas, estruturais e testes biológicos. As caracterizações foram divididas em três momentos, antes e depois da imersão em SBF, e o teste de atividade antibacteriana.

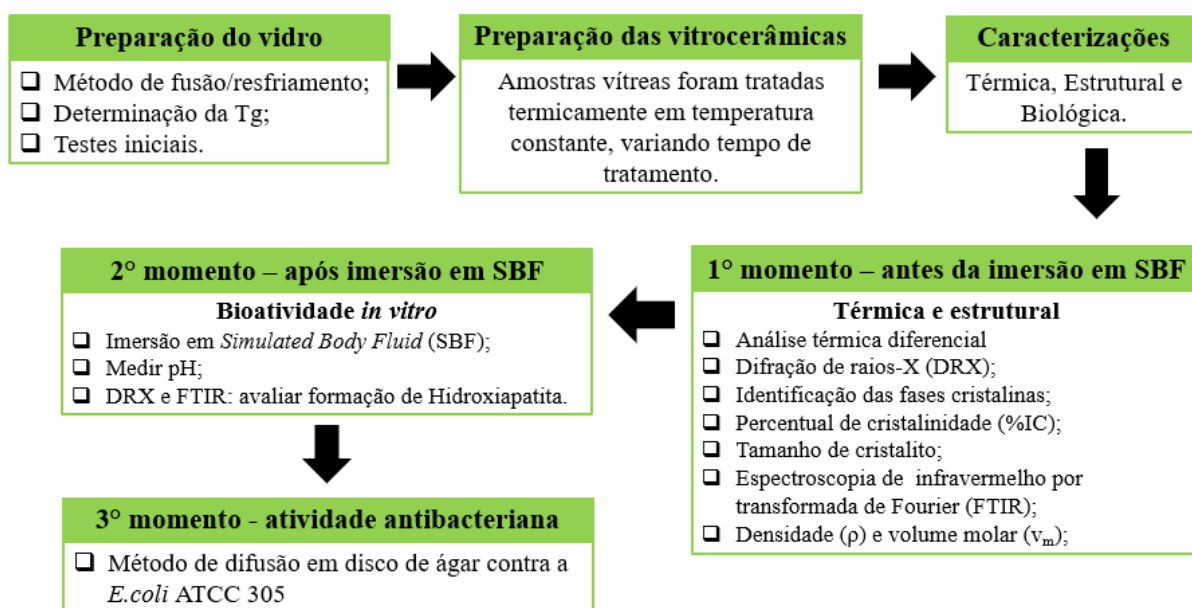
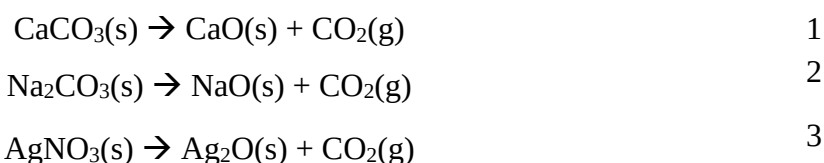


Figura 18 – Fluxograma das atividades desenvolvidas.

### 4.1 Preparação das amostras (vidro e vitrocerâmicas)

Amostras do sistema vítreo, com composição química  $59,5\text{B}_2\text{O}_3\text{-}2\text{P}_2\text{O}_5\text{-}9,5\text{CaO-}19,5\text{Na}_2\text{O-}9\text{CaF}_2\text{-}0,5\text{Ag}_2\text{O}$  (% em mol), foram preparadas utilizando o método de fusão/resfriamento, no Laboratório de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (LEOF), na Unidade de Preparação e Caracterização de Materiais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – *campus* Imperatriz. Os reagentes utilizados foram: Trióxido de Boro ( $\text{B}_2\text{O}_3$ ), Pentóxido de Fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ), Carbonato de Cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), Carbonato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Fluoreto de Cálcio ( $\text{CaF}_2$ ) e Nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ ), ambos os reagentes da marca Sigma *Aldrich* com grau de pureza 98-99,99 %.

Inicialmente, pesou-se a massa de  $\text{CaCO}_3$  em uma balança analítica (modelo AUW220D da SHIMADZU, com precisão  $\pm 0,01$  mg) que foi levada ao forno em atmosfera a ar (modelo LF0061401 da JUNG) dentro de um cadinho de platina até  $900\text{ }^\circ\text{C}$  para o processo de calcinação, ou seja, redução do  $\text{CaCO}_3$  para o Óxido de Cálcio ( $\text{CaO}$ ), liberando o Dióxido de Carbono ( $\text{CO}_2$ ), conforme representado pela Equação 1. Finalizando o processo de calcinação, todos os outros reagentes foram pesados e homogeneizados em um almofariz de ágata, transferiu-se a massa total para o cadinho de platina que foi levado ao forno em atmosfera a ar. Para o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{AgNO}_3$ , as reduções de carbonato e nitrato em óxidos, respectivamente, ocorrem antes da fusão. As Equações 2 e 3, representam essas reduções. Os cálculos para determinação das massas previamente pesadas levaram em consideração essas reações.



A rampa utilizada na preparação das amostras é representada na Figura 20. Uma taxa de aquecimento de  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  foi usada para atingir a temperatura de fusão ( $1100\text{ }^\circ\text{C}$ ). O processo de aquecimento até a temperatura de fusão demorou 180 minutos. A amostra permaneceu 90 minutos na temperatura de fusão. O líquido fundido foi agitado com o intuito de homogeneização e a eliminação de possíveis bolhas ainda presentes. Terminando o intervalo de fusão da rampa, a temperatura foi elevada até  $1200\text{ }^\circ\text{C}$  para garantir a homogeneidade total da amostra. Posteriormente, a amostra foi vertida em um molde de aço inoxidável no formato cilíndrico, pré-aquecido em  $420\text{ }^\circ\text{C}$ . Retirou-se o molde, e o vidro permaneceu no forno para tratamento térmico em  $450\text{ }^\circ\text{C}$  durante 240 minutos, com o objetivo de aliviar as tensões no material devido ao choque térmico. A amostra só foi retirada do forno após o seu resfriamento até a temperatura ambiente.

As amostras vítreas foram cortadas em uma cortadeira na espessura de  $1,2\text{ mm}$  e ranhuras foram realizadas em sua superfície usando uma lixa 600 grãos de arêa/ $\text{cm}^2$  em uma politriz (modelo POLIPANU da Grinder Polisher). A temperatura de transição vítrea para o vidro preparado foi determinada por DTA,  $T_g = 512\text{ }^\circ\text{C}$  ( $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ ), e testes foram realizados inicialmente para determinação dos parâmetros do processo de cristalização controlada que seriam adotados.

Determinou-se que o tratamento térmico no vidro seria isotérmico, na temperatura de 530 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em forno de atmosfera a ar (modelo W-one da EDG equipamento) variando em função do tempo de tratamento térmico: 0 (vidro), 4, 8, 12, 24 e 36 horas. Portanto, as amostras foram tratadas em uma temperatura acima da T<sub>g</sub>, com o intuito de obter diferentes percentuais de cristalização. A Figura 20 representa a rampa de tratamento térmico utilizada no processo de cristalização controlada.

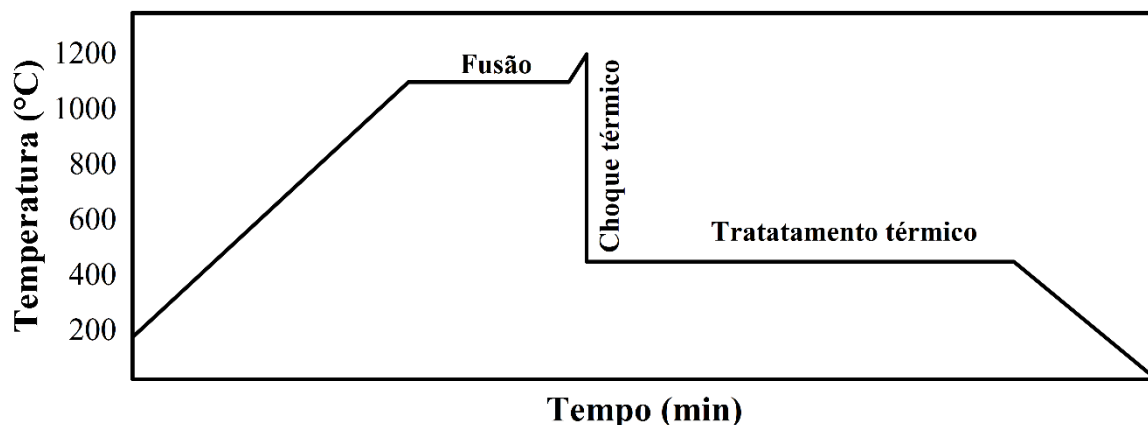


**Figura 19** - Rampa utilizada na preparação da amostra vítrea.

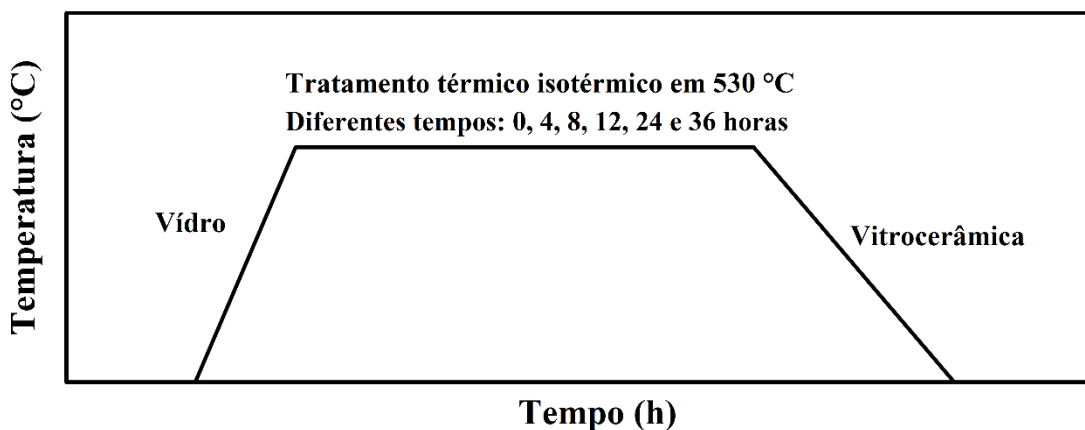


**Figura 20** - Rampa utilizada na preparação da amostra vítrea.

As amostras depois do tratamento térmico foram denominadas em função do tempo de tratamento, conforme a Tabela 8. Essa codificação foi utilizada para as caracterizações ao longo do trabalho.

**Tabela 8** – Codificação das amostras.

| <b>Tempo de tratamento térmico (horas)</b> | <b>0</b>    | <b>4</b> | <b>8</b> | <b>12</b> | <b>24</b> | <b>36</b> |
|--------------------------------------------|-------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Codificação                                | 0 h (vidro) | 4 h      | 8 h      | 12 h      | 24 h      | 36 h      |

## 4.2 Técnicas de Caracterização

### 4.2.1 Análise térmica diferencial (DTA)

A análise de DTA registra a diferença de temperatura entre uma amostra ( $T_a$ ) e de um material utilizado como referência ( $T_r$ ). Qualquer alteração nesta diferença de temperatura é associada ao comportamento térmico da amostra em função da temperatura [161].

Para um processo em que ocorre absorção de calor, denominado processo endotérmico, será verificada uma menor temperatura em relação ao material de referência. A energia absorvida será consumida no trabalho das transformações físicas que ocorrem na estrutura do material durante a análise. Caso contrário, no processo em que o calor é liberado, denominado evento exotérmico, a amostra em análise apresentará uma maior temperatura, quando comparada a amostra referência [161]. Os resultados obtidos são expressos em termogramas.

Os termogramas levam em consideração a diferença entre as temperaturas, por meio deles é possível identificar a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_x$ ) e a temperatura de pico de cristalização ( $T_p$ ). Durante o fenômeno de  $T_g$ , características dos materiais amorfos, as ligações entre os átomos se tornam mais fracas. Na  $T_x$ , ocorre o aumento da viscosidade na rede vítrea, possibilitando a difusão atômica e a separação de fases [161].

Para essa medida, o equipamento utilizado foi um DTA-TG simultâneo (modelo DTG-60 da *Shimadzu*). Uma massa de 20 mg das amostras (0 h, 12 h, 24 h, 36 h) foram pulverizadas e transferidas para um cadinho de platina, aquecidas entre 27 e 900 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de gás nitrogênio, com fluxo de 50 ml/min. As medidas foram realizadas no Laboratório de Análises Térmicas (LAT), UFMA – campus Imperatriz.

#### 4.2.2 Difração de raios-X (DRX)

A difração de raios-X é uma técnica essencial para caracterização estrutural de materiais. Ela resulta da interação do feixe de raios-X com os elétrons dos átomos presentes na composição da amostra. Quando expostos ao feixe de radiação eletromagnética, os elétrons são excitados e passam a vibrar na mesma frequência do feixe, emitindo radiação em todas as direções, caracterizando o fenômeno de difração [1,162].

Considerando a estrutura de um material e avaliando dois planos atômicos que são paralelos, representados na Figura 21, como A-A' e B-B', onde  $d$  é a distância interplanar entre esses planos,  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação utilizada no feixe que incide sobre esses planos é um certo ângulo, denominado ângulo de incidência ( $\theta$ ) [51]. Pela representação, se os raios incidentes 1 e 2 são dispersos pelos átomos Q e P, e se a diferença entre o comprimento das trajetórias 1-P-1' e 2-Q-2' for igual a um número inteiro ( $n$ ) de comprimento de onda, ocorre uma interferência construtiva, satisfazendo a Lei de Bragg, representada na Equação 4.

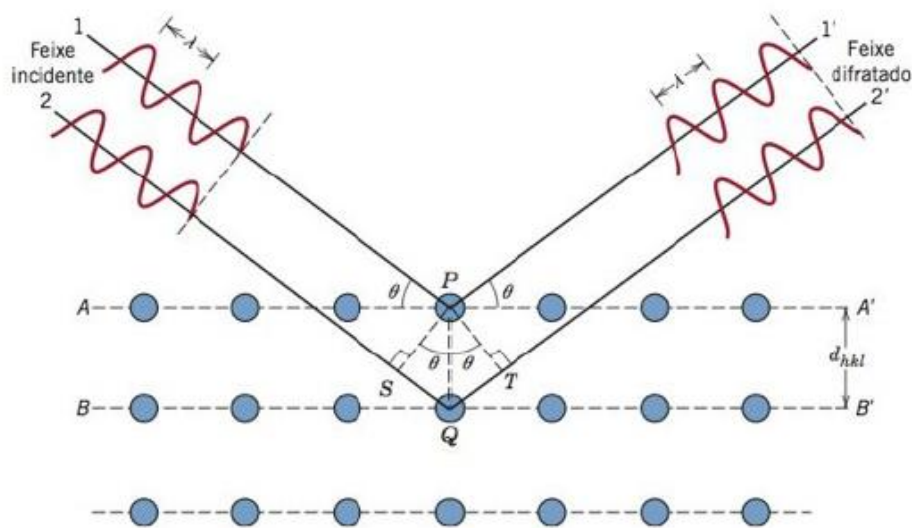


**Figura 21** – Representação do fenômeno de difração de raio-X. **Fonte:** Adaptação de Callister [51].

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad 4$$

Os vidros são materiais amorfos, isso significa que não apresentam ordenamento estrutural de longo alcance, gerando difratogramas que apresentam banda largas com valores de ângulos baixos [14,82]. Por sua vez, nos materiais cristalinos, como a HA, existe uma repetição regular e tridimensional da organização espacial do retículo cristalino. Logo, os difratogramas desses materiais possuem picos de difração estreitos e intensos [163]. Materiais vitrocerâmicos, apresentam em seu difratograma picos característicos de uma ou mais fases cristalinas, e bandas largas características de fase amorfa residual [111].

Na Figura 22 é possível observar o padrão de DRX de um vidro borato (preparado e pesquisado pelo grupo de pesquisadores em materiais vítreos e cerâmicos da UFMA- *campus* Imperatriz), da HA (sintetizada da calcinação da espinha de peixe pelos pesquisadores da Universidade Estadual de Maringá (UEM)) e de uma amostra vitrocerâmica preparada durante os testes iniciais dessa pesquisa.

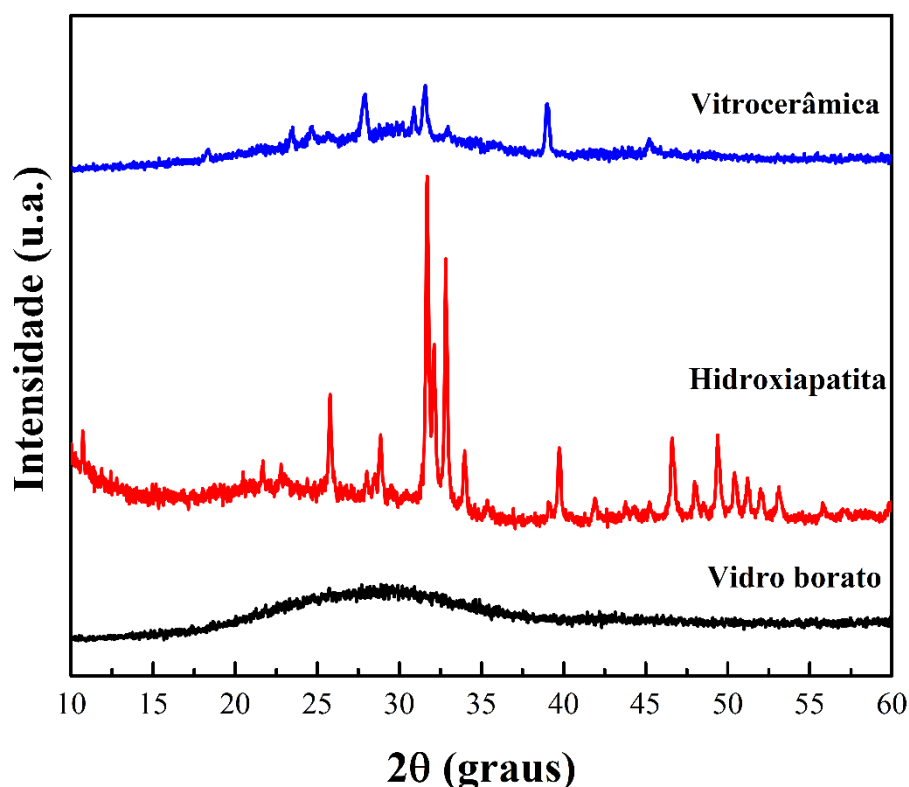


**Figura 22** - Padrão de DRX característico de um vidro borato, hidroxiapatita e vitrocerâmica.

Inicialmente, a técnica de DXR foi utilizada para comprovar o carácter amorfo do vidro preparado, posteriormente para detectar as fases cristalinas nos materiais vitrocerâmicos (na forma de bulk), e por fim para confirmar o surgimento de hidroxiapatita na superfície das amostras depois da imersão em SBF (na forma de pó). A caracterização foi realizada no

Laboratório de Difração de Raios-X da UFMA – *campus* Imperatriz, utilizando um difratômetro (modelo *Empyrian* da marca *Panalytical*) com varredura angular no intervalo de 10° até 60° (2θ), com passo de 0,02° com tempo de contagem de 2 segundos/passos, com radiação emitida pelo alvo de cobre,  $\lambda_{Cu} = 1,5406 \text{ \AA}$ .

#### 4.2.3 Identificação das fases cristalinas, porcentagem de cristalinidade (% IC) e o tamanho de cristalito

Para identificar as fases cristalinas presentes nas amostras tratadas termicamente e depois do teste de bioatividade *in vitro*, os difratogramas obtidos foram comparados (observou-se a localização e intensidade dos picos) com as fichas catalogadas presentes no banco de dados *Inorganic Crystal Structure Database* (ICSD).

O percentual de fases cristalinas ou porcentagem de cristalinidade (% IC) das amostras cristalizadas foi calculado pelo método de Krimm e Tobolsky [164]. A relação entre a área cristalina, presente nos difratogramas das amostras vitrocerâmicas e área total é expressa na Equação 5.

$$IC = \frac{A_c}{A_t} * 100 \quad 5$$

O procedimento é exemplificado na Figura 23. Inicialmente, foi realizada uma linha de base (linha vermelha) no difratograma da amostra vitrocerâmica, delimitando a área total difratada ( $A_t$ ), que corresponde a soma das áreas cristalinas ( $A_c$ ) e amorfas ( $A_a$ ). Buscando determinar apenas a área cristalina do difratograma, calculou-se a área entre a linha de base e a linha em azul, para quantificar o percentual de área amorfa. Posteriormente realizou-se uma subtração entre as áreas para encontrar o percentual de  $A_c$ . Os valores  $A_t$  e  $A_c$  encontrados foram aplicados na equação 5 e o %IC foi calculado.

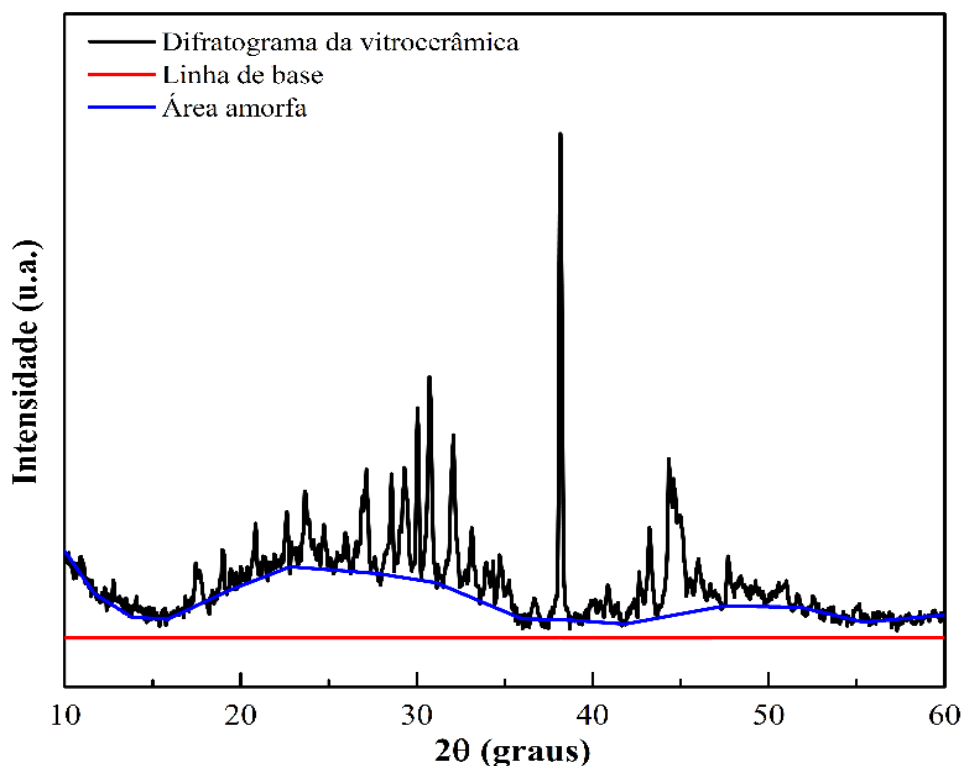


**Figura 23** - Representação do método usado para calcular %IC.

Por meio dos difratogramas, também foi possível calcular os tamanhos de cristalito nas amostras tratadas termicamente, utilizando a Equação de Scherrer, Equação 6.

$$D = \frac{\kappa \lambda}{\beta \cos \theta} \quad 6$$

na qual, D corresponde ao diâmetro médio das partículas, o valor de k é uma constante que varia em função do formato das partículas (para partículas no formato esférico o valor dessa constante é 0,9),  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação eletromagnética (radiação emitida pelo cobre,  $\lambda_{\text{Cu}} = 1,5406 \text{ \AA}$ ),  $\theta$  é o ângulo de difração e  $\beta$  é a largura na metade da altura do pico de difração. Para esse cálculo, foi levado em consideração a largura à meia altura dos picos mais intensos característicos das fases  $\text{Ag}^0$  e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  nos difratogramas, o ajuste do pico de difração foi realizado no software *Origin 2016* utilizando a função *Pseudo-Voigt*.

#### 4.2.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR é baseada na vibração dos átomos da amostra na presença da radiação infravermelha (IV), sendo parte dela absorvida e outra parte transmitida. Para que essa absorção ocorra, é necessário a existência de um momento dipolo elétrico nas moléculas, gerando um espectro de absorção que torna possível a identificação por meios das vibrações moleculares características localizadas em bandas e/ou picos específicos. Os espectros funcionam como uma “impressão digital” das moléculas, cada uma apresentando seu espectro característico [165,166].

A técnica de FTIR foi utilizada, inicialmente nas amostras cristalizadas, com o intuito também de compreender como a cristalização controlada altera estrutura da rede vítrea, e posteriormente para avaliar o desenvolvimento de hidroxiapatita nas amostras após imersão em fluido corporal simulado, reforçando assim os resultados obtidos por meio do DRX.

As amostras foram pesadas e pulverizadas com o Brometo de Potássio (KBr) em um almofariz de ágata, pressionadas em pastilhador com carga de 7 toneladas durante 30 s. As pastilhas preparadas pesavam 200 mg, com 1% de massa da amostra. As medidas foram realizadas utilizando um espectrômetro (*Bruker* modelo *Vertex 70V*). O modo de análise foi o de absorção, no intervalo de 400 até 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com 16 varreduras com a resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Essa medida foi realizada no LEOF.

#### 4.2.5 Densidade ( $\rho$ ) e o volume molar ( $v_m$ )

A  $\rho$  dos materiais é uma das propriedades físicas simples de ser determinada e é utilizada com o intuito de compreender a estrutura do material. Ela representa uma relação entre a quantidade de massa do material em uma unidade do volume que ele ocupa, podendo ser determinada em quilograma por metro cúbico ( $\text{Kg/m}^3$ ) ou grama por centímetro cúbico ( $\text{g/cm}^3$ ) [57]. O princípio de Arquimedes, por meio da Equação 7, foi utilizado para calcular a  $\rho$  das amostras:

$$\rho_{\text{vidro}} = \frac{m_{\text{ar}}}{m_{\text{ar}} - m_{\text{água}}} * \rho_{\text{água}} \quad 7$$

na qual,  $m_{ar}$  = massa da amostra em ar e  $m_{\acute{a}gua}$  = massa da amostra imersa em um líquido de densidade e temperatura conhecidas. O líquido usado nesse experimento foi a água destilada,  $\rho_{\acute{a}gua} = 0,99707 \text{ g/cm}^3$  a 25 °C.

A densidade de materiais vítreos e vitrocerâmicas está relacionada a sua composição química, alterações estruturais em função da presença de dopantes, tratamento térmicos controlados e o surgimento de estruturas cristalinas, alterando sua densidade [167]. Outra grandeza que possui relação com a estrutura desses materiais é o  $v_m$ , ele está relacionado a distribuição dos íons no volume desses materiais, podendo indicar homogeneidade ou alterações estruturais [168–170]. A unidade do volume molar é grama por centímetro cúbico ( $\text{g/cm}^3$ ).

A determinação do  $v_m$  foi realizada por meio da Equação 8. Na qual, M corresponde a massa molecular das amostras e  $\rho$  a densidade, encontrada por meio da equação anterior.

$$v_m = \frac{M}{\rho} \quad 8$$

Inicialmente pesou-se as amostras em ar e depois elas foram pesadas imersas em um béquer contendo 100 mL de água destilada, as medidas foram realizadas em triplicata, no LEOF. Para essa medida, o bulk da amostra base (0 h (vidro)) e das amostras tratadas por 12 h, 24 h e 36 h foram utilizados.

#### 4.2.6 Bioatividade *in vitro*

A habilidade de estabelecer interação com o tecido ósseo foi avaliada em função da precipitação de HA na superfície das amostras quando imersas em meio corporal simulado, o que afirma sua bioatividade [89,171,172]. Os ensaios foram realizados em uma solução acelular que simula as concentrações iônicas e pH do plasma sanguíneo humano, denominada *Simulated Body Fluid* (SBF). Ela foi preparada seguindo os critérios propostos por Kokubo e Takadama [90].

Para o preparo da solução os materiais utilizados foram previamente lavados e secos, o uso de recipientes de vidro foi evitado. Água deionizada foi aquecida a 36,5 °C em um banho-maria (modelo PG1800 da Gehaka) e de forma simultânea, conforme a sequência da Tabela 9, os reagentes foram adicionados e dissolvidos para preparar 1 L de SBF.

**Tabela 9** – Ordem, reagente, quantidade, fornecedor e pureza dos reagentes utilizados para preparar SBF.

| Ordem | Reagente                                                     | Quantidade | Fornecedor    | Pureza (%) |
|-------|--------------------------------------------------------------|------------|---------------|------------|
| 1°    | NaCl                                                         | 8,035 g    | Sigma Aldrich | 99,5       |
| 2°    | NaHCO <sub>3</sub>                                           | 0,355 g    | Sigma Aldrich | 99,5       |
| 3°    | KCl                                                          | 0,255 g    | Sigma Aldrich | 99,5       |
| 4°    | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3H <sub>2</sub> O          | 0,231 g    | Sigma Aldrich | 99,0       |
| 5°    | MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O                        | 0,311 g    | Sigma Aldrich | 98,0       |
| 6°    | HCl (1 M)                                                    | 39 mL      | Vertex        | -          |
| 7°    | CaCl <sub>2</sub>                                            | 0,292 g    | Sigma Aldrich | 95,0       |
| 8°    | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                              | 0,072 g    | Sigma Aldrich | 99,0       |
| 9°    | ((HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub> ) (Tris) | 6,118 g    | Sigma Aldrich | 99,0       |
| 10°   | HCl (1 M)                                                    | 0 – 5 mL   | Vertex        | -          |

Depois de preparada, a solução com o pH aproximadamente de 7,4 foi transferida para um tubo de polipropileno e guardada na geladeira, esperou-se dois dias para verificar se haveria ou não precipitação. Caso houvesse, a solução seria descartada. Esperado esse tempo, as amostras já fatiadas, polidas, o vidro base e as tratadas termicamente foram suspensas em um suporte de polipropileno e imersas em tubos de falcon, contendo o SBF. A relação entre a área da amostra e o volume da solução de SBF foi calculada pela Equação 9 [90]:

$$v_s = \frac{v_a}{10} \quad 9$$

na qual,  $v_s$  = volume de que será utilizado (mL) e  $v_a$  = área aparente da superfície da amostra (mm<sup>2</sup>). Os testes ocorreram no banho-maria, a temperatura de 36,5 °C, no período de 7, 14, 21 e 28 dias, na qual, o valor do pH foi verificado diariamente. Após imersão, as amostras foram secas e guardadas à vácuo no dessecador. Medidas de DRX e FTIR foram realizadas para detectar se houve a deposição de HA na superfície das amostras durante período de imersão.

#### 4.2.7 Medidas de pH

A habilidade dos biomateriais em formar uma camada de HA em suas superfícies, quando imersos em fluidos corporais (reais ou simulados) está relacionada com a supersaturação da solução. O comportamento dos materiais bioativos quando imersos em SBF ocorre por meio de duas etapas: dissolução e precipitação regressiva. No primeiro momento ocorre uma rápida liberação de íons das amostras imersas, alterando, as concentrações iônicas e o potencial de hidrogênio (pH) da solução. Essa alteração promove uma precipitação da

camada de apatita biológica na superfície do material. Alta taxa de degradação/dissolução ocasiona maiores valores de pH, o que também favorece a formação da HA [167,173].

O pH é medido com o intuito de analisar a concentração iônica de íons Hidrônio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) e Hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) em soluções aquosas. Durante o período de imersão em SBF, dos materiais vítreos e vitrocerâmicos, a deposição da camada de apatita nas superfícies dos materiais investigados possui relação direta com as trocas iônicas entre o meio e o material, ocasionando alterações no valor do pH da solução [78,85,88,89].

Para obtenção dos valores de pH, utilizou-se um pHmetro de bancada (modelo PG1800 da Gehaka), com precisão de  $\text{pH} = 0,01$ . A calibração do equipamento foi realizada diariamente utilizando soluções tampões. A preparação da solução de SBF, imersão e as medidas de pH foram realizadas na Central Analítica da UFMA – *campus* Imperatriz. Após a plotagem, o gráfico de pH foi fitado no software *Origin 2016* de forma exponencial utilizando a função *ExpGro1*.

#### 4.2.8 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana das vitrocerâmicas preparadas via tratamento térmico em vidros boratos contendo 0,5% em mol de  $\text{Ag}_2\text{O}$  foi avaliada contra a *E.coli* ATCC 6305 pelo método de difusão em disco de ágar [174]. Utilizou-se o caldo nutritivo *Brain Heart Infusion* (BHI) da marca Kasvi como meio de cultura para as bactérias. Inicialmente, o caldo foi diluído para a preparação do ágar. Os materiais utilizados no teste e as amostras foram esterilizadas por radiação UV e o inóculo bacteriano foi preparado. Posteriormente as bactérias foram suspensas no ágar.

As amostras 0 h (vidro), 12 h e 36 h foram usadas no teste. Como controle negativo utilizou-se uma amostra sem prata em sua composição, denominada 0 Ag, e como controle positivo o fármaco Cloranfenicol (CLO). O meio de cultura com as amostras foi incubado em estufa por 24 h na temperatura de  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , e examinados quanto formação de zonas de inibição contra a espécie microbiana avaliada, ao final do procedimento os halos verificados foram medidos. Sendo o teste realizado em duplicata, a média do tamanho dos halos foi calculada.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Amostras preparadas

A amostra vítrea (preparada pelo método de fusão/resfriamento) e as amostras vitrocerâmicas (preparadas por cristalização controlada via tratamento térmico em 530 °C variando em função do tempo) são apresentadas na Figura 24. Quando comparadas ao vidro base, inicialmente transparente e incolor, as amostras cristalizadas se tornaram opacas e amareladas.

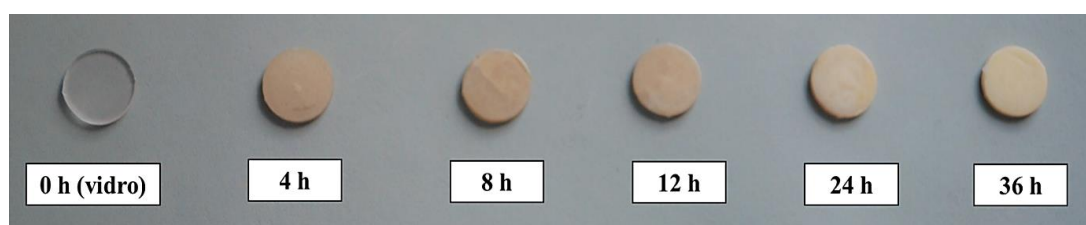


**Figura 24** – Fotografia da amostra base (vidro) e das amostras cristalizadas (vitrocerâmicas).

### 5.2 Caracterização das amostras antes da imersão em SBF

#### 5.2.1 Análise térmica diferencial (DTA)

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de cristalização ( $T_x$ ) e estabilidade térmica ( $T_x - T_g$ ) das amostras 0 h (vidro), 12 h, 24 h e 36 h, obtidos por meio da análise de DTA, são mostradas na Figura 25 e na Tabela 10.

Mediante o aumento do tempo de tratamento térmico, os valores de  $T_g$  não apresentam variações significativas, esse comportamento pode ser associado ao percentual de vidro residual nas amostras. A  $T_g$  é uma característica de relaxamento estrutural que ocorrem na rede vítrea, portanto, as ligações e as energias das ligações químicas do vidro residual presente nas amostras cristalizadas não são alteradas, sendo necessária a mesma quantidade de energia (calor) para quebra dessas ligações [26,121,167,175].

O valor de  $T_x$  e de estabilidade térmica das amostras diminuem com o aumento do tempo de tratamento. A diminuição de  $T_x$ , de 602 °C na amostra 0 h (vidro base) para 586 °C na amostra 36 h, pode ser relacionada ao aumento na quebra das ligações da rede vítrea, aumentando o número de oxigênios não ligados, resultando em uma menor conectividade da

rede, diminuindo as temperaturas de cristalização [113,176]. O parâmetro de estabilidade térmica mediante o processo de cristalização, diminui de 90°C na amostra 0 h (vidro), para 66 °C na amostra 36 h.

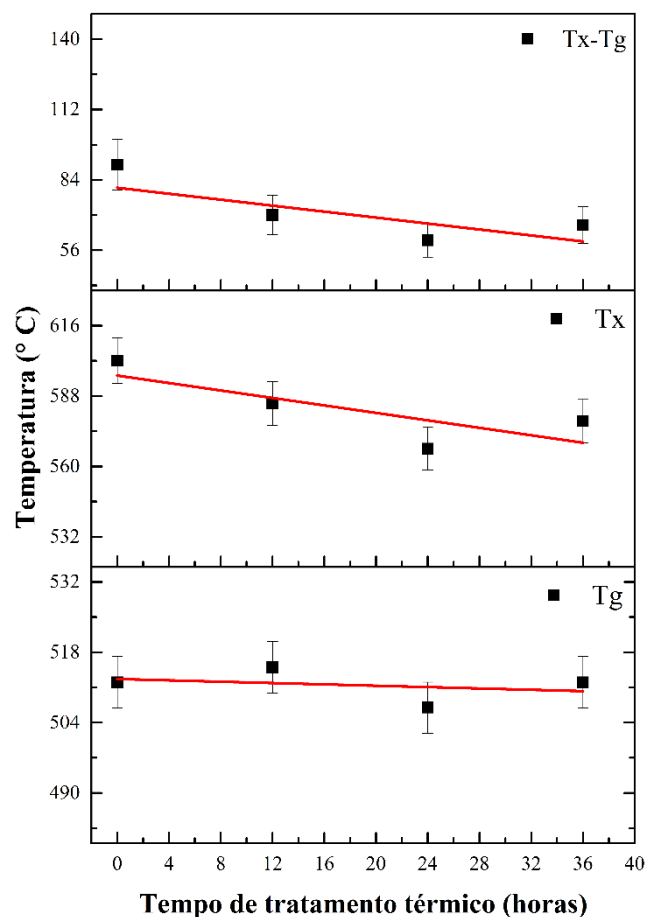


**Figura 25** - Tg, Tx e estabilidade térmica (Tx-Tg) das amostras 0 h (vidro), 12 h, 24 h e 36 h.

**Tabela 10** – Dados de Tg, Tx e Tx-Tg para as amostras 0 h (vidro), 12 h, 24 h e 36 h obtidos por DTA.

| Amostra     | Tg °C ( $\pm 5$ ) | Tx °C ( $\pm 5$ ) | (Tg-Tx) °C ( $\pm 10$ ) |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------------------|
| 0 h (vidro) | 512               | 602               | 90                      |
| 12 h        | 515               | 585               | 70                      |
| 24 h        | 507               | 567               | 60                      |
| 36 h        | 512               | 578               | 66                      |

Como as amostras não apresentavam variação na composição, não havendo alteração na rede em função de substituição iônica, isso indica que as alterações observadas nos valores de Tx e na estabilidade térmica são decorrentes apenas do tempo de tratamento térmico. Resultados similares foram encontrados por Valle *et al* [158] quando estudaram a influência dos

precursores de prata (AgCl, AgNO<sub>3</sub>, AgO e Ag<sub>2</sub>O) no desenvolvimento de nanopartículas de prata metálica, mediante tratamento térmico em função do tempo, em vidros WO<sub>3</sub>-SbPO<sub>4</sub>-PbO.

### 5.2.2 Difração de raios-X, percentual de cristalinidade (%IC) e o tamanho de cristalito

A Figura 26 apresenta os difratogramas de difração de raios-X das amostras com diferentes tempos de tratamento térmico. Observando a figura é possível concluir que, durante o tratamento térmico controlado, ocorreu o desenvolvimento de estruturas cristalinas na rede vítrea, detectadas pelo surgimento de picos estreitos e intensos nos difratogramas, quando comparados com o difratograma da amostra vítrea, que confirma o carácter amorfo das amostras antes do tratamento térmico. O perfil das fases cristalinas desenvolvidas possuem relação com a composição química do vidro, parâmetros do tratamento térmico adotados, presença e quantidade do agente nucleante [34,177].

Durante a fusão do vidro, ocorre a dissociação do Óxido de Prata (Ag<sub>2</sub>O), representada pela Equação 10:



Quando dissolvidos, íons de Ag<sup>+</sup>, participam da estrutura do vidro e durante o tratamento térmico atuam como agentes modificadores de rede, enfraquecendo as ligações estruturais, criando pontos de descontinuidade reticular, ocasionando um aumento na viscosidade dos vidros e facilitando o processo de cristalização [113,178].

O difratograma da amostra 0 h (vidro) apresenta duas bandas largas em 29° e 47° = 2θ, revelando seu carácter amorfo. Essas bandas em vidros são relacionadas aos vidros boratos [179,180]. Quando comparadas as posições e intensidades dos picos dos difratogramas com as fichas catalogadas no banco de dados ICSD, identificou-se que as fases cristalinas presentes nas amostras 4 h, 8 h, 12 h, 24 h e 36 h foram: Prata metálica (Ag<sup>0</sup> – arquivo ICSD n° 64997), Fosfato de Cálcio (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> – arquivo ICSD n° 089320), Borato de Sódio (Na<sub>2</sub>B<sub>8</sub>O<sub>13</sub> – arquivo ICSD n° 14355) e Borato de Sódio e Cálcio (CaNa<sub>3</sub>B<sub>5</sub>O<sub>9</sub> – arquivo ICSD n° 61165).

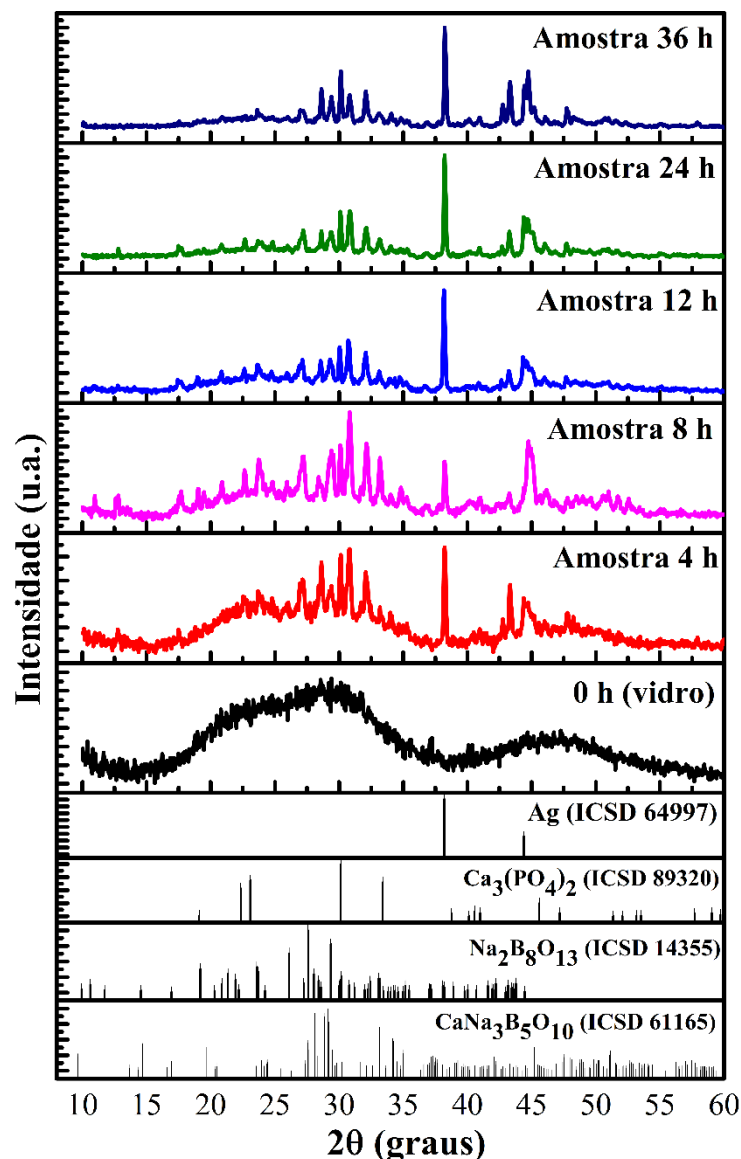
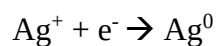


**Figura 26** - Difratomogramas de raios-X das amostras preparadas: 0 h (vidro), 4h, 8 h, 12 h, 24 h e 36 h de tempo de tratamento térmico.

Os picos característicos das fases cristalinas desenvolvidas na matriz vítrea se desenvolveram sobre os halos, e que mesmo para as amostras tratadas termicamente, ainda é possível avaliar a presença dos halos, em menor intensidade. Esse comportamento dos difratogramas pode ser associado ao percentual de fase amorfa, caracterizando o material como vitrocerâmico. Durante o tratamento térmico, íons de  $\text{Ag}^+$  podem ser reduzidos a sua forma metálica ( $\text{Ag}^0$ ) [159], conforme a Equação 11.

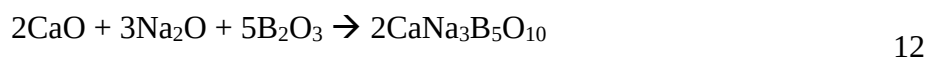


11

Durante o tratamento térmico ocorre o aumento no número de elétrons que circundam os íons de  $\text{Ag}^+$ , possibilitando sua redução e a formação da prata metálica. Nos difratogramas de todas as amostras cristalizadas, observa-se um aumento na intensidade dos picos localizados em  $38,26^\circ$  e  $44,73^\circ$  ( $2\theta$ ) que são associados a  $\text{Ag}^0$ , confirmando a redução da prata iônica para prata metálica. Portanto, ocorre um aumento na intensidade desses picos em função do tempo de tratamento térmico. Uma parte dos íons  $\text{Ag}^+$  são reduzidos à sua forma metálica, havendo prata iônica na fase residual de vidro.

A cor amarelada das vitrocerâmicas desenvolvidas, conforme analisadas na Figura 24, pode estar relacionada ao efeito de ressonância plasmônica de superfície da  $\text{Ag}^0$ , resultando da interação entre o campo elétrico recebido e os elétrons livres da redução dos íons de  $\text{Ag}^+$  [159]. A prata metálica, em vidros fosfatos, promoveu a cristalização e diminui as temperaturas de cristalização [113], concordando com os resultados de DTA.

Analisando a composição química do vidro e a formação das fases cristalinas desenvolvidas durante o processo de cristalização controlada, podem ocorrer por meio das reações descritas nas equações abaixo (12, 13 e 14) [107,181,182]:



Portanto, é possível afirmar que o  $\text{Ag}_2\text{O}$ , presente na quantidade em 0,5 % em mol na composição do vidro borato utilizado nessa pesquisa, atuou como agente nucleante durante o tratamento térmico, contribuindo para a cristalização das amostras. O aumento no tempo de tratamento térmico reduz o percentual de fase amorfa e aumenta o teor de fase cristalina. Nos difratogramas, o aumento na cristalinidade das amostras, em função do tempo de tratamento térmico, é relacionado com o aumento na quantidade e intensidade dos picos característicos das fases cristalinas [26,29,34]. Essa interpretação, por meio dos difratogramas, é confirmada pelo resultado do percentual de cristalinidade (%IC), calculado e exibido na Figura 27.

O %IC aumentou em função do tempo de tratamento térmico, atingindo o percentual máximo de 48%. Trabalhos já relatados com o foco em vitrocerâmicas bioativas preparadas por cristalização controlada também relataram o aumento do percentual de cristalização em função da temperatura ou do tempo de tratamento térmico [29,37,173,184,185].

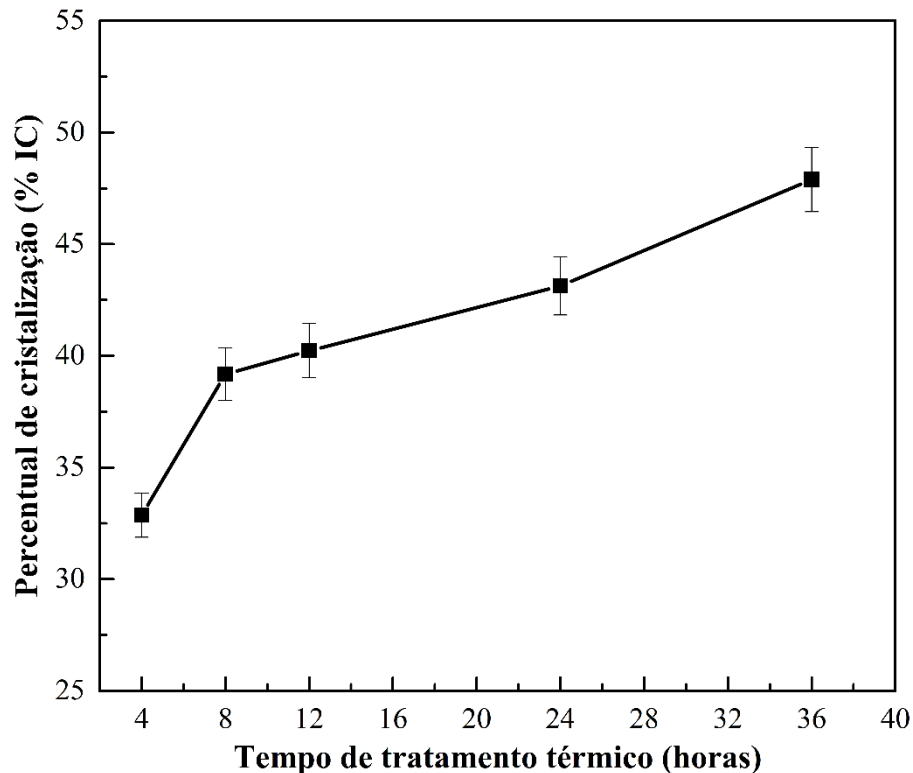


**Figura 27** - Percentual de cristalização (% IC) em função do tempo de tratamento térmico.

Durante o tratamento térmico controlado, a estrutura vítrea ganha mobilidade atômica, possibilitando sua difusão e o desenvolvimento de fases cristalinas. Os resultados apresentados na Figura 27 sugerem que quanto maior o tempo de tratamento térmico, maior difusão atômica e maior o percentual de fase cristalina desenvolvida. A determinação do percentual de fases cristalinas é uma ferramenta importante na tentativa de compreender o controle da taxa de degradação [121] e as propriedades mecânicas [186] em materiais vitrocerâmicos.

O tamanho do cristalito, mostrado na Figura 28, foi calculado pela Equação de *Scherrer*. Para esse procedimento, os picos de difração mais intensos característicos da  $\text{Ag}^0$  ( $2\theta = 38,26^\circ$ ) e do  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ( $2\theta = 30,01^\circ$ ) foram utilizados. Observando o gráfico, é possível concluir que houve um aumento no tamanho de cristalito em função do tempo de tratamento térmico. Trabalhos sobre cristalização controlada em sistemas vítreos, também relatam o aumento do tamanho de cristalito [32,45,173,187].

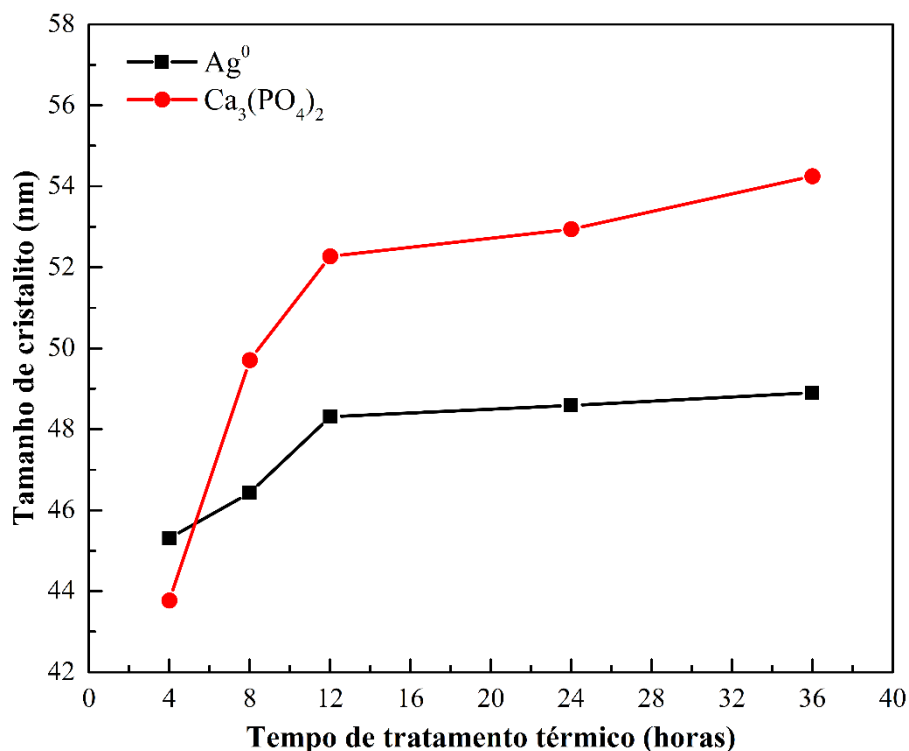


**Figura 28** - Tamanho de cristalito da  $Ag^0$  e do  $Ca_3(PO_4)_2$  em função do tempo de tratamento térmico.

As vitrocerâmicas desenvolvidas nessa pesquisa possuem tamanho de cristalito superior para outras vitrocerâmicas relatadas que apresentam a prata metálica também como fase cristalina. Kumar e Mariappan [40] relatam vitrocerâmicas de vidros  $SiO_2$ - $CaO$ - $B_2O_3$  dopados com 5% mol de  $Ag_2O$ , tratadas em 400 °C/2 h e 600 °C/2 h. O tamanho de cristalito foi calculado pela equação *Scherrer*, a prata metálica apresentou tamanho de cristalito de 33 nm. Mirza *et al* [45] cristalizando vidros silicatos dopados com 10% em mol de  $Ag_2O$ , tratados em 600 °C/2h e 800 °C/2h relataram um tamanho de cristalito da prata metálica de 28 nm e 29 nm. Nessa pesquisa a amostra tratada termicamente durante 36 h apresentou tamanho de cristalito de 49 nm para a prata metálica.

### 5.2.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A

Figura 29 mostra os espectros de FTIR das amostras preparadas: 0 h (vidro), 4 h, 8 h, 12 h, 24 h e 36 h. Os espectros revelam três bandas largas de absorção, a primeira de 400-800  $\text{cm}^{-1}$ , segunda de 800-1200  $\text{cm}^{-1}$  e a terceira de 1200-1600  $\text{cm}^{-1}$ . O Boro, sendo um formador vítrea de baixa massa atômica quando comparado a sílica ou ao fósforo, apresenta vibrações características dos grupos boratos, unidades trigonais ( $\text{BO}_3$ ) e tetraédricas ( $\text{BO}_4$ ), em número de ondas na faixa média do espectro (500-1550  $\text{cm}^{-1}$ ) [46,188].

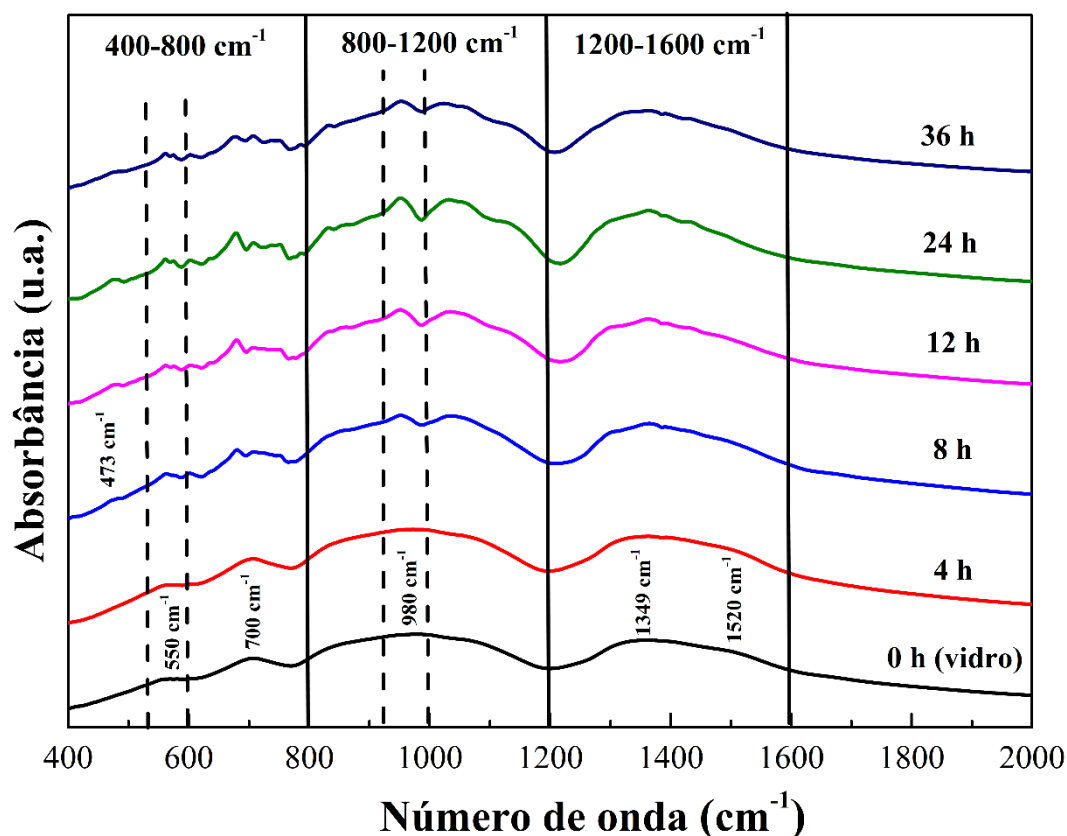


**Figura 29-** FTIR das amostras cristalizadas (0 h (vidro), 4 h, 8 h, 12 h, 24 h e 36 h).

Na amostra 0 h (vidro), as bandas presentes na primeira região são associadas aos modos de vibração do tipo flexão dos grupos boratos, os picos localizados em 550  $\text{cm}^{-1}$  e em próximo de 700  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos aos modos vibracionais da ligação P-O nos íons  $\text{PO}_4^{3-}$  e aos modos de flexão dos grupos trigonais de boratos, respectivamente. A segunda região está relacionada com as vibrações assimétricas de alongamento dos grupos boratos tetraédricos, representados

pela banda larga centrada em  $980\text{ cm}^{-1}$ . A terceira região é atribuída as vibrações das ligações B-O presente nas unidades dos grupos  $\text{BO}_3$ , associadas pelas bandas centradas em  $1349\text{ cm}^{-1}$  e  $1520\text{ cm}^{-1}$ , que são características das vibrações (anéis metaboratos e grupos piro e ortoborato) e relaxação assimétricas, respectivamente [179,189,190]. A Tabela 11 apresenta as vibrações características com os seus respectivos comprimentos de onda.

**Tabela 11** – Número de onda e atribuições no espectro de FTIR da amostra 0 h (vidro).

| Posição observada          | Atribuições                                                                                                                                                                                                    | Referências       |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 400-800 $\text{cm}^{-1}$   | 700 $\text{cm}^{-1}$ → vibrações de flexão dos grupos de $\text{BO}_3$<br>550 $\text{cm}^{-1}$ → modos vibracionais da ligação P-O nos íons $\text{PO}_4^{3-}$                                                 | [173,179,189–191] |
| 800-1200 $\text{cm}^{-1}$  | 980 $\text{cm}^{-1}$ → vibrações dos grupos de $\text{BO}_4$                                                                                                                                                   |                   |
| 1200-1600 $\text{cm}^{-1}$ | 1349 $\text{cm}^{-1}$ → vibrações das ligações B-O de $\text{BO}_3$ em anéis metaboratos e grupos piro e ortoborato<br>1520 $\text{cm}^{-1}$ → relação assimétrica das ligações B-O em grupos de $\text{BO}_3$ |                   |

Com o aumento do tempo de tratamento térmico, pelos espectros de FTIR das amostras 4 h, 8 h, 12 h, 24 h e 36 h ocorre uma deformação das bandas características das unidades de boratos, isso significa que as vibrações moleculares da rede vítrea foram alteradas durante o tratamento térmico, ou seja, a disposição das unidades estruturais do vidro borato foi modificada. Comparando os espectros do vidro base e das amostras cristalizadas, verifica-se o surgimento de inúmeros picos de absorção relacionados aos materiais vitrocerâmicos, que são materiais que possuem uma microestrutura cristalizada com dimensões específicas. Portanto, diferem do arranjo estrutural do vidro [46,192]. Esses resultados estão de acordo com os resultados de DRX, que comprovaram alterações na estrutura amorfa do vidro após o tratamento térmico.

Os espectros de FTIR das amostras vitrocerâmicas, quando comparadas com o espectro do vidro base, apresentam algumas diferenças. Pelos espectros de FTIR das amostras cristalizadas, ocorre o surgimento de um pico em  $473\text{ cm}^{-1}$ , ele pode ser relacionado as vibrações dos íons metálicos  $\text{Na}^+$  e/ou  $\text{Ca}^{2+}$  [46,182], presentes nas fases cristalinas:  $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_9$ ,  $\text{Na}_2\text{B}_8\text{O}_{13}$  e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  desenvolvidas durante o tratamento e detectadas pelo DRX.

O pico de baixa intensidade localizado em  $550\text{ cm}^{-1}$ , torna-se mais definido e estreito, paralelo a isso ocorre o surgimento de outros dois picos em  $576$  e  $601\text{ cm}^{-1}$ . Ambos os picos são atribuídos as vibrações das ligações P-O do fosfato de cristalino. O pico localizado em  $980\text{ cm}^{-1}$ , referente ao boro de coordenação tetraédrica, também apresenta uma melhor definição em função do tempo de tratamento térmico [40,193]. Esses resultados podem ser relacionados ao

aumento no percentual de cristalinidade da vitrocerâmica em função do aumento no tempo de tratamento térmico, o que está de acordo com os resultados de DRX e %IC.

#### 5.2.4 Densidade ( $\rho$ ) e o volume molar ( $v_m$ )

Os dados de  $\rho$  e  $v_m$  são capazes de revelarem informações com relação as alterações na estrutura do material. Como não ocorre variação na composição das amostras, qualquer variação nessas grandezas não pode ser atribuída a substituição de íons na rede, somente ao tempo de tratamento térmico. Para as amostras preparadas nesse estudo, os resultados de densidade e volume molar das amostras as amostras 0 h (vidro), 12 h, 24 h e 36 h são exibidos na Figura 30.

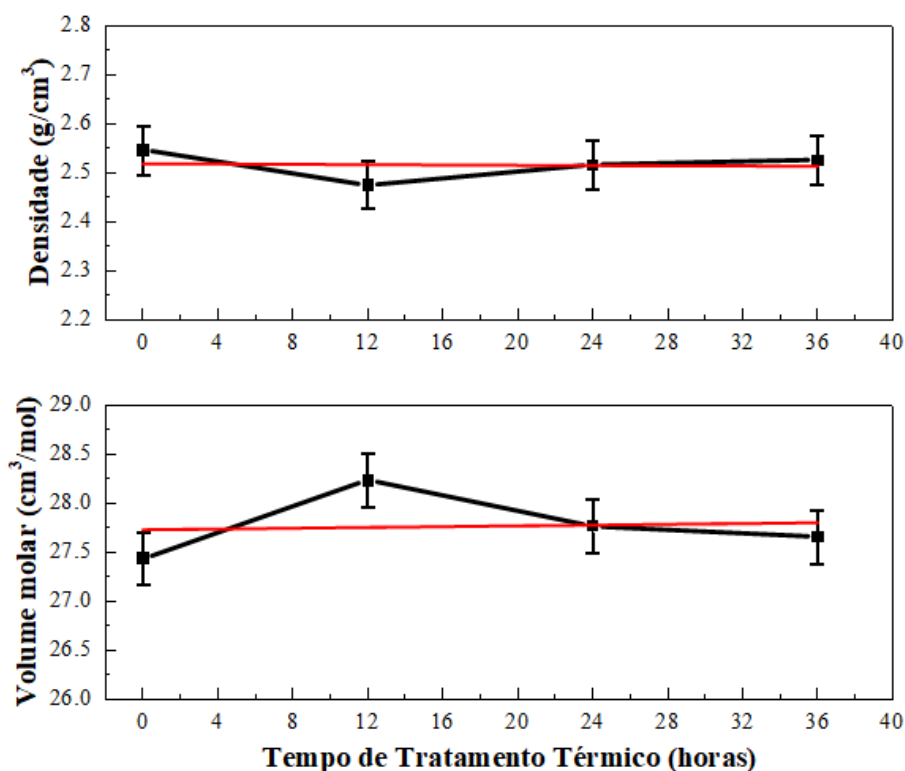


**Figura 30** - Densidade ( $\rho$ ) e volume molar ( $v_m$ ) das amostras 0 h (vidro), 12 h, 24 h e 36 h.

Verifica-se que os valores de densidade e o volume molar das amostras cristalizadas, quando comparadas com os valores da amostra vítrea não apresentam variações significativas. Apesar de literatura mencionar o aumento na densidade em vitrocerâmicas em função da densificação da rede vítrea durante o tratamento térmico [178,183,194,195], isso não foi observado nas amostras desenvolvidas/estudadas nessa pesquisa. Esse comportamento por ser

relacionado ao percentual de cristalização, indicando que a cristalização possivelmente ocorreu na superfície das amostras e não foi o suficiente para causar variações significativas nessas grandezas. Caso a cristalização fosse volumétrica, o esperado seria que o teor de cristalização de 48% (%IC máxima) tivesse ocasionado alterações na densidade e volume molar.

### **5.3 Caracterização das amostras depois da imersão em SBF**

Depois de preparada a solução de SBF, as fatias do vidro e das vitrocerâmicas, foram imersas na solução em tubos de polipropileno. Para isso foi utilizado um banho maria, em temperatura constante de 36,5 °C, por 28 dias. No 6º dia de imersão, observou-se que a amostra 0 h (vidro) tornou-se totalmente opaca. No 17º dia de imersão, a amostra começou a se degradar, havendo formação de precipitado no fundo do tubo.

Para as amostras cristalizadas, em diferentes intervalos de tempos, também ocorreram variação na coloração de suas superfícies e a formação de precipitados. Durante o período de imersão, o pH da solução de SBF foi medido, para ser utilizado como um parâmetro para avaliar a ocorrência de trocas iônicas entre a solução e as amostras. Buscando avaliar a bioatividade do material, tendo como critério a formação de hidroxiapatita durante período de imersão, as medidas de DRX e FTIR foram realizadas e serão apresentadas nos itens 5.3.2 e 5.3.3, respectivamente.

#### **5.3.1 Medidas de pH**

A Figura 31 apresenta o gráfico de pH das amostras em imersão na solução de SBF no intervalo de 28 dias.

O pH inicial da solução do SBF com todas amostras imersas era 7,40. As alterações ocorridas nos valores de pH da solução, em função do tempo de imersão das amostras são associadas as trocas iônicas que ocorrem entre os íons presentes na solução e aos produtos resultantes da degradação na amostra vítrea e nas amostras vitrocerâmicas. A variação do pH na amostra 0 h (vidro) foi de 7,40 para 8,69 e na amostra 36 h foi de 7,40 para 8,87, revelando que a amostra com maior %IC trocou mais íons com a solução, quando comparada ao vidro base. Pelas curvas de pH, a curva da amostra 0 h (vidro) se encontra abaixo das curvas de todas as vitrocerâmicas, indicando que as trocas iônicas foram mais efetivas nas amostras cristalizadas.

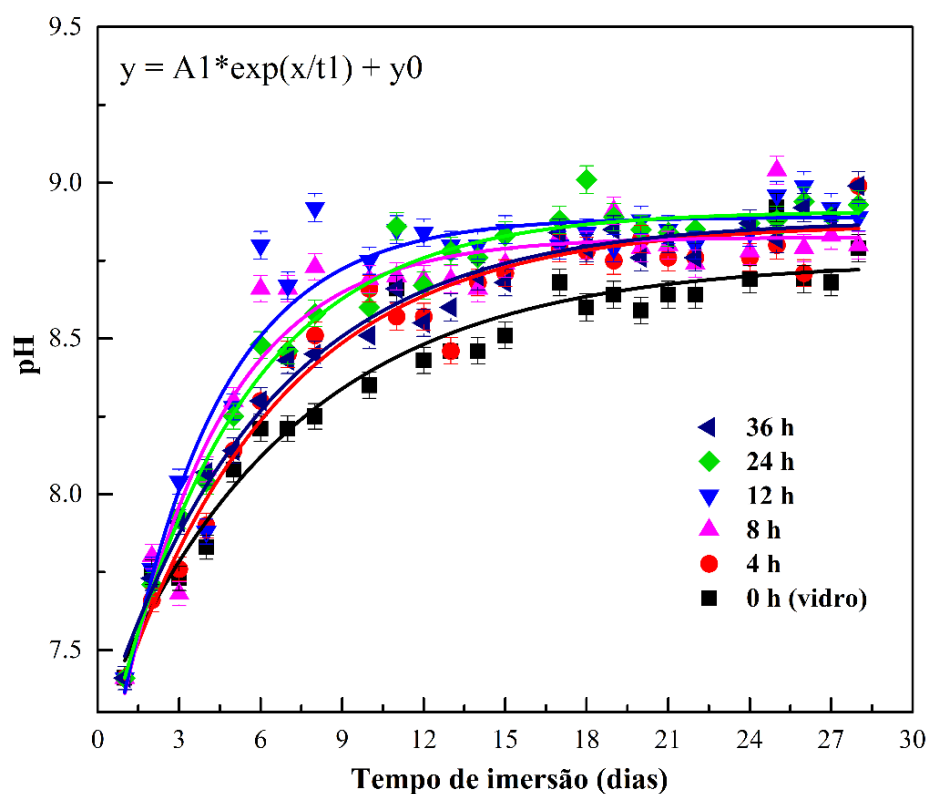


**Figura 31** - Medidas do pH da solução de SBF durante 28 dias de imersão das amostras.

Alguns estudos relatam que a cristalização controlada em vidros bioativos tornam as trocas iônicas entre o material e a solução fisiológica mais lenta, podendo reduzir a bioatividade das amostras [192,196,197]. Contudo, perante os resultados obtidos, é possível avaliar que as trocas iônicas entre as vitrocerâmicas e a solução de SBF foram mais favoráveis, quando comparadas ao vidro base. Isso pode ser explicado pelo processo de lixiviação das amostras vitrocerâmicas ser mais fácil, a presença de espécies microcristalinas promoverem a dissolução mais rápida do que uma estrutura amorfa ou pela solubilidade das fases resultantes da cristalização controlada, e o teor de vidro residual [46,198,199].

Pelo gráfico do pH, ocorre uma elevação do potencial de hidrogênio até por volta do 18º dia de imersão, depois disso os valores de pH tendem a se tornar constantes. Isso pode ser explicado pela taxa de troca iônica inicialmente ser alta, depois ocorre uma saturação dessas taxas e das concentrações iônicas. O aumento do pH ocorre pela dissolução de íons dos metais alcalinos ou metais alcalinos-terrosos (que tornam o pH mais alcalino). Esses íons são liberados das amostras, e os íons  $H^+$  e/ou  $OH^-$  se ligam aos íons na estrutura do material, favorecendo a

degradação da camada externa do material e disponibilizando os íons  $\text{Ca}^{2+}$  que interagem com os íons  $\text{PO}_4^{-3}$ , possibilitando a deposição de hidroxiapatita na superfície das amostras [167,200].

### 5.3.2 Difração de raios-X

Os difratogramas abaixo mostram as mudanças que ocorreram na superfície das amostras 0 h (vidro), 4 h, 8 h, 12 h, 24 h e 36 h em função do tempo de imersão em SBF (7, 14, 21 e 28 dias). Novamente utilizou-se o banco de dados ICSD para determinar as fases cristalinas presentes nas amostras após imersão em SBF, depois de comparadas as posições e as intensidades dos picos presentes nos difratogramas com as fichas catalográficas, identificou-se a Hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$  – arquivo ICSD nº 026204) e o Cloreto de Prata ( $\text{AgCl}$  – arquivo ICSD nº 64734). Em algumas amostras, mesmo após imersão em SBF, a prata metálica ( $\text{Ag}^0$  – arquivo ICSD nº 064997) resultante do tratamento térmico controlado ainda foi detectada.

Para a amostra 0 h (vidro), com os difratogramas mostrados na Figura 32, são observados os picos característicos da hidroxiapatita e do cloreto de prata nos difratogramas em todos os tempos de imersão.

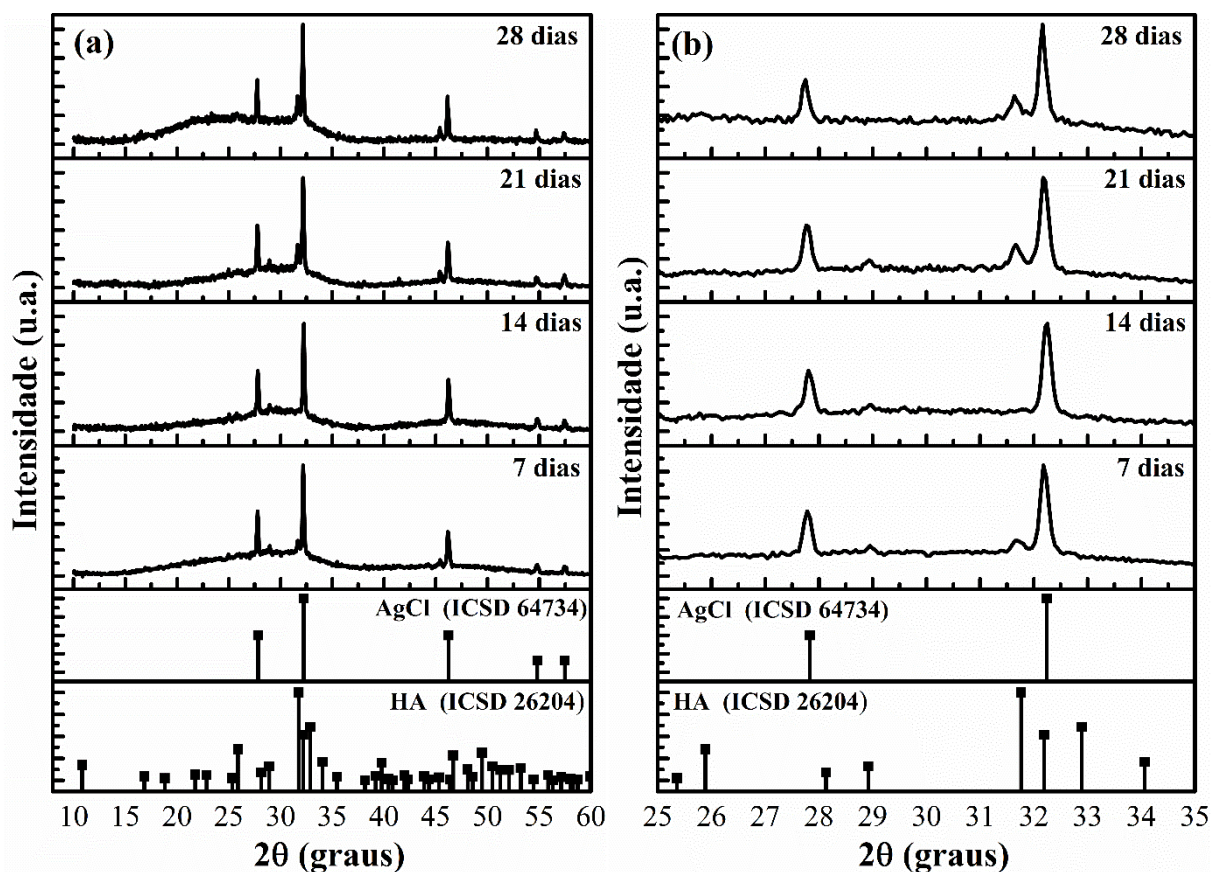


**Figura 32 – (a)** Difratomogramas da amostra 0 h (vidro) depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. **(b)** Difratomogramas da amostra 0 h (vidro) depois da imersão em SBF na região entre 25° e 35° (2θ).

Na Figura 32 (a) os picos localizados em 28,9°, 31,7° e 45,6° (2θ) são picos característicos da hidroxiapatita, indicando que após interação com os íons da solução de SBF, houve a precipitação de HA na superfície das amostras, confirmando a bioatividade do vidro utilizado nessa pesquisa. Entretanto, ambos os picos exibem uma baixa intensidade, indicando uma precipitação incompleta da camada de HA formada [198,201].

Os picos na Figura 32 (a) localizados em 27,8°, 32,2°, 46,1°, 54,7° e 57,4° (2θ) são característicos do cloreto de prata, precipitado também durante a imersão em SBF, mediante a reação entre os íons de  $\text{Cl}^-$ , presentes na solução, e os íons de  $\text{Ag}^+$ , que são liberados durante a degradação das amostras [121], conforme Equação 15. A precipitação do AgCl na superfície das amostras ocorre devido baixa solubilidade desse composto [202,203].



Verifica-se que os picos localizados em 31,7° e 32,2° (2θ), característicos da HA e AgCl, respectivamente, estão bem próximos, havendo uma sobreposição desses picos [202,204], como mostrado na Figura 32 (b).

A Figura 33 (a) mostra os difratogramas da amostra 4 h após os diferentes tempos de imersão em SBF. Como na amostra 0 h (vidro), na amostra 4 h ocorre o surgimento de picos característicos da HA, localizados em 25,8°, 28,9° e 45,6° (2θ) e, observou-se a precipitação do AgCl. A razão para a formação de picos nítidos de difração no intervalo 31-33° (2θ), como mostrado na Figura 33 (b), pode ser relacionado à sobreposição dos picos de hidroxiapatita e AgCl ou a formação de camada mais cristalina do sal de prata quando comparada com a camada de hidroxiapatita [204].

No difratograma da amostra com maior tempo de imersão (28 dias), o pico em 31,7° (2θ), característico da hidroxiapatita torna-se nítido, revelando a necessidade de mais tempo na formação de uma camada de HA mais cristalina na amostra tratada termicamente por 4 horas [85], quando comparada a amostra 0 h (vidro).

Para a amostra 8 h, com os difratogramas exibidos na Figura 34 (a) observou-se o surgimento de picos que não estão presentes nos difratogramas da amostra de 4 h. Os picos presentes em 32,9°, 34,1°, 40,2°, 46,8° e 49,6° (2θ) são característicos da HA, e o pico em 38,2° (2θ), característico da  $\text{Ag}^0$ , reduz sua intensidade e desaparece com 28 dias de imersão, indicando a solubilidade da prata metálica durante imersão. Comportamento semelhante é

observado nos picos das outras fases cristalinas desenvolvidas no tratamento térmico, indicando sua solubilidade.

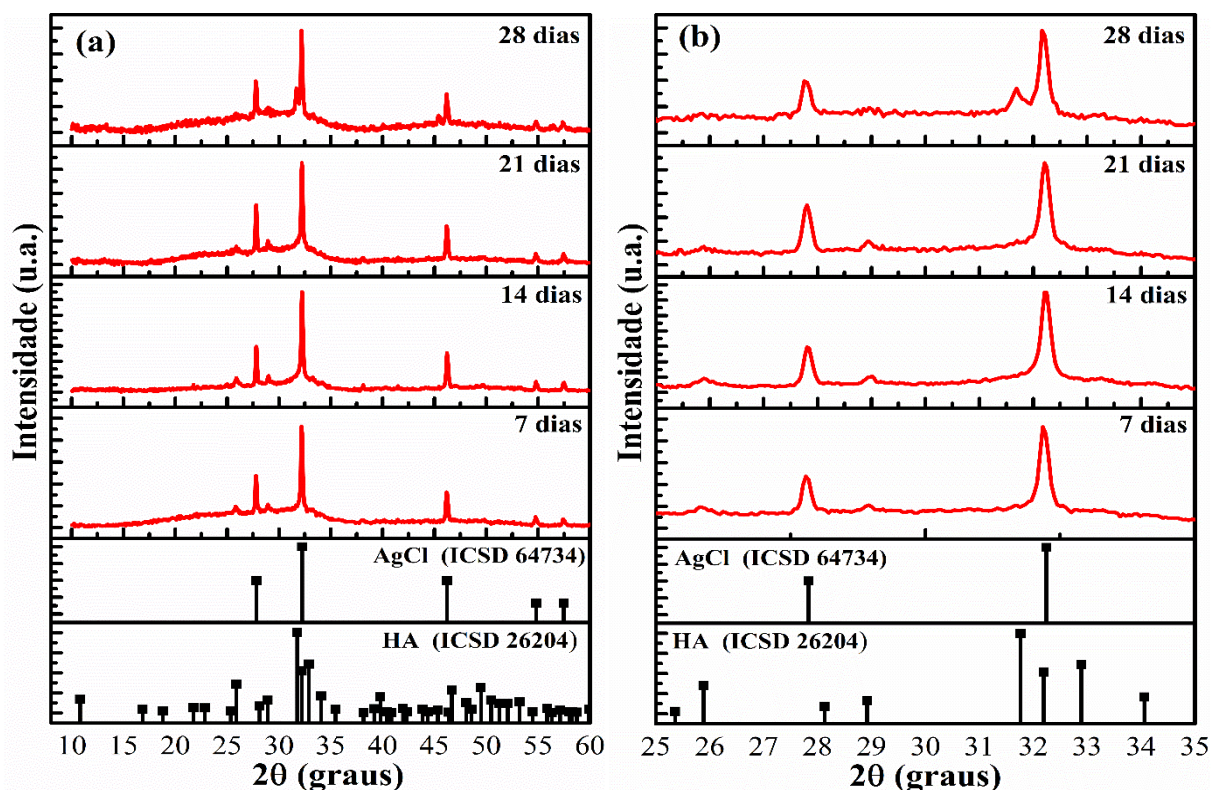


**Figura 33 – (a)** Difratomogramas da amostra 4 h depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. **(b)** Difratomogramas da amostra 4 h depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias na região entre 25° e 35° (2θ).

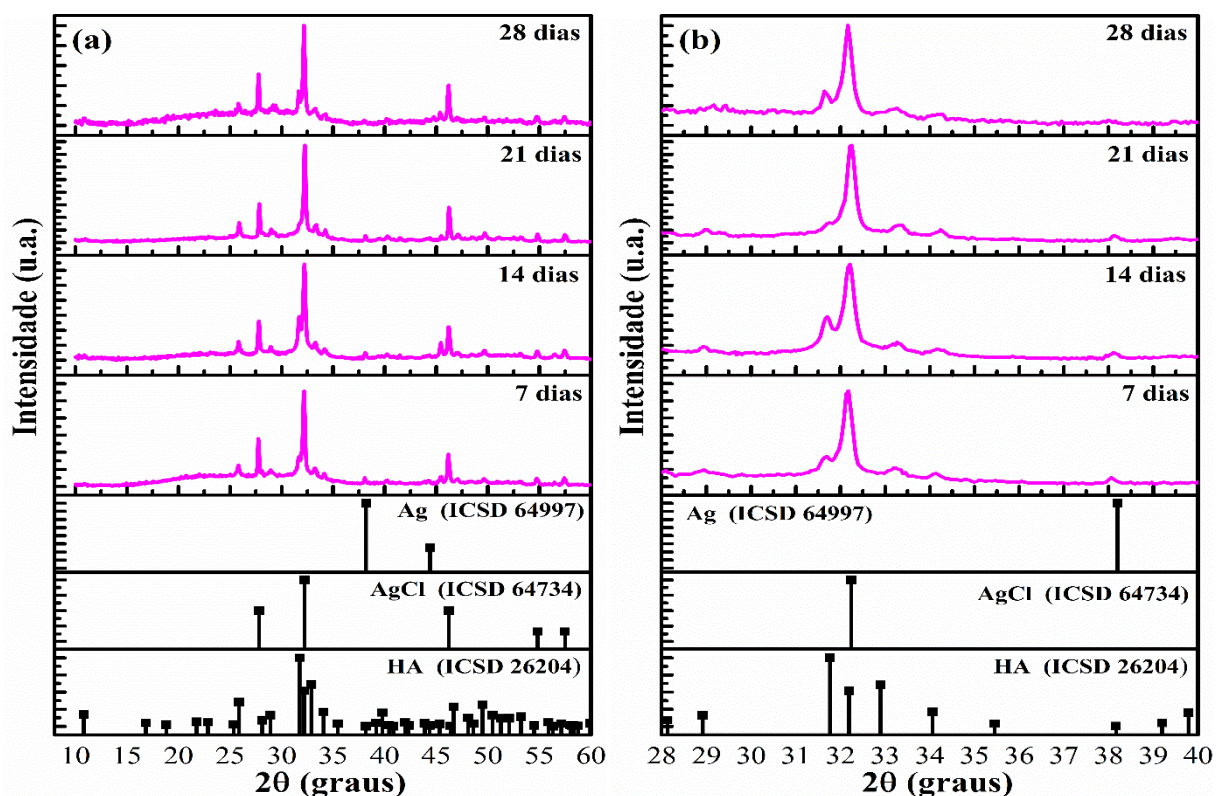


**Figura 34 – (a)** Difratomogramas da amostra 8 h depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. **(b)** Difratomogramas da amostra 8 h depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias na região entre 28° e 40° (2 $\theta$ ).

A intensidade do pico centralizado em 32,2° e a sobreposição dos picos em 31,7° e 32,2°(2 $\theta$ ), exibem comportamentos diferentes entre as amostras em função do tempo de imersão, isso pode ser relacionado ao percentual de cristalinidade. Para a amostra 4 h, esse pico revela intensidade máxima com 14 dias de imersão e a sobreposição do pico é verificada no difratograma após 28 dias de imersão. Para a amostra 8 h, a intensidade máxima ocorre com 21 dias de imersão, havendo sobreposição dos picos nos tempos de imersão, como mostrado na Figura 34 (b). Essas alterações podem ser associadas a precipitação de novas camadas tanto de HA como de AgCl durante o imersão, distribuição e a morfologia dos cristais precipitados [188,205].

Para a amostra 12 h, os difratogramas mostrados na Figura 35 apresentam comportamento semelhante as amostras 4 h e 8 h.

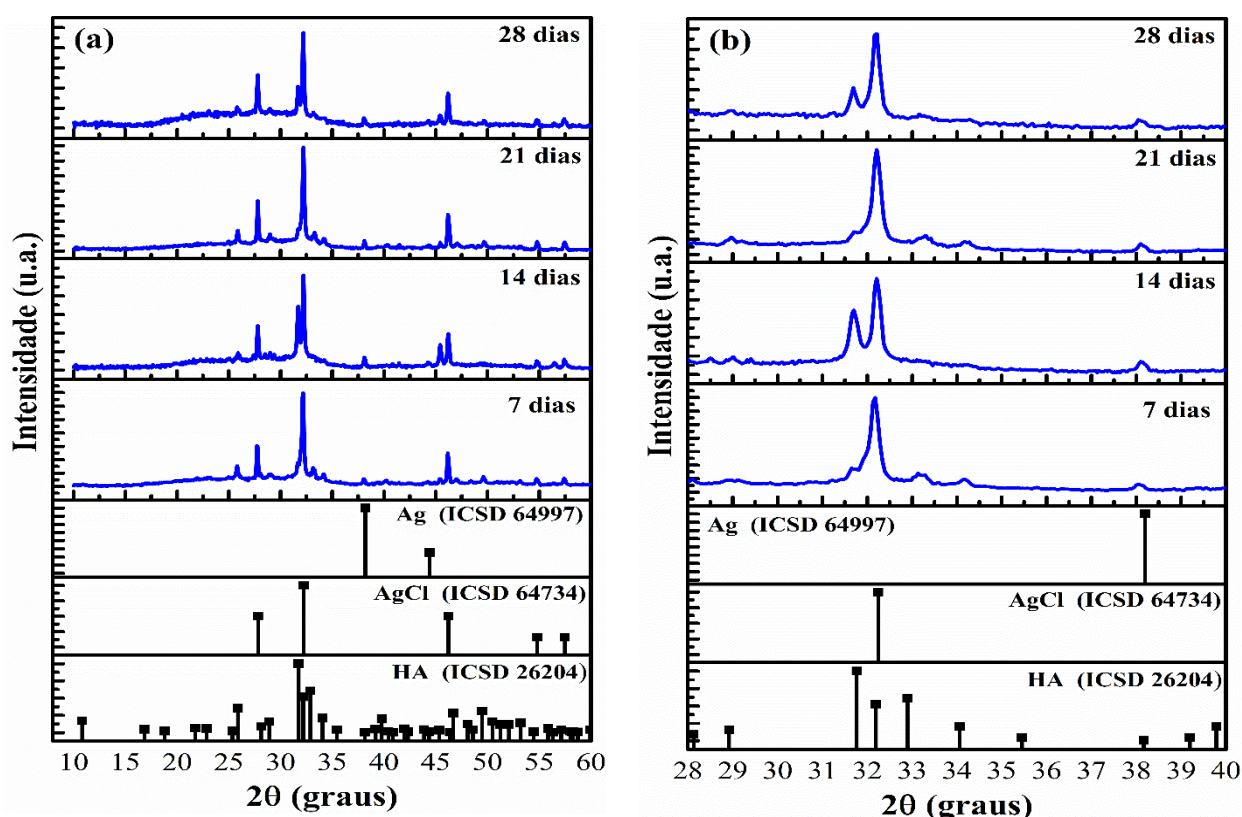


**Figura 35- (a)** Difratomogramas da amostra 12 h depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. **(b)** Difratomogramas da amostra 12 h depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias na região entre 28° e 40° (2 $\theta$ ).

Pela análise da Figura 35 (a) a precipitação de HA e AgCl ocorrem, e alterações nas intensidades dos picos são confirmadas. Observando a Figura 35(b) é possível verificar a sobreposição de picos em 31,7° e 32,2° (2 $\theta$ ). Por sua vez, mesmo para a amostra com 28 dias de imersão, o pico característico da prata metálica não desapareceu, ou seja, mesmo após imersão, essa fase cristalina resultante do tratamento térmico ainda se encontra no material, indicando a estabilidade da prata metálica no fluido fisiológico simulado [203,206]. Esse comportamento pode ser justificado pelo aumento do percentual de cristalinidade, quando comparadas as amostras 4 h e 8 h.

A presença da prata desenvolvida mediante o tratamento térmico ainda nas amostras mesmo após 4 semana de imersão no SBF indica uma atividade antibacteriana a longo prazo das amostras [207]. Os íons de Ag<sup>+</sup> são liberados em um curto período para matar as bactérias, enquanto a Ag<sup>0</sup> é liberada de forma lenta como prata iônica mediante oxidação [203,208], representada pela Equação 16.



Pela Figura 36 (a) o comportamento dos difratogramas da amostra 24 h durante imersão é exibido. A formação da HA e AgCl, e a prata metálica mesmo após 28 dias de imersão são confirmados.

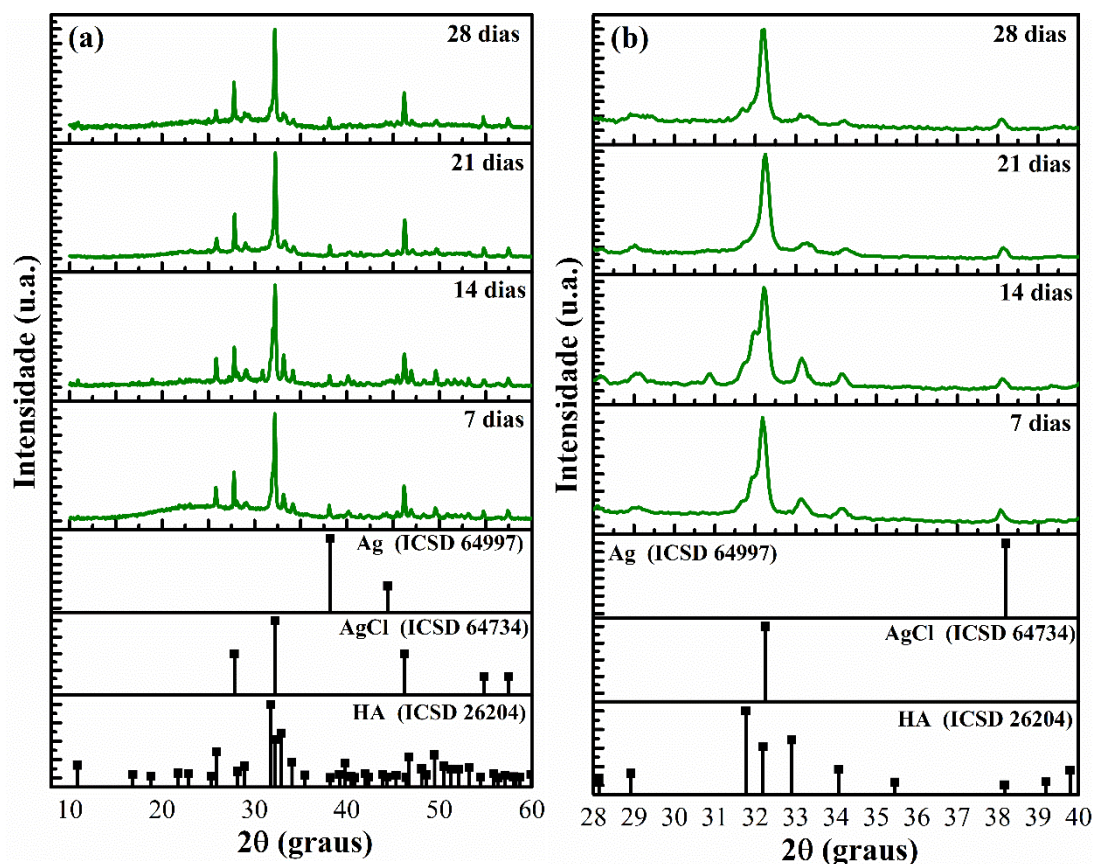


**Figura 36-** (a) Difratomogramas da amostra 24 h depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. (b) Difratomogramas da amostra 24 h depois da imersão em SBF na região entre 28° e 40° (2θ).

Pela Figura 36 (b) a sobreposição dos picos de cloreto de prata e hidroxiapatita é bem nítida nos dois primeiros intervalos de imersão (7 e 14 dias). Posteriormente, com 21 e 28 dias de imersão, a sobreposição de picos não é tão evidente, com o destaque do pico em 32,2° (θ), essa alteração pode estar associada a precipitação de uma nova camada de HA durante o imersão, distribuição e a morfologia dos cristais precipitados [188,205].

Para amostra 36 h, com os difratogramas presentes na Figura 37 (a), percebe-se o surgimento de seis novos picos característicos da hidroxiapatita, localizados em 10,8°, 18,8°, 23,6°, 30,4°, 40,2° e 44,6° (2θ). Além da formação de HA e AgCl, também é possível analisar uma melhor definição do pico em 32,2° (2θ) e a presença de para metálica mesmo após 28 dias em SBF.

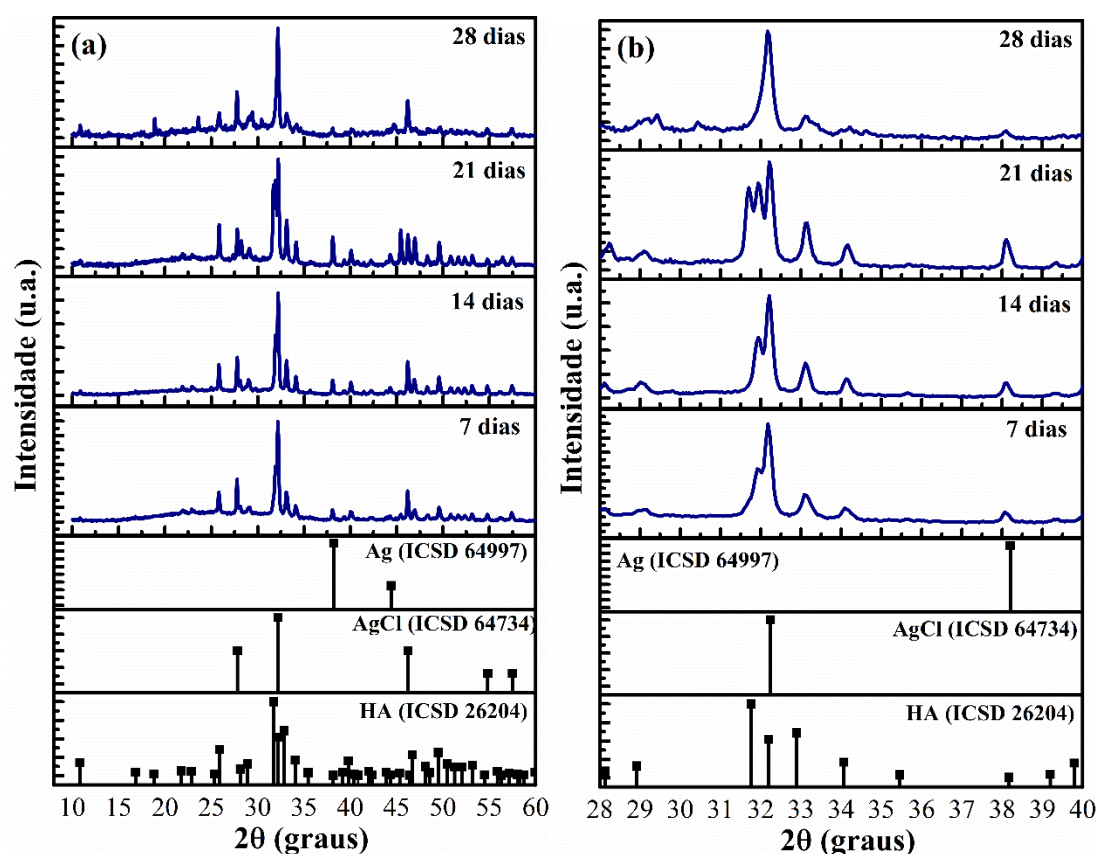


**Figura 37 – (a)** Difratomogramas da amostra 36 h depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. **(b)** Difratomogramas da amostra 36 h depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias na região entre 28° e 40° (2θ).

Como mostrado na Figura 37 (b), verifica-se a sobreposição dos picos em 31,7° e 32,2° (2θ) até o 21° dias de imersão. As amostras com 7 e 14 dias de imersão apresentam os picos em 31,7° e 32,2° (2θ) sobrepostos, verifica-se um aumento na intensidade que pode ser relacionada ao aumento do tempo de imersão. Na amostra com 21 dias de imersão nota-se três picos, os picos em 31,7° e 31,9° (2θ) são característicos da Hidroxiapatita e o pico em 32,2° (2θ) é característico do Cloreto de Prata. O mesmo comportamento é observado para os picos localizados em 33,1° e 34,2° (2θ), característicos da hidroxiapatita. Portanto, o desenvolvimento do sal de prata não inibiu o desenvolvimento de cristais de HA [209], para as vitrocerâmicas preparadas e estudadas nessa pesquisa.

Com 28 dias de imersão os picos de HA não são evidentes nessa região do difratograma, somente do AgCl. Isso pode ser associado à precipitação de nova camada de hidroxiapatita no material que ainda estava se organizando, apresentando uma estrutura que não foi capaz de ser detectada pela difração de raios-X. O pico característico do AgCl torna-se mais alargado e

menos intenso, indicando alterações no cristal e na forma do grão em função do tempo de imersão [210].

A Figura 38 mostra os difratogramas de todas amostras após 28 dias de imersão em SBF.

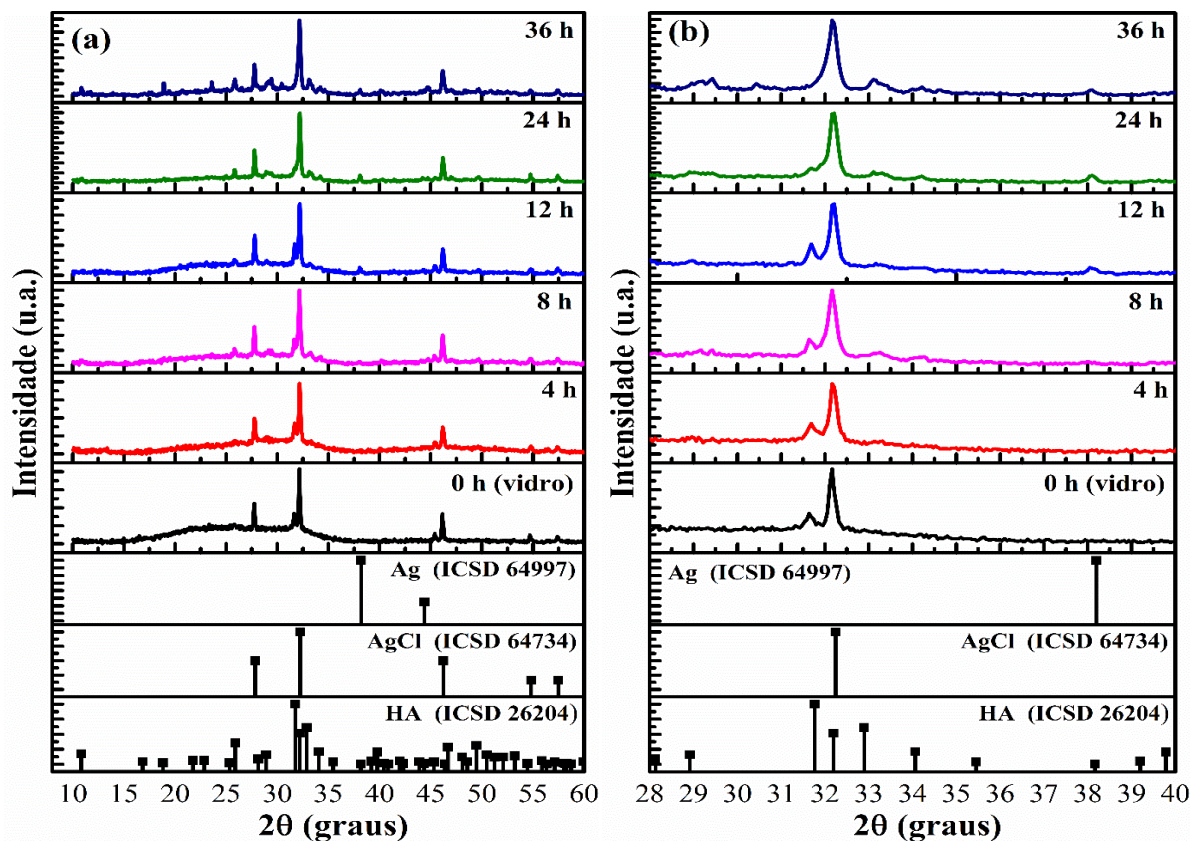


**Figura 38 – (a)** Difratogramas das amostras 0 h (vidro), 4 h, 8 h, 12 h, 24 h e 36 h depois da imersão em SBF por 28 dias. **(b)** Detalhe do gráfico (a) na região entre 28° e 40° (2θ).

Pelos difratogramas na Figura 38 (a), ocorre o surgimento de novos picos quando comparados com os difratogramas das amostras antes da imersão, o desaparecimento dos picos característicos das fases cristalinas desenvolvidas durante a cristalização controlada, indica a solubilização das fases, e a formação da hidroxiapatita comprova a bioatividade do vidro e das amostras cristalizadas. Conforme a Figura 38 (b), as amostras com maiores percentuais de cristalização ainda apresentam prata metálica em sua composição mesmo após 4 semanas de imersão, apesar da redução nos picos dessa fase que é relacionada a liberação de íons de  $\text{Ag}^+$  durante degradação das amostras. A interação desses íons com os íons cloreto forma cloreto de prata que foi detectado nas amostras após imersão.

Vulpoi *et al* [209] desenvolveram compósitos de polímero/biocerâmicas e relatam o desenvolvimento de cristais contendo Ag (AgCl e Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) na superfície das amostras após imersão das amostras em SBF, esses cristais não inibiram o desenvolvimento de hidroxiapatita. Scaffolds de vidro Borossilicato dopados com Ag<sub>2</sub>O mostraram uma liberação de íons de prata por mais de 8 semanas no SBF, simulando a resistência contra colônia de bactérias [211]. Trabalho desenvolvido por Zheng *et al* [212] com nanopartículas de vidro modificadas por Ag para atividade antibacteriana reportam a presença de prata metálica detectada nos difratogramas das amostras após 7 dias de imersão em SBF, indicando estabilidade da Ag<sup>0</sup> em fluidos fisiológicos, devido à existência de prata iônica e metálica, as amostras apresentam potencial atividade antibacteriana prolongada.

Estudos sobre os efeitos da cristalização na bioatividade abordam que o desenvolvimento de uma microestrutura inibe e/ou retarda o desenvolvimento de HA na superfície das amostras, comprometendo a bioatividade do material [21,23,27,213,214]. No presente estudo, por meio dos resultados obtidos pelos difratogramas das amostras, em todos os tempos de imersão, as mudanças nos difratogramas revelam mudanças ocorridas nas superfícies. Os picos característicos da HA surgem, o que indica a bioatividade das amostras, e ocorrem reduções nos picos característicos da prata metálica e das outras fases cristalinas, o que pode ser associado a dissolução dessas fases cristalinas [167,175,213] na solução de SBF.

A precipitação do AgCl ocorre mediante interação dos íons de Ag<sup>+</sup> dissolvidos, com os íons de Cl<sup>-</sup> da solução. As diferenças observadas nos difratogramas das amostras em função da imersão podem ser associadas ao percentual de cristalinidade das amostras. As reduções nas intensidades do difratogramas no 28° dia de imersão podem indicar a formação de uma camada de HA incompletamente cristalizada, podendo ser associada também a precipitação de uma nova camada de hidroxiapatita.

### 5.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR também foi utilizada para avaliar a formação de hidroxiapatita na superfície das amostras após imersão em SBF, complementando os dados de DRX. Para a amostra 0 h (vidro), os espectros de FTIR são mostrados na Figura 39.

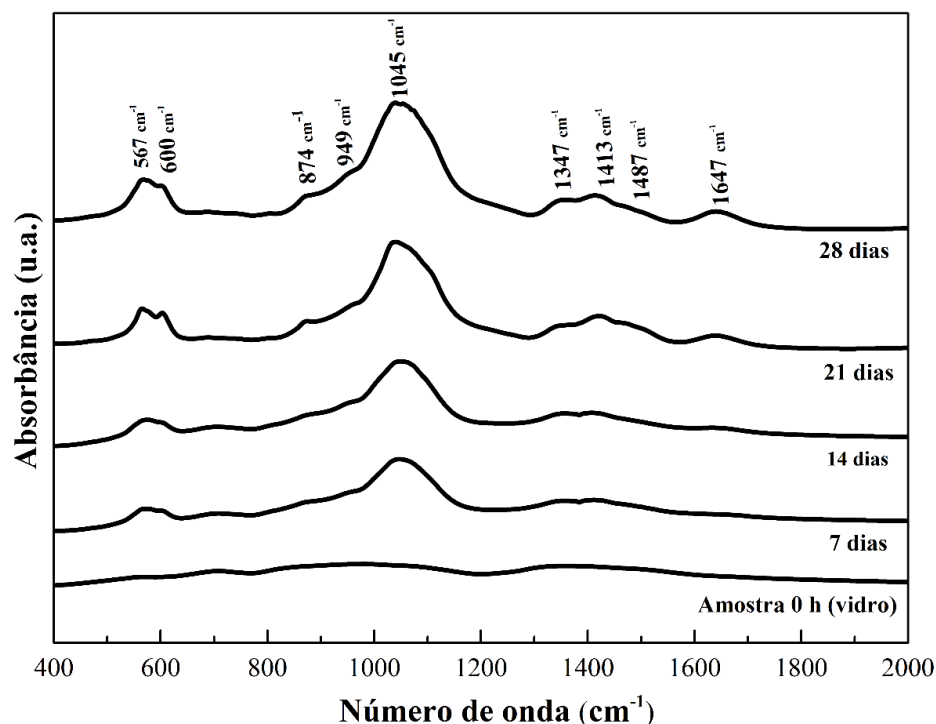


**Figura 39** – Espectros de FTIR da amostra 0 h (vidro) antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.

Analizados os espectros de FTIR, verifica-se o surgimento de novas bandas após imersão. Uma banda com dois picos de baixa intensidade, centralizados em  $574\text{ cm}^{-1}$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ . Essa banda é atribuída à ressonância da ligação P-O no grupo  $\text{PO}_4$  [203]. A banda com pico centralizado em  $1042\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento assimétrico da ligação P-O, também nos grupos  $\text{PO}_4$ . O ombro presente em  $946\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído ao grupo  $\text{PO}_4^{3-}$ . O ombro  $874\text{ cm}^{-1}$  e o pico presente em  $1487\text{ cm}^{-1}$  é característico da ligação C-O nos grupos  $\text{CO}_3^{2-}$ , e o pico em  $1646\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído ao grupo  $\text{OH}^-$ . Todas essas bandas e picos são característicos da molécula de hidroxiapatita [165,205,215], confirmando a bioatividade do vidro utilizado [45,175,216]. A presença do íon carbonato indica que a hidroxiapatita formada é a hidroxiapatita carbonatada [203,212].

Pelos espectros de FTIR da Figura 39, verifica-se que quanto maior o tempo de imersão maior a intensidade das bandas e picos. A Tabela 12 exhibe as posições das bandas identificadas e as suas atribuições.

**Tabela 12** – Posição e atribuição das bandas e picos identificados nos espectros de FTIR da amostra 0 h (vidro) depois de 7, 14, 21 e 28 dias de imersão.

| Posição observada                 | Atribuições                                                   | Referências |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------|
| 570 e 602 $\text{cm}^{-1}$        | Ressonância presente na ligação P-O em grupos $\text{PO}_4$   | [29,185]    |
| 956 e 1042 $\text{cm}^{-1}$       | Estiramento assimétrico da ligação P-O no $\text{PO}_4$       | [29,185]    |
| 1347 $\text{cm}^{-1}$             | Vibrações da ligação B-O das unidades trigonais $\text{BO}_3$ | [46,138]    |
| 867, 1413 e 1487 $\text{cm}^{-1}$ | Ressonância da ligação C-O em $\text{CO}_3^{2-}$              | [215,217]   |
| 1646 $\text{cm}^{-1}$             | Grupo hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) da banda da água.           | [215,217]   |

Para as amostras 4 h e 8 h, os espectros de FTIR são apresentados na Figura 40 e Figura 41, respectivamente.

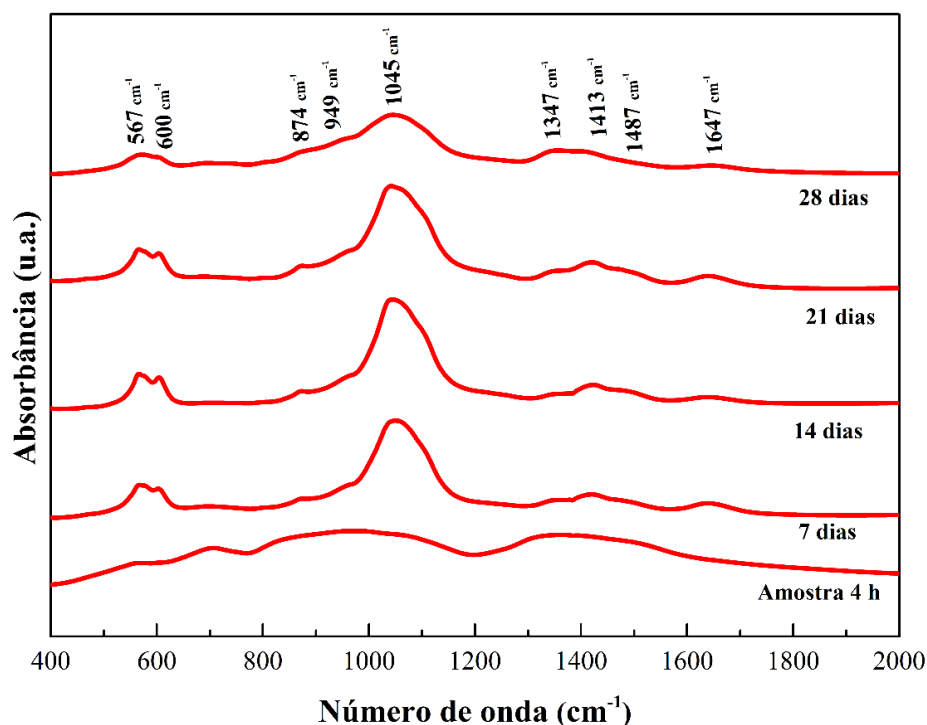


**Figura 40** - Espectros de FTIR da amostra 4 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.

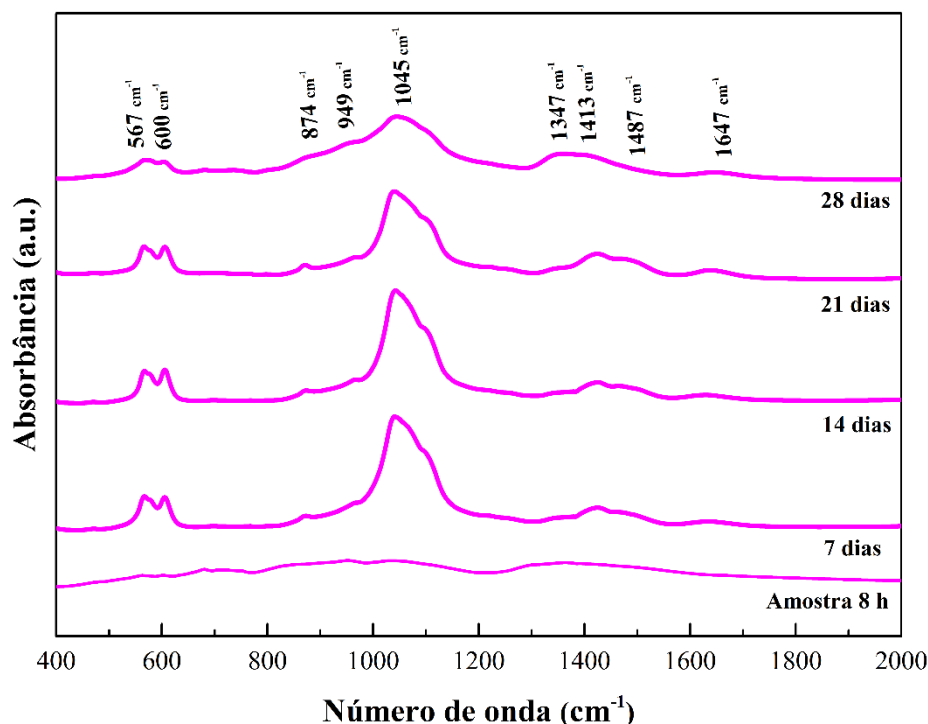


**Figura 41** - Espectros de FTIR da amostra 8 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.

Os picos e as bandas que surgem nessas amostras, depois da imersão, revelam comportamento semelhante as bandas e picos presentes na amostra 0 h (vidro). Para ambas as amostras, com 7, 14 e 21 dias de imersão, a intensidade e a definição das bandas e picos são semelhantes. Entretanto com 28 dias de imersão ocorre uma redução na intensidade das bandas e picos. As principais observações são nos picos localizados em  $574\text{ cm}^{-1}$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ , característicos do fosfato cristalino, o pico centralizado em  $1042\text{ cm}^{-1}$ , características do estiramento assimétrico da ligação P-O, e as bandas centralizadas  $1347\text{ cm}^{-1}$ ,  $1413\text{ cm}^{-1}$  e  $1487\text{ cm}^{-1}$ , características de vibrações dos grupos boratos e ressonância da ligação C-O. O comportamento semelhante dessas amostras pode ser relacionado ao percentual de cristalização também serem semelhantes, 4 h (33%) e 8 h (39%).

Na Figura 42 são exibidos os espectros de FTIR da amostra 12 h. As atribuições das bandas e picos identificados são as mesmas apresentadas na Tabela 12. Como nos difratogramas das amostras 4 h e 8h, observa-se picos e bandas intensos com 7,14 e 21 dias de imersão e redução após 28 dias de imersão. Essa redução pode ser indicativo da cristalização de uma nova camada de hidroxiapatita, que têm início pela formação de uma camada de fosfato amorfo, após migração dos íons de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  para a superfície das amostras [26,40]. As variações na intensidade e forma da banda em função do tempo de imersão do pico centralizado em  $1045\text{ cm}^{-1}$  podem indicar a precipitação de uma camada de HA que ainda estava ocorrendo [218].

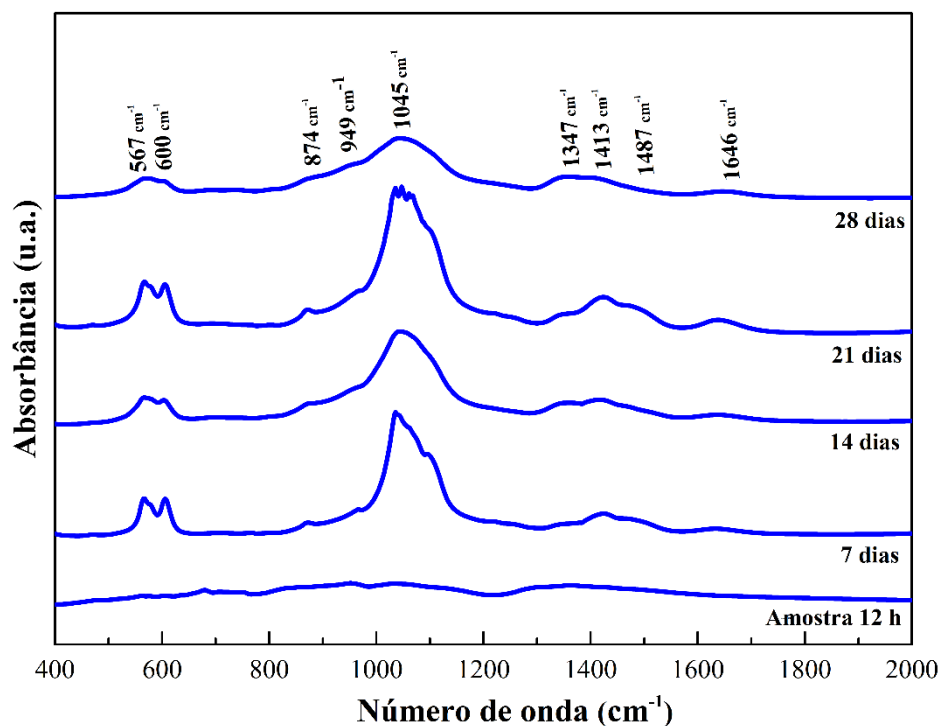


**Figura 42** - Espectros de FTIR da amostra 12 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.

Os espectros de FTIR das amostras 24 h e 36 h, apresentados na Figura 43 e Figura 44, respectivamente, são semelhantes com os outros espectros, já apresentados/discutidos.

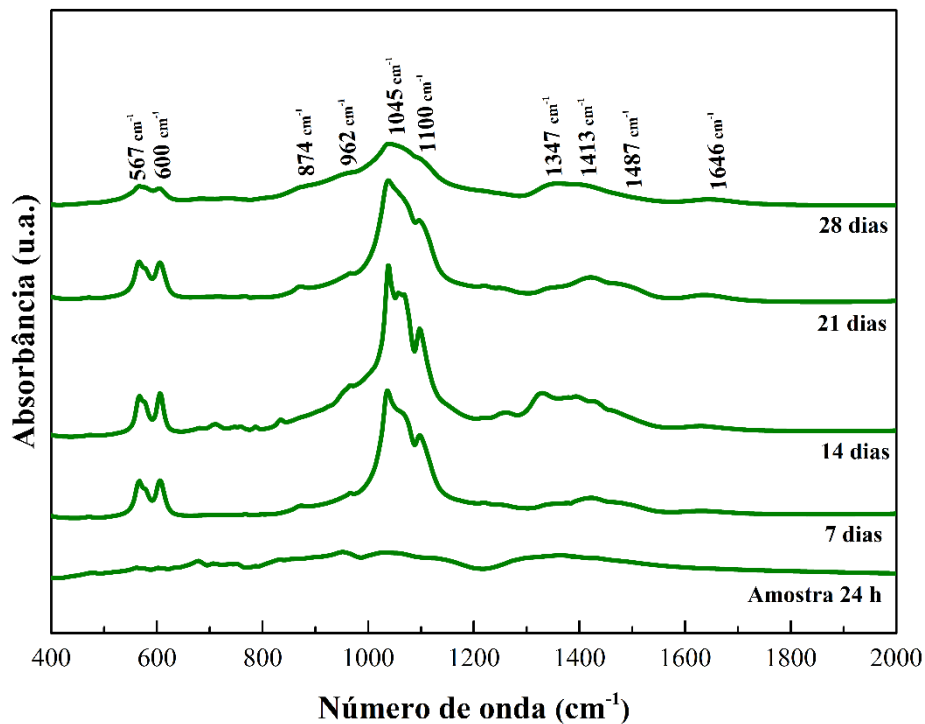


**Figura 43** - Espectros de FTIR da amostra 24 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.

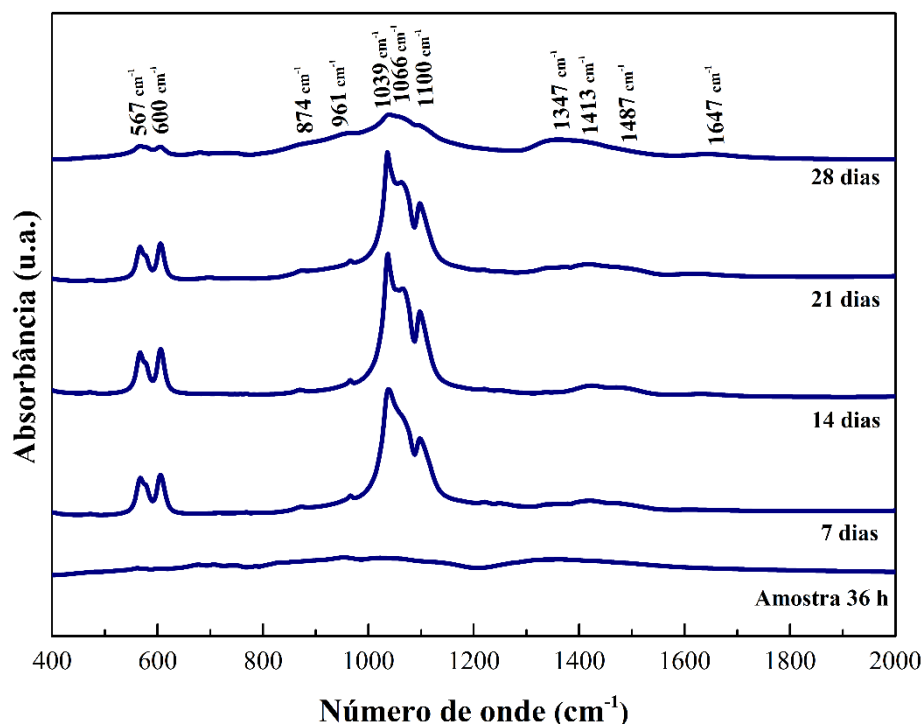


**Figura 44** - Espectros de FTIR da amostra 36 h antes e depois da imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.

Entretanto, ocorre o surgimento de novos picos centralizados em  $1066\text{ cm}^{-1}$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$ , característicos dos grupos fosfatos, acompanhado da redução intensidade das bandas e picos após 28 dias de imersão em SBF. Esses novos picos no FTIR podem ser associados com uma melhor definição dos picos de HA sobrepostos ao pico de AgCl nos difratogramas de DRX da amostra 36h, como mostrado na Figura 37 (b).

Quando comparado esses resultados com os dados apresentados anteriormente, das amostras 4 h, 8h e 12 h, verifica-se uma melhor definição dos picos em 576, 600 e  $\sim 1040\text{ cm}^{-1}$  e a redução desses picos com 28 dias de imersão. Uma melhor definição desses picos pode ser associada com a precipitação de uma hidroxiapatita mais cristalina, os dados de pH indicaram maiores valores para as amostras mais cristalinas, isso pode ser relacionado com uma taxa de trocas iônicas mais significativas, possibilitando à precipitação dessa hidroxiapatita mais cristalina. A redução dos picos com 28 dias de imersão é um indicativo que durante essas trocas iônicas novas camadas de HA estão se depositando na superfície das amostras, que inicialmente precipita na forma de fosfato amorfo.

A Figura 45 mostra os espectros de FTIR de todas as amostras após 21 dias de imersão em SBF. Pelos espectros, verifica-se picos e bandas específicos característicos da hidroxiapatita, concordando com os dados de DRX e confirmando que a cristalização controlada, nas amostras estudadas/pesquisadas, não inibe a bioatividade. Verifica-se pelos

espectros que os picos localizados em  $567\text{ cm}^{-1}$  e  $600\text{ cm}^{-1}$ , e a banda com os picos em  $1042\text{ cm}^{-1}$ ,  $1066\text{ cm}^{-1}$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$  apresentam melhor definição nas amostras cristalizadas, quando comparadas ao vidro.

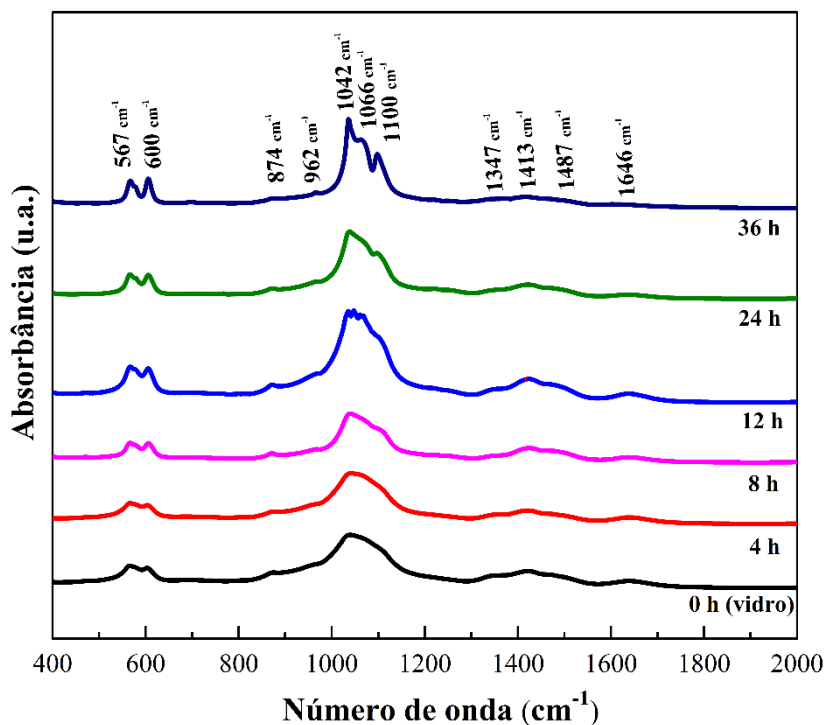


**Figura 45** – Espectros das amostras 0 h (vidro), 4 h, 8 h, 12 h, 24 e 36 h depois da imersão em SBF por 21 dias.

Satyanarayana *et al* [182] menciona que vidros cristalizados apresentam mudanças em sua microestrutura, resultante da separação de fases durante o tratamento térmico, essas mudanças microestruturais alteram a reatividade na superfície das vitrocerâmicas na imersão em SBF. O efeito da cristalização controlada na formação de HA pode ser relacionada, segundo Plewinski [28] e Daguano *et al* [29,185], a presença de cristais de fosfatos de cálcio. Nas vitrocerâmicas desenvolvidas nessa pesquisa, umas das fases presentes é um fosfato de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ).

A redução na intensidade das bandas localizadas em  $1347\text{ cm}^{-1}$  (associada as vibrações da ligação B-O, em anéis metaboratos, e grupos piroborato e ortoborato),  $874\text{ cm}^{-1}$ ,  $1413\text{ cm}^{-1}$  e  $1487\text{ cm}^{-1}$  (características da ressonância da ligação C-O em grupos carbonatos) e  $1446\text{ cm}^{-1}$  (atribuídas ao grupo  $\text{OH}^-$ ) podem ser relacionadas, a dissolução desses grupos durante o período de imersão. A redução da banda em  $1347\text{ cm}^{-1}$  pode ser um indicativo da dissolução do vidro na solução, reduzindo sua intensidade [219,220].

## 5.4 Atividade antibacteriana

A Figura 46 mostra a zona de inibição das amostras contra a *E.coli* ATCC 6305. A amostra sem prata (0 Ag – controle negativo) não apresentou zona de inibição, enquanto as amostras com 0,5% em mol de Ag<sub>2</sub>O (vidro e vitrocerâmicas) e o fármaco Cloranfenicol (CLO – controle positivo) apresentaram atividade antibacteriana, confirmada pelo surgimento de halo bacteriano. Na Tabela 13 são apresentados os tamanhos dos halos e a médias dos valores obtidos.

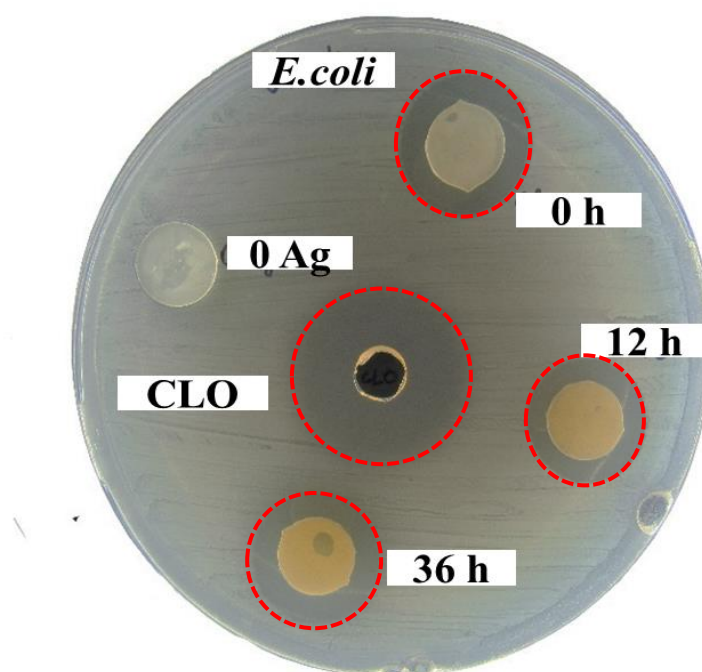


**Figura 46** – Ensaio antibacteriano pelo método de difusão em disco de ágar. O tracejado em vermelho é um guia para a visualização do tamanho do halo.

**Tabela 13** – Comprimento dos halos de inibição das amostras e dos grupos controles.

| Amostras    | Placa 1 | Placa 2 | Média   |
|-------------|---------|---------|---------|
| 0 Ag        | -       | -       | -       |
| 0 h (vidro) | 17 mm   | 17 mm   | 17 mm   |
| 12 h        | 17 mm   | 17 mm   | 17 mm   |
| 36 h        | 18 mm   | 18 mm   | 18 mm   |
| CLO         | 24 mm   | 23 mm   | 23,5 mm |

Estudos sobre os efeitos de íons metálicos como agentes terapêuticos na Engenharia de Tecidos visando o desenvolvimento de biomateriais com atividade antibacteriana são necessários [221]. As infecções bacterianas são uma das principais razões das falhas no uso de vidros e vitrocerâmicas no tratamento ósseo [222], podendo causar dor ao paciente, recuperação prolongada e novos procedimentos clínicos [223].

Vidros e vitrocerâmicas com atividade antibacteriana baseadas na presença de íons metálicos já existem. Os mecanismos para atividade desses elementos podem ser relacionados com a interrupção de funções nas células bacterianas, mediante a interação entre os produtos da dissolução das amostras com os componentes celulares [222].

Íons de  $\text{Ag}^+$  quando entram em contato com células bacterianas interrompem a atividade metabólica, desativando proteínas e inibindo a replicação do DNA [224]. Mediante os resultados obtidos, foi possível observar que a amostra sem prata não apresentou halo bacteriano, confirmando que a atividade antibacteriana das amostras ocorre devido à dissolução dos íons de prata no meio de ágar [225]. Os resultados da amostra vítrea e das amostras cristalizadas revelam que a cristalização controlada não inibiu a liberação dos íons de  $\text{Ag}^+$ . A semelhança no comprimento dos os halos podem ser relacionados com o fato de que as amostras possuem a mesma concentração de  $\text{Ag}_2\text{O}$  em sua composição.

A atividade antibacteriana de vitrocerâmicas baseadas em vidros silicatos com 6% em mol de  $\text{Ag}_2\text{O}$  foi avaliada, o tamanho de halo verificado contra a *E.coli* foi de 19,3 mm [40]. Vitrocerâmicas preparadas por meio de tratamento usando vidros borosilicatos dopados com 10% em mol de  $\text{Ag}_2\text{O}$  e a atividade antibacteriana contra a *E.coli* foi analisada, com halos medindo 18,2 mm [45]. Os estudos citados revelam halos bacterianos com comprimento semelhantes ao encontrados para as vitrocerâmicas desenvolvidas nessa pesquisa. Apesar das variações nas concentrações do óxido de prata, a semelhança entre os comprimentos dos halos pode ser relacionada as diferenças de composição química, técnica de preparação das amostras, condições de tratamento térmico utilizadas e ao papel dos íons de prata dissolvidos.

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho vitrocerâmicas foram obtidas utilizando o processo de cristalização controlada em função do tempo de tratamento térmico de um vidro borato com 0,5% em mol de  $\text{Ag}_2\text{O}$  em sua composição. Os difratogramas de DRX e os espectros de FTIR das amostras cristalizadas comprovam o desenvolvimento de fases cristalinas no vidro após o tratamento térmico. Quanto maior o tempo de tratamento térmico, maior o percentual de cristalização e o tamanho de cristalito da prata metálica e do fosfato de cálcio. Os resultados de DTA sugerem alterações na estrutura das amostras em função do tratamento térmico, confirmando os resultados de DRX e FTIR.

Os dados de pH comprovaram a ocorrência de trocas iônicas alterando o seu valor até por volta do 18º dia de imersão, após esse período, o pH tornou-se constante. Os resultados de DRX das amostras após imersão na solução de SBF apresentam picos característicos da hidroxiapatita e do cloreto de prata. Além disso, para as amostras com maiores percentuais de cristalização, tratadas termicamente por 12, 24 e 36 h, verificou-se a presença de prata metálica, mesmo após 4 semanas de imersão. Esse resultado indica a estabilidade dessa fase cristalina e uma potencial atividade antibacteriana das amostras, a longo prazo, em meio biológico.

Os espectros de FTIR após imersão mostram bandas e picos característicos da hidroxiapatita. A presença de bandas características dos íons carbonatos, indicam que a hidroxiapatita formada é a hidroxiapatita carbonatada. A redução na definição das bandas e picos após 28 dias de imersão foram associadas a precipitação de uma nova camada de hidroxiapatita, que inicialmente se precipita na forma de fosfato amorfo.

O teste de atividade antibacteriana contra a bactéria *E.coli* 6305 mostrou halos de inibição com tamanhos semelhantes entre as amostras: 0 h (vidro) (17 mm), 12 h (17 mm) e 36 h (18 mm), indicando que a cristalização controlada não inibiu a liberação dos íons de  $\text{Ag}^+$ . A semelhança no comprimento dos halos pode ser relacionada ao fato de que as amostras possuem a mesma concentração de  $\text{Ag}_2\text{O}$  em sua composição.

Os resultados obtidos revelam que as amostras cristalizadas apresentam comportamento bioativo, mostrando formação de hidroxiapatita. Portanto, a cristalização não inibe a bioatividade, esse comportamento pode ser associado a dissolução das fases cristalinas desenvolvidas durante o tratamento térmico e do percentual de vidro residual nas amostras. Perante os resultados apresentados, as vitrocerâmicas possuem potencial para serem utilizadas como biomateriais, em tratamentos ósseos, e inibirem eventuais infecções bacterianas.

## **7. PERSPECTIVAS**

- Realizar medidas de microdureza *Vickers*;
- Analisar a morfologia das amostras (vidro e vitrocerâmicas) antes e de depois da imersão da imersão em SBF por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Avaliar a citotoxicidade em células de linhagem osteoblástica.

## REFERÊNCIAS

- [1] M.R.W.S. Abdala, *Ciência e engenharia de materiais*, 8 ed, 2018. <https://doi.org/10.22533/at.ed.642183010>.
- [2] I.M. Marks, M.G. Gelder, *Integrated biomaterials science*, Br. J. Psychiatry. 112 (1966) 211–212. <https://doi.org/10.1192/bjp.112.483.211-a>.
- [3] A. Oryan, S. Alidadi, A. Moshiri, N. Maffulli, Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions, J. Orthop. Surg. Res. 9 (2014) 18. <https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18>.
- [4] J.M. Anderson, Biological responses to materials, Annu. Rev. Mater. Res. 31 (2001) 81–110. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.31.1.81>.
- [5] M. Vallet-Regí, Ceramics for medical applications, J. Chem. Soc. Dalt. Trans. (2001) 97–108. <https://doi.org/10.1039/b007852m>.
- [6] L.L. Hench, The future of bioactive ceramics, J. Mater. Sci. Mater. Med. 26 (2015) 86. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5425-3>.
- [7] P. Habibovic, J.E. Barralet, Bioinorganics and biomaterials: bone repair, Acta Biomater. 7 (2011) 3013–3026. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.027>.
- [8] L.L. Hench, The story of Bioglass®, J. Mater. Sci. Mater. Med. 17 (2006) 967–978. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>.
- [9] J.R. Jones, Review of bioactive glass: from Hench to hybrids, Acta Biomater. 23 (2015) 53–82. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.019>.
- [10] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castaño, J.A. Planell, Biomaterials in orthopaedics, J. R. Soc. Interface. 5 (2008) 1137–1158. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0151>.
- [11] A. Hoppe, N.S. Güldal, A.R. Boccaccini, A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, Biomaterials. 32 (2011) 2757–2774. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.004>.
- [12] R.L. Siqueira, E.D. Zanotto, Biosilicato®: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade, Quim. Nova. 34 (2011) 1231–1241. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000700023>.
- [13] L. Cormier, Nucleation in Glasses – new experimental findings and recent theories, Procedia Mater. Sci. 7 (2014) 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.mspro.2014.10.009>.
- [14] W.H. Zachariasen, The atomic arrangement in glass, J. Am. Chem. Soc. 54 (1932) 3841–3851. <https://doi.org/10.1021/ja01349a006>.

- [15] S. Mukhopadhyay, Bioactive glass-ceramics, Elsevier, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102203-0.00006-8>.
- [16] D. Liu, Bioactive glass-ceramic: formation, characterization and bioactivity, *Mater. Chem. Phys.* 36 (1994) 294–303. [https://doi.org/10.1016/0254-0584\(94\)90045-0](https://doi.org/10.1016/0254-0584(94)90045-0).
- [17] J. Chakraborty, D. Basu, Bioceramics - a new era, *Trans. Indian Ceram. Soc.* 64 (2005) 171–192. <https://doi.org/10.1080/0371750X.2005.11012210>.
- [18] X. Chatzistavrou, P. Newby, A.R. Boccaccini, Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering, *Bioact. Glas. Mater. Prop. Appl.* 3 (2010) 3867–3910. <https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-768-6.50005-3>.
- [19] P.N. De Aza, A.H. De Aza, P. Pena, S. De Aza, Cerámica y vidrio bioactive glasses and glass-ceramics, *Bol. Soc. Esp. Ceram Vidr.* 46 (2007) 45–55.
- [20] L.L. Hench, Bioactive glasses and glass-ceramics, *Mater. Sci. Forum.* 293 (1998) 37–64. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.293.37>.
- [21] P. Jha, S.S. Danewalia, G. Sharma, K. Singh, Antimicrobial and bioactive phosphate-free glass–ceramics for bone tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 86 (2018) 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.01.002>.
- [22] J.K.M.F. Daguano, C. dos Santos, P.A. Suzuki, L.A. Bicalho, M.H.F.V. Fernandes, Improvement of the mechanical properties of glasses based on the 3CaO.P2O5-SiO2-MgO system after heat-treatment, *Mater. Sci. Forum.* 636–637 (2010) 41–46. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.636-637.41>.
- [23] N.A.F. Almeida, M.H.F.V. Fernandes, Effect of glass ceramic crystallinity on the formation of simulated apatite layers, *Mater. Sci. Forum.* 514–516 (2006) 1039–1043. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.514-516.1039>.
- [24] S. Chakraborty, R.K. Chaturvedi, R. Pyare, In vitro characterisation and microstructure of B2O3/P2O5 doped bioactive spodumene glass–ceramics, *Adv. Appl. Ceram.* 106 (2007) 216–221. <https://doi.org/10.1179/174367607X159356>.
- [25] B. Thavornyutikarn, B. Feltis, P.F.A. Wright, T.W. Turney, Effect of pre-treatment of crystallized bioactive glass with cell culture media on structure, degradability, and biocompatibility, *Mater. Sci. Eng. C.* 97 (2019) 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.034>.
- [26] H.C. Li, D.G. Wang, J.H. Hu, C.Z. Chen, Crystallization, mechanical properties and in vitro bioactivity of sol–gel derived Na2O–CaO–SiO2–P2O5 glass–ceramics by partial substitution of CaF2 for CaO, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 67 (2013) 56–65.

- <https://doi.org/10.1007/s10971-013-3050-5>.
- [27] P. Guanabara, A.C.M. Rodrigues, O. Peitl, Bioactivity study of glass-ceramics with various crystalline fractions obtained by controlled crystallization, *Mater. Sci. Eng. C*. 24 (2004) 689–691. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2004.08.012>.
  - [28] M. Plewinski, K. Schickle, M. Lindner, A. Kirsten, M. Weber, H. Fischer, The effect of crystallization of bioactive bioglass 45S5 on apatite formation and degradation, *Dent. Mater.* 29 (2013) 1256–1264. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.09.016>.
  - [29] J.K.M.F. Daguano, K. Strecker, E.C. Ziemath, S.O. Rogero, M.H. V Fernandes, C. Santos, Effect of partial crystallization on the mechanical properties and cytotoxicity of bioactive glass from the 3CaO.P2O5-SiO2-MgO system, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 14 (2012) 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.04.024>.
  - [30] S. Sasikumar, L. Ravy, Influence of needle-like morphology on the bioactivity of nanocrystalline wollastonite &ndash; an in vitro study, *Int. J. Nanomedicine*. 10 (2015) 129. <https://doi.org/10.2147/IJN.S79986>.
  - [31] F.A. Shah, P. Thomsen, A. Palmquist, Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface, *Acta Biomater.* 84 (2019) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.018>.
  - [32] L. Lefebvre, J. Chevalier, L. Gremillard, R. Zenati, G. Thollet, D. Bernache-Assolant, A. Govin, Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments, *Acta Mater.* 55 (2007) 3305–3313. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2007.01.029>.
  - [33] N. Kanchanarat, S. Bandyopadhyay-Ghosh, I.M. Reaney, I.M. Brook, P. V. Hatton, Microstructure and mechanical properties of fluorcanasite glass-ceramics for biomedical applications, *J. Mater. Sci.* 43 (2008) 759–765. <https://doi.org/10.1007/s10853-007-2180-y>.
  - [34] A.R. Molla, B. Basu, Microstructure, mechanical, and in vitro properties of mica glass-ceramics with varying fluorine content, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20 (2009) 869–882. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3643-7>.
  - [35] E. Prado Ferraz, G. Pereira Freitas, M. Camuri Crovace, O. Peitl, E. Dutra Zanotto, P.T. de Oliveira, M. Mateus Beloti, A. Luiz Rosa, Bioactive-glass ceramic with two crystalline phases (BioS-2P) for bone tissue engineering, *Biomed. Mater.* 12 (2017) 045018. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa768e>.
  - [36] J. Massera, S. Fagerlund, L. Hupa, M. Hupa, Crystallization mechanism of the bioactive glasses, 45S5 and S53P4, *J. Am. Ceram. Soc.* 95 (2012) 607–613.

- <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2011.05012.x>.
- [37] J.K.M.B. Daguano, M.T.B. Milesi, A.C.D. Rodas, A.F. Weber, J.E.S. Sarkis, M.A. Hortellani, E.D. Zanotto, In vitro biocompatibility of new bioactive lithia-silica glass-ceramics, *Mater. Sci. Eng. C.* 94 (2019) 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.006>.
  - [38] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3, *J. Biomed. Mater. Res.* 24 (1990) 721–734. <https://doi.org/10.1002/jbm.820240607>.
  - [39] F. Baghbani, F. Moztarzadeh, M. Mozafari, M. Raz, H. Rezvani, Production and characterization of a Ag- and Zn-doped glass-ceramic material and in vitro evaluation of its biological effects, *J. Mater. Eng. Perform.* 25 (2016) 3398–3408. <https://doi.org/10.1007/s11665-016-2156-7>.
  - [40] C.R. Mariappan, N. Ranga, Influence of silver on the structure, dielectric and antibacterial effect of silver doped bioglass-ceramic nanoparticles, *Ceram. Int.* 43 (2017) 2196–2201. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.11.003>.
  - [41] M. Saini, Implant biomaterials: a comprehensive review, *World J. Clin. Cases.* 3 (2015) 52. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i1.52>.
  - [42] W. Wu, R. Cheng, J. das Neves, J. Tang, J. Xiao, Q. Ni, X. Liu, G. Pan, D. Li, W. Cui, B. Sarmiento, Advances in biomaterials for preventing tissue adhesion, *J. Control. Release.* 261 (2017) 318–336. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.06.020>.
  - [43] B.D. Ratner, S.J. Bryant, Biomaterials: where we have been and where we are going, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 6 (2004) 41–75. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140027>.
  - [44] M. Riaz, R. Zia, F. Saleemi, F. Bashir, T. Hossain, Z. Kayani, In vitro evaluation of bioactivity of SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-CaF<sub>2</sub>-ZnO glass-ceramics, *Mater. Sci.* 32 (2014) 364–374. <https://doi.org/10.2478/s13536-014-0206-0>.
  - [45] A. Kumar, C.R. Mariappan, B.S. Sarahan, Antibacterial and structural properties of mesoporous Ag doped calcium borosilicate glass-ceramics synthesized via a sol-gel route, *J. Non. Cryst. Solids.* 505 (2019) 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.11.024>.
  - [46] F.H. El-Batal, A.A. El-Kheshen, G.T. El-Bassyouni, A.A. Abd El Aty, In vitro bioactivity behavior of some borate glasses and their glass-ceramic derivatives containing Zn<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup> or Cu<sup>2+</sup> by immersion in Phosphate solution and their anti-

- microbial activity, *Silicon*. 10 (2018) 943–957. <https://doi.org/10.1007/s12633-017-9552-y>.
- [47] O. Lysenko, O. Dubok, A. Borysenko, O. Shinkaruk, The biological properties of the silver- and copper-doped ceramic biomaterial, *J. Nanoparticle Res.* 17 (2015) 178. <https://doi.org/10.1007/s11051-015-2971-z>.
- [48] A. Melaiye, W.J. Youngs, Silver and its application as an antimicrobial agent, *Expert Opin. Ther. Pat.* 15 (2005) 125–130. <https://doi.org/10.1517/13543776.15.2.125>.
- [49] A.E. McRee, Therapeutic review: silver, *J. Exot. Pet Med.* 24 (2015) 240–244. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2015.04.015>.
- [50] S. Chernousova, M. Epple, Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal, *Angew. Chemie Int. Ed.* 52 (2013) 1636–1653. <https://doi.org/10.1002/anie.201205923>.
- [51] J. Willian D. Callister, *Ciência e engenharia de materiais: uma introdução*, 8th ed., Rio de Janeiro, 2002.
- [52] N. Huebsch, D.J. Mooney, Inspiration and application in the evolution of biomaterials, *Nature*. 462 (2009) 426–432. <https://doi.org/10.1038/nature08601>.
- [53] V. Miguez-Pacheco, L.L. Hench, A.R. Boccaccini, Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft tissues, *Acta Biomater.* 13 (2015) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.11.004>.
- [54] J.E. Lemons, Ceramics: Past, present, and future, *Bone*. 19 (1996) S121–S128. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(96\)00128-7](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(96)00128-7).
- [55] M. Dang, L. Saunders, X. Niu, Y. Fan, P.X. Ma, Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering, *Bone Res.* 6 (2018) 25. <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0025-8>.
- [56] U. Ripamonti, N. Duneas, Tissue engineering of bone by osteoinductive biomaterials, *MRS Bull.* 21 (1996) 36–39. <https://doi.org/10.1557/S0883769400031833>.
- [57] T.L. Brown, E. LeMay, B. Bursten, J.R. Burdge, *Química - A Ciência Central*, 9th ed., São Paulo, 2005.
- [58] C. Gao, S. Peng, P. Feng, C. Shuai, Bone biomaterials and interactions with stem cells, *Bone Res.* 5 (2017) 17059. <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.59>.
- [59] H. Döring, C. Schmitt, R. Lutz, S. Eitner, K.A. Schlegel, Bone substitutes used for three-dimensional augmentation, *Int. J. Stomatol. Occlusion Med.* 6 (2013) 144–150. <https://doi.org/10.1007/s12548-011-0022-7>.
- [60] J. Patterson, M.M. Martino, J.A. Hubbell, Biomimetic materials in tissue engineering, *Mater. Today*. 13 (2010) 14–22. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(10\)70013-4](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(10)70013-4).

- [61] M. Catauro, F. Papale, G. Roviello, C. Ferone, F. Bollino, M. Trifuoggi, C. Aurilio, Synthesis of SiO<sub>2</sub> and CaO rich calcium silicate systems via sol-gel process: Bioactivity, biocompatibility, and drug delivery tests, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 102 (2014) 3087–3092. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34978>.
- [62] K.A. Hing, Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?, *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. A Math. Phys. Eng. Sci.* 362 (2004) 2821–2850. <https://doi.org/10.1098/rsta.2004.1466>.
- [63] A.J. Salgado, O.P. Coutinho, R.L. Reis, Bone tissue engineering: state of the art and future trends, *Macromol. Biosci.* 4 (2004) 743–765. <https://doi.org/10.1002/mabi.200400026>.
- [64] A.M.. Moore, Keith L; Dalley, Arthur F; Agur, Clinically oriented anatomy, 6 th ed, Rio de Janeiro, 2013.
- [65] N. Eliaz, N. Metoki, Calcium phosphate bioceramics: a review of neir their history, strcucture, properties, coating technologies and biomedical applications, *Materials (Basel)*. 10 (2017) 334. <https://doi.org/10.3390/ma10040334>.
- [66] R. Dimitriou, E. Tsiridis, P. V. Giannoudis, Current concepts of molecular aspects of bone healing, *Injury*. 36 (2005) 1392–1404. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.019>.
- [67] R. Cancedda, B. Dozin, P. Giannoni, R. Quarto, Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone, *Matrix Biol.* 22 (2003) 81–91. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(03\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(03)00012-X).
- [68] Z.S. Al-Aql, A.S. Alagl, D.T. Graves, L.C. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, Molecular mechanisms controlling bone fomrormation during fracture healing and distraction osteogenesis, *J. Dent. Res.* 87 (2008) 107–118. <https://doi.org/10.1177/154405910808700215>.
- [69] F.B. Miguel, A. de Almeida Barbosa Júnior, F.L. de Paula, I.C. Barreto, G. Goissis, F.P. Rosa, Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24 (2013) 2567–2575. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4980-8>.
- [70] H. V. Precheur, Bone graft materials, *Dent. Clin. North Am.* 51 (2007) 729–746. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2007.03.004>.
- [71] C. Nich, M. Hamadouche, Synthetic bone grafts: clinical use, in: *Compr. Biomater.*, Elsevier, 2011: pp. 335–347. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-055294-1.00214-2>.

- [72] E.Y. Kawachi, C.A. Bertran, R.R. dos Reis, O.L. Alves, Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar, *Quim. Nova.* 23 (2000) 518–522. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000400015>.
- [73] A. El-Ghannam, Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering, *Expert Rev. Med. Devices.* 2 (2005) 87–101. <https://doi.org/10.1586/17434440.2.1.87>.
- [74] J. Henkel, M.A. Woodruff, D.R. Epari, R. Steck, V. Glatt, I.C. Dickinson, P.F.M. Choong, M.A. Schuetz, D.W. Hutmacher, Bone regeneration based on tissue engineering conceptions — A 21st century perspective, *Bone Res.* 1 (2013) 216–248. <https://doi.org/10.4248/BR201303002>.
- [75] A. Palangkaraya, J. Yong, Population ageing and its implications on aggregate health care demand: empirical evidence from 22 OECD countries, *Int. J. Health Care Finance Econ.* 9 (2009) 391–402. <https://doi.org/10.1007/s10754-009-9057-3>.
- [76] S. Gangadoo, J. Chapman, Emerging biomaterials and strategies for medical applications: a review, *Mater. Technol.* 30 (2015) B3–B7. <https://doi.org/10.1179/1753555714Y.0000000206>.
- [77] B. Basu, D.S. Katti, A. Kumar, *Advanced biomaterials*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2009. <https://doi.org/10.1002/9780470891315>.
- [78] M.N. Rahaman, D.E. Day, B. Sonny Bal, Q. Fu, S.B. Jung, L.F. Bonewald, A.P. Tomsia, Bioactive glass in tissue engineering, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2355–2373. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.016>.
- [79] C.H.G. Martins, T.C. Carvalho, M.G.M. Souza, C. Ravagnani, O. Peitl, E.D. Zanotto, H. Panzeri, L.A. Casemiro, Assessment of antimicrobial effect of Biosilicate® against anaerobic, microaerophilic and facultative anaerobic microorganisms, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (2011) 1439–1446. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4330-7>.
- [80] G. Jell, M.M. Stevens, Gene activation by bioactive glasses, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 997–1002. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0435-9>.
- [81] I.O. Alves, Oswaldo Luiz; Gimenez, Iara de Fátima; Mazali, Vidros, *Cad. Temáticos Química Nov. Na Esc.* (2001) 13–24.
- [82] C. Rüssel, Introduction to Glass Science and Technology, *Zeitschrift Für Phys. Chemie.* (1999). [https://doi.org/10.1524/zpch.1999.208.Part\\_1\\_2.292](https://doi.org/10.1524/zpch.1999.208.Part_1_2.292).
- [83] E.D. Zanotto, J.C. Mauro, The glassy state of matter: its definition and ultimate fate, *J. Non. Cryst. Solids.* (2017) 490–495. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2017.05.019>.
- [84] P.P. de Souza, G.G. Silva, L.O.F. Amaral, O Cotidiano é meio amorfo: transição vítrea,

- Química Nov. Na Esc. 20 (2004) 21–25.
- [85] F. Baino, Bioactive glasses – When glass science and technology meet regenerative medicine, *Ceram. Int.* 44 (2018) 14953–14966. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.05.180>.
  - [86] D.S. Brauer, Bioactive glasses - structure and properties, *Angew. Chemie Int. Ed.* 54 (2015) 4160–4181. <https://doi.org/10.1002/anie.201405310>.
  - [87] L.L. Hench, Opening paper 2015- some comments on bioglass: four eras of discovery and development, *Biomed. Glas.* 1 (2015) 1–11. <https://doi.org/10.1515/bglass-2015-0001>.
  - [88] L.L. Hench, N. Roki, M.B. Fenn, Bioactive glasses: importance of structure and properties in bone regeneration, *J. Mol. Struct.* 1073 (2014) 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.066>.
  - [89] M. Bohner, J. Lemaitre, Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?, *Biomaterials.* 30 (2009) 2175–2179. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.008>.
  - [90] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials.* 27 (2006) 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
  - [91] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, A review of the clinical implications of anti-infective biomaterials and infection-resistant surfaces, *Biomaterials.* 34 (2013) 8018–8029. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.048>.
  - [92] C. Joo, U. Werner-Zwanziger, J.W. Zwanziger, The ring structure of boron trioxide glass, *J. Non. Cryst. Solids.* 261 (2000) 282–286. [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(99\)00609-2](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(99)00609-2).
  - [93] L. Lefebvre, L. Gremillard, J. Chevalier, R. Zenati, D. Bernache-Assolant, Sintering behaviour of 45S5 bioactive glass, *Acta Biomater.* 4 (2008) 1894–1903. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.05.019>.
  - [94] 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: Na<sub>2</sub>O-CaO-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and NaF-CaF<sub>2</sub>-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, *Ceram. Int.* 42 (2016) 8247–8256. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.02.037>.
  - [95] F.H. Nielsen, The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle, *Nutrition.* 16 (2000) 512–514. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00324-5](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00324-5).
  - [96] L.L. Hench, Biomaterials: a forecast for the future, *Biomaterials.* 19 (1998) 1419–1423. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00133-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00133-1).

- [97] J.A. Juhasz, S.M. Best, Bioactive ceramics: processing, structures and properties, *J. Mater. Sci.* 47 (2012) 610–624. <https://doi.org/10.1007/s10853-011-6063-x>.
- [98] J.A. Juhasz, S.M. Best, Bioactive ceramics: processing, structures and properties, *J. Mater. Sci.* 47 (2012) 610–624. <https://doi.org/10.1007/s10853-011-6063-x>.
- [99] R.M. Day, A.R. Boccaccini, Effect of particulate bioactive glasses on human macrophages and monocytes in vitro, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 73A (2005) 73–79. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30262>.
- [100] M. Montazerian, E.D. Zanotto, A guided walk through Larry Hench's monumental discoveries, *J. Mater. Sci.* 52 (2017) 8695–8732. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0804-4>.
- [101] J.K.M.F. Daguano, P.A. Suzuki, K. Strecker, J.M.M. de Oliveira, M.H.F. Vaz Fernandes, C. Santos, Development and characterization of 3CaO·P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO glass-ceramics with different crystallization degree, *J. Adv. Ceram.* 2 (2013) 378–388. <https://doi.org/10.1007/s40145-013-0086-5>.
- [102] N. Sharmin, C.D. Rudd, Structure, thermal properties, dissolution behaviour and biomedical applications of phosphate glasses and fibres: a review, *J. Mater. Sci.* 52 (2017) 8733–8760. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0784-4>.
- [103] E. Verné, S. Ferraris, M. Miola, G. Fucile, G. Maina, G. Martinasso, R.A. Canuto, S. Di Nunzio, C. Vitale-Brovarone, Synthesis and characterisation of bioactive and antibacterial glass-ceramic Part 1 – Microstructure, properties and biological behaviour, *Adv. Appl. Ceram.* 107 (2008) 234–244. <https://doi.org/10.1179/174367508X306532>.
- [104] M. Lauri, G. Leite, Cristalização e sinterização de Bio-vidros do sistema Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, *J. Mater.* 17 (2006) 2503–2503.
- [105] N. Karpukhina, R.G. Hill, R. V. Law, Crystallisation in oxide glasses – a tutorial review, *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 2174–2186. <https://doi.org/10.1039/C3CS60305A>.
- [106] E.D. Zanotto, Glass crystallization research - A 36-year retrospective. Part II, methods of study and glass-ceramics, *Int. J. Appl. Glas. Sci.* 4 (2013) 117–124. <https://doi.org/10.1111/ijag.12024>.
- [107] K. Sharma, S.S. Meena, S. Saxena, S.M. Yusuf, A. Srinivasan, G.P. Kothiyal, Structural and magnetic properties of glass-ceramics containing silver and iron oxide, *Mater. Chem. Phys.* 133 (2012) 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.12.085>.
- [108] J. Deubener, M. Allix, M.J. Davis, A. Duran, T. Höche, T. Honma, T. Komatsu, S. Krüger, I. Mitra, R. Müller, S. Nakane, M.J. Pascual, J.W.P. Schmelzer, E.D. Zanotto,

- S. Zhou, Updated definition of glass-ceramics, *J. Non. Cryst. Solids*. 501 (2018) 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.01.033>.
- [109] P. Callejas, J.M. Rincón, *Materiales vitrocerámicos: El proceso vitrocerámico*, 32 (1993) 157–167.
- [110] W. Vogel, *Glass chemistry*, in: *Clim. Chang. 2013 - Phys. Sci. Basis*, 3 ed, Cambridge University Press, Cambridge, 1989. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [111] J. Deubener, W. Höland, Editorial: Nucleation and Crystallization of Glasses and Glass-Ceramics, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmats.2017.00014>.
- [112] A.M. Rodrigues, L.D. Silva, R. Zhang, V.O. Soares, Structural effects on glass stability and crystallization, *CrystEngComm*. 20 (2018) 2278–2283. <https://doi.org/10.1039/C7CE02135F>.
- [113] S. Banijamali, B.E. Yekta, A.R. Aghaei, The effect of ionic and metallic silver on the crystalline phases developed in CaO-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-TiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glasses, *J. Non. Cryst. Solids*. 358 (2012) 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2011.09.026>.
- [114] S. Aravindan, V. Rajendran, N. Rajendran, Influence of Ag<sub>2</sub>O on crystallisation and structural modifications of phosphate glasses, *Phase Transitions*. 85 (2012) 630–649. <https://doi.org/10.1080/01411594.2011.639013>.
- [115] J.C. Mauro, E.D. Zanotto, Two centuries of glass research: historical trends, current status, and grand challenges for the future, *Int. J. Appl. Glas. Sci.* 5 (2014) 313–327. <https://doi.org/10.1111/ijag.12087>.
- [116] W. Höland, G.H. Beall, *Glass-ceramics*, in: *Handb. Adv. Ceram.*, Elsevier, 2013: pp. 371–381. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385469-8.00021-6>.
- [117] G. Kaur, V. Kumar, F. Baino, J.C. Mauro, G. Pickrell, I. Evans, O. Bretcanu, Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: state-of-the-art review and future challenges, *Mater. Sci. Eng. C*. 104 (2019) 109895. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109895>.
- [118] M. Montazerian, E. Dutra Zanotto, History and trends of bioactive glass-ceramics, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 104 (2016) 1231–1249. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35639>.
- [119] J. PARK, A. OZTURK, Bioactivity of apatite-wollastonite glass-ceramics produced by melting casting, *Surf. Rev. Lett.* 20 (2013) 1350010. <https://doi.org/10.1142/S0218625X13500108>.
- [120] A. Hoppe, E. Boccardi, F.E. Ciraldo, A.R. Boccaccini, R.G. Hill, Bioactive Glass-

- Ceramics, in: *Compr. Biomater.* II, Elsevier, 2017: pp. 235–243. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10238-3>.
- [121] M.N. Capela, D.M. Tobaldi, C. Oliveira, A. Pereira, A.S. Duarte, M.P. Seabra, M.H.V. Fernandes, Bioactivity and antibacterial activity against E-coli of calcium-phosphate-based glasses: effect of silver content and crystallinity, *Ceram. Int.* 43 (2017) 13800–13809. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.07.100>.
- [122] D.E. Marx, D.J. Barillo, Silver in medicine: the basic science, *Burns.* 40 (2014) S9–S18. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.09.010>.
- [123] G. Duarte de Souza, M. Aparecida Rodrigues, P. Pereira Silva, W. Guerra, Prata: breve histórico, propriedades e aplicações, *Educ. Química.* 24 (2013) 14–16. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)73189-6](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)73189-6).
- [124] A. Melaiye, W.J. Youngs, Silver and its application as an antimicrobial agent, *Expert Opin. Ther. Pat.* 15 (2005) 125–130. <https://doi.org/10.1517/13543776.15.2.125>.
- [125] R.D. Glover, J.M. Miller, J.E. Hutchison, Generation of metal nanoparticles from silver and copper objects: nanoparticle dynamics on surfaces and potential sources of nanoparticles in the environment, *ACS Nano.* 5 (2011) 8950–8957. <https://doi.org/10.1021/nn2031319>.
- [126] R. White, K. Cutting, Exploring the effects of silver in wound management - what is optimal?, *Wounds.* 18 (2006) 307–314.
- [127] J.W. Alexander, History of the medical use of silver, *Surg. Infect. (Larchmt).* 10 (2009) 289–292. <https://doi.org/10.1089/sur.2008.9941>.
- [128] R. White, Silver in healthcare: antimicrobial effects and safety in use, *J. Wound Care.* 20 (2011) 26–26. <https://doi.org/10.12968/jowc.2011.20.1.26>.
- [129] A.D. Russell, W.B. Hugo, Antimicrobial activity and action of silver, *Prog. Med. Chem.* 31 (1994) 351–370. [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)70024-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70024-9).
- [130] R.B. Thurman, C.P. Gerba, G. Bitton, The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses, *Crit. Rev. Environ. Control.* 18 (1989) 295–315. <https://doi.org/10.1080/10643388909388351>.
- [131] R.J. White, An historical overview of the use of silver in wound management, *Br. J. Community Nurs.* 6 (2001) 3–8. <https://doi.org/10.12968/bjcn.2001.6.Sup1.12619>.
- [132] G. Gravante, R. Caruso, R. Sorge, F. Nicoli, P. Gentile, V. Cervelli, Nanocrystalline Silver, *Ann. Plast. Surg.* 63 (2009) 201–205. <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e3181893825>.

- [133] R.M. Slawson, H. Lee, J.T. Trevors, Bacterial interactions with silver, *Biol. Met.* 3 (1990) 151–154. <https://doi.org/10.1007/BF01140573>.
- [134] P.D. Bragg, D.J. Rainnie, The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*, *Can. J. Microbiol.* 20 (1974) 883–889. <https://doi.org/10.1139/m74-135>.
- [135] A.B.G. Lansdown, Silver: its antibacterial properties and mechanism of action, *J. Wound Care.* 11 (2002) 125–130. <https://doi.org/10.12968/jowc.2002.11.4.26389>.
- [136] A. V. Legler, A.S. Kazachenko, V.I. Kazbanov, O. V. Per'yanova, O.F. Veselova, Synthesis and antimicrobial activity of silver complexes with arginine and glutamic acid, *Pharm. Chem. J.* 35 (2001) 501–503. <https://doi.org/10.1023/A:1014098810078>.
- [137] K. Vasilev, J. Cook, H.J. Griesser, Antibacterial surfaces for biomedical devices, *Expert Rev. Med. Devices.* 6 (2009) 553–567. <https://doi.org/10.1586/erd.09.36>.
- [138] A.M. Fayad, M.A. Marzouk, F.H. El-Batal, Bioactivity behavior of Ag<sub>2</sub>O or CuO doped in glass systems of Na<sub>2</sub>O-CaF<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and Na<sub>2</sub>O-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and their glass-ceramic derivatives assessed by FTIR, X-ray diffraction and SEM measurements, *SN Appl. Sci.* 1 (2019) 203. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0215-z>.
- [139] M.A. Marzouk, F.H. ElBatal, N.A. Ghoneim, In vitro bioactivity behavior of modified multicomponent borate glasses containing dopants of Ag<sub>2</sub>O, CuO, CeO<sub>2</sub> or V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 124 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00339-017-1526-9>.
- [140] M. Diba, A.R. Boccaccini, Silver-containing bioactive glasses for tissue engineering applications, in: *Precious Met. Biomed. Appl.*, Elsevier, 2014: pp. 177–211. <https://doi.org/10.1533/9780857099051.2.177>.
- [141] L. Haas, C. Smith, L. Placek, M. Hall, Y. Gong, N. Mellott, A.W. Wren, Investigating the effect of silver coating on the solubility, antibacterial properties, and cytocompatibility of glass microspheres, *J. Biomater. Appl.* 30 (2015) 450–462. <https://doi.org/10.1177/0885328215591902>.
- [142] H. Zhu, C. Hu, F. Zhang, X. Feng, J. Li, T. Liu, J. Chen, J. Zhang, Preparation and antibacterial property of silver-containing mesoporous 58S bioactive glass, *Mater. Sci. Eng. C.* 42 (2014) 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.004>.
- [143] A.A. Ahmed, A.A. Ali, D.A.R. Mahmoud, A.M. El-Fiqi, Preparation and characterization of antibacterial P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O-Ag<sub>2</sub>O glasses, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 98A (2011) 132–142. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33101>.
- [144] 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.* 95B (2010) 441–448. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31735>.
- [145] S.P. Valappil, D.M. Pickup, D.L. Carroll, C.K. Hope, J. Pratten, R.J. Newport, M.E. Smith, M. Wilson, J.C. Knowles, Effect of Silver Content on the Structure and Antibacterial Activity of Silver-Doped Phosphate-Based Glasses, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 4453–4461. <https://doi.org/10.1128/AAC.00605-07>.
- [146] 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 anti-bacterial activity, *J. Non. Cryst. Solids.* 505 (2019) 438–446. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.11.026>.
- [147] J. Coelho, S.H. Nandyala, P.S. Gomes, P. Sampaio, A.P. Pacheco, O.C. Nunes, M.A. Lopes, M.H. Fernandes, J.D. Santos, Development and characterization of Ag<sub>2</sub>O-doped ZnLB glasses and biological assessment of Ag<sub>2</sub>O-ZnLB-hydroxyapatite composites, *J. Am. Ceram. Soc.* 95 (2012) 2732–2740. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2012.05187.x>.
- [148] D. Guldiren, S. Aydin, Characterization and antimicrobial properties of soda lime glass prepared by silver/sodium ion exchange, *Mater. Sci. Eng. C.* 67 (2016) 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.109>.
- [149] M.T. Souza, L.A. Campanini, C.R. Chinaglia, O. Peitl, E.D. Zanotto, C.W.O. Souza, Broad-spectrum bactericidal activity of a new bioactive grafting material (F18) against clinically important bacterial strains, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 50 (2017) 730–733. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.08.015>.
- [150] M.N. Capela, D.M. Tobaldi, C. Oliveira, A. Pereira, A.S. Duarte, M.P. Seabra, M.H.V. Fernandes, Bioactivity and antibacterial activity against E-coli of calcium-phosphate-based glasses: effect of silver content and crystallinity, *Ceram. Int.* 43 (2017) 13800–13809. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.07.100>.
- [151] A. Balamurugan, G. Balossier, D. Laurent-Maquin, S. Pina, A.H.S. Rebelo, J. Faure, J.M.F. Ferreira, An in vitro biological and anti-bacterial study on a sol–gel derived silver-incorporated bioglass system, *Dent. Mater.* 24 (2008) 1343–1351. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.02.015>.
- [152] E. Mendes, R. Piletti, T. Barichello, C.M. Oliveira, C.T. Kniess, E. Angioletto, H.G. Riella, M.A. Fiori, The influence of particle size and AgNO<sub>3</sub> concentration in the ionic

- exchange process on the fungicidal action of antimicrobial glass, *Mater. Sci. Eng. C*. 32 (2012) 1518–1523. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.04.035>.
- [153] F. Sharifianjazi, N. Parvin, M. Tahriri, Synthesis and characteristics of sol-gel bioactive SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO-Ag<sub>2</sub>O glasses, *J. Non. Cryst. Solids*. 476 (2017) 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2017.09.035>.
- [154] K. Magyari, R. Stefan, D.C. Vodnar, A. Vulpoi, L. Baia, The silver influence on the structure and antibacterial properties of the bioactive 10B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-30Na<sub>2</sub>O-60P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glass, *J. Non. Cryst. Solids*. 402 (2014) 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2014.05.033>.
- [155] A.M. El-Kady, A.F. Ali, R.A. Rizk, M.M. Ahmed, Synthesis, characterization and microbiological response of silver doped bioactive glass nanoparticles, *Ceram. Int.* 38 (2012) 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.05.158>.
- [156] 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. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.08.007>.
- [157] J.R. Swathy, M.U. Sankar, A. Chaudhary, S. Aigal, Anshup, T. Pradeep, Antimicrobial silver: an unprecedented anion effect, *Sci. Rep.* 4 (2015) 7161. <https://doi.org/10.1038/srep07161>.
- [158] P.S. Valle, M. Montesso, M. Nalin, J.P. Donoso, I.D.A. Silva, C.J. Magon, Influência dos precursores de prata no crescimento de nanopartículas metálicas em vidros óxidos de metais pesados, *Quim. Nova*. 36 (2013) 967–971. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000700008>.
- [159] S. Taruta, A. Mizoguchi, T. Yamakami, T. Yamaguchi, Formation of Ag nanoparticles in transparent mica glass-ceramics, *J. Non. Cryst. Solids*. 455 (2017) 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2016.10.016>.
- [160] M.S.K. Mubina, S. Shailajha, R. Sankaranarayanan, L. Saranya, In vitro bioactivity, mechanical behavior and antibacterial properties of mesoporous SiO<sub>2</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> nano bioactive glass ceramics, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 100 (2019) 103379. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.103379>.
- [161] M. Ionashiro, F. Caires, D. Gomes, Fundamentos da termogravimetria e análise térmica diferencial/calorimetria exploratória diferencial, 2nd ed., São Paulo, 2014.
- [162] J. Seto, P.A. Romero, Shaping it up: desing and engineering of biominerals and

- crystalline materials from the bottom up, in: *Biominer. Biomater.*, Elsevier, 2016: pp. 3–50. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-338-6.00002-8>.
- [163] S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, J.-P. Laval, Determination of calcium/phosphorus atomic ratio of calcium phosphate apatites using X-ray diffractometry, *J. Am. Ceram. Soc.* 84 (2004) 359–66. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.2001.tb00663.x>.
- [164] S. Krimm, A. V Tobolsky, Quantitative x-ray studies of order in amorphous and crystalline polymers. Quantitative x-ray determination of crystallinity in polyethylene, *J. Polym. Sci.* 7 (1951) 57–76. <https://doi.org/10.1002/pol.1951.120070105>.
- [165] S.A. Khan, S.B. Khan, L.U. Khan, A. Farooq, K. Akhtar, A.M. Asiri, Fourier transform infrared spectroscopy: Fundamentals and application in functional groups and nanomaterials characterization, *Handb. Mater. Charact.* (2018) 317–344. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_9).
- [166] D.E. Gaffney, Jeffrey S; Marley, Nancy A; Jones, Fourier Transform Infrared Spectroscopy Fourier Transform Infrared ( FTIR ), in: *Charact. Mater.*, USA, 2012: pp. 1105–1135.
- [167] E.M.A. Khalil, R.A. Youness, M.S. Amer, M.A. Taha, Mechanical properties, in vitro and in vivo bioactivity assessment of  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$  glass-ceramics, *Ceram. Int.* 44 (2018) 7867–7876. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.01.222>.
- [168] U.B. Chanshetti, V.A. Shelke, S.M. Jadhav, S.G. Shankarwar, T.K. Chondhekar, A.G. Shankarwar, V. Sudarsan, M.S. Jogad, Density and molar volume studies of phosphate glasses, *Facta Univ. - Ser. Physics, Chem. Technol.* 9 (2011) 29–36. <https://doi.org/10.2298/fupct1101029c>.
- [169] J.K.M. de F. Daguano, Biovidros e vitrocerâmicos bioativos do sistema  $3\text{CaO}.\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2-\text{MgO}$  para aplicações biomédicas: processamento e caracterizações estruturais, mecânicas e biológicas, (Tese de doutorado) Universidade de São Paulo (USP), 2011.
- [170] S. Inaba, S. Fujino, Empirical equation for calculating the density of oxide glasses, *J. Am. Ceram. Soc.* 93 (2010) 217–220. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2009.03363.x>.
- [171] 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. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34690>.

- [172] T. Winkler, F.A. Sass, G.N. Duda, K. Schmidt-Bleek, A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering, *Bone Joint Res.* 7 (2018) 232–243. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.73.bjr-2017-0270.r1>.
- [173] A. Mirza, M. Riaz, R. Zia, T. Hussain, F. Bashir, Effect of temperature on mechanical and bioactive properties of glass-ceramics, *J. Alloys Compd.* 726 (2017) 348–351. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.07.285>.
- [174] S.F. Costa, Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão : norma aprovada, 2005.
- [175] H.C. Li, D.G. Wang, J.H. Hu, C.Z. Chen, Effect of various additives on microstructure, mechanical properties, and in vitro bioactivity of sodium oxide-calcium oxide-silica-phosphorus pentoxide glass-ceramics, *J. Colloid Interface Sci.* 405 (2013) 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.04.046>.
- [176] J.-H. Jean, C.-R. Chang, C.-D. Lei, Sintering of a Crystallizable CaO-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> Glass with Silver, *J. Am. Ceram. Soc.* 87 (2004) 1244–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.2004.tb07718.x>.
- [177] T. Komatsu, Design and control of crystallization in oxide glasses, *J. Non. Cryst. Solids.* 428 (2015) 156–175. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2015.08.017>.
- [178] J.-H. Jean, C.-R. Chang, C.-D. Lei, Sintering of a Crystallizable CaO-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> Glass with Silver, *J. Am. Ceram. Soc.* 87 (2004) 1244–1249. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.2004.tb07718.x>.
- [179] 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, W.H. Huang, K.L. Lin, J. Chang, Strontium borate glass: potential biomaterial for bone regeneration, *J. R. Soc. Interface.* 7 (2010) 1025–1031. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0504>.
- [180] J. Ning, A. Yao, D. Wang, W. Huang, H. Fu, X. Liu, X. Jiang, X. Zhang, Synthesis and in vitro bioactivity of a borate-based bioglass, *Mater. Lett.* 61 (2007) 5223–5226. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.04.089>.
- [181] 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-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ZnO bioactive glasses, *Sci. Rep.* 4 (2015) 4392. <https://doi.org/10.1038/srep04392>.
- [182] T. Satyanarayana, M.V. Babu, G. Nagarjuna, D.V.R. Koti Reddy, P.V. Rao, P.S. Prasad,

- Structural investigations on P2O5-CaO-Na2O-K2O: SrO bioactive glass ceramics, *Ceram. Int.* 43 (2017) 10144–10150. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.05.037>.
- [183] P. Intawin, S. Eitssayeam, T. Tunkasiri, K. Pengpat, Crystallization kinetics and heat treatment temperature on microstructure and properties of Na2O-CaO-P2O5 bioactive glass system, *Ceram. Int.* 44 (2018) S203–S206. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.08.114>.
- [184] A. El-Ghannam, E. Hamazawy, A. Yehia, Effect of thermal treatment on bioactive glass microstructure, corrosion behavior, potential zeta, and protein adsorption, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 387–395. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20010605\)55:3<387::AID-JBM1027>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20010605)55:3<387::AID-JBM1027>3.0.CO;2-V).
- [185] J.K.M.F. Daguano, S.O. Rogero, M.C. Crovace, O. Peitl, K. Strecker, C. dos Santos, Bioactivity and cytotoxicity of glass and glass–ceramics based on the 3CaO·P2O5-SiO2-MgO system, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24 (2013) 2171–2180. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4972-8>.
- [186] I. Denry, Elastic constants, vickers hardness, and fracture toughness of fluorrichterite-based glass-ceramics, *Dent. Mater.* 20 (2004) 213–219. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(03\)00094-0](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(03)00094-0).
- [187] M. Riaz, R. Zia, A. Mirza, T. Hussain, F. Bashir, S. Anjum, Synthesis, characterization of CaF<sub>2</sub> doped silicate glass-ceramics, *Mater. Sci. Eng. C.* 75 (2017) 872–876. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.141>.
- [188] S.M. Abo-Naf, E.-S.M. Khalil, E.-S.M. El-Sayed, H.A. Zayed, R.A. Youness, In vitro bioactivity evaluation, mechanical properties and microstructural characterization of Na2O–CaO–B2O3–P2O5 glasses, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 144 (2015) 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.02.076>.
- [189] Manupriya, K.S. Thind, G. Sharma, V. Rajendran, K. Singh, A. V. Gayathri Devi, S. Aravindan, Structural and acoustic investigations of calcium borate glasses, *Phys. Status Solidi.* 203 (2006) 2356–2364. <https://doi.org/10.1002/pssa.200622140>.
- [190] Y. Cheng, H. Xiao, W. Guo, W. Guo, Structure and crystallization kinetics of PbO-B2O3 glasses, *Ceram. Int.* 33 (2007) 1341–1347. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2006.04.025>.
- [191] H.A. ElBatal, A.A. El-Kheshen, N.A. Ghoneim, M.A. Marzouk, F.H. ElBatal, A.M. Fayad, A.M. Abdelghany, A.A. El-Beih, In vitro bioactivity behavior of some borophosphate glasses containing dopant of ZnO, CuO or SrO together with their glass-

- ceramic derivatives and their antimicrobial activity, *Silicon*. 11 (2019) 197–208. <https://doi.org/10.1007/s12633-018-9845-9>.
- [192] M.A. Marzouk, F.H. ElBatal, N.A. Ghoneim, In vitro bioactivity behavior of modified multicomponent borate glasses containing dopants of Ag<sub>2</sub>O, CuO, CeO<sub>2</sub> or V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, *Appl. Phys. A*. 124 (2018) 110. <https://doi.org/10.1007/s00339-017-1526-9>.
- [193] J.R.J. Delben, O.M. Pimentel, M.B. Coelho, P.D. Candelario, L.N. Furini, F. Alencar dos Santos, F.S. de Vicente, A.A.S.T. Delben, Synthesis and thermal properties of nanoparticles of bioactive glasses containing silver, *J. Therm. Anal. Calorim.* 97 (2009) 433–436. <https://doi.org/10.1007/s10973-009-0086-4>.
- [194] A. Karamanov, M. Pelino, Induced crystallization porosity and properties of sintered diopside and wollastonite glass-ceramics, *J. Eur. Ceram. Soc.* 28 (2008) 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2007.08.001>.
- [195] A. Karamanov, M. Pelino, Sinter-crystallization in the diopside–albite system, *J. Eur. Ceram. Soc.* 26 (2006) 2519–2526. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2005.12.007>.
- [196] A. Yao, M.N. Rahaman, J. Lin, W. Huang, Structure and crystallization behavior of borate-based bioactive glass, *J. Mater. Sci.* 42 (2007) 9730–9735. <https://doi.org/10.1007/s10853-007-1995-x>.
- [197] I. Kansal, A. Goel, D.U. Tulyaganov, M.J. Pascual, H.-Y. Lee, H.-W. Kim, J.M.F. Ferreira, Diopside (CaO·MgO·2SiO<sub>2</sub>)–fluorapatite (9CaO·3P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>·CaF<sub>2</sub>) glass-ceramics: potential materials for bone tissue engineering, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 16247. <https://doi.org/10.1039/c1jm11876e>.
- [198] A.V. Gayathri Devi, V. Rajendran, N. Rajendran, Structure, solubility and bioactivity in TiO<sub>2</sub>-doped phosphate-based bioglasses and glass–ceramics, *Mater. Chem. Phys.* 124 (2010) 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.06.038>.
- [199] P. Li, Q. Yang, F. Zhang, T. Kokubo, The effect of residual glassy phase in a bioactive glass-ceramic on the formation of its surface apatite layer in vitro, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 3 (1992) 452–456. <https://doi.org/10.1007/BF00701242>.
- [200] A. Kumar, C.R. Mariappan, Synthesis, characterization, bioactivity and antibacterial studies of silver doped calcium borosilicate glass-ceramics, in: *AIP Conf. Proc.*, 2018: p. 070015. <https://doi.org/10.1063/1.5028813>.
- [201] N. Ranga, E. Poonia, S. Jakhar, A.K. Sharma, A. Kumar, S. Devi, S. Duhan, Enhanced antimicrobial properties of bioactive glass using strontium and silver oxide nanocomposites, *J. Asian Ceram. Soc.* 7 (2019) 75–81.

- <https://doi.org/10.1080/21870764.2018.1564477>.
- [202] S. Di Nunzio, C. Vitale Brovarone, S. Spriano, D. Milanese, E. Verné, V. Bergho, G. Maina, P. Spinelli, Silver containing bioactive glasses prepared by molten salt ion-exchange, *J. Eur. Ceram. Soc.* 24 (2004) 2935–2942. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2003.11.010>.
  - [203] N. Gargiulo, A.M. Cusano, F. Causa, D. Caputo, P.A. Netti, Silver-containing mesoporous bioactive glass with improved antibacterial properties, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24 (2013) 2129–2135. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4968-4>.
  - [204] N. Nezafati, F. Moztarzadeh, S. Hesarak, Surface reactivity and in vitro biological evaluation of sol gel derived silver/calcium silicophosphate bioactive glass, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17 (2012) 746–754. <https://doi.org/10.1007/s12257-012-0046-x>.
  - [205] Y. Gu, W. Xiao, L. Lu, W. Huang, M.N. Rahaman, D. Wang, Kinetics and mechanisms of converting bioactive borate glasses to hydroxyapatite in aqueous phosphate solution, *J. Mater. Sci.* 46 (2011) 47–54. <https://doi.org/10.1007/s10853-010-4792-x>.
  - [206] R. Phetnin, S.T. Rattanachan, Preparation and antibacterial property on silver incorporated mesoporous bioactive glass microspheres, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 75 (2015) 279–290. <https://doi.org/10.1007/s10971-015-3697-1>.
  - [207] H. Wang, S. Zhao, X. Cui, Y. Pan, W. Huang, S. Ye, S. Luo, M.N. Rahaman, C. Zhang, D. 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. <https://doi.org/10.1557/jmr.2015.243>.
  - [208] L.E. Valenti, C.E. Giacomelli, Stability of silver nanoparticles: agglomeration and oxidation in biological relevant conditions, *J. Nanoparticle Res.* 19 (2017) 156. <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3860-4>.
  - [209] A. Vulpoi, V. Simon, H. Ylänen, S. Simon, Development and in vitro assessment of bioactive glass/polymer nanostructured composites with silver, *J. Compos. Mater.* 48 (2014) 63–70. <https://doi.org/10.1177/0021998312468186>.
  - [210] X. Han, D.E. Day, Reaction of sodium calcium borate glasses to form hydroxyapatite, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18 (2007) 1837–1847. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3053-2>.
  - [211] H. Wang, S. Zhao, X. Cui, Y. Pan, W. Huang, S. Ye, S. Luo, M.N. Rahaman, C. Zhang, D. 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. <https://doi.org/10.1557/jmr.2015.243>.
- [212] K. Zheng, P. Balasubramanian, T.E. Paterson, R. Stein, S. MacNeil, S. Fiorilli, C. Vitale-Brovarone, J. Shepherd, A.R. Boccaccini, Ag modified mesoporous bioactive glass nanoparticles for enhanced antibacterial activity in 3D infected skin model, *Mater. Sci. Eng. C*. 103 (2019) 109764. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109764>.
- [213] M.A. de la Casa-Lillo, P. Velásquez, P.N. De Aza, Influence of thermal treatment on the “in vitro” bioactivity of wollastonite materials, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (2011) 907–915. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4254-2>.
- [214] J.K.M.F. Daguano, S.O. Rogero, M.C. Crovace, O. Peitl, K. Strecker, C. dos Santos, Bioactivity and cytotoxicity of glass and glass–ceramics based on the  $3\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\text{--SiO}_2\text{--MgO}$  system, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24 (2013) 2171–2180. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4972-8>.
- [215] T. Kokubo, Bioactive glass ceramics: properties and applications, *Biomaterials*. 12 (1991) 155–163. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(91\)90194-F](https://doi.org/10.1016/0142-9612(91)90194-F).
- [216] O. Peitl, E. Dutra Zanotto, L.L. Hench, Highly bioactive  $\text{P}_2\text{O}_5\text{--Na}_2\text{O--CaO--SiO}_2$  glass-ceramics, *J. Non. Cryst. Solids*. 292 (2001) 115–126. [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(01\)00822-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(01)00822-5).
- [217] 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. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-9220-z>.
- [218] L. Bunetel, E. Wers, A. Novella, A. Bodin, P. Pellen-Mussi, H. Oudadesse, In vitro chemical and biological effects of Ag, Cu and Cu + Zn adjunction in 46S6 bioactive glasses, *Mater. Res. Express*. 2 (2015) 095402. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/2/9/095402>.
- [219] H. El Feki, J.M. Savariault, A. Ben Salah, Structure refinements by the Rietveld method of partially substituted hydroxyapatite:  $\text{Ca}_9\text{Na}_{0.5}(\text{PO}_4)_4.5(\text{CO}_3)_{1.5}(\text{OH})_2$ , *J. Alloys Compd.* 287 (1999) 114–120. [https://doi.org/10.1016/S0925-8388\(99\)00070-5](https://doi.org/10.1016/S0925-8388(99)00070-5).
- [220] L. Müller, E. Conforto, D. Caillard, F.A. Müller, Biomimetic apatite coatings—Carbonate substitution and preferred growth orientation, *Biomol. Eng.* 24 (2007) 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.07.011>.
- [221] V. Mouriño, J.P. Cattalini, A.R. Boccaccini, Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new

- developments, *J. R. Soc. Interface.* 9 (2012) 401–419. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0611>.
- [222] J.S. Fernandes, P. Gentile, R.A. Pires, R.L. Reis, P. V. Hatton, Multifunctional bioactive glass and glass-ceramic biomaterials with antibacterial properties for repair and regeneration of bone tissue, *Acta Biomater.* 59 (2017) 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.046>.
- [223] J.E. Phillips, T.P. Crane, M. Noy, T.S.J. Elliott, R.J. Grimer, The incidence of deep prosthetic infections in a specialist orthopaedic hospital. A 15-year prospective survey, *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B.* 88 (2006) 943–948. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.88B7.17150>.
- [224] 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07>.
- [225] L. Paiva, T.K.S. Fidalgo, L.P. da Costa, L.C. Maia, L. Balan, K. Anselme, L. Ploux, R.M.S.M. Thiré, Antibacterial properties and compressive strength of new one-step preparation silver nanoparticles in glass ionomer cements (NanoAg-GIC), *J. Dent.* 69 (2018) 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.12.003>.