



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Centro de Ciências de Imperatriz – CCIIm

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM

Taís Silva Moraes

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO ÓXIDO DE ZINCO NA BIOATIVIDADE DE
VIDROS CÁLCIO-SÓDIO-BORATOS.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^a. Franciana Pedrochi

Imperatriz -MA

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Centro de Ciências de Imperatriz – CCIIm

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM

Taís Silva Moraes

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO ÓXIDO DE ZINCO NA BIOATIVIDADE DE
VIDROS CÁLCIO-SÓDIO-BORATOS.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^a. Franciana Pedrochi

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

Imperatriz -MA

2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Silva Moraes, Tais.

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO ÓXIDO DE ZINCO NA BIOATIVIDADE
DE VIDROS CÁLCIO-SÓDIO-BORATOS / Tais Silva Moraes. -
2024.

92 p.

Orientador(a): Franciana Pedrochi.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciência dos Materiais/ccim, Universidade Federal do
Maranhão, Imperatriz, 2024.

1. Biomateriais. 2. Hidroxiapatita. 3. Vidros
boratos bioativos. 4. Zinco. I. Pedrochi, Franciana. II.
Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA

Centro de Ciências de Imperatriz - CCIM



Membros da comissão julgadora da defesa da dissertação de mestrado da aluna Tais Silva Moraes apresentada e aprovada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais (PPGCM), em 26/01/2024.

COMISSÃO JULGADORA:

- Prof^ª. Dr^ª. Franciana Pedrochi (PPGCM/UFMA) - Presidente e Orientadora.
- Prof. Dr^ª. Taiana Gabriela Moretti Bonadio (UNICENTRO)- Avaliadora externa.
- Prof. Dr. Alysson Steimacher (PPGCM/UFMA) -Avaliador interno.

OBS.: Ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se na coordenação do programa da unidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por todas as bênçãos que me proporcionou.

Ao papai, Raimundo Nonato, por todo amor, carinho e cuidado que teve e tem comigo desde o dia do meu nascimento. Agradeço também pelo apoio e ajuda durante a minha vida acadêmica.

Aos meus irmãos, Laíza, Marcos e Railson, à minha avó Luiza e à minha tia Erinalda pelo amor e apoio de sempre. Sem vocês nada disso seria possível.

À minha mãe Vilma, pelo apoio e carinho.

Ao meu querido amigo Otávio, que conheci no LEOF e que se tornou o melhor amigo que eu poderia ter, obrigada pelo incentivo, por toda ajuda, pelo carinho e pelas conversas sobre a vida e sobre ciências dos vidros. Ao meu amigo João, pelo incentivo, pelo apoio e por ser sempre tão gentil e querido comigo.

Aos meus amigos que me acompanham desde a graduação: Ana Beatriz, Anderson, Ayla, Ayslla, Déborah, Jacivan, Jayson e ao Marinaldo. Obrigada pelo apoio, conversas e companheirismo. À minha amiga Vanessa, por todo incentivo e por torcer tanto por mim.

Aos meus amigos do LEOF, vulgo melhor laboratório do PPGCM: Ailda, Andrea, Hellen, Kallebe, Natacya, Nayane, Maria Eduarda e Marcelo pelas conversas, ajuda e pelas risadas.

À minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Franciana Pedrochi, primeiramente pela confiança e oportunidade, pela orientação, ajuda e instruções desde a iniciação científica, pelas conversas, pela paciência, por ter me ensinado a ser pesquisadora e ser um exemplo de pessoa, professora e cientista.

Aos professores Alysson Steimacher e Márcio José Barbosa, pelos ensinamentos sobre ciências dos materiais durante as disciplinas e no laboratório, pelas conversas e contribuições durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Laboratório de Difração de Raios-X (LDRX), pela realização da caracterização de difração de raios-X do material.

Ao Laboratório de Análises Térmicas (LAT) pelas análises de DTA.

Ao Laboratório de Fisiopatologia e Investigação Terapêutica (LaFIT), ao professor Aramys Reis e à mestrande Tatielle Gomes pelas análises de citotoxicidade.

À clínica Imagem Oral e à odontóloga Tatiana Mesquita pelas radiografias das amostras. À CAPES, Fapema e CNPq pelo suporte financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

A ocorrência de defeitos nos tecidos ósseos, resultantes de acidentes, doenças e envelhecimento, é cada vez mais comum. De modo semelhante, lesões nos tecidos epiteliais ocorrem frequentemente, resultantes de fatores como: queimaduras, abrasões, cortes e úlceras. Íons metálicos, como Zn^{2+} , podem ser adicionados aos vidros boratos para melhorar suas propriedades bioativas, pois este íon tem a propriedade de estimular a osteogênese, a cicatrização de feridas e possui ação antibacteriana. Nesta pesquisa, amostras vítreas contendo ZnO com concentração de 0-10 mol% ((64-x) B_2O_3 -2 P_2O_5 -18 CaO -16 Na_2O -x ZnO , x= 0, 1, 2,5, 5, 7,5 e 10 mol %)) foram sintetizadas, pelo método de fusão/resfriamento, a fim de confirmar a sua bioatividade e potencial para aplicação na regeneração de tecidos duros e moles. Foi observado um aumento da densidade e na fração N_4 e diminuição do volume molar com a substituição de B_2O_3 por ZnO, indicando que a adição de ZnO modificou a estrutura do material. Os resultados da análise térmica diferencial (DTA) mostraram um aumento na temperatura de início de cristalização (T_x) e estabilidade térmica com o aumento da inserção de zinco nas amostras. Por meio da análise de viabilidade celular todos os vidros mostraram ser não citotóxicos em macrófagos murinos RAW 247. Os difratogramas das amostras comprovaram o caráter amorfo destas e os espectros FTIR mostraram bandas característica de vidros boratos. As radiografias realizadas mostraram que as amostras são radiopacas e que o nível de radiopacidade aumentou à medida que se aumentou a concentração de ZnO. Os vidros foram imersos por 7, 14, 21 e 28 dias em SBF, a fim de atestar a sua bioatividade. Os valores de pH do SBF em que as amostras ficaram imersas mostraram que houve uma diminuição da taxa de troca iônica entre o material e o SBF com a adição crescente de ZnO. A adição de ZnO aumentou a estabilidade química das amostras, isto foi observado pela diminuição da taxa de degradação destas; esse comportamento foi indicado pela análise de perda de massa das amostras vítreas após todos os períodos de imersão em SBF. Os difratogramas DRX e espectros FTIR dos vidros, após imersão em SBF, indicaram a bioatividade das amostras CaNaB, 2,5% ZnO e 5% ZnO pela presença de picos e bandas característicos da formação de HA. Todas as amostras vítreas apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e negativas. Os resultados obtidos indicam o potencial das amostras vítreas para uso em regeneração de tecidos ósseos e possível uso em regeneração de tecidos moles.

Palavras chave: Biomateriais. Vidros boratos bioativos. Hidroxiapatita. Zinco. Tecidos ósseos.

ABSTRACT

The occurrence of defects in bone tissues resulting from accidents, diseases and aging is increasingly common. Similarly, injuries to epithelial tissues often occur resulting from factors such as: burns, abrasions, cuts and ulcers. Metallic ions as Zn^{2+} can be added to borate glasses to improve their bioactive properties, once this ion has feature of stimulating osteogenesis, wound healing and antibacterial action. In this research, vitreous samples containing ZnO with concentration of 0-10 mol% ((64-x) B_2O_3 –2 P_2O_5 –18 CaO –16 Na_2O –x ZnO , x= 0, 1, 2.5, 5, 7.5 e 10 mol %)) were synthesized by the melt-quenching technique in order to confirm bioactivity and potential for application in the hard and soft tissues regeneration. An increase in density and decrease in molar volume were observed with the replacement of B_2O_3 by ZnO indicating that the addition of ZnO modified the structure of the materials. The results of differential thermal analysis (DTA) showed an increase in crystallization onset temperature (T_x) and thermal stability with increasing zinc insertion in the samples. By cell viability analysis, all glasses were shown to be non-cytotoxic. The diffractograms of samples confirmed their amorphous character and FTIR spectra showed characteristic bands of borate glasses. The radiographs showed that the samples are radiopaque and that the level of radiopacity increased as the ZnO concentration increased. The glasses were immersed in SBF for 7, 14, 21 and 28 days to attest their bioactivity. The pH values of SBF showed that there was a decrease in ionic exchange rate between the material and the SBF with the increasing addition of ZnO. The addition of ZnO increased the chemical stability of samples, which was observed by the decrease in their degradation rate, this behavior was indicated by the analysis of mass loss of glass samples after all periods of immersion in SBF. The DRX diffractograms and FTIR spectra of glasses after immersion in SBF indicated the bioactivity CaNaB, 2.5% ZnO and 5% ZnO samples by the presence of peaks and bands characteristic of HA formation. All vitreous samples showed antibacterial activity against Gram positive and negative bacteria. The results indicate the potential of vitreous samples for use in bone tissue regeneration and possible use in soft tissue regeneration.

Keywords: Biomaterials. Bioactive borate glasses. Hydroxyapatite. Zinc. Bone tissues.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Antigo modelo da válvula cardíaca de Starr e Edwards, na direita uma fotografia e na esquerda uma ilustração do dispositivo médico. Fonte: [33].....	12
Figura 2- Estrutura atômica de um material vítreo. Fonte: [49]	16
Figura 3- Imagem esquemática da formação da camada de hidroxiapatita na superfície de um vidro bioativo imerso em fluido corporal simulado (SBF). Fonte: Adaptado de [56].	18
Figura 4- Esquema ilustrando a conversão de um vidro borato e do vidro silicato Bioglass® 45S5 em HA durante teste in vitro. Fonte: Adaptado de [64].	20
Figura 5- Aplicações de vidros boratos nos campos de regeneração de tecidos duros e moles. Fonte: Adaptado de [73].	21
Figura 6 - Fluxograma do processo de síntese das amostras pelo método de fusão/resfriamento.	25
Figura 7- Termograma da amostra 7,5% ZnO.....	28
Figura 8- Penetrômetro de alumínio utilizado na análise de radiopacidade.....	30
Figura 9- Fotografia da amostra CaNaB durante o período de imersão em SBF.....	31
Figura 10- Fotografia das amostras vítreas cortadas em fatias de 10 milímetros de diâmetro e 1,25 milímetros de espessura.....	35
Figura 11- Densidade e volume molar das amostras em função da concentração de ZnO.	36
Figura 12- Difrátograma das amostras antes da imersão em SBF.....	37
Figura 13- Espectros FTIR de todas as amostras antes da imersão em SBF.....	38
Figura 14- Espectro FTIR da amostra 10% ZnO deconvoluído.....	39
Figura 15- Valores de N4 em função da concentração de ZnO adicionado nas amostras vítreas.	40
Figura 16- Valores de Tx, Tg e Tx-Tg em função da concentração de ZnO.....	41
Figura 17- Radiografia das amostras vítreas e do penetrômetro de alumínio.	43
Figura 18- Gráficos do nível de cinza em função dos milímetros de alumínio para obtenção do nível de radiopacidade em mmAl das amostras a) CaNaB, 1% ZnO e 2,5% ZnO e b) 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO.	43
Figura 19- Nível de radiopacidade das amostras, em mmAl, em função da concentração de ZnO.....	44
Figura 20 - Amostras CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO após imersão em SBF por 28 dias.....	45

Figura 21- Valores de pH do SBF medidos durante os 28 dias de imersão para as amostras CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO.	46
Figura 22- Percentual de perda de massa das amostras em função do tempo de imersão.....	48
Figura 23- Viabilidade celular de macrófagos RAW 247 após contato por 24 horas com extrato vítreo em concentrações de 500µg/mL e 1000µg/ mL de todas as amostras.	50
Figura 24- Picos do difratograma padrão da hidroxiapatita (JCPDS 09-0432). Fonte: Adaptado de [127].	52
Figura 25-Difratogramas obtidos para a amostra CaNaB após 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF.	52
Figura 26- Difratogramas da amostra 1% ZnO após 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF.	53
Figura 27- Difratogramas da amostra 2,5% ZnO após 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF.	54
Figura 28- Difratogramas obtidos para a amostra 5% ZnO após 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF.	54
Figura 29- Difratogramas obtidos para a amostra 7,5% ZnO após 7, 14, 21 e 28 dias de imersão SBF.	55
Figura 30- Difratogramas obtidos para a amostra 10% ZnO após 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF.	55
Figura 31- Difratogramas obtidos para todas as amostras após 21 dias de imersão em SBF.	57
Figura 32- Espectros FTIR da amostra CaNaB após imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.	58
Figura 33- Espectros FTIR da amostra 1% ZnO após imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28.	59
Figura 34- Espectros FTIR da amostra 2,5% ZnO após imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.	60
Figura 35- Espectros FTIR da amostra 5% ZnO após imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.	61
Figura 36- Espectros FTIR da amostra 7,5% ZnO após imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.	62
Figura 37- Espectros FTIR da amostra 10% ZnO após imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.	62
Figura 38- Espectros FTIR das amostras CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO após imersão em SBF por 28 dias.	63
Figura 39- Fotografias das placas contendo 4 diferentes antibióticos testados por 24 horas contra a bactéria S. Aureus	65

Figura 40- Fotografias das placas contendo as amostras vítreas testadas por 24 horas contra a bactéria S. Aureus.....	65
Figura 41 - Fotografias das placas contendo 4 diferentes antibióticos testados por 24 horas contra a bactéria E. coli.	66
Figura 42- Fotografias das placas contendo as amostras vítreas testadas por 24 horas contra a bactéria E. Coli.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Biomateriais comumente usados e suas aplicações. Fonte: Adaptado de [31].....	15
Tabela 2- Códigos das amostras e concentrações dos reagentes utilizados na preparação de cada amostra em porcentagem peso (%wt) e porcentagem molar (%mol).....	24
Tabela 3- Valores de temperatura de transição vítrea (T _g), temperatura de início de cristalização (T _x) e estabilidade térmica (T _x -T _g) das amostras vítreas sintetizadas.	41
Tabela 4- Números de onda das bandas apresentadas nos espectros FTIR e suas atribuições.	58
Tabela 5 - Antibióticos e amostras vítreas testadas e seus respectivos diâmetros da zona de inibição do crescimento bacteriano, em milímetros, contra as bactérias S. Aureus e E. Coli..	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
2.1 Biomateriais	12
2.2 Vidros bioativos	15
2.3 Bioatividade de vidros boratos	19
2.4 Vidros bioativos contendo zinco.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Síntese das amostras	24
3.2 Técnicas de caracterização.....	26
3.2.1 Densidade e volume molar.....	26
3.2.2 Análise térmica diferencial (DTA).....	27
3.2.3 Testes de Citotoxicidade	28
3.2.4 Radiopacidade	29
3.2.5 Testes <i>in vitro</i> em SBF (<i>Simulated Body Fluid</i>) e medidas de pH.....	30
3.2.6 Difração de Raios X (DRX)	32
3.2.7 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	32
3.2.8 Fração de Boros Tetracoordenados (N ₄)	33
3.2.9 Perda/Ganho de massa	33
3.2.10 Atividade antibacteriana.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Densidade volumétrica e volume molar.....	35
4.2 Difração de Raios X (DRX)	37
4.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	38
4.4 Fração de Boros Tetracoordenados (N ₄)	39
4.5 Análise térmica diferencial (DTA).....	40
4.6 Radiopacidade	42
4.7 Análise visual das amostras durante e após imersão em SBF por 28 dias	45
4.8 Análise de dados de pH.....	46
4.9 Perda/Ganho de massa	47
4.10 Citotoxicidade	49
4.11 Difração de Raios-X (DRX).....	51
4.12 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	57

4.13 Atividade antibacteriana.....	64
5 CONCLUSÃO.....	69
PERSPECTIVAS.....	70
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE A – Tabela das comparações pareadas, pelo método de Tukey com nível de significância de 5%, entre os resultados obtidos na análise de atividade antibacteriana.	

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas tecnologias em materiais para aplicações biomédicas é de extrema importância para o sucesso em tratamentos na área de regeneração de tecidos. É cada vez mais comum a ocorrência de defeitos nos tecidos ósseos resultantes de acidentes, doenças (por exemplo tumores ósseos e osteoporose) e envelhecimento[1]. De modo semelhante, lesões nos tecidos epiteliais ocorrem frequentemente, em diferentes níveis de gravidade, resultantes de fatores como: queimaduras, abrasões, cortes e úlceras [2]. A pele desempenha uma importante função de barreira, então quando esta sofre ruptura e não é reparada em tempo hábil, o risco de expor os tecidos do corpo a infecções microbianas e danos mecânicos é elevado [2,3].

Implantes artificiais bioinertes, autoenxertos (transplante de tecido de uma parte para outra parte do corpo do mesmo indivíduo [4]) , xenoenxertos (tecido transplantado do indivíduo de uma espécie para outro de espécie distinta [4]) e aloenxertos (transplante de tecido de um ser de uma espécie, mas geneticamente diferente, para outro da mesma espécie[4]) são métodos comumente utilizados para a correção e tratamento de lesões nos tecidos epiteliais [3,4] e ósseos [5,6] , mas estes métodos costumam apresentar limitações como, por exemplo: transmissão de doenças[3], morbidade do local doador [5] e disponibilidade limitada [3]. Com isso, se viu a necessidade de criar novos materiais para restauração e correção de tecidos lesionados; um dos materiais desenvolvidos foram os vidros bioativos [3,5–7].

Estudos sobre vidros bioativos começaram a ser realizados a partir de 1969 com o desenvolvimento do primeiro vidro dessa classe, o Bioglass 45S5® [8–10]. Esse vidro silicato, desde então, vem sendo utilizado em diferentes aplicações biomédicas, como correção e restauração de tecidos ósseos e de tecidos dentários [11–13]. As principais propriedades dos vidros bioativos consistem na capacidade de formação de uma camada de hidroxiapatita em sua superfície, que funciona como interface de ligação entre o material e o tecido circundante, e na dissolução e liberação de íons terapêuticos, quando imersos em fluidos fisiológicos [14–16]. Os vidros silicatos, que possuem a SiO_2 como elemento formador de rede, foram e são amplamente estudados, mas, com o crescente número de pesquisas nesta área, outras composições vítreas tendo como formadores de rede outros elementos, e dentre estes o B_2O_3 [17–20], também começaram a ser amplamente estudadas [21].

Os vidros boratos apresentam uma taxa de degradação mais rápida que os vidros silicatos quando imersos em fluidos fisiológicos, possuindo uma menor durabilidade química e maior taxa de liberação de íons [17,20]. Esse biomaterial ganhou relevância em estudos para aplicações biomédicas nos últimos anos, principalmente na regeneração de tecidos ósseos

[17,20], como carreador de drogas [17,22] e, mais recentemente, na regeneração de tecidos moles [23,24]. Nesta última área eles se mostraram promissores devido às suas propriedades antimicrobianas, de estimulação da angiogênese (processo de criação de novos vasos sanguíneos), de envolvimento no crescimento de fibroblastos e migração de queratinócitos [3,25,26].

À composição dos vidros boratos podem ser adicionados diferentes elementos que quando inseridos à rede vítrea podem modificar e melhorar suas propriedades físicas, terapêuticas e mecânicas [27]. O zinco, por exemplo, é um elemento bastante promissor para essa aplicação, pois apresenta propriedades antibacterianas [14,17,27,28], anti-inflamatórias [14,27], estimula a homeostase [17], a angiogênese [17], a proliferação de células relacionadas à pele no processo de cicatrização de feridas [17,29] e também desempenha papel na formação e metabolismo das células ósseas [27,28,30].

Com base nas informações apresentadas, esse trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização de amostras vítreas do sistema $\text{CaO-NaO-B}_2\text{O}_3$, adicionadas de ZnO em diferentes concentrações, a fim de investigar sua bioatividade para potencial aplicação destes materiais na restauração e correção de tecidos duros e moles.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biomateriais

A utilização de materiais, naturais e sintéticos, para correção de defeitos e lesões corporais remonta a tempos longínquos. Com o passar dos anos e com o aprimoramento tecnológico e científico em diferentes áreas do conhecimento, foi observada a evolução no desenvolvimento e aplicação de diferentes materiais e dispositivos médicos. Materiais de diferentes composições foram amplamente usados no reparo e substituição de partes do corpo no decorrer da história da humanidade[31]. Como exemplo disso, os implantes dentários foram um dos primeiros procedimentos realizados. Por volta do ano 600 d.C. o povo maia moldava dentes a partir de conchas marinhas e estes, quando implantados, atingiam uma completa osteointegração [31,32]. Já no século XVI, médicos na Europa utilizavam metais como ouro e prata para reparação dentária [32].

Avançando um pouco mais na história, em 1900 na Inglaterra, com o intuito de reparar ossos longos, começaram a ser fabricadas placas de aço para uso em fraturas ósseas [33]. Nas décadas de 40 e 50 foi utilizado o metilmetacrilato, um polímero acrílico, para substituição de córnea devido a esse ser transparente e apresentar biocompatibilidade. Em 1960, Starr e Edwards projetaram a primeira válvula cardíaca a ser disponível comercialmente, usando uma bola de silicone em um suporte de metal cônico [33].

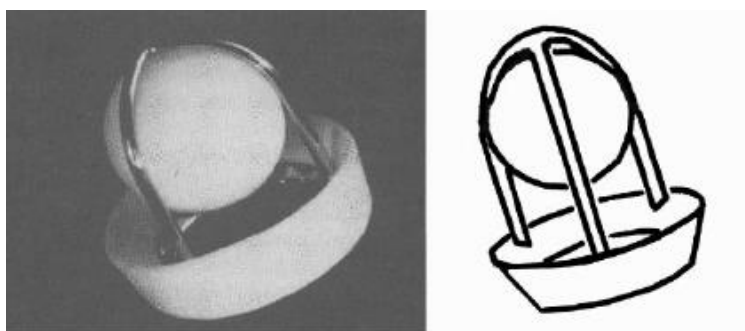


Figura 1- Antigo modelo da válvula cardíaca de Starr e Edwards, na direita uma fotografia e na esquerda uma ilustração do dispositivo médico. Fonte: [33]

Quando os materiais, substâncias ou misturas de substâncias atuam nos sistemas biológicos, parcial ou totalmente, com o propósito de ajudar no desenvolvimento de uma função ou órgão, recebendo uma resposta biológica apropriada, sem causar qualquer tipo de resposta adversa ao organismo hospedeiro, eles são classificados como biomateriais [34–36]. A *European Society for Biomaterials Conference* (Conferência da Sociedade Europeia de Biomateriais)

(1987) definiu material bioativo como “aquele que foi projetado para induzir uma atividade biológica específica” [37].

O termo biomaterial, como é utilizado hoje, só começou a ser usado para designar esses materiais no século XX[31,38]. Antes disso, por não haver uma grande produção de dispositivos biomédicos, normas regulamentadoras e cursos acadêmicos na área, havia a utilização desses materiais apenas de forma mais simples, principalmente em implantes [31]. Esses, muitas vezes, eram sem sucesso, devido à falta de conhecimento acerca de biocompatibilidade e esterilização [31,33,38,39].

Dependendo de suas características e propriedades, os biomateriais podem ser classificados em biomateriais de primeira, segunda ou terceira geração [31,32,40]. A primeira geração começou logo após a segunda guerra mundial, nesse período se observou um crescimento do uso de biomateriais devido a uma maior disponibilidade de metais avançados, cerâmicas e polímeros para esse fim [31,32].

O principal comportamento que se buscava nos biomateriais de primeira geração era que esses apresentassem uma resposta tóxica mínima ao organismo ao mesmo tempo que apresentassem uma combinação adequada de propriedades físicas correspondentes a do tecido substituído[41]. Na primeira geração os materiais para reparação de tecidos eram projetados para ser biologicamente inertes, ou seja, bioinertes [41–43].

Dispositivos fabricados com materiais bioinertes, quando implantados, podem apresentar falha devido a incompatibilidade da interface do material com o tecido próximo [43]. Com isso, no decorrer dessa geração se viu a necessidade de mais estudos sobre biocompatibilidade [38]. No final dos anos 60, a comunidade médica começou a colaborar mais ativamente com os pesquisadores e se estabeleceram requisitos e estratégias de desenvolvimento para biomateriais [38,43].

Foi observado que, para o desenvolvimento de novos biomateriais, era importante se ter em mente uma maior biocompatibilidade destes [38]. Para um biomaterial ser considerado biocompatível é necessário que este possua a capacidade de realizar interações com as células circundantes levando em consideração a situação e características específicas do local e órgão que foi implantado [44]. Após implantado, um material biocompatível deve se adaptar ao ambiente e com isso ter chances mínimas de provocar uma resposta inflamatória que cause a sua rejeição pelo corpo hospedeiro [45].

A segunda geração, que teve início por volta de 1980, foi marcada pelo aprimoramento de estudos em biomateriais voltados para aplicações mais específicas, como por exemplo, regeneração de tecidos ósseos e dentários, cicatrização de feridas e tratamento imunoterápico

de tumores. A concepção das ideias e conceitos da ciência dos biomateriais, como são conhecidas atualmente, também se deu nesse período [38,46,47].

Neste período, o objetivo da produção de biomateriais começou a mudar, deixando de ser apenas obter materiais bioinertes e visando produzir materiais bioativos com capacidade de provocar reações no ambiente fisiológico de implante [42]. O desenvolvimento de biomateriais reabsorvíveis, ou seja, que exibem degradação e reabsorção química controlada, que é importante em usos clínicos, também foi um avanço desse período. Nessa geração, os materiais bioativos desenvolvidos começaram a ser usados clinicamente, principalmente em aplicações odontológicas e ortopédicas. Materiais como os vidros bioativos, vitrocerâmicas, cerâmicas e compósitos são destaques nestas aplicações [41,42].

No presente momento a ciência dos biomateriais se encontra na terceira geração. Materiais mais complexos, com respostas em nível celular e molecular são amplamente estudados [38,40]. Nos materiais de terceira geração, os conceitos de materiais bioativos e materiais reabsorvíveis, que na segunda geração eram tidos como propriedades de materiais distintos, agregaram-se. Atualmente materiais bioativos e reabsorvíveis são os mais atraentes para as pesquisas [41]. Tendo em mente que, um maior entendimento da resposta do organismo hospedeiro ao biomaterial implantado ajuda a aumentar a eficiência no desenvolvimento e aplicação deste, o estudo das condições mecânicas e químicas do sistema biológico específico de implantação também se mostrou relevante nos últimos anos [38].

A ciência dos biomateriais é uma área multidisciplinar, abrangendo conhecimentos em física, biologia, química, materiais, medicina e engenharia. Com o avanço científico e tecnológico dos últimos anos, diferentes tipos de biomateriais foram desenvolvidos para correção de defeitos em vários órgãos e tecidos do corpo humano [31,38,47]. A tabela 1 traz alguns exemplos de biomateriais comumente utilizados e suas respectivas aplicações.

Tabela 1- Biomateriais comumente usados e suas aplicações. **Fonte:** Adaptado de [31].

Aplicação	Biomaterial usado
Substituições articulares (joelho, ombro e quadril)	Titânio, polietileno, alumina, zircônia
Reparação de defeitos ósseos	Fosfatos de cálcio, produtos de ossos humanos
Reparação e substituição de cartilagem, tendão ou ligamento	Tecido suíno descelularizado, dispositivos de fixação de poli(lactídeo) e metálicos, colágeno, lubrificantes de ácido hialurônico
Implante dentário- fixação dentária	Titânio, zircônia
Enxertos vasculares e dispositivos endovasculares	Dacron, poli(tetrafluoretileno) expandido, Nitinol, CoCr, aço inoxidável, tecido fixo
Válvulas cardíacas: mecânicas e bioprotéticas (transcateter e tradicional)	Dacron, carbono, CoCr, tecido bovino e suíno fixo, aço inoxidável, nitinol
Hemodiálise	Polisulfona, celulose modificada, poliacrilonitrila, policarbonato, silicone, cloreto de polivinila
Lentes intraoculares	PMMA, PDMS, poliacrilato-PMMA, PHEMA

2.2 Vidros bioativos

Os vidros são comumente definidos como “um sólido amorfo completamente sem estrutura atômica periódica de longo alcance, que exibe uma região de comportamento de transformação vítrea” [48]. Segundo Zachariasen (1932) a presença ou ausência de periodicidade e simetria a longo alcance é o que difere um material cristalino de um material vítreo [49]. A Figura 2 apresenta a representação da estrutura atômica sem periodicidade a longo alcance de um material vítreo.

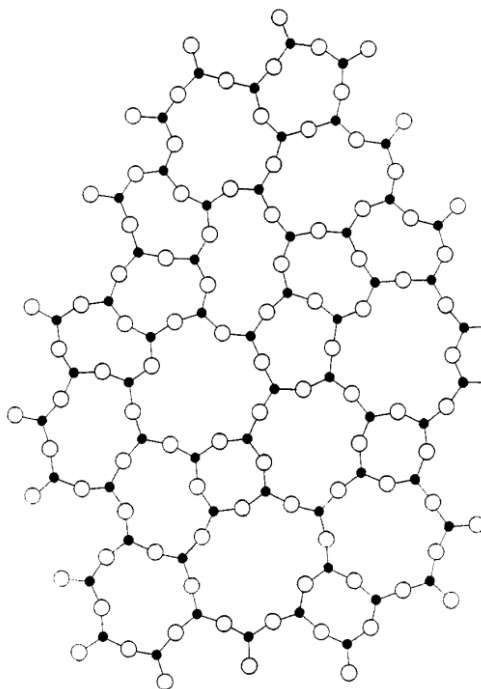


Figura 2- Estrutura atômica de um material vítreo. **Fonte:** [49]

Em 1969 o professor e pesquisador Larry Hench desenvolveu o primeiro material vítreo com propriedades bioativas usando o óxido de silício como formador de rede e uma composição, em % peso, de 45% SiO_2 -24.5% Na_2O -24.5% CaO -6% P_2O_5 [9,25,43]. Esse vidro foi nomeado Bioglass® 45S5 devido a possuir 45% de sílica como material formador de rede, e uma razão molar Ca/P de 5 para 1 [25,43]. Com a sintetização desse material se originou uma nova classe de biomateriais; os vidros bioativos [43]. A partir do estudo de Hench, muitos outros trabalhos e novas composições de vidros foram desenvolvidos a fim de se observar bioatividade [50,51].

Para um vidro ser considerado um material bioativo é necessário que este, quando em contato com fluidos fisiológicos, apresente o crescimento de uma camada de apatita em sua superfície [37,51,52]. Essa camada de apatita deve apresentar equivalência estrutural e química a fase mineral dos ossos [51,52]. Ela vai funcionar como uma interface que estabelece fortes ligações químicas entre o material vítreo implantado e o tecido que o circunda, causando a adesão do material ao tecido receptor que, juntamente com a liberação de íons resultantes do processo de degradação do vidro, vai possibilitar a recuperação dos tecidos lesionados [37,51–54].

O crescimento da camada de hidroxiapatita (HA) e as ligações químicas que se estabelecem entre o material e o tecido hospedeiro ocorrem devido a uma sequência de reações

químicas na superfície do vidro quando este é implantado [9]. Hench (2006) distribuiu as reações que ocorrem para o Bioglass® 45S5 em 11 estágios, partindo desde as primeiras reações de lixiviação de íons em solução até a mineralização da matriz óssea extracelular no estágio final [9]. Os 5 primeiros estágios são as reações que ocorrem na superfície do material vítreo, os 6 estágios seguintes descrevem as reações celulares que ocorrem na interface de HA localizada entre o material e o ambiente fisiológico [55].

A seguir, são apresentados os 11 estágios de reações que ocorrem em um vidro silicato bioativo quando em contato com fluidos corporais ou fluidos corporais simulados [9,51]:

- **Estágio 1:** Troca rápida entre íons Na^+ do material por íons H^+ ou H_3O^+ da solução;
- **Estágio 2:** Sílica solúvel na forma $\text{Si}(\text{OH})_4$ é perdida para a solução devido à quebra das ligações Si-O-Si e acontece a formação de silanóis (Si-OH) na interface vidro/solução;
- **Estágio 3:** Condensação e repolimerização de uma camada rica em SiO_2 na superfície da amostra que está deficiente em íons alcalinos ou alcalinos terrosos;
- **Estágio 4:** Através da camada rica em SiO_2 acontece a migração de grupos Ca^{2+} e PO_4^{3-} do interior para a superfície da amostra vítrea, formando um filme rico em CaO- P_2O_5 no topo da camada de SiO_2 , em seguida acontece o crescimento de uma camada amorfa rica em CaO- P_2O_5 pela incorporação de fosfato e cálcio solúvel da solução;
- **Estágio 5:** Cristalização da camada amorfa rica em CaO- P_2O_5 pela incorporação de ânions OH^- e CO_3^{2-} para formar uma camada de hidroxiapatita carbonatada;
- **Estágio 6:** A camada de hidroxiapatita formada a partir das reações anteriores aumenta a adsorção e dessorção de fatores de crescimento;
- **Estágio 7:** A camada de HA influencia o período de tempo que os macrófagos são necessários para preparar o local do implante para o reparo tecidual;
- **Estágio 8:** Fixação dos osteoblastos;
- **Estágio 9:** Proliferação sincronizada e diferenciação de osteoblastos;
- **Estágio 10:** Geração da matriz óssea extracelular;
- **Estágio 11:** Mineralização da matriz óssea extracelular, formação de osteócitos maduros.

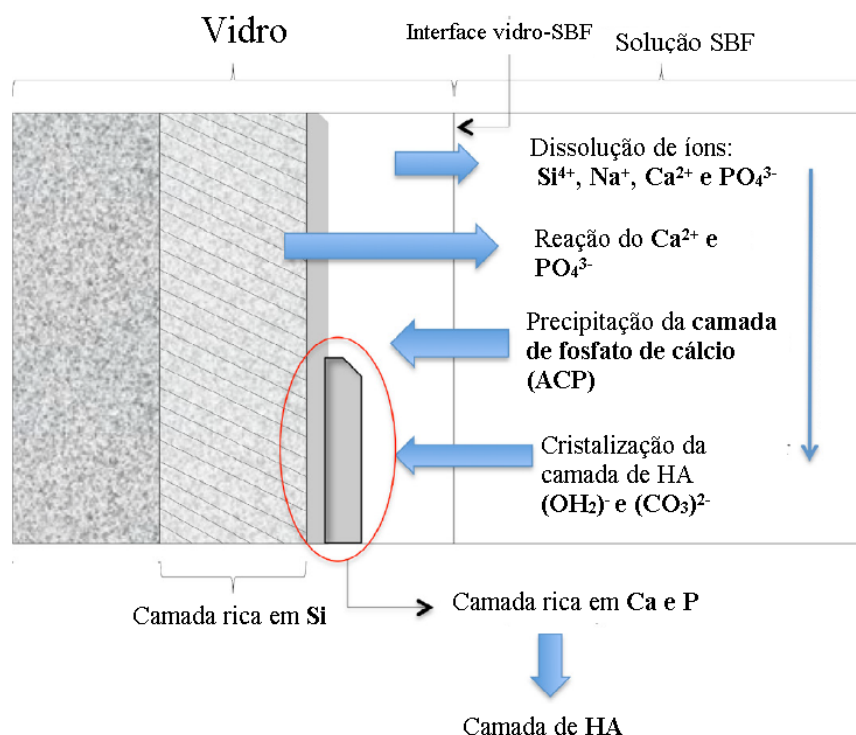


Figura 3- Imagem esquemática da formação da camada de hidroxiapatita na superfície de um vidro bioativo imerso em fluido corporal simulado (SBF). Fonte: Adaptado de [56].

Como objetivo principal de vários estudos *in vivo* e *in vitro* com vidros bioativos está a percepção da capacidade destes de estimular o crescimento de tecido ósseo saudável e em quantidade adequada para o reparo de defeitos e fraturas. Por isso, é muito importante que estes materiais sejam osteocondutores e osteoindutores, ou seja, que estes tenham a capacidade de induzir a formação de osso, orientando o ambiente biológico circundante à formação óssea [50,57–59].

As interações biológicas que ocorrem entre a camada de hidroxiapatita formada na superfície dos vidros e as células do tecido ósseo próximo, e que possibilita a restauração do tecido danificado, envolve os processos de adsorção de proteínas, incorporação de fibrilas de colágeno, fixação de células progenitoras ósseas, diferenciação celular, excreção de matriz óssea extracelular, e por fim, a mineralização dessa matriz [60]. Além disso, as composições vítreas também liberam produtos biologicamente ativos em sua dissolução que promovem ainda mais a osteogênese (formação de novo tecido ósseo), pois esses íons liberados agem estimulando as células osteoprogenitoras e consequentemente influenciando o crescimento de novo tecido ósseo [50,60,61]

Assim como observado para a osteogênese, os produtos de dissolução dos vidros também podem influenciar positivamente na angiogênese [50]. É necessário fisiologicamente que estes dois processos ocorram simultaneamente, já que áreas mais vascularizadas tendem a formar em maior quantidade novos tecidos ósseos e, uma menor vascularização em locais com defeitos ósseos tende a diminuir a reparação dos tecidos [50,58,62]. Assim, para ter êxito nas interações entre o biomaterial e o tecido é necessário que haja um fornecimento sanguíneo adequado [62]. Isso ocorre porque os vasos sanguíneos possibilitam para as células em crescimento nutrientes e o oxigênio que são indispensáveis para que estas sobrevivam [63].

A formação da camada de HA na superfície dos vidros, quando estes estão em contato com fluidos fisiológicos é o que possibilita a adesão do material aos tecidos adjacentes devido às fortes ligações químicas estabelecidas [37,51]. Essa propriedade, juntamente com a capacidade do material liberar íons biologicamente ativos durante a sua dissolução, são características que favorecem a regeneração óssea na presença de vidros bioativos [37,51,53,54]. Mas, além da sua aplicação como implante ósseo, os vidros bioativos também são descritos com potencial para aplicação na regeneração de tecidos moles, como administradores de drogas e no revestimento de peças de titânio [57,59,64].

Em um primeiro momento os vidros bioativos a base de óxido de silício, principalmente o Bioglass® 45S5, foram amplamente estudados, e são apontados na literatura como materiais bioativos com alto potencial para aplicações biomédicas. Em um momento posterior, vidros com outros formadores de rede, como boro e fósforo, começaram a ser frequentemente estudados para aplicações em sistemas bioativos [14,21].

2.3 Bioatividade de vidros boratos

O boro é um oligoelemento muito importante para a saúde dos ossos. A quantidade de boro varia entre 3 a 20 mg no corpo humano, e está contido principalmente nos ossos, cabelos e unhas. Estudos em animais indicaram que a ausência de boro no corpo é prejudicial, diminuindo a atividade osteogênica e aumentando anormalidades nos tecidos ósseos [21,64–66].

Vidros que possuem o boro como elemento formador de rede são denominados de vidros boratos. Nos últimos anos, se observou um crescente interesse de pesquisadores da área de biomateriais em vidros com composições contendo boro [21]. Nos anos 90 foi realizado o primeiro estudo de um vidro borossilicato (que tem o boro e a sílica como formadores de rede) para aplicações em áreas médicas [21,67]. Esse interesse em vidros boratos ocorreu devido à

identificação da alta bioatividade destes frente aos, já consolidados, vidros silicatos[17,20] . Diferentes trabalhos substituíram o SiO_2 por B_2O_3 , parcial ou totalmente, em vidros silicatos com composições já bastante conhecidas e estudadas como o Bioglass 45S5 e o 13-93 [18,68].

Vidros boratos possuem alta bioatividade devido à sua rápida taxa de dissolução e baixa durabilidade química, quando em contato com fluidos corporais, o que promove a conversão mais rápida e completa desse vidro em hidroxiapatita, quando comparados a vidros silicatos [37,69,70]. Essa diferença é observada devido à característica que os silicatos apresentam durante sua degradação de formar uma camada rica em SiO_2 [9,14,37]. Essa camada funciona como uma barreira que dificulta o transporte de íons e por consequência desacelera a taxa de formação da camada de fosfato de cálcio na superfície do material [14]. Nos boratos esse problema não é observado [14]. A Figura 4 apresenta uma ilustração esquemática da conversão de um vidro borato e do vidro silicato Bioglass® 45S5 em HA durante testes *in vitro*.

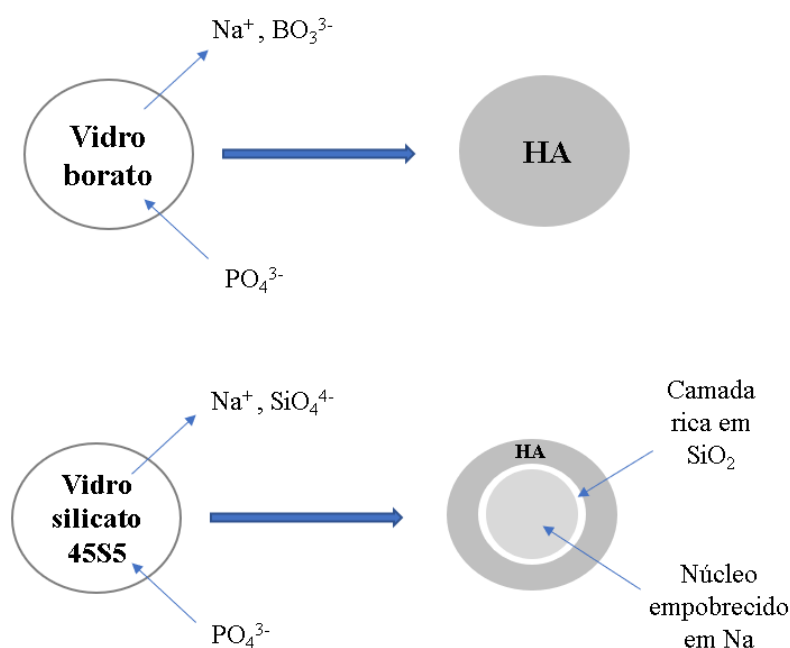


Figura 4- Esquema ilustrando a conversão de um vidro borato e do vidro silicato Bioglass® 45S5 em HA durante teste *in vitro*. **Fonte:** Adaptado de [64].

Fu e colaboradores (2010) realizaram um estudo substituindo o SiO_2 do vidro 13-93 parcialmente (um terço) e totalmente por B_2O_3 , obtendo o vidro borosilicato 13-93B1 e o vidro borato 13-93B3. Foi observado que o *scaffold* de vidro 13-93B3 apresentou uma taxa de conversão em HA 3 a 4 vezes maior que o *scaffold* de vidro 13-93, além disso, o 13-93B3 foi convertido completamente em HA, já o 13-93 e o 13-93B1 foram convertidos apenas parcialmente [71]. Bi e colaboradores (2012) estudaram o desempenho de *scaffolds* de vidros 13-93 e 13-93B3 em defeitos ósseos cranianos de ratos, eles observaram que, com a substituição

do SiO_2 por B_2O_3 , o volume de novo osso formado dentro do defeito foi significativamente maior [72].

O boro se mostrou importante no processo de metabolismo ósseo devido a influenciar diversas reações metabólicas e interagir com o cálcio, magnésio e vitamina D, além de demonstrar atividades antioxidante e anti-inflamatória [73]. Esse elemento, em níveis apropriados, é necessário para o metabolismo do cálcio e para prevenir a perda óssea, principalmente em mulheres na menopausa e em idosos [64]. Os vidros boratos, além de apresentar bioatividade, pela formação de uma camada de hidroxiapatita, liberam íons de boro (juntamente com outros íons presentes na composição vítrea), que influenciam positivamente na osteogênese [64,73].

É conhecido o potencial de vidros boratos para a regeneração de tecidos ósseos e dentários, mas, nos últimos anos, cresceram os estudos de vidros boratos voltados para outras aplicações, como para o tratamento de tecidos moles, principalmente cicatrização de feridas, regeneração de tecido nervoso e como carreadores de drogas [17,73]. São apresentadas na Figura 5 algumas aplicações dos vidros boratos dentro dos campos de regeneração de tecidos duros e moles.

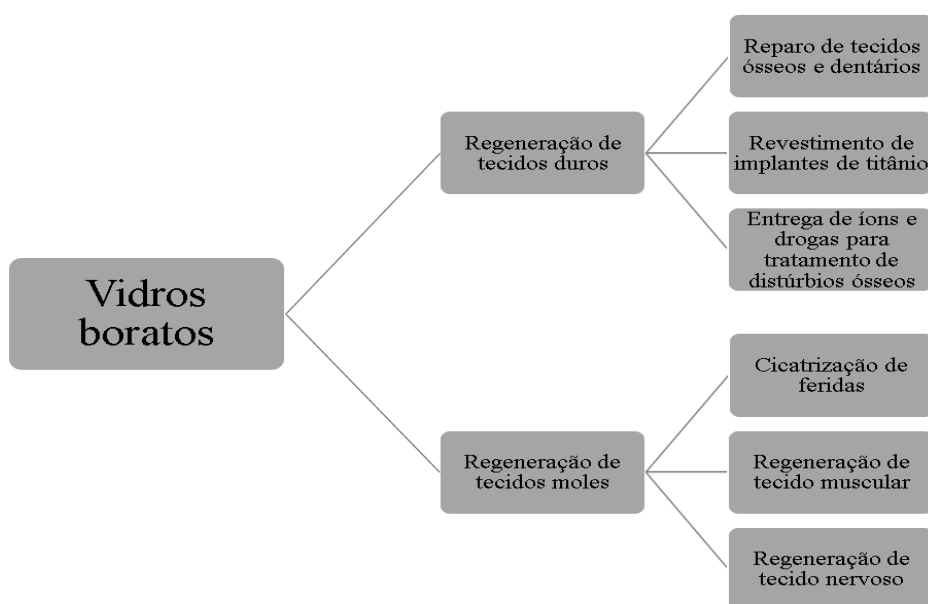


Figura 5- Aplicações de vidros boratos nos campos de regeneração de tecidos duros e moles. **Fonte:** Adaptado de [73].

Os vidros boratos são promissores candidatos para aplicações na regeneração de tecidos moles, uma vez que possuem propriedades antimicrobianas, de estimulação da angiogênese, de envolvimento no crescimento de fibroblastos e na migração de queratinócitos. O boro desempenha papel na regulação da liberação de colágeno, proteoglicanos e proteínas, o que

previne a formação de fibrose durante a cicatrização de feridas e contribui no seu potencial cicatrizante [3,24,26,73].

Zhou e colaboradores (2016) desenvolveram um estudo com microfibras de vidro borato bioativo ($56.6\text{B}_2\text{O}_3-18.5\text{CaO}-11.1\text{K}_2\text{O}-5.5\text{Na}_2\text{O}-4.6\text{MgO}-3.7\text{P}_2\text{O}_5$ (%peso)) e microfibras de vidro silicato 45S5 para aplicação como curativos de feridas dérmicas. Eles concluíram que as duas microfibras não foram tóxicas para células endoteliais da veia umbilical humana, em testes *in vitro*, e que ambas melhoraram o fechamento de feridas de grande tamanho em pele de ratos. Também observaram que as microfibras de vidro borato reduziram mais rapidamente o tamanho da ferida e apresentaram maior vascularização quando comparadas as de vidro silicato [74].

No final de 2016, a *US Food and Drug Administration* (FDA) concedeu aprovação a uma formulação de vidro a base de boro, que foi chamada de MIRRAGENTM, para ser usado como curativo no tratamento de feridas crônicas na pele [24].

2.4 Vidros bioativos contendo zinco

Aos vidros bioativos podem ser incorporados íons de elementos alcalinos e metálicos a fim de lhes proporcionar modificações positivas em propriedades físicas, terapêuticas e mecânicas [65]. De acordo com o elemento adicionado, pode-se observar melhora em propriedades como capacidade de regeneração tecidual, caráter antibacteriano e citocompatibilidade [75]. Há presente na literatura diferentes trabalhos que investigam a melhoria da bioatividade dos vidros pela incorporação de íons inorgânicos terapêuticos na matriz vítrea. Íons metálicos, como Cu e Zn, são exemplos de íons terapêuticos apontados como benéficos para os processos de osteogênese e angiogênese [64,75].

O zinco é um metal de transição do grupo 12 da tabela periódica. Ele é encontrado na natureza principalmente no mineral sulfeto de zinco esfarelita, mas também nos minerais willemita, franklinita e zincita, ocupando a 24ª posição no ranking de elementos químicos mais abundantes no planeta [76]. Esse elemento atua como um óxido intermediário quando inserido na matriz vítrea, os íons Zn^{2+} atuam tanto como formadores de rede quando coordenados quatro vezes pelo oxigênio, como modificadores de rede quando coordenados seis vezes pelo oxigênio, sendo que a composição do vidro que influencia no número de coordenação [27,77,78].

O zinco está presente nas células animais e vegetais em pequenas concentrações, no corpo de um adulto sua concentração média é de 1,4 a 2,3 gramas, sendo 85% desse total encontrado nos músculos e ossos e 11% na pele e no fígado. Ele desempenha papel fundamental no corpo humano, pois é necessário para a diferenciação e proliferação celular e é um

constituente estrutural de enzimas e proteínas, servindo como cofator em muitos fatores de transcrição e sistemas enzimáticos [21,79,80].

É conhecido na literatura o potencial uso de zinco na cicatrização de feridas. Em estudos foi observado que o tratamento tópico com zinco aumentou a epitelização em feridas cirúrgicas de ratos [77,81], agiu melhorando o reparo de pele ulcerada [77,82] e apresentou efeito anti-inflamatório [75]. Também há estudos sobre a sua capacidade antibacteriana frente a bactérias comumente associadas a infecções em processos cirúrgicos como a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* [75,83,84].

Estudos com vidros contendo zinco demonstraram que eles são promissores para aplicações na engenharia de tecidos, pois o zinco atua na formação e manutenção das células ósseas, estimulando a osteogênese, e com isso facilitando o desenvolvimento de uma ligação durável do material com o osso [55,85]. Com isso, a lenta liberação do zinco incorporado no material tende a estimular a formação óssea nas adjacências do material implantado [55]. O zinco também age no aumento da proliferação de fibroblastos, migração de células epiteliais e diminuição do risco de infecção em lesões de tecidos moles, principalmente no processo de cicatrização de feridas, além de normalmente também não apresentar risco de toxicidade para organismos vivos [80,86].

Babu e colaboradores (2021) sintetizaram e estudaram vidros $\text{CaO} - \text{Na}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5$ adicionados de ZnO em concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 % mol. Eles concluíram que todas as amostras produzidas apresentaram crescimento da camada de HA em sua superfície, após 21 dias de imersão em SBF, indicando a bioatividade destas. Também foi concluído por meio dos testes de citocompatibilidade e proliferação que os vidros não foram tóxicos às células e estimularam a proliferação de células ósseas, sendo indicados como aptos para aplicação em reparos ósseos [85].

Em outro estudo, Kermani e colaboradores (2023) produziram vidros boratos mesoporosos 13-93B3 adicionados de zinco, cobre e zinco/cobre em concentrações de 1, 2,5, 5 e 7,5 % em mol, a fim de observar seu potencial para aplicação em cicatrização de feridas. Eles concluíram que os vidros contendo zinco e cobre reduziram significativamente a viabilidade celular de bactérias *P. aeruginosa*, após contato destas com o extrato dos materiais vítreos (2 e 4 mg/mL) por 24 horas [75].

Por outro lado, é relatado que a presença de óxido de zinco em vidros bioativos pode aumentar a sua resistência mecânica e sua durabilidade química, o que tende a reduzir sua degradação quando em contato com soluções aquosas, como o SBF [55,85]. Haimi e colaboradores (2009) observaram que a adição de 5% em mol de óxido de zinco em vidros

compostos por $\text{SiO}_2 - \text{CaO} - \text{Na}_2\text{O} - \text{K}_2\text{O} - \text{MgO} - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{B}_2\text{O}_3 - \text{TiO}_2$ retardou a degradação e formação de HA na superfície da amostra quando imersos por até 14 dias em SBF [53]. Isso pode ser desejado em caso de necessidade de materiais quimicamente resistentes. Com base nas informações apresentadas foi realizado o estudo dos vidros cálcio-sódio-boratos adicionados de óxido de zinco em diferentes concentrações.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção é apresentada a composição das amostras vítreas bem como é descrito o processo de síntese para a obtenção destas. Também são apresentados os processos, materiais e equipamentos utilizados em cada caracterização e análise que os materiais foram submetidos.

3.1 Síntese das amostras

As amostras vítreas foram sintetizadas no Laboratório de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (LEOF), localizado na Unidade de Preparação e Caracterização de Materiais (UPCM) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – Campus Avançado Bom Jesus, na cidade de Imperatriz. Para a síntese das amostras foram utilizados os reagentes: trióxido de boro (B_2O_3), pentóxido de fósforo (P_2O_5), carbonato de cálcio (CaCO_3), carbonato de sódio (Na_2CO_3) e óxido de zinco (ZnO), todos da marca Sigma-Aldrich e com grau de pureza superior a 99%. Para a inserção de ZnO na composição, a mesma porcentagem de B_2O_3 foi retirada da composição da amostra base CaNaB. Na Tabela 2 estão apresentados os códigos de identificação, bem como as composições em porcentagem molar (% mol) e porcentagem peso (% wt) das amostras sintetizadas.

Tabela 2- Códigos das amostras e concentrações dos reagentes utilizados na preparação de cada amostra em porcentagem peso (%wt) e porcentagem molar (%mol).

Amostras	B ₂ O ₃		P ₂ O ₅		CaO		Na ₂ O		ZnO	
	%wt	%mol	%wt	%mol	%wt	%mol	%wt	%mol	%wt	%mol
CaNaB	66,1	64	4,2	2	14,9	18	14,7	16	-	-
1% ZnO	64,9	63	4,2	2	14,9	18	14,7	16	1,2	1
2,5% ZnO	63,2	61,5	4,2	2	14,9	18	14,6	16	3	2,5
5% ZnO	60,4	59	4,2	2	14,8	18	14,6	16	5,98	5
7,5% ZnO	57,6	56,5	4,15	2	14,8	18	14,5	16	8,9	7,5
10% ZnO	54,8	54	4,1	2	14,7	18	14,4	16	11,8	10

No processo de síntese das amostras vítreas primeiramente foi realizada a calcinação do CaCO_3 , processo realizado para liberação de CO_2 e obtenção do CaO ; para a realização desse procedimento o CaCO_3 foi pesado em uma balança analítica, modelo AUW220D e marca SHIMADZU, colocado em um cadinho de platina e levado a um forno da marca JUNG, de atmosfera a ar, com temperatura inicial de 28°C e atingindo 800°C após decorridos 80 minutos, e após decorrido mais 30 minutos atingindo a temperatura de 900°C .

Em seguida foi realizada a pesagem dos demais reagentes e esses, juntamente com o CaO , foram homogeneizados em um almofariz de ágata, transferidos para um cadinho de platina e levados ao forno para que ocorresse a fusão da mistura, a temperatura de fusão foi em 1150°C . O material fundido foi vertido em molde de aço inoxidável previamente aquecido a 450°C , temperatura abaixo da temperatura de transição vítrea (T_g). Posteriormente as amostras foram submetidas a tratamento térmico, também em temperatura de 450°C , em forno de atmosfera a ar, por 4 horas. O tratamento térmico foi realizado para diminuir as tensões internas do vidro presentes devido ao choque térmico. A Figura 6 apresenta um fluxograma resumindo o processo de síntese das amostras vítreas.

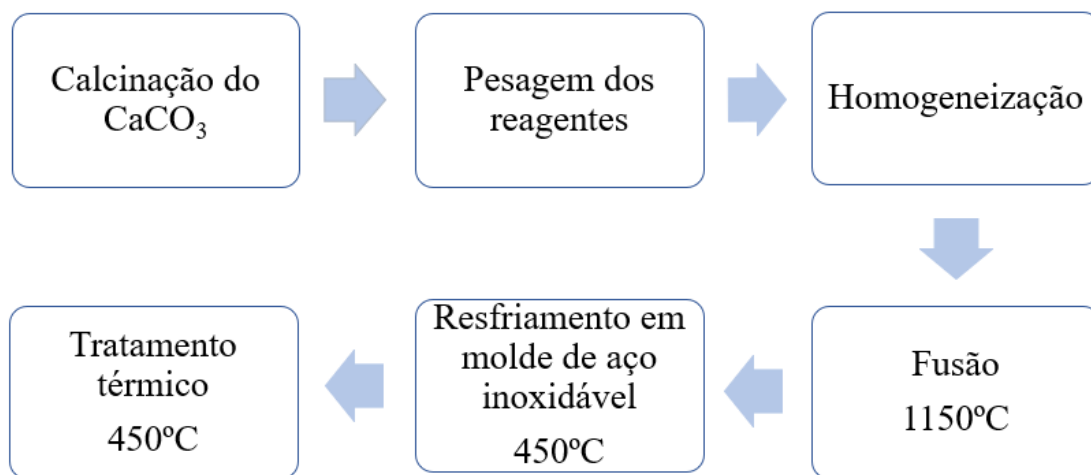


Figura 6 - Fluxograma do processo de síntese das amostras pelo método de fusão/resfriamento.

3.2 Técnicas de caracterização

3.2.1 Densidade e volume molar

A análise da densidade dos sólidos desempenha um papel importante no estudo estrutural destes. Nos vidros, a densidade é dependente principalmente da composição química do material, seu comportamento pode indicar quando ocorre mudanças estruturais em materiais vítreos pela inserção ou retirada de algum elemento da composição. A densidade pode aumentar pela substituição de um elemento de menor massa molar por um de maior, bem como pela compactação da estrutura vítrea [87,88].

O volume molar dos materiais é outra característica importante a ser analisada. Esta propriedade é diretamente ligada à densidade e trata da distribuição espacial dos átomos que formam a estrutura, indicando a proximidade de ligação entre estes; quanto mais próximos, menor o volume molar e quanto mais afastados, maior o volume molar. A diminuição ou aumento do volume molar com a mudança na composição indica as mudanças estruturais por meio dos processos de formação e modificação da rede vítrea [88–90].

No presente trabalho, as medidas de densidade das amostras vítreas, foram realizadas com base no princípio de Arquimedes. Este método consiste em pesar a amostra em ar e posteriormente pesa-la em um líquido de densidade e temperatura conhecidas. A equação 1 foi utilizada para calcular a densidade das amostras:

$$\rho = \left(\frac{mc}{mc - m_{Ap}} \right) \rho L, \quad (1)$$

Em que ρ é a densidade da amostra vítrea, mc é a massa da amostra em ar, m_{Ap} é a massa aparente da amostra (pesada em água) e ρL é a densidade do líquido em determinada temperatura; em nosso experimento utilizamos água destilada. Os valores de volume molar foram obtidos a partir da densidade calculada, utilizando a equação 2:

$$Vm = \frac{M}{\rho}, \quad (2)$$

Na qual Vm é o volume molar, M a massa molar e ρ a densidade das amostras vítreas. A densidade é dada em unidades de g/cm^3 e o volume molar em cm^3/mol . As medidas foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (LEOF) da UPCM com o auxílio de uma balança analítica, modelo AUW220D e marca SHIMADZU e considerando a

densidade da água a 25°C igual a $\rho L = 0,99707 \text{ g/cm}^3$. O erro estimado para os resultados foi de 0,5%.

3.2.2 Análise térmica diferencial (DTA)

Na análise térmica diferencial (DTA) a diferença de temperatura entre a amostra a ser analisada e um cadinho vazio é medida enquanto ambos são submetidos a aquecimento gradual e controlado. Esta técnica fornece informações como: oxidação, ponto de ebulição, temperatura de cristalização (T_x) e temperatura de transição vítrea (T_g), sendo também possível detectar se o fenômeno tem natureza endotérmica ou exotérmica [91,92].

A análise térmica diferencial das amostras foi realizada no Laboratório de Análises Térmicas (LAT), localizado na UPCM, utilizando um equipamento TG-DTA, modelo DTG-60 SHIMADZU, em atmosfera de nitrogênio. Foram utilizadas massas de 20 mg de amostra em cadinho de platina, em um intervalo de temperatura de 20 a 900°C, com taxa de aquecimento de 10°C/min e com fluxo de 100 mL/min.

A partir dessa análise foram obtidos os valores de temperatura de transição vítrea (T_x), temperatura de início de cristalização (T_x), e por conseguinte, da estabilidade térmica (T_x-T_g) das amostras vítreas. Para isso foram utilizadas linhas de intersecção nos eventos observados nos termogramas das amostras obtidos na análise. Como exemplificação do método utilizado, a Figura 7 apresenta o termograma da amostra 7,5% ZnO; nesta é possível observar os principais eventos característicos para esse vidro. Os eventos atribuídos à temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de início de cristalização (T_x) e temperatura de pico de cristalização (T_p) são indicados.

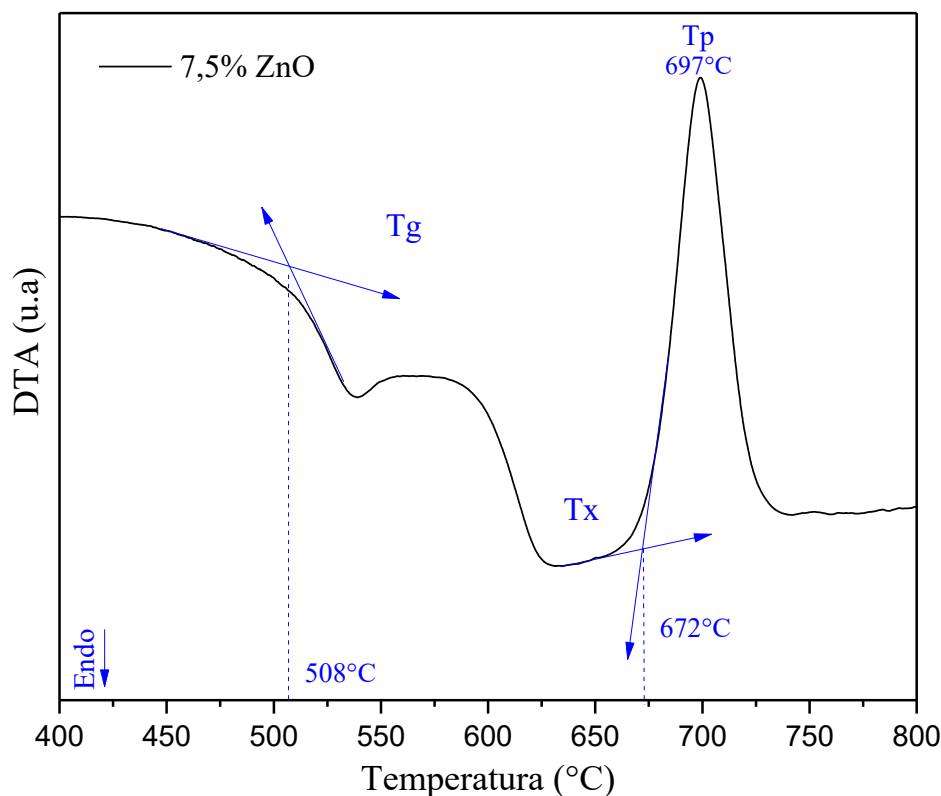


Figura 7- Termograma da amostra 7,5% ZnO.

3.2.3 Testes de Citotoxicidade

Segundo a ISO 10993, do Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), para confirmar se há biocompatibilidade em um material para aplicações biomédicas, o primeiro teste que necessita ser realizado é o ensaio de citotoxicidade *in vitro*, e só depois de comprovada a não toxicidade do material é que os ensaios *in vivo* com animais poderão ser realizados para continuar o estudo da biocompatibilidade. O teste de citotoxicidade compreende a verificação, utilizando diferentes métodos, das alterações que ocorrem em células, via de regra de mamíferos, quando estas são colocadas em contato direto ou indireto com o material testado, e a viabilidade celular é o parâmetro mais comumente utilizado para determinar a toxicidade [93,94].

O teste de citotoxicidade foi realizado no Laboratório de Fisiopatologia e Investigação Terapêutica (LaFIT), localizado na Universidade Federal do Maranhão (UFMA)- Campus Imperatriz. A avaliação da atividade citotóxica dos vidros foi realizada utilizando células da linhagem de macrófagos murinos RAW-264.7; esta linhagem de células foi escolhida para o teste devido a ser característica do sistema imunológico. Então, com a utilização desta linhagem também consegue se prever uma resposta de aceitação ou rejeição pelo corpo ao material implantado. Primeiramente, 1 mg de cada amostra vítrea pulverizada foram esterilizadas em

luz UV por 15 minutos, em seguida foram imersas em 1 mL de meio RPMI-1640 (1 mg/mL) por 24 h a 37°C; após decorrido esse tempo estas foram centrifugadas e o meio foi coletado e usado como estoque de solução. De modo semelhante também foi preparado um extrato vítreo de concentração 0,5 mg/mL.

As células foram incubadas em placas de 96 poços (1×10^5 células/poço) com meio RPMI suplementando com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1% de ácido pirúvico, 0,1% de anfotericina e 0,1% de penicilina/estreptomicina (P/S) por 2 horas a 37°C, em incubadora com 5% de CO₂ e umidade de 95%. Após decorrido esse período, as células não aderentes foram removidas, enquanto as células aderidas foram tratadas com o produto da dissolução iônica (100µL), derivado da incubação das amostras vítreas em meio RPMI, células cultivadas em meios sem o produto iônico de dissolução do vidro bioativo foram utilizadas como o grupo de controle.

A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) [95]. Deste modo, ao final da incubação, o sobrenadante foi removido e substituído por meio de cultura fresco (90µL) e em seguida foi adicionado 10µL de MTT (0,5 mg/mL). A viabilidade celular foi quantificada pela capacidade das células vivas de reduzir o corante amarelo a um produto de coloração púrpura, denominado Formazan. Três horas mais tarde, o sobrenadante foi removido e o produto MTT Formazan foi dissolvido em 100µL DMSO. A absorbância foi medida utilizando um leitor de microplaca da BioTek ELx808 a 540 nm.

3.2.4 Radiopacidade

Materiais radiopacos são vantajosos para utilização em implantes médicos. Essa propriedade permite que o desempenho dos implantes possa ser monitorado de forma econômica e não invasiva por meio de radiografias de raios X. É necessário que o material implantado tenha um certo nível de radiopacidade para poder ser distinguido dos tecidos circundantes e assim ser possível o acompanhamento do grau de formação de tecido ósseo, da reabsorção do material e da cicatrização e regeneração dos tecidos. Elementos como bário, zinco e estrôncio são utilizados para atribuir radiopacidade aos materiais [96,97].

Para analisar a radiopacidade das amostras sintetizadas foi realizada a radiografia das mesmas. A radiografia é uma técnica de imagem que consiste em incidir raios X em um objeto e registrar a intensidade com que os raios passam por este. Isso é possível por meio de filmes ou detectores que permitem tornar a estrutura interna do material visível em razão da diferença de absorção pelos diferentes meios incididos [98].

A radiografia das amostras foi realizada na clínica de imagens Imagem Oral, pela odontologista Tatiana Mesquita. Em placas de fósforo intraoral foram colocadas as amostras cortadas previamente em fatias com espessura de 1 mm. Para realizar a radiografia dos vidros foi utilizado o aparelho de raios X FOCUS da marca Kavo, com emissão de radiação de 60 eV e 7 mA. A distância foco-objeto foi de 20 cm e o tempo de exposição das amostras foi de 0,160 segundos. Após a radiografia das amostras as placas foram inseridas no cassete da estação de tratamento de marca Dürre Dental e modelo VistaScan Perio Plus para a digitalização das imagens.

Junto com as amostras foi radiografado um penetrômetro de alumínio (Figura 8), com degraus de 1 a 5 mm de espessura, a fim de comparação futura. As radiografias digitais foram analisadas por meio da ferramenta histograma do software *Adobe Photoshop Lightroom* em que o valor médio de cinza foi obtido para as amostras e para os degraus do penetrômetro. O nível de cinza das amostras foi então comparado ao dos degraus do penetrômetro para se obter o nível de radiopacidade dos vidros em milímetros de alumínio equivalentes (mmAl).



Figura 8- Penetrômetro de alumínio utilizado na análise de radiopacidade.

3.2.5 Testes *in vitro* em SBF (*Simulated Body Fluid*) e medidas de pH

Para um material ser considerado bioativo é necessário que este, quando submetido a testes *in vitro* e/ou *in vivo*, apresente a formação de uma camada de HA na sua superfície, em que esta vai funcionar como uma interface que estabelece fortes ligações químicas entre o material e o tecido circundante [9]. Os testes *in vitro*, neste trabalho, foram realizados utilizando o SBF, um fluido corporal simulado que possui concentrações iônicas semelhantes ao do plasma sanguíneo, e que foi preparado segundo a metodologia proposta por Kokubo [99].

As amostras sintetizadas foram cortadas em fatias usando uma cortadeira de serra diamantada da marca *Nitrocut*, as fatias foram atritadas a lixas de granulometria 600 em equipamento politriz da marca *Pantec*, modelo *Panlipan U* para provocar ranhuras, aumentando assim a superfície de contato do material com o fluido de imersão durante o teste de bioatividade. As amostras fatiadas ficaram todas com espessura aproximada de 1,25 mm.

As fatias foram fixadas em suportes de polipropileno e inseridas em tubos cônicos também de polipropileno (tubos Falcon); aos tubos foram adicionados 25 mL de SBF. Estes foram, então, colocados em banho-maria da marca NOVATECNICA, modelo N1030T aquecido a temperatura de 36,5°C e permaneceram nessa condição por intervalos de tempo de 7,14, 21 e 28 dias. Durante o tempo de imersão, o pH da solução SBF em que as amostras estavam imersas foi aferido diariamente usando um medidor de pH da marca Gehaka modelo PG 1800 e as mudanças visuais nas amostras durante e após a imersão foram observadas. Ao final dos períodos de 7,14, 21 e 28 dias as amostras foram retiradas do banho-maria e dos tubos de polipropileno, secas ao ar em temperatura média de 25°C e por fim guardadas em dessecador a vácuo para a realização de análises futuras. Todo o processo foi realizado no laboratório LEOF II da UPCM- UFMA.



Figura 9- Fotografia da amostra CaNaB durante o período de imersão em SBF.

3.2.6 Difração de Raios X (DRX)

A técnica de DRX tem como base a capacidade dos materiais cristalinos de difratar os raios-X de forma singular pelos planos cristalinos periódicos de sua estrutura e na detecção do ângulo ou resolução de energia do sinal difratado [98]. Na análise de difração de raios X o padrão do difratograma dependerá do material que está sendo analisado. Nos vidros, que são materiais amorfos, ou seja, possuem desordenamento atômico de longo alcance em sua estrutura, não são observados picos em seu difratograma, mas sim bandas largas e de baixo ângulo; em contrapartida, em materiais cristalinos há arranjo atômico de forma regular e se observa picos estreitos e de intensidade característica da amostra cristalina analisada [100–102].

As medidas de difração de raio X (DRX) foram realizadas antes da imersão das amostras em SBF com o propósito de comprovar a natureza amorfa do material e após a imersão para identificar o crescimento de uma camada de hidroxiapatita cristalina em sua superfície. Essa análise foi realizada no laboratório de Difração de Raios X (LDRX) localizado na Unidade de Preparação e Caracterização de Materiais da Universidade Federal do Maranhão (UPCM), utilizando-se o equipamento Empyrean da marca Panalytical, com varredura angular de 10 a 60° (2 θ), com passo de 0,02 em 2 segundos por passo.

3.2.7 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) consiste em incidir um feixe de radiação infravermelha na amostra a ser analisada, a radiação será parte absorvida e parte transmitida. Como resultado se tem um espectro que representa a absorção da radiação pelas moléculas da amostra. O espectro de absorção contém bandas e picos que caracterizam a frequência de vibração de ligações químicas ou grupos funcionais específicos das moléculas. Como os materiais tem composições diferentes e arranjos atômicos distintos, não há dois compostos que produzam o mesmo espectro, então, este atua como uma impressão digital, que caracteriza apenas uma única estrutura molecular. Esse método pode ser usado para a caracterização de vidros e é uma ferramenta valiosa para estudar a bioatividade desses materiais [103,104].

Os espectros de absorção no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos em um espectrômetro da marca BRUKER, modelo Vertex 70V em temperatura ambiente, com a realização média de 32 varreduras e resolução espectral de 4 cm⁻¹, em uma faixa de número de onda de 4000-400 cm⁻¹, utilizando a técnica da pastilha de brometo de

potássio (KBr). Essa técnica consiste na mistura de 2 miligramas da amostra vítrea com 198 miligramas de KBr para formar uma pastilha de 200 miligramas, a mistura é prensada em uma prensa hidráulica sob uma carga de 7 toneladas/cm² e forma pastilhas homogêneas. Logo após o preparo das pastilhas foram realizadas as medidas. As medidas de FTIR foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Óptica (LEOF) da UPCM, antes e após imersão das amostras em SBF.

3.2.8 Fração de Boros Tetracoordenados (N₄)

Os espectros FTIR das amostras, obtidos antes da imersão em SBF, foram deconvoluídos fazendo uso de funções gaussianas. A deconvolução dos espectros FTIR foi realizada a fim de calcular o N₄, que consiste na fração de boros tetracoordenados (BO₄) presentes na rede vítrea. Utilizando a equação 3 e os espectros FTIR de cada amostra foi calculado o N₄ para cada um dos vidros.

$$N_4 = \frac{A_4}{A_4 + A_3} \quad (3)$$

Em que A₄ representa a área das bandas correspondentes ao grupamento BO₄ e A₃ corresponde a área das bandas referentes ao grupamento BO₃. Então para a determinação da fração de boro tetracoordenado presente em cada amostra foi utilizada a razão entre as áreas das bandas correspondentes ao BO₄ (A₄) pela área total, correspondente à soma das áreas das bandas referentes aos grupos BO₄ e BO₃ (A₄ + A₃) [105,106].

3.2.9 Perda/Ganho de massa

Esta medida consiste na quantificação da perda ou ganho de massa que as amostras vítreas podem ter durante o período de imersão em soluções fisiológicas. Essa perda ou ganho de massa pode ser explicada pelas diversas reações de troca iônica que acontecem entre a superfície dos vidros e o SBF circundante durante o período de imersão [70].

Tais reações são imprescindíveis para a formação da hidroxiapatita na superfície dos vidros, uma vez que a formação desta camada é essencial para a caracterização do material como bioativo. A perda de massa das amostras foi calculada a partir da equação 4, em que w₀ é a massa da amostra antes da imersão em SBF e w é a massa após a imersão.

$$\Delta W = \frac{(w_0 - w)}{w_0} \cdot 100 \quad (4)$$

As amostras foram pesadas antes da imersão em SBF e também após o término dos períodos de imersão de 7, 14, 21 e 28 dias utilizando uma balança analítica de modelo AUW220D e marca SHIMADZU. Todo o processo de análise da perda de massa foi realizado no laboratório LEOF II da UPCM- UFMA.

3.2.10 Atividade antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana dos vidros boratos adicionados de ZnO foram usadas a bactéria Gram positiva *Staphylococcus Aureus* ATCC 6538 e a bactéria Gram negativa *Escherichia Coli* ATCC 25922, utilizando a metodologia de difusão em disco de ágar [107]. Os inóculos bacterianos foram preparados na concentração de 10^8 UFC/mL utilizando o meio de cultura Ágar *Mueller Hinton*; este foi preparado seguindo as especificações do fabricante. Placas de petri contendo ágar foram preparadas um dia antes, com a finalidade de serem utilizadas no teste.

A estas placas de petri foram adicionados 100 µL do inóculo bacteriano de *S.Aureus* ou 100 µL do inóculo bacteriano de *E.Coli* e então espalhados com swab. Nas placas contendo os inóculos bacterianos foram adicionados discos das amostras CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO. Os discos foram produzidos a partir das amostras vítreas pulverizadas e prensadas, estes tinham massa de 300 mg e 13 mm de diâmetro. Nas placas contendo os inóculos bacterianos também foram adicionados discos dos antibióticos Penicilina G/ Benzilpenicilina (Pen 10), Gentamicina (Gen 10), Tetraciclina (Tet 30) e Vancomicina (Van 05), estes com diâmetro de 6,7 mm. A amostra CaNaB, que não contém zinco em sua composição, foi utilizada com controle negativo e os antibióticos anteriormente mencionados foram utilizados como controle positivo.

As placas preparadas com as amostras vítreas e com os antibióticos foram incubadas em estufa, com temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$, pelo período de 24 horas. Ao fim do tempo de incubação as placas foram retiradas e foi observado se houve a formação de zonas de inibição do crescimento bacteriano, em forma de halos, ao redor dos discos. Se formados, o diâmetro dos halos foi medido e anotado. O teste foi realizado em duplicata e a média foi calculada, a fim de comprovar se há diferença significativa entre as médias dos grupos foi utilizado a análise de variância ANOVA- One way, ao nível de significância $p \leq 0,05$. Para comparação pareada das médias, a fim de identificar quais médias diferem entre si, foi utilizado o teste de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados e discussões referentes às análises realizadas nos materiais vítreos durante o desenvolvimento deste trabalho. Uma foto das amostras vítreas CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO, cortadas em fatias com diâmetro de 10 mm e espessura de 1,25 mm, é apresentada na Figura 10. Todas as amostras são transparentes e incolores, sem a presença de cristalitos ou estrias visíveis (sob inspeção visual). Com isso, a inserção de ZnO não provocou nenhuma alteração visual nos vidros sintetizados.

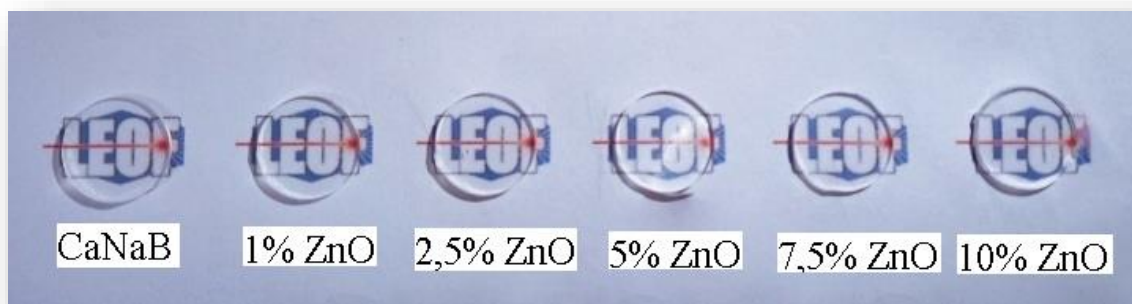


Figura 10- Fotografia das amostras vítreas cortadas em fatias de 10 milímetros de diâmetro e 1,25 milímetros de espessura.

4.1 Densidade volumétrica e volume molar

A Figura 11 apresenta os valores de densidade volumétrica e volume molar das amostras vítreas em função da concentração de ZnO, (em % molar). Observando os dados apresentados, é possível perceber um aumento da densidade em função do aumento da concentração de óxido de zinco inserido na matriz vítrea. Os dados de volume molar apresentam comportamento inverso aos de densidade; observou-se uma diminuição do volume molar das amostras em função do aumento da concentração de ZnO.

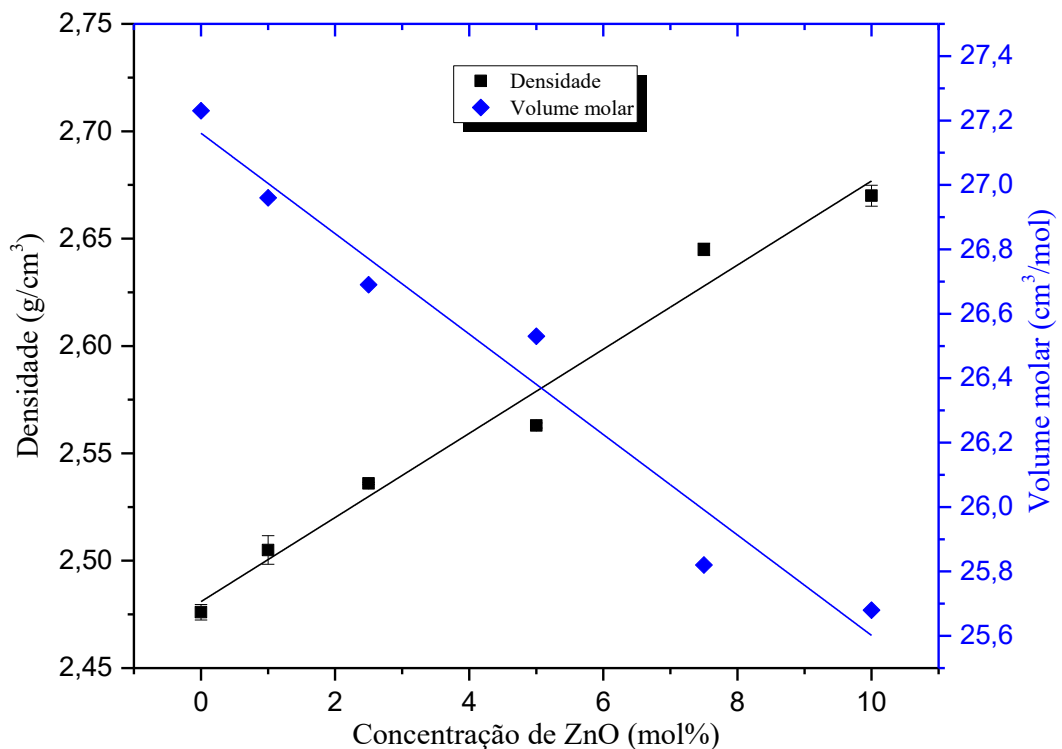


Figura 11- Densidade e volume molar das amostras em função da concentração de ZnO.

A densidade apresentou aumento de $2,48 \text{ g/cm}^3$ (amostra CaNaB) para $2,67 \text{ g/cm}^3$ (amostra 10% ZnO), sendo essa porcentagem de aumento de 7,66%. Para a inserção do ZnO na matriz vítrea foi retirado o B_2O_3 na mesma porcentagem. O aumento da densidade ocorreu devido à essa substituição, pois a massa molar do óxido de zinco ($81,38 \text{ g/mol}$) é maior que a do trióxido de boro ($69,62 \text{ g/mol}$). E ainda, esse aumento pode ser relacionado à possível compactação da rede, comportamento indicado pela diminuição do volume molar em função do aumento da concentração de zinco [108].

O volume molar apresentou uma diminuição de $27,23 \text{ g/cm}^3$ (CaNaB) para $25,68 \text{ g/cm}^3$ (10% ZnO), diminuição essa de 5,69%. Ahmad e colaboradores (2014) obtiveram resultado semelhante no estudo de vidros boratos com substituição de B_2O_3 por ZnO em concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30% em mol. Eles relataram que com o aumento da concentração de ZnO também se observou uma diminuição do volume molar das amostras vítreas e que esse comportamento indica que a inserção de ZnO deixou a rede vítrea mais compacta com diminuição de tamanho de ligação entre os átomos. Segundo os autores, a diminuição do volume molar dos vidros se deu devido à diferença no volume molar entre o B_2O_3 , que tem maior volume molar ($43,09 \text{ cm}^3/\text{mol}$), e o ZnO, que apresenta menor volume molar ($14,52 \text{ cm}^3/\text{mol}$) [109]. A compactação da rede vítrea também pode ter ocorrido devido às mudanças nas unidades estruturais dessa rede, mais especificamente, pode ter ocorrido conversão de

unidades BO_3 em unidades BO_4 e com isso uma diminuição na concentração de oxigênios não ligados na rede vítrea[106]. Esta hipótese será abordada e discutida na seção 4.4.

4.2 Difração de Raios X (DRX)

A Figura 12 apresenta os difratogramas das amostras vítreas, realizados antes da imersão em SBF. Estes confirmam a natureza amorfa do material, pois nota-se a ausência de picos cristalinos e presença apenas de duas bandas largas, com centros em ~ 29 e $47^\circ 2\theta$, que são características de vidros boratos [19,110]. Observa-se também, que os difratogramas de todas as amostras são semelhantes entre si, não apresentando mudanças significativas pela adição de óxido de zinco.

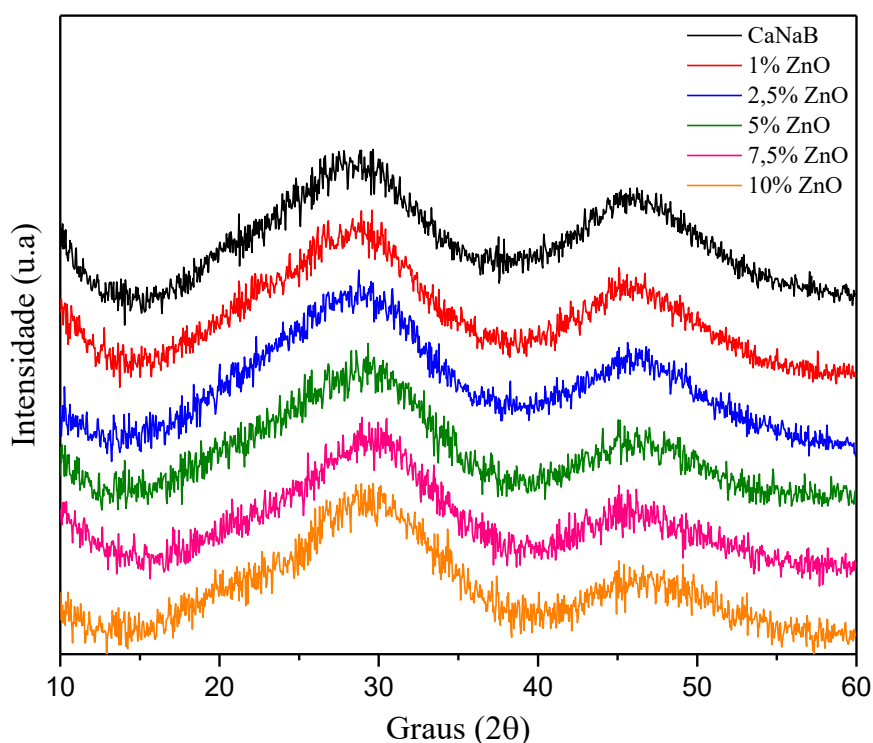


Figura 12- Difratograma das amostras antes da imersão em SBF.

Wers e colaboradores (2014), a partir dos difratogramas de DRX, também observaram que a adição de ZnO em concentrações de 0,1 a 10% (em peso) em vidros silicatos 46S6 ($46 \text{ SiO}_2 - 24 \text{ CaO} - 24 \text{ Na}_2\text{O} - 6 \text{ P}_2\text{O}_5$ % peso) não afetou o caráter amorfo das amostras vítreas [91].

4.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção FTIR das amostras vítreas estão apresentados na Figura 13. Estes apresentam três regiões de absorção típicas de vidros boratos, a primeira região em ~ 470 - 780 cm^{-1} , a segunda em ~ 780 - 1200 cm^{-1} e a terceira em aproximadamente 1200 a 1650 cm^{-1} [111].

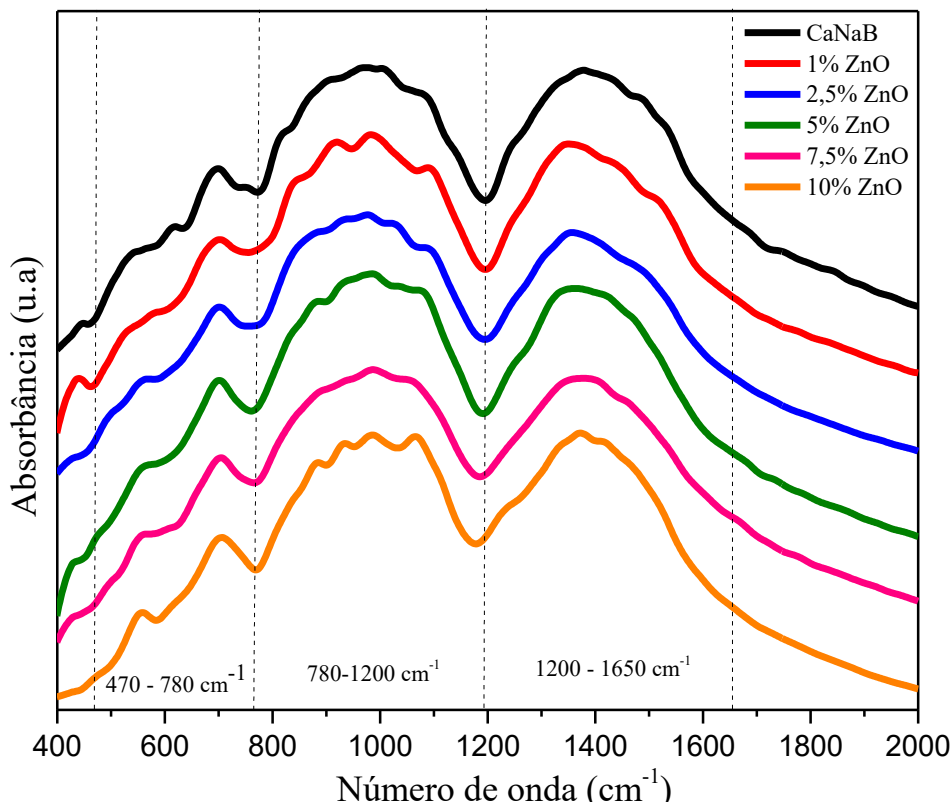


Figura 13- Espectros FTIR de todas as amostras antes da imersão em SBF.

Na primeira região do espectro, a banda com centro em aproximadamente 560 cm^{-1} é atribuída às vibrações da ligação P-O-P nos grupos PO_4^{3-} [54,112]. A banda compreendida na região de 600 a 780 cm^{-1} , com centro em $\sim 700\text{ cm}^{-1}$, está relacionada a vibrações do tipo flexão das ligações B-O-B dos grupos BO_3 [16,113]. A banda localizada na região central do espectro de 780 - 1200 cm^{-1} é originária de vibrações do tipo estiramento das ligações B-O-B dos grupos BO_4 [69,114]. E a última banda, localizada na faixa de 1200 - 1650 cm^{-1} , é referente às vibrações do tipo estiramento das ligações B-O-B dos grupos BO_3 [54,112,113].

É possível observar uma pequena banda em aproximadamente 430 cm^{-1} , essa banda pode ser atribuída às vibrações das ligações Zn-O dos grupos ZnO_4 , pois estudos indicam que a faixa de número de onda de 400 a 550 cm^{-1} apresenta bandas características desse grupamento

em vidros contendo zinco [109,115]. A presença de bandas características de ZnO_4 são um indicativo que o zinco está atuando na matriz vítrea como formador de rede. Corroborando a isso, trabalhos na literatura reportam que os íons de zinco atuam predominantemente, como formadores de rede, na forma de ZnO_4 , quando adicionados aos vidros boratos alcalinos [78,79,116]. Entretanto, não é possível concluir completamente se essa banda é realmente devido aos grupamentos ZnO_4 , pois essa região do espectro apresentou ruídos em quantidade significativa.

4.4 Fração de Boros Tetracoordenados (N_4)

A Figura 14 apresenta o espectro FTIR da amostra 10% ZnO deconvoluído por meio de funções gaussianas.

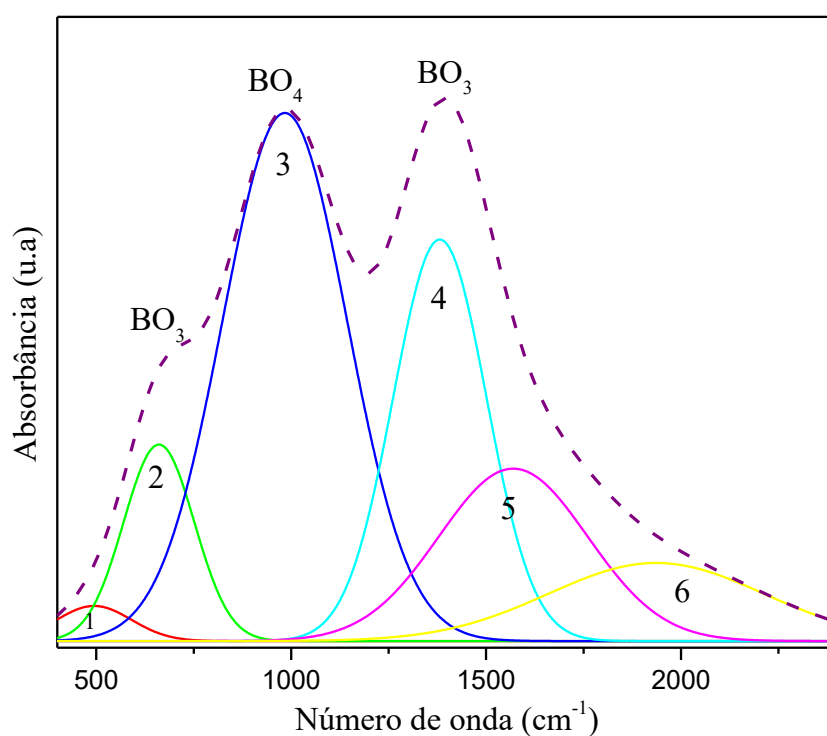


Figura 14- Espectro FTIR da amostra 10% ZnO deconvoluído.

Observando a Figura 14, tem-se que a área A_4 corresponde a área da banda 3, já a área A_3 corresponde às áreas das bandas 1,2,4,5 e 6. Esse procedimento foi realizado para todas as amostras e se obteve o valor de N_4 para cada uma delas. A Figura 15 apresenta os valores de N_4 em função da concentração de ZnO presente no material vítreo.

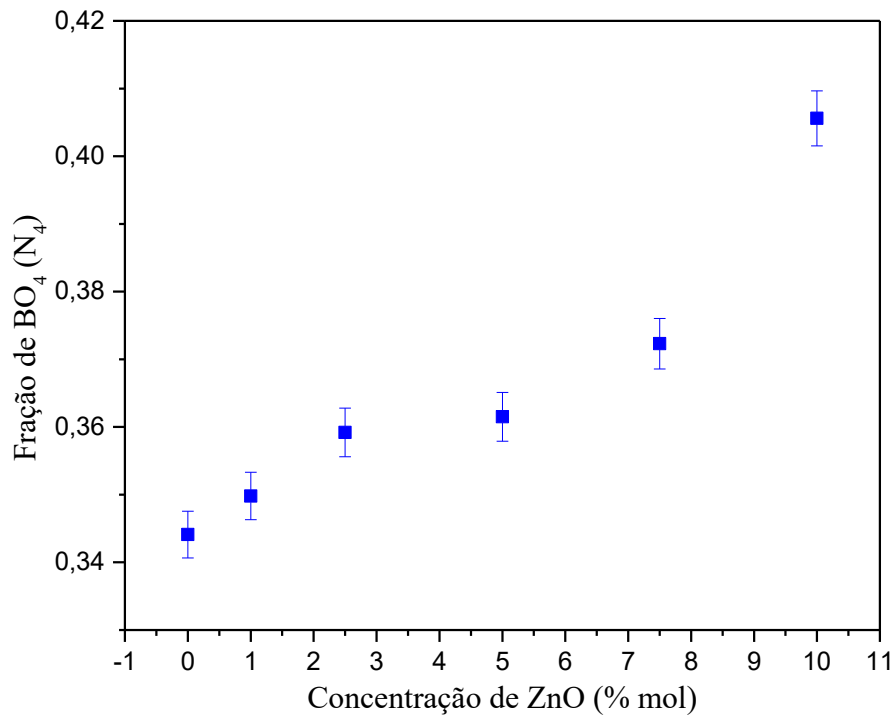


Figura 15- Valores de N_4 em função da concentração de ZnO adicionado nas amostras vítreas.

De acordo com a Figura 15, é possível indicar que houve um aumento na fração de boros tetracoordenados (N_4) em função do aumento da concentração de ZnO adicionado às amostras vítreas. Este resultado indica que a inserção de ZnO na matriz vítrea proporcionou uma conversão de unidades BO_3 para unidades BO_4 . Comprovando o que foi indicado no resultado obtido na análise do volume molar. A diminuição do volume molar das amostras com a adição de ZnO já indicava a compactação da rede vítrea e essa foi comprovada pela análise de N_4 . Então, a maior conversão de unidades BO_3 para BO_4 , comprovada pela deconvolução dos espectros FTIR, acarretou na diminuição de oxigênios não ligados presentes na matriz vítrea [105,109] e na compactação da rede vítrea, em função da concentração crescente de ZnO adicionada [106]. A maior compactação da rede, com o aumento crescente da concentração de ZnO é um fator que influencia no aumento da estabilidade química do material.

4.5 Análise térmica diferencial (DTA)

A Tabela 3 apresenta os valores de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de início de cristalização (T_x) e estabilidade térmica ($T_x - T_g$) obtidos a partir dos termogramas das amostras sintetizadas. A Figura 16 apresenta o gráfico de T_g , T_x e estabilidade térmica em função da concentração de ZnO presente nas amostras vítreas.

Tabela 3- Valores de temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de início de cristalização (Tx) e estabilidade térmica (Tx-Tg) das amostras vítreas sintetizadas.

Amostra	Tg (°C) ($\pm 5^{\circ}\text{C}$)	Tx (°C) ($\pm 5^{\circ}\text{C}$)	Tx – Tg (°C) ($\pm 10^{\circ}\text{C}$)
CaNaB	508	638	130
1% ZnO	510	643	133
2,5% ZnO	514	639	125
5% ZnO	515	658	143
7,5% ZnO	508	672	164
10% ZnO	518	675	157

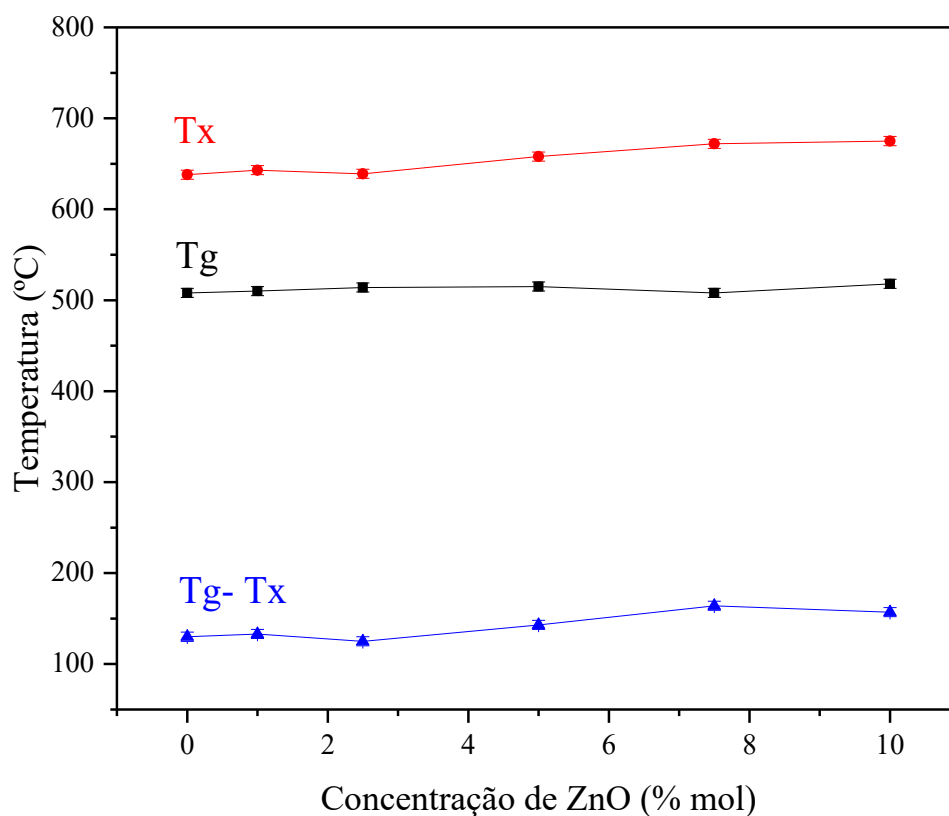


Figura 16- Valores de Tx, Tg e Tx-Tg em função da concentração de ZnO.

Observando a Tabela 3 e a Figura 16, é possível indicar que a Tg das amostras vítreas não varia significativamente, em função da concentração de ZnO, levando em consideração o erro de 5°C atribuído à análise. A Tx varia entre 634°C (CaNaB) e 675°C (10% ZnO), podendo ser observado que os valores de Tx para as amostras CaNaB, 1% ZnO e 2,5 % ZnO não variam (dentro do erro), mas é notado um aumento para as amostras 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10 % ZnO.

Por conseguinte, a estabilidade térmica apresenta comportamento semelhante, apresentando valores próximos para as amostras CaNaB, 1% ZnO e 2,5 % ZnO e aumento para as amostras 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10 % ZnO.

Kullberg e colaboradores (2016) obtiveram resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Eles observaram que a Tx e a estabilidade térmica de vidros borossilicatos contendo zinco apresentaram aumento com o aumento da razão $\text{ZnO/B}_2\text{O}_3$ nas amostras vítreas [117]. Yang e colaboradores (2019) também observaram aumento nos valores de Tx e estabilidade térmica com o aumento da concentração de ZnO presente nos vidros $\text{ZnO-B}_2\text{O}_3\text{-Bi}_2\text{O}_3\text{-BaO}$ [118].

Quanto maior a estabilidade térmica do vidro, menores são as chances de ocorrer cristalização em operações de trabalho que demandem aquecimento [117]. Então, com o aumento da estabilidade térmica dos vidros em função da maior concentração de ZnO há um aumento na faixa de temperatura de trabalho destes, o que pode ser vantajoso para aplicações destes vidros em dispositivos médicos que necessitem que o material vítreo seja modelado.

4.6 Radiopacidade

A Figura 17 apresenta as radiografias das amostras vítreas juntamente com o penetrômetro de alumínio.

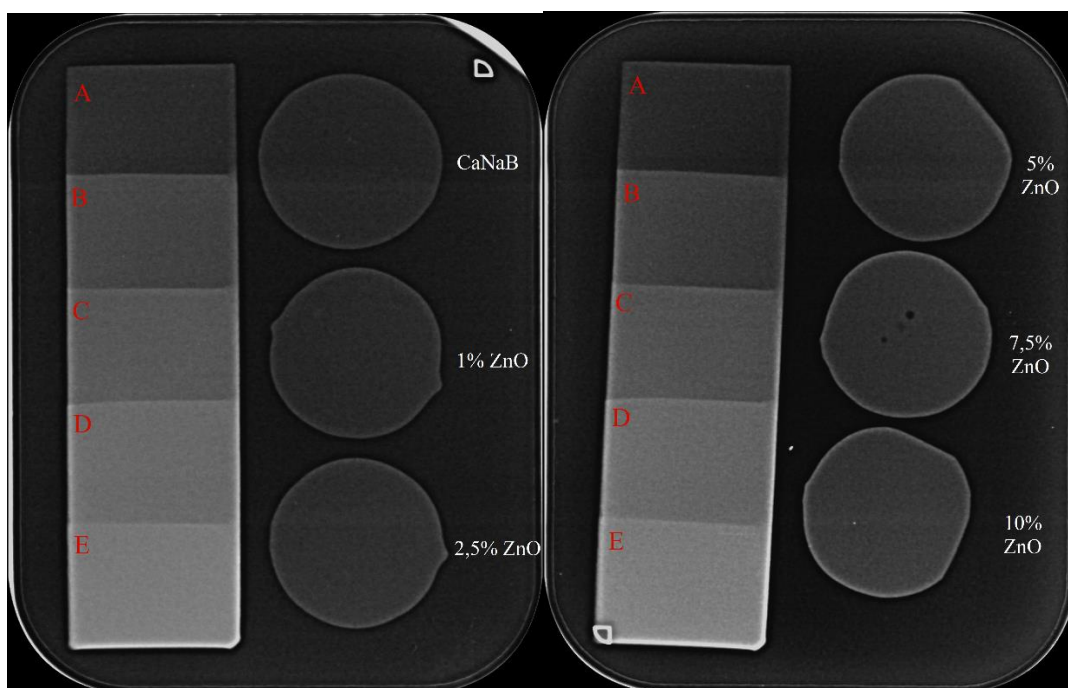


Figura 17- Radiografia das amostras vítreas e do penetrômetro de alumínio.

A partir das imagens de radiografia foram obtidos os valores de nível de cinza para cada um dos degraus do penetrômetro como também para as amostras vítreas. Os degraus do penetrômetro são identificados na Figura 17 com as letras de A a E de acordo com a sua espessura. O degrau A tem 1 mm de espessura, o degrau B tem 2 mm, o C tem 3 mm, o D tem 4 mm e o E tem 5 mm de espessura. A Figura 18 apresenta os gráficos de níveis de cinza em função da espessura, em milímetros, dos degraus do penetrômetro. Na Figura 18a) é apresentada a comparação do nível de cinza das amostras CaNaB, 1% ZnO e 2,5% ZnO e na Fig. 18b) das amostras 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO com o nível de cinza dos degraus de alumínio. Essa comparação foi realizada para se obter o nível de radiopacidade das amostras vítreas em milímetros de alumínio equivalentes (mm Al).

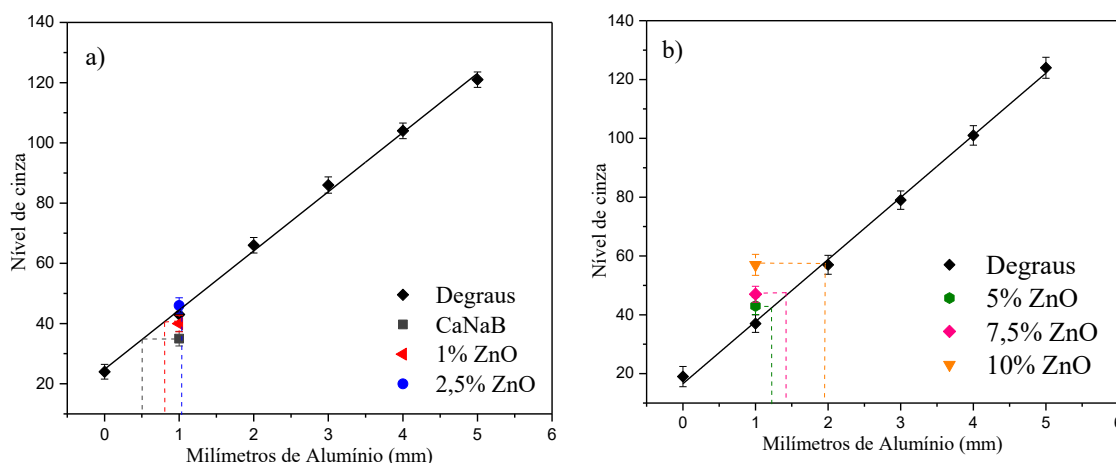


Figura 18- Gráficos do nível de cinza em função dos milímetros de alumínio para obtenção do nível de radiopacidade em mmAl das amostras a) CaNaB, 1% ZnO e 2,5% ZnO e b) 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO.

A Figura 19 apresenta o gráfico de nível de radiopacidade em milímetros de alumínio equivalentes em função da concentração de ZnO, em % molar, das amostras vítreas.

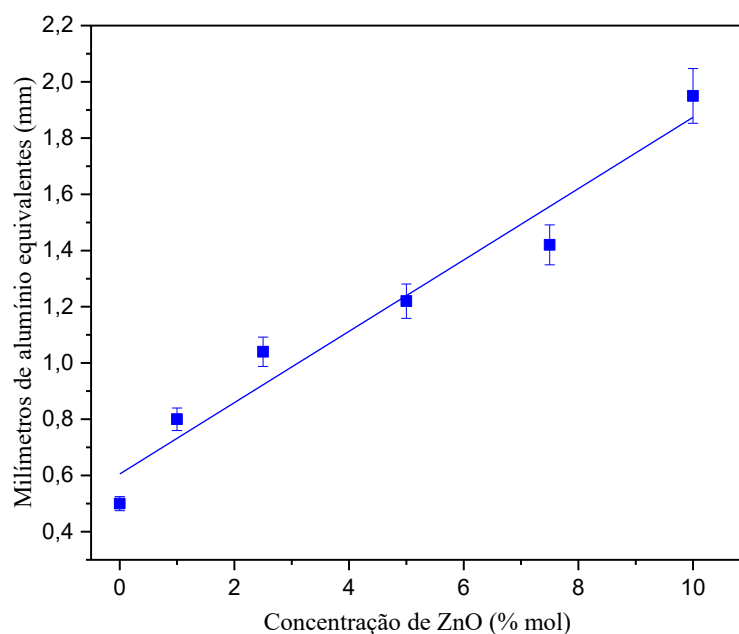


Figura 19- Nível de radiopacidade das amostras, em mmAl, em função da concentração de ZnO.

É possível observar que a amostra CaNaB, com 1 mm de espessura, apresentou nível de radiopacidade equivalente com 0,5 mm de alumínio. A amostra 1% ZnO teve equivalência a 0,8 mmAl, a amostra 2,5% ZnO a 1,04 mmAl, a 5% ZnO a 1,22 mmAl, a 7,5% ZnO a 1,42 mmAl e a 10% ZnO a 1,95 mmAl. Todas as amostras foram radiografadas com espessura de 1mm. Então, é possível indicar que há um aumento da radiopacidade dos vidros em função do aumento da concentração de óxido de zinco na matriz vítrea. Esse aumento pode ser explicado devido à incorporação de uma concentração crescente de ZnO ao vidro, pois a radiopacidade de um material aumenta com a adição de elementos de maior número atômico em sua composição, o zinco tem número atômico igual a 30 [119].

Em imagens de radiografia utilizadas a fim de acompanhar o processo de implantação de materiais em tecidos ósseos e dentários, é necessário que seja possível distinguir o material do tecido circundante. A dentina tem radiopacidade equivalente a 1 mmAl [120], com a inserção de maiores concentrações de ZnO se observa valores maiores que 1mmAl para a radiopacidade das amostras 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO. Portanto, esse é um indício de que, em aplicações odontológicas os vidros boratos bioativos contendo 5, 7,5 e 10% de ZnO conseguiriam ser distinguidos da dentina quando monitorados por radiografia.

4.7 Análise visual das amostras durante e após imersão em SBF por 28 dias

As amostras CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO, após a imersão por 28 dias em SBF, são exibidas na Figura 20.

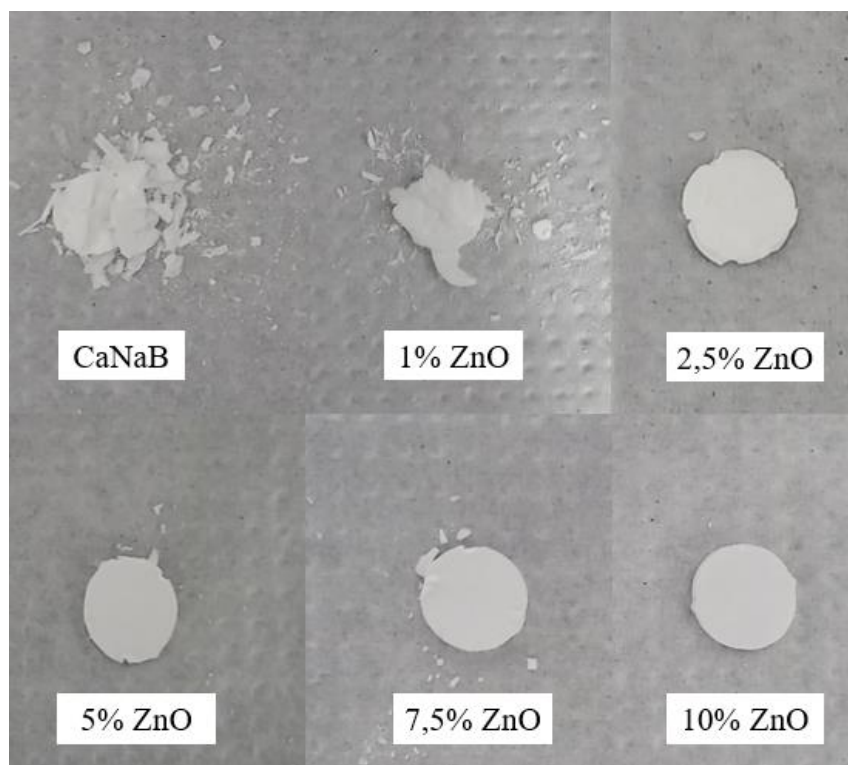


Figura 20 - Amostras CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO após imersão em SBF por 28 dias.

É possível observar que as amostras apresentaram mudanças morfológicas quando comparadas às amostras antes da imersão (Figura 10). Foram observadas diariamente as mudanças visíveis nas amostras durante os 28 dias. As amostras CaNaB, 1% ZnO e 2,5% ZnO começaram a apresentar opacidade no 2º dia de imersão, no 3º dia a amostra 5% ZnO apresentou opacidade, a 7,5% ZnO apresentou no 5º dia e a 10% ZnO no 9º dia.

No 4º dia de imersão foi observado, nas amostras CaNaB e 1% ZnO, o surgimento de uma camada branca na superfície do vidro começando a partir das bordas e se desenvolvendo na direção do centro, cobrindo todo o exterior da amostra CaNaB, no 9º dia, e da amostra 1% ZnO, no 8º dia. Do mesmo modo, a amostra 2,5% ZnO começou a apresentar a camada branca no 5º dia e foi totalmente coberta no 12º dia. A amostra 5% ZnO apresentou o surgimento da camada no 8º dia de imersão e ela cobriu totalmente a superfície dessa amostra no 17º dia. As amostras 7,5% e 10% ZnO começaram a apresentar a camada branca mais tarde, no 12º e 14º

dia, respectivamente, e observou-se essa recobrir todo o exterior das amostras apenas no 21º dia de imersão.

Na Figura 20, é possível notar que as amostras CaNaB e 1% ZnO apresentaram, visualmente, a maior degradação, mostrando descamação e maior perda da integridade física, seguida da 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e da 10% ZnO. O indica que os vidros que possuem uma maior concentração de ZnO apresentaram uma menor degradação em solução, o que é um indício do papel do ZnO como estabilizador da rede vítrea devido à maior compactação da rede, comportamento este indicado nos resultados de densidade, volume molar e fator N4.

4.8 Análise de dados de pH

Os valores de pH da solução SBF, contendo as amostras vítreas CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO, estão apresentados na Figura 21. Os valores do pH ao longo do tempo de imersão indicam que houve interação iônica entre os vidros e o SBF, em que estes ficaram imersos durante 7, 14, 21 e 28 dias.

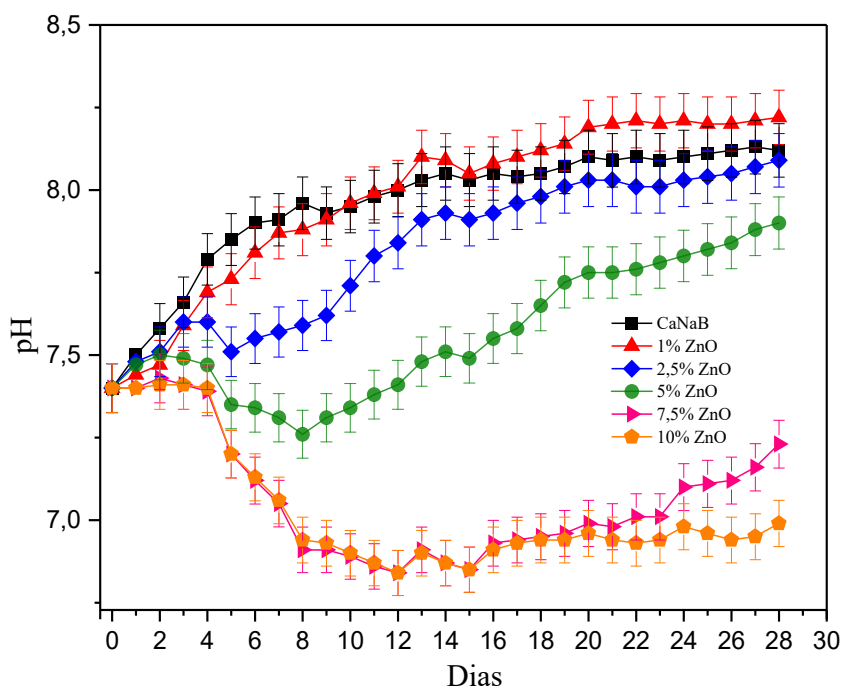


Figura 21- Valores de pH do SBF medidos durante os 28 dias de imersão para as amostras CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO.

Para todas as amostras, o pH no dia da imersão foi de 7,40, sendo este o valor de referência. É possível observar que, com o passar dos dias, os valores de pH do SBF apresentaram comportamentos diferentes de acordo com a amostra imersa. O pH das soluções

contendo as amostras CaNaB e 1% ZnO apresentou aumento com o passar dos dias, e estabilizou a partir do 20º dia, atingindo pH de 8,12 e 8,22 no 28º dia, respectivamente. Esse aumento pode ser explicado pela troca de íons entre a solução e o vidro, principalmente os íons Ca^{2+} e Na^{+} da amostra vítrea com os íons H^{+} do SBF. Essa troca aumenta a concentração de íons alcalinos e diminui a concentração de íons H^{+} na solução SBF, aumentando a basicidade da solução [121–123].

O pH da solução SBF em que foi imersa a amostra 2,5% ZnO se manteve estável (dentro do erro) até o 9º dia de imersão e, posteriormente, foi observado um aumento gradual semelhante ao observado nas duas amostras anteriores. Em contrapartida, no pH da amostra 5% ZnO foi observada uma queda do 3º ao 8º dia, e após isso, foi observada uma elevação. O pH das soluções contendo as amostras 7,5% ZnO e 10% ZnO apresentou comportamento similar entre si. Esses apresentaram uma queda mais acentuada do 4º ao 12º dia, atingindo o menor valor de pH de 6,84 para ambas as amostras. Posteriormente, a amostra 7,5% ZnO apresentou um sutil aumento no pH, já a 10% ZnO manteve o pH constante até o 28º dia.

O aumento do pH nos primeiros dias de imersão provavelmente se deu devido à rápida reação inicial de troca de íons alcalinos da amostra com os íons H^{+} da solução. A posterior diminuição dos valores de pH, possivelmente ocorreu devido ao aumento da concentração de ZnO na composição, pois, nesses casos, é possível ter ocorrido uma maior migração de íons zinco para o SBF e isso propicia a formação de $\text{Zn}(\text{OH})_2$ na solução, aumentando a concentração de H^{+} livre no meio, ocasionando o decréscimo do pH do SBF [85,124,125]. A possível formação de $\text{Zn}(\text{OH})_2$ na solução [126] pode propiciar uma diminuição da taxa de formação de hidroxiapatita. Isso pode ocorrer devido à competição dos íons Zn^{2+} com o fosfato de cálcio pelos íons OH^{-} , íons estes que são necessários na fase final de cristalização da HA [9,51].

A partir das medidas de pH do SBF, contendo as amostras, é possível apontar que devido ao aumento da concentração de ZnO adicionado à matriz vítrea, houve uma menor troca de íons alcalinos Ca^{2+} e Na^{+} da amostra vítrea com os íons H^{+} da solução. Essas trocas iônicas são o que propiciam a formação da camada de hidroxiapatita no material [9]. Pode-se indicar isso já que foi observado uma diminuição nos valores de pH em função do aumento da concentração de ZnO presente no material e, maiores valores de pH são um indicativo de uma maior taxa de troca entre esses íons [122,123].

4.9 Perda/Ganho de massa

A Figura 22 apresenta os percentuais de perda de massa de todas as amostras, calculados a partir da equação 3. É possível observar que a porcentagem de perda de massa tende a aumentar com o decorrer do tempo de imersão, para as amostras CaNaB, 1% ZnO e 2,5% ZnO até o 28º dia de imersão e para as amostras 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO até o 21ª dia. Nota-se também que, a partir da amostra 2,5% ZnO, com o aumento da concentração de zinco adicionado na amostra, há uma diminuição da porcentagem desta perda. O erro da balança utilizada foi 0,0001 g, e a partir disso, o erro associado à perda de massa foi calculado por propagação de erro.

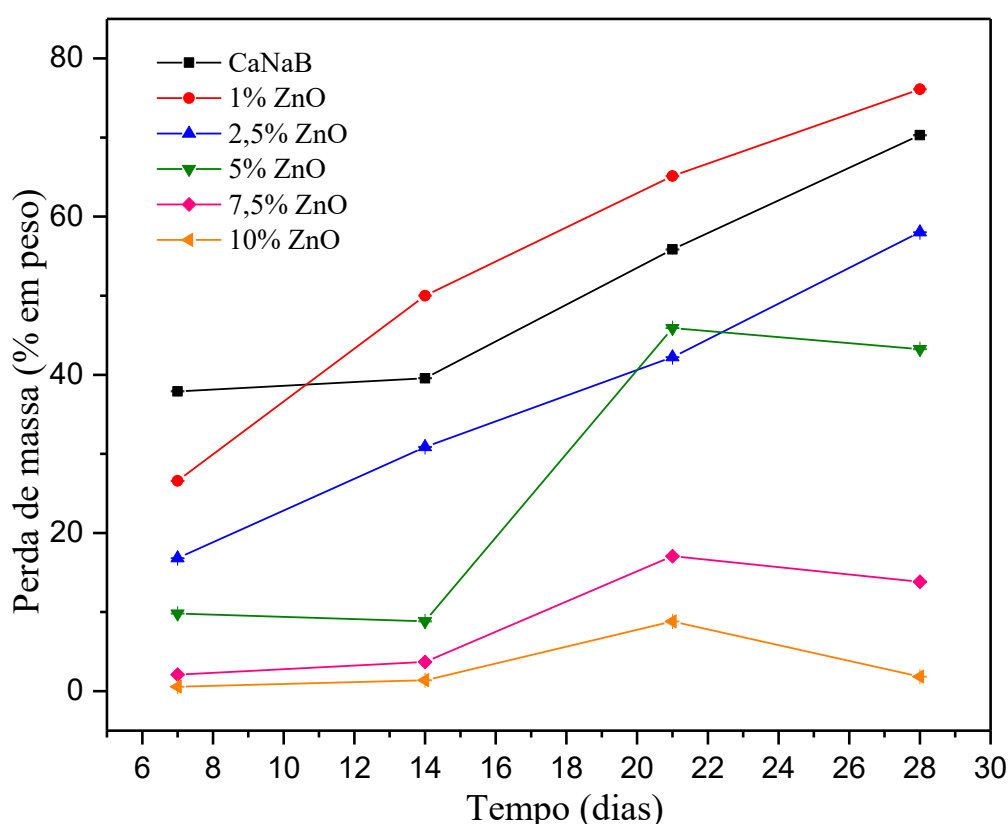


Figura 22- Percentual de perda de massa das amostras em função do tempo de imersão.

Este resultado é um indicativo do efeito estabilizador do zinco na matriz vítrea, o que corrobora os resultados anteriormente apresentados da análise visual das amostras e medidas de pH do SBF. A inserção de maiores concentrações de ZnO na matriz vítrea pode aumentar a estabilidade química desta, diminuindo então, a taxa de dissolução das amostras devido à diminuição da lixiviação dos íons de sua superfície para o meio, o que, consequentemente, retarda a degradação deste [62]. É apontado nos resultados de volume molar e fração de BO_4 (N_4) que há a compactação da rede vítrea devido a inserção de ZnO, e que isso tende a aumentar a estabilidade química do material. Os resultados de perda de massa comprovam isso.

Haimi e colaboradores (2009) obtiveram resultados semelhantes para perda de massa. As fibras de vidro borossilicato adicionadas de zinco em concentrações de 0 a 5% molar apresentaram uma perda de massa no decorrer de 14 dias de imersão, inversamente proporcional ao teor de zinco presente na matriz vítrea [53].

É possível observar que os resultados de percentual de perda de massa das amostras (Figura 22) e as medidas de pH do SBF (Figura 21) estão diretamente relacionados. O mesmo comportamento observado nas medidas de pH do SBF é observado no percentual de perda de massa das amostras, em que há uma diminuição dos valores de pH medidos e também uma diminuição nos percentuais de perda de massa em função do aumento da concentração de ZnO presente na matriz vítrea. O que mostra que a degradação química e física das amostras é diretamente relacionada às trocas iônicas entre o material e a solução SBF.

Nota-se que as amostras CaNaB e 1% ZnO, que tiveram a maior perda de massa em função do tempo de imersão, também apresentaram valores mais elevados de pH, como também aumento nesses valores em função do período de imersão. Esse comportamento comprova que, para essas amostras, houve uma maior troca iônica entre o material e o SBF durante o período de imersão, e por consequência, uma maior degradação química e física destas.

As amostras 7,5% ZnO e 10% ZnO apresentaram os menores percentuais de perda de massa e menores valores de pH do SBF, como também diminuição desses valores em função do aumento do tempo de imersão. O que mostra que, com o aumento da concentração de ZnO, a taxa de troca iônica entre o material e a solução diminuiu, e devido a isto, a perda de massa do material foi menor. Reforçando, o já anteriormente mencionado, indício da capacidade do zinco de aumentar a estabilidade química da matriz vítrea estudada.

4.10 Citotoxicidade

Os resultados do teste de citotoxicidade para todas as amostras estão exibidos na Figura 23. Esta traz o percentual de viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7, depois de tratados por 24h com a solução obtida a partir da dissolução de cada amostra vítrea em meio RPMI em concentrações de 500µg/mL e 1000µg/mL. Para compreender os resultados obtidos, é preciso levar em consideração os resultados da amostra controle. Esta contém apenas o meio celular, sem a presença de amostra vítrea, ou seja, a proliferação celular é 100%. Segundo a ISO 10993, para um material ser considerado não citotóxico se admite um limite mínimo de viabilidade celular de 70% [93].

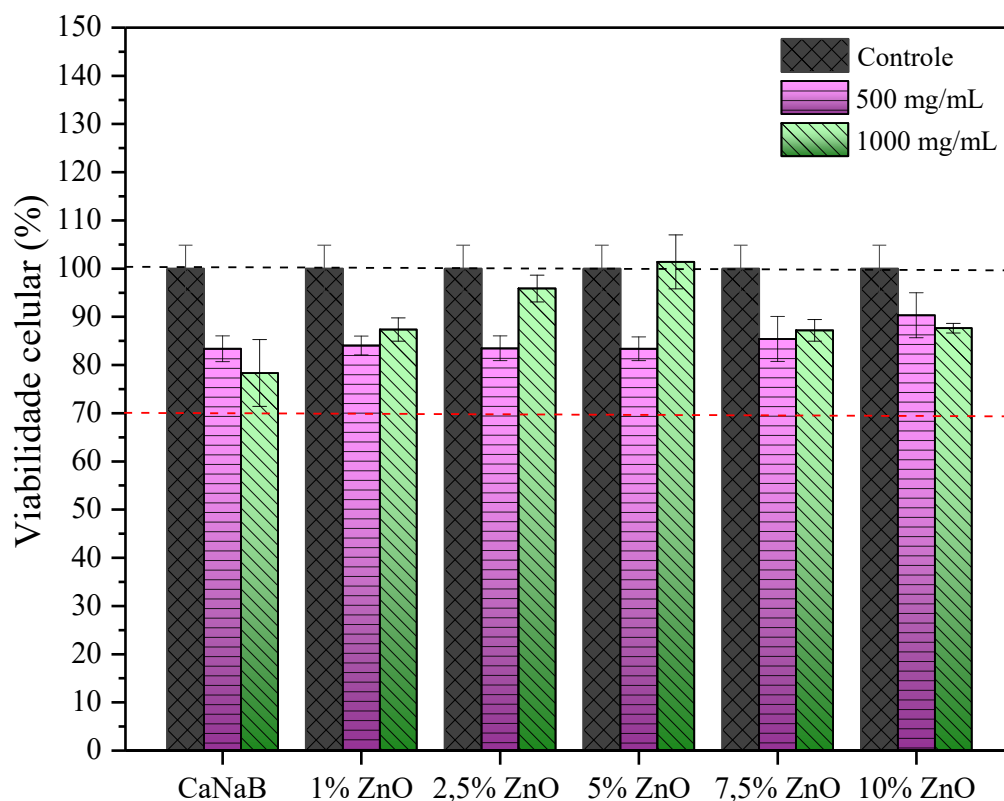


Figura 23- Viabilidade celular de macrófagos RAW 247 após contato por 24 horas com extrato vítreo em concentrações de 500µg/mL e 1000µg/ mL de todas as amostras.

Os resultados mostraram que nenhum dos vidros bioativos apresentou citotoxicidade nas duas concentrações testadas, pois nenhum apresentou uma viabilidade celular menor que 70%. Analisando a Figura 23, é possível observar que as porcentagens de viabilidade celular obtidas após o contato dos extratos vítreos de todas as amostras em concentração 500µg/mL com os macrófagos foram semelhantes, não apresentando aumento ou diminuição significativa com o aumento da concentração de ZnO adicionado ao material.

Em contrapartida, na análise realizada com extrato vítreo de concentração 1000µg/mL, houve um aumento da viabilidade celular com a adição de ZnO até 5% em mol na matriz vítrea CaNaB, seguida de uma diminuição na viabilidade para as amostras 7,5% ZnO e 10% ZnO.

Kermani e colaboradores (2023) avaliaram a citotoxicidade de vidros boratos adicionados de ZnO em concentrações de 1; 2,5; 5 e 7,5 % mol. Eles concluíram que os extratos vítreos com concentração 0,5 mg/mL não apresentaram citotoxicidade às células de fibroblasto de camundongo (L929), mas ao aumentar a concentração de ZnO observou-se uma diminuição da viabilidade celular [75].

Os resultados de viabilidade celular com extrato vítreo das amostras em concentração de 1000µg/mL podem estar relacionados à liberação iônica do material no fluido de imersão, essa indicada pelas medidas de pH apresentadas na Figura 21. É possível notar que as amostras CaNaB e 1% ZnO apresentam valores de pH com comportamento semelhante ao longo do tempo de imersão, de mesmo modo as amostras 7,5% ZnO e 10% ZnO também apresentam valores de pH com comportamento semelhante entre si. A solução contendo as amostras 2,5% ZnO e 5% ZnO apresentam valores de pH intermediários a esses dois grupos anteriormente mencionados; é possível observar que o comportamento de evolução dos valores de pH, principalmente da amostra 5% ZnO, é mais constante e apresenta menor aumento ou diminuição quando comparadas às outras amostras.

Isso é um indicativo que os maiores valores de viabilidade celular observados para a amostra 2,5% ZnO e, principalmente, para a amostra 5% ZnO podem estar relacionados a uma taxa de liberação iônica sem grandes variações, do material para o meio.

4.11 Difração de Raios-X (DRX)

A análise de difração de raios-X foi realizada para as amostras para as amostras após os tempos de 7, 14, 21 e 28 dias de imersão destas em SBF. A fim de identificar os picos apresentados nos difratogramas, e comprovar que estes são referentes à formação de HA no material, foi utilizado o difratograma padrão da hidroxiapatita como referência (JCPDS 09-0432) (Figura 24).

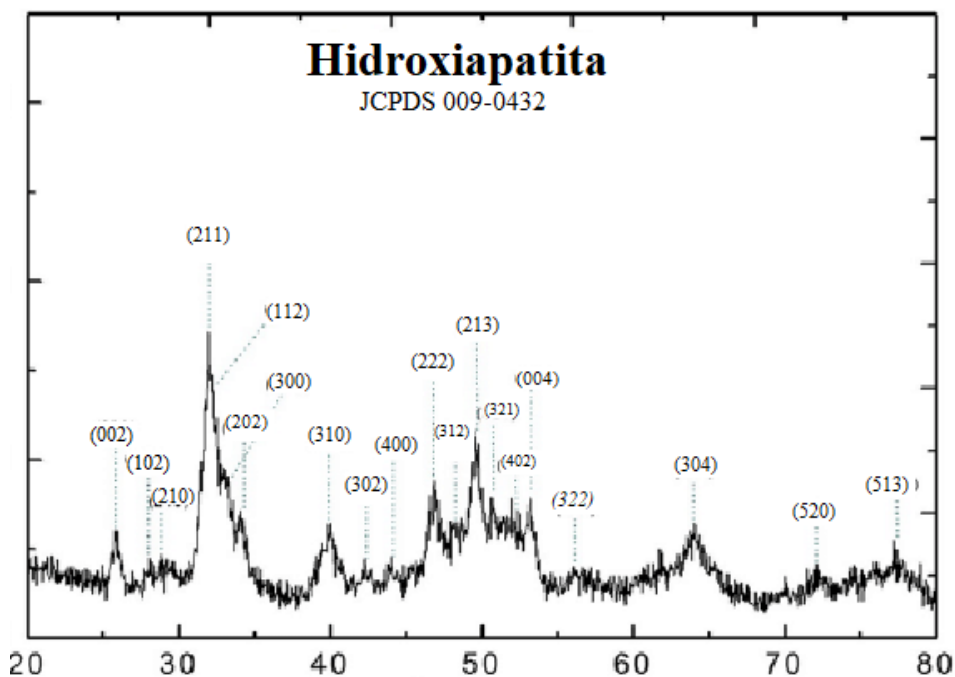


Figura 24- Picos do difratograma padrão da hidroxiapatita (JCPDS 09-0432). **Fonte:** Adaptado de [127].

A Figura 25 exibe os difratogramas obtidos para a amostra CaNaB após imersão por 7, 14, 21 e 28 dias em SBF.

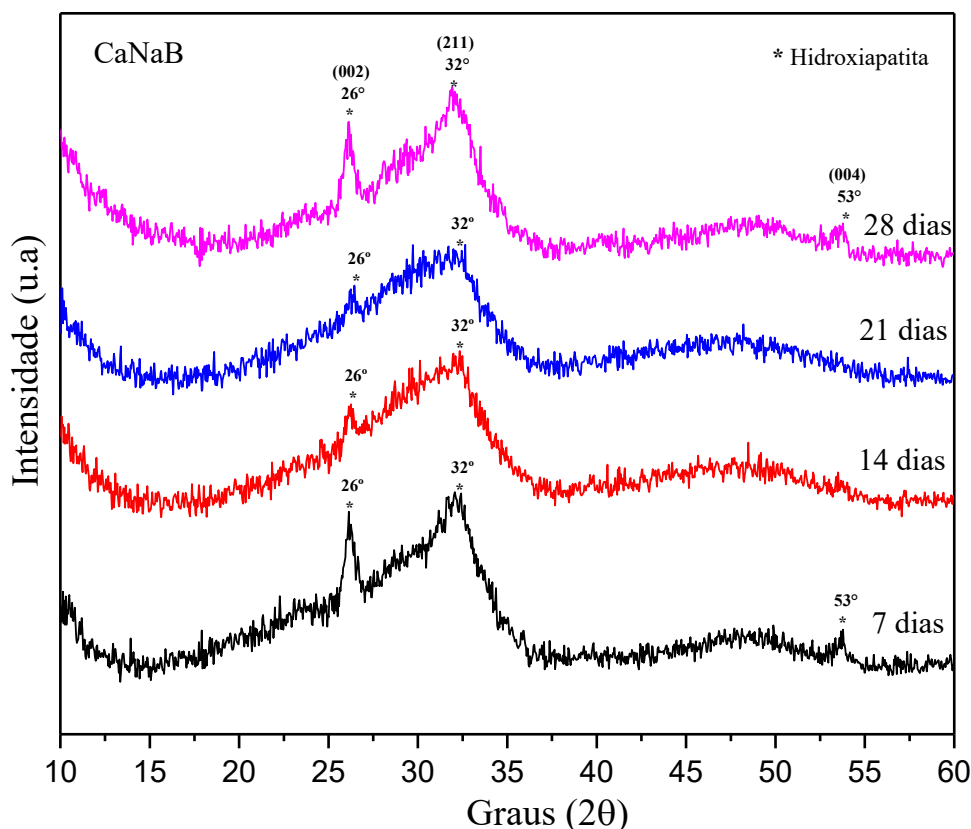


Figura 25-Difratogramas obtidos para a amostra CaNaB após 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF.

Nos difratogramas obtidos para a amostra CaNaB (Figura 25) foi possível observar o surgimento de picos em 26° e 32° 2θ após todos os períodos de imersão, como também de um pico em 53° 2θ no difratogramas obtidos após 7 e 28 dias de imersão em SBF. Os picos em 26° , 32° e 53° 2θ correspondem respectivamente aos planos 002, 211 e 004 do difratograma padrão da hidroxiapatita (JCPDS 09-0432) [1,13,127–129]. A Figura 26 contém os difratogramas obtidos para a amostra 1% ZnO após 7, 14, 21 e 28 dias de imersão. Após esses períodos específicos de imersão em SBF, não foi possível observar picos cristalinos nos difratogramas dessa amostra.

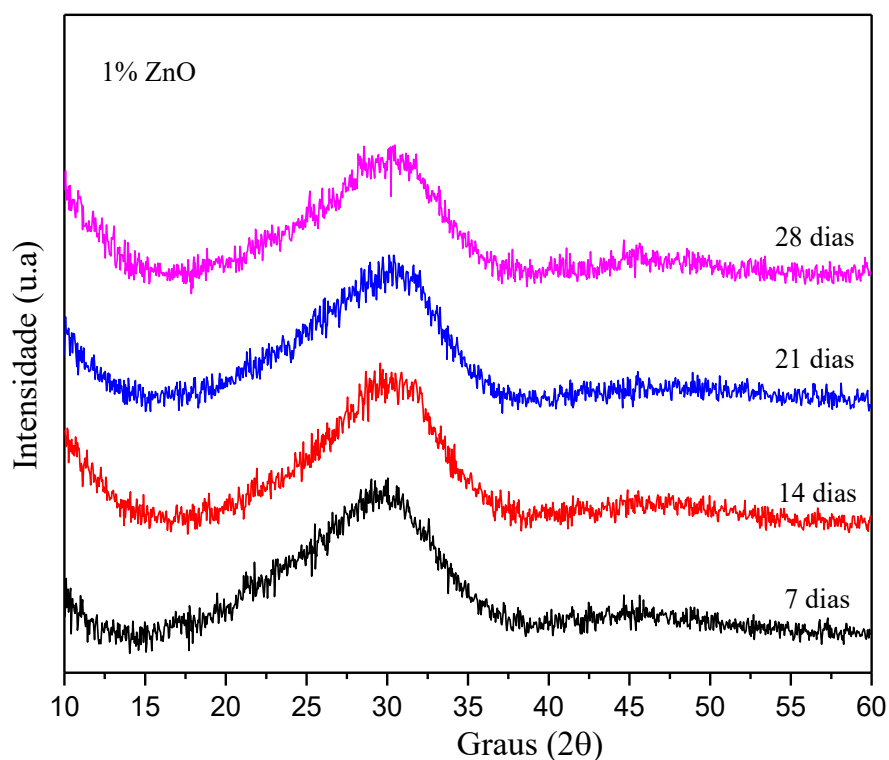


Figura 26- Difratomogramas da amostra 1% ZnO após 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF.

Os difratogramas da amostra 2,5% ZnO, após os quatro períodos de imersão em SBF, são apresentados na Figura 27. Para essa amostra se observa o aparecimento de picos cristalinos em 32 e 46° 2θ apenas no difratograma do material imerso por 21 dias em SBF, onde o pico em 46° corresponde ao plano 222 do difratograma padrão da hidroxiapatita [127], não sendo possível observar picos nos difratogramas após os outros períodos de imersão.

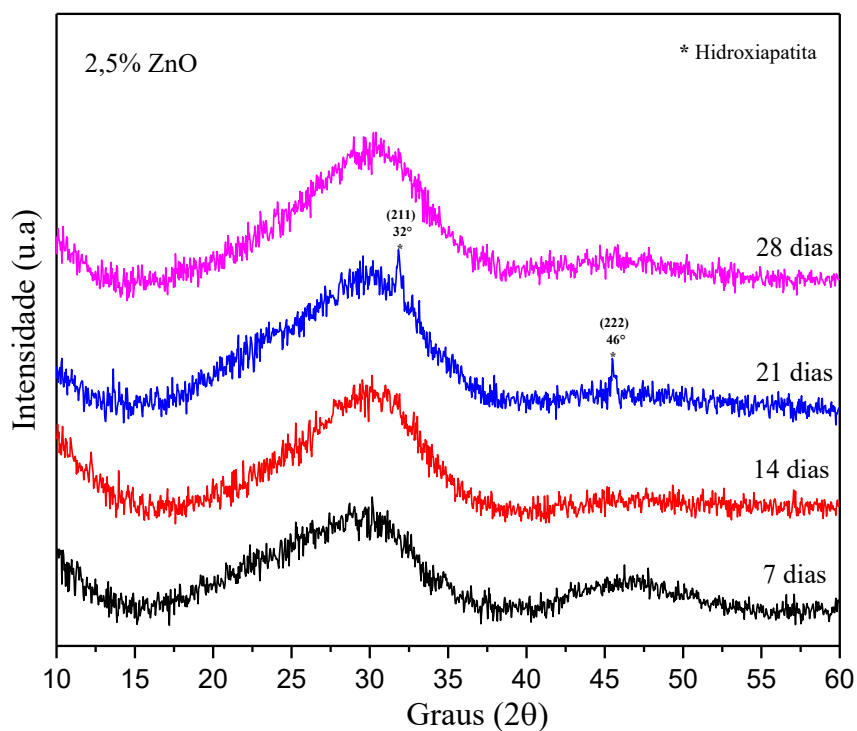


Figura 27- Difratomogramas da amostra 2,5% ZnO após 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF.

A Figura 28 mostra os difratogramas da amostra 5% ZnO após os períodos de imersão. Essa amostra apresenta comportamento semelhante a 2,5% ZnO, apenas o difratograma obtido para o material imerso por 21 dias apresentou picos em 32 e 46° 2θ.

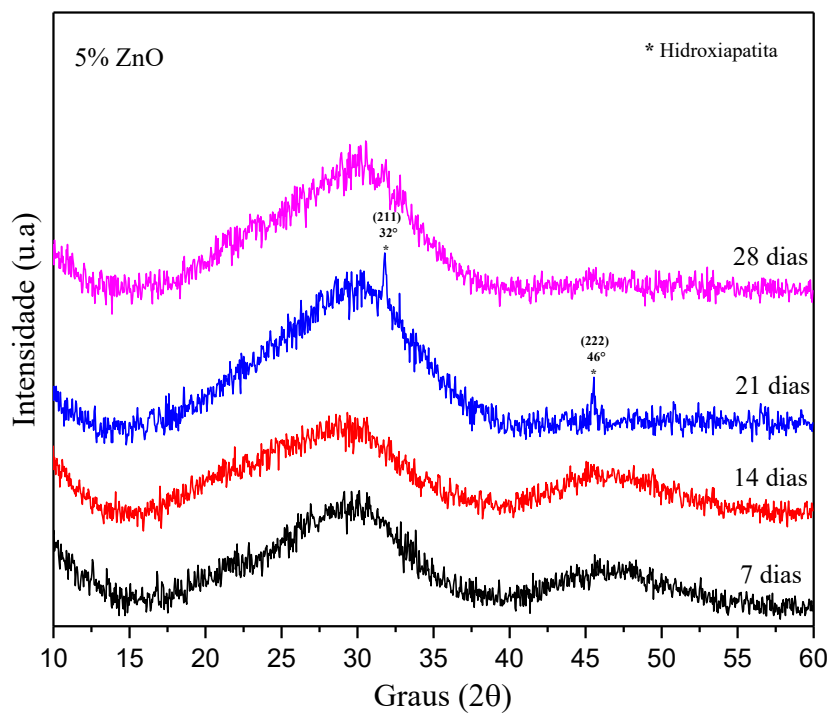


Figura 28- Difratomogramas obtidos para a amostra 5% ZnO após 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF.

As Figuras 29 e 30 apresentam os difratogramas para as amostras 7,5% ZnO e 10% ZnO, respectivamente, após 7, 14, 21 e 28 dias de imersão. Nos difratogramas das duas amostras não foi observado picos cristalinos após nenhum dos períodos de imersão em solução SBF.

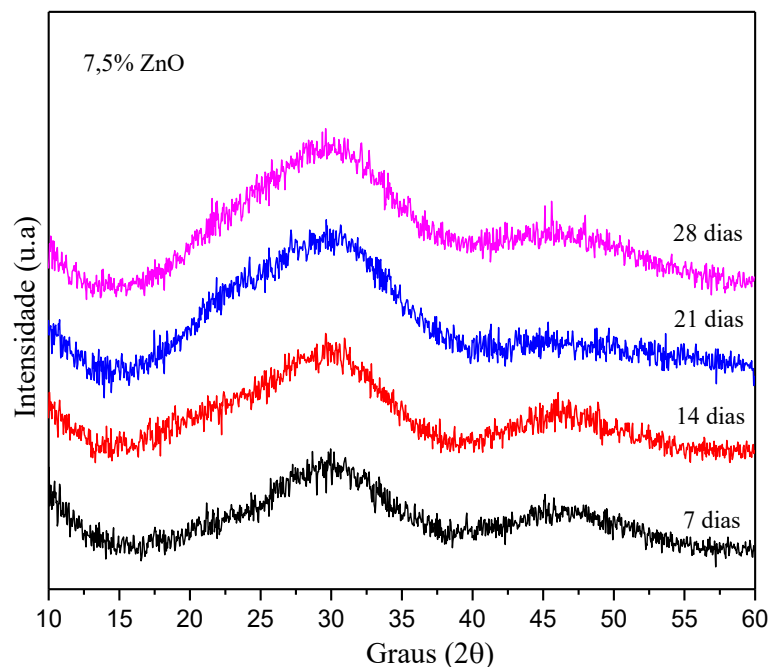


Figura 29- Difratogramas obtidos para a amostra 7,5% ZnO após 7, 14, 21 e 28 dias de imersão SBF.

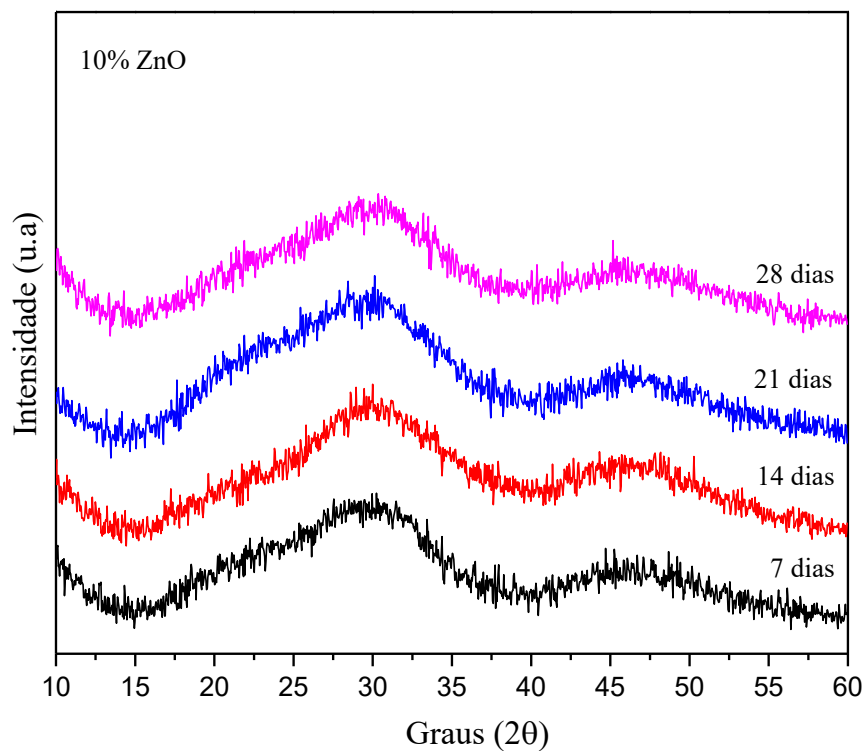


Figura 30- Difratogramas obtidos para a amostra 10% ZnO após 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF.

A formação de hidroxiapatita na superfície dos vidros, durante imersão, ocorre devido a um conjunto de várias reações de dissolução e precipitação. Nesse processo os íons Ca^{2+} que estão localizados na superfície da amostra, devido ao processo de dissolução desta, reagem com os íons PO_4^{3-} do SBF levando à formação de uma camada superficial de fosfato de cálcio que posteriormente pode cristalizar em HA pela incorporação de íons OH^- [9,51].

Se após a formação da camada de HA, a solução conter ainda uma grande quantidade de íons H_3O^+ e OH^- , ocorrerão novas reações de precipitação que formarão nova camada de fosfato de cálcio amorfo, podendo haver cristalização [18]. Este processo comumente ocorre, e pode ter sido a causa da ausência de picos característicos da hidroxiapatita nos difratogramas das amostras 2,5% ZnO e 5% ZnO após o tempo de imersão de 28 dias, mesmo estes sendo observados após 21 dias de imersão.

Observou-se também que as amostras contendo maior concentração de zinco (7,5% ZnO e 10% ZnO) não apresentaram picos cristalinos após imersão em qualquer período, o que provavelmente ocorreu devido à maior estabilidade da rede vítrea e consequentemente menor taxa de troca iônica e formação de HA pela maior incorporação de zinco na rede.

Outra possível explicação para esse comportamento, é o retardo da nucleação e inibição do crescimento de cristais de hidroxiapatita devido à adsorção de íons de zinco nos sítios de crescimento da HA, desacelerando então a formação da camada, principalmente no início do processo de mineralização, devido à possível maior quantidade de íons de zinco no processo. [130].

Portanto, os picos em 26, 32, 46 e 53° 2 θ correspondem, respectivamente, aos planos 002, 211, 222 e 004 do difratograma padrão da hidroxiapatita (JCPDS 09-0432) [1,13,127–129]. Indicando que houve a formação de uma camada de hidroxiapatita cristalina sobre a superfície das amostras CaNaB, 2,5% ZnO e 5% ZnO, comprovando a bioatividade dessas amostras. Esse comportamento é melhor destacado na Figura 31 que mostra os difratogramas de todas as amostras após 21 dias de imersão.

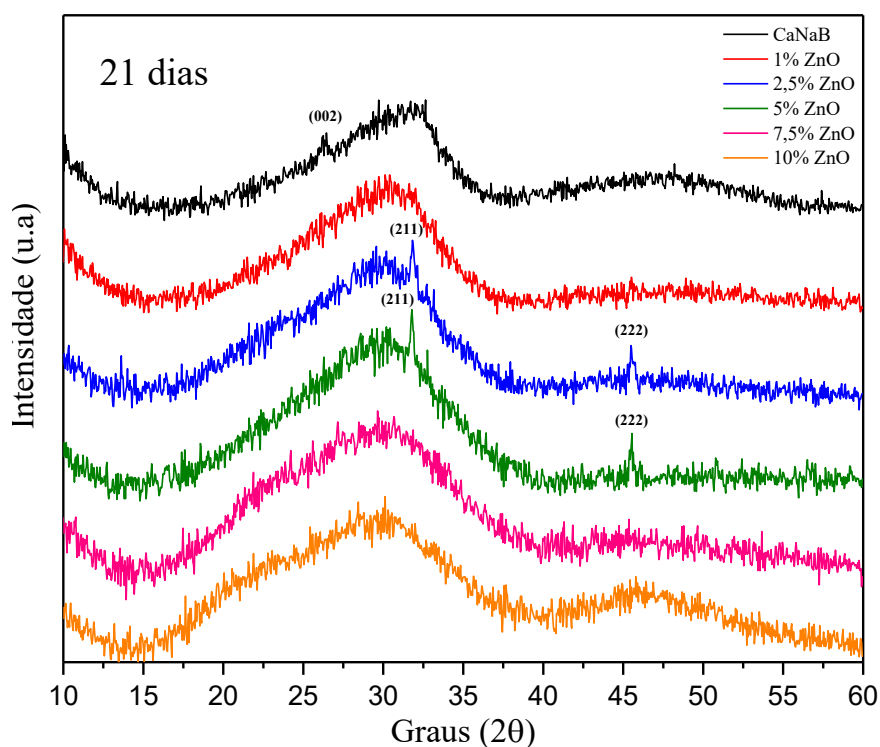


Figura 31- Difrátogramas obtidos para todas as amostras após 21 dias de imersão em SBF.

Aina e colaboradores (2008) estudaram o efeito da adição de ZnO nas concentrações de 5(HZ5) e 20,2 (HZ20) % em peso no Bioglass 45S5. Eles concluíram que a alta concentração de zinco no vidro HZ20 foi responsável por uma excessiva redução da dissolução e pela incapacidade de formação de hidroxiapatita no material após 14 dias de imersão, enquanto o vidro HZ5 apresentou formação de HA em até uma semana [62].

4.12 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros FTIR das amostras vítreas foram obtidos após a imersão destas em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias. A Figura 32 apresenta os espectros obtidos para a amostra base CaNaB.

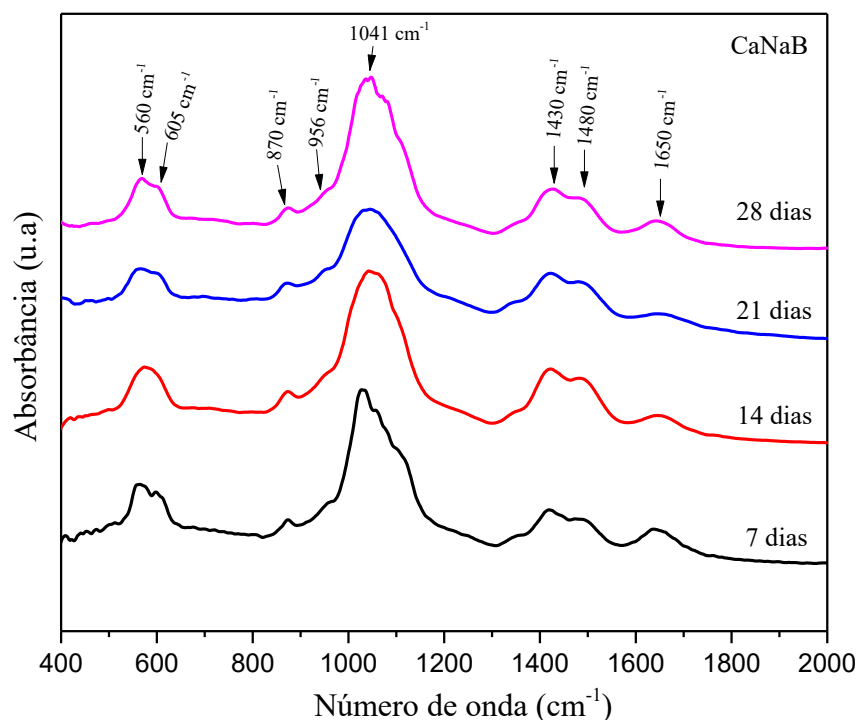


Figura 32- Espectros FTIR da amostra CaNaB após imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.

A banda localizada na região de $500\text{--}650\text{ cm}^{-1}$, que em alguns dos espectros se divide em duas bandas em 560 e 605 cm^{-1} , é atribuída a modos triplamente degenerados de vibrações do modo de flexão das ligações O-P-O em grupos fosfatos tetraédricos (PO_4). Essa banda corresponde ao fosfato de cálcio amorfo, a divisão desta em duas bandas menores com centros é um indicativo da cristalização do fosfato de cálcio, o que é dado como um indicativo da formação de hidroxiapatita [130–133]. A banda mais intensa com centro em 1041 cm^{-1} é atribuída a modos triplamente degenerados de vibrações do modo estiramento assimétrico das ligações O-P-O em grupos fosfatos (PO_4) [54,114,133].

As bandas em 870 e 956 cm^{-1} também são referentes ao grupamento PO_4 . As bandas em aproximadamente 1430 e 1480 cm^{-1} , compreendidos dentro da faixa de 1400 a 1500 cm^{-1} , são atribuídos à ressonância da ligação C-O no CO_3^{2-} [70,132,134]. A banda com centro em aproximadamente 1650 cm^{-1} é referente aos grupos OH^- [13,85]. A Tabela 4 apresenta os números de onda das bandas anteriormente citadas e as ligações e grupos a que essas são atribuídas.

Tabela 4- Números de onda das bandas apresentadas nos espectros FTIR e suas atribuições.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
500 – 650	Modo de flexão das ligações O-P-O em grupos PO_4 .

1041	Modo de estiramento das ligações O-P-O em grupos PO ₄ .
870 e 956	Grupos PO ₄ .
1400 – 1500	Ressonância da ligação C-O do grupo CO ₃ ²⁻ .
1650	Grupos OH ⁻ .

A presença da banda em 500-650 cm⁻¹ e da banda com centro em 1041 cm⁻¹ é um indicativo da formação da camada de hidroxiapatita na superfície das amostras, sendo assim um indício da bioatividade do material. É possível observar uma variação na definição das bandas de acordo com tempo de imersão destas em SBF. A divisão da banda localizada em 500-650 cm⁻¹ em duas pequenas bandas é observada no espectro obtido após 7 dias de imersão da amostra, mas não é observado no espectro da amostra obtido após 14 dias de imersão. Voltando essa divisão a ser visível nos espectros obtidos após 21 e 28 dias, mas a partir do resultado obtido nos difratogramas DRX, apresentados na seção 4.11, é possível afirmar que há a formação de HA na amostra CaNaB após todos os períodos de imersão.

A figura 33 apresenta os espectros para a amostra 1% ZnO, após imersão em SBF.

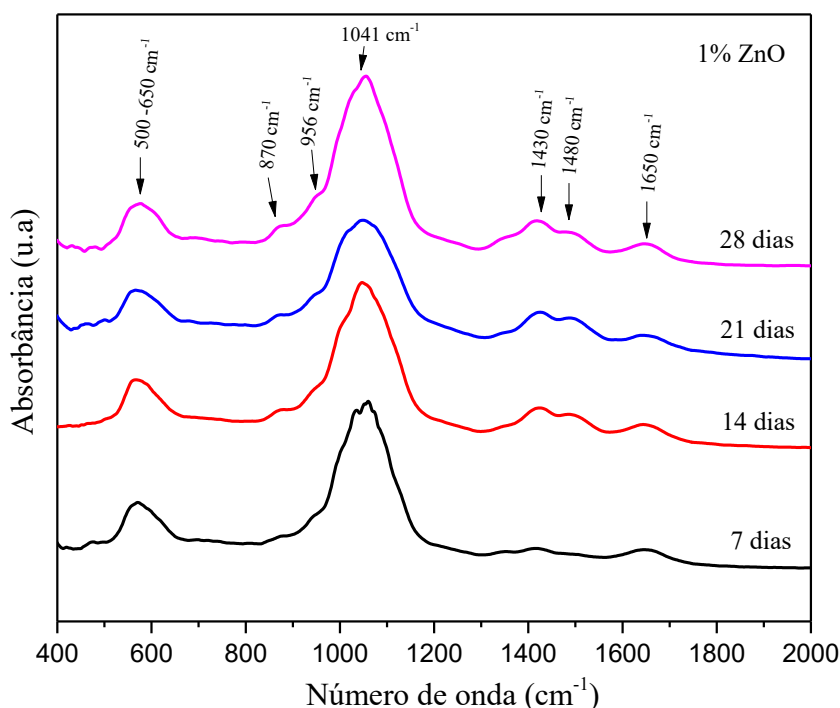


Figura 33- Espectros FTIR da amostra 1% ZnO após imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28.

Os espectros da amostra 1% ZnO são semelhantes aos espectros anteriormente apresentados para a amostra CaNaB, apresentando bandas nas mesmas regiões e com as

mesmas atribuições. Entretanto, é possível notar que, nos espectros apresentados na Figura 32, a banda na região de $500\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ não apresenta divisão em duas bandas menores que indicam a presença da forma cristalina do fosfato, o que sugere que, nesta amostra, o fosfato de cálcio amorfo é predominante. Também se nota um aumento na intensidade das duas bandas localizadas em $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$, com o aumento do tempo de imersão. Esse resultado corrobora o obtido nos difratogramas DRX apresentados anteriormente, que mostrou que para essa amostra não foram observados picos cristalinos referentes a HA.

As Figuras 34 e 35 apresentam os espectros para as amostras 2,5% ZnO e 5% ZnO, respectivamente, após os mesmos períodos de imersão em SBF.

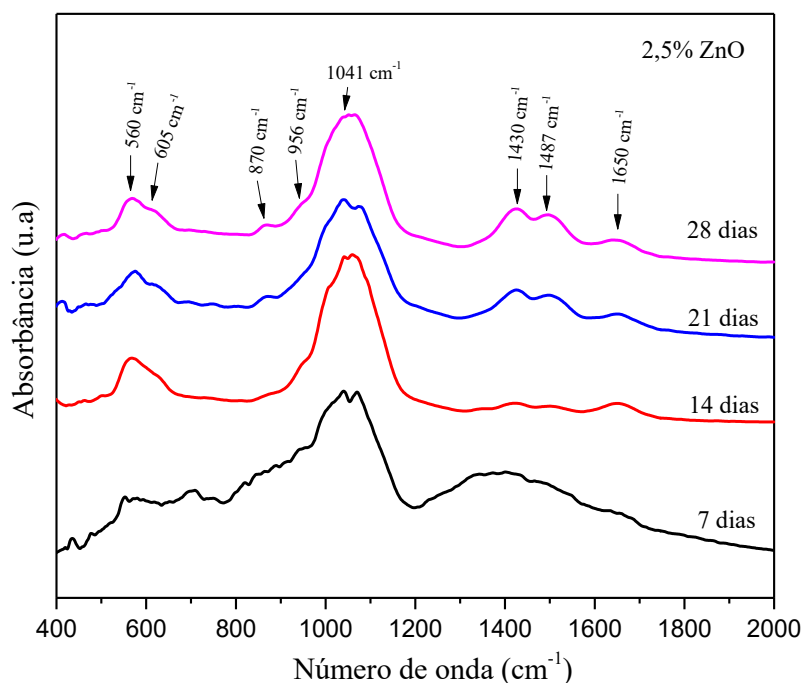


Figura 34- Espectros FTIR da amostra 2,5% ZnO após imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.

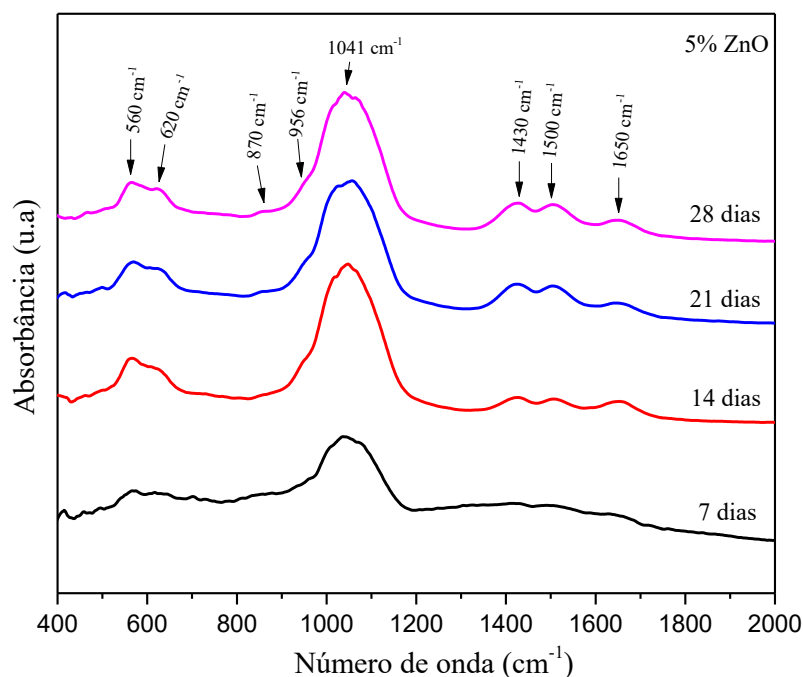


Figura 35- Espectros FTIR da amostra 5% ZnO após imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.

Os espectros das amostras 2,5% ZnO e 5% ZnO também são semelhantes aos espectros já apresentados anteriormente, porém, se observa que nos espectros obtidos após tempos menores de imersão (7 e 14 dias) que há uma menor definição e intensidade de bandas características dos grupos PO_4 e CO_3^{2-} .

Os espectros FTIR das amostras 7,5% ZnO e 10% ZnO são apresentados nas Figuras 36 e 37, respectivamente.

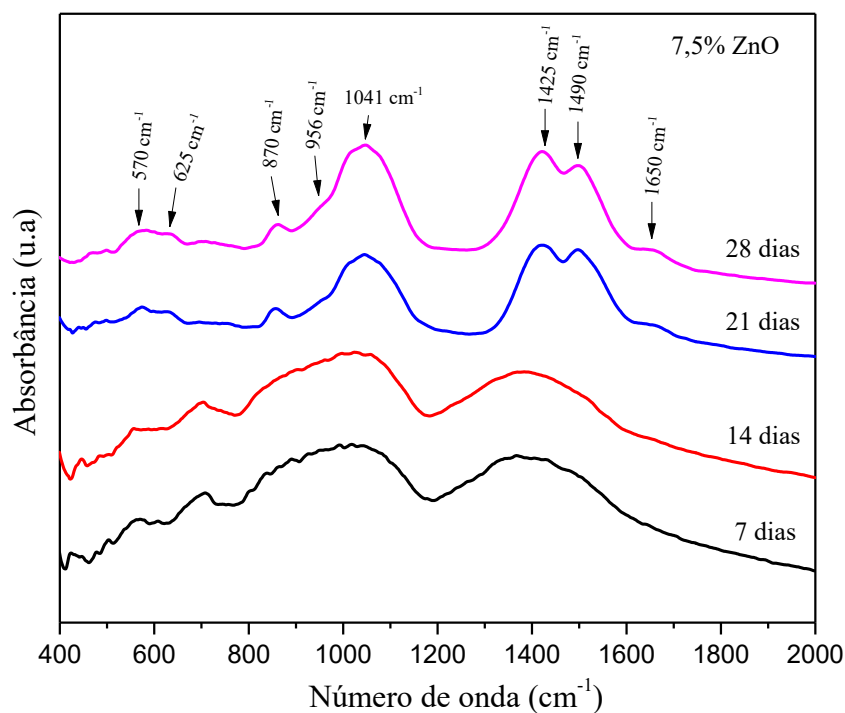


Figura 36- Espectros FTIR da amostra 7,5% ZnO após imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.

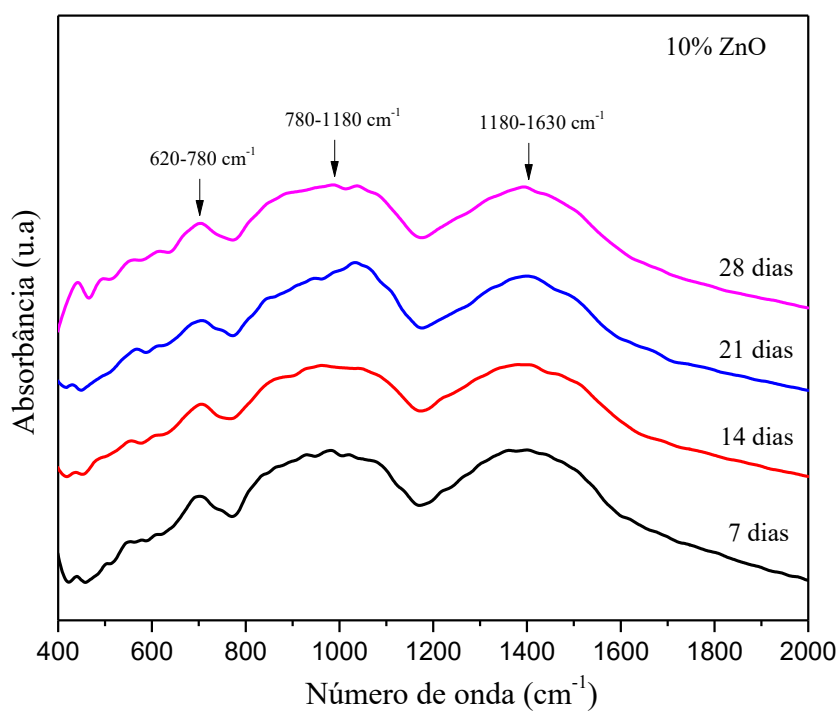


Figura 37- Espectros FTIR da amostra 10% ZnO após imersão em SBF por 7, 14, 21 e 28 dias.

Os espectros FTIR da amostra 7,5% ZnO (Figura 36), apresentam formas diferentes em função do tempo de imersão. É possível observar um estreitamento das bandas com o aumento do período de imersão em SBF, em que os espectros da amostra após 7 e 14 dias imergidas

apresentam bandas mais largas e localizadas na mesma região de número de onda das bandas observadas nos espectros das amostras antes de imergir. Para os espectros obtidos para as amostras imersas por 21 e 28 dias se observa bandas semelhantes às apresentadas nos espectros das amostras CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO e 5% ZnO, pós imersão.

Na Figura 37, são apresentados os espectros FTIR da amostra 10% ZnO após os 4 períodos de imersão. Estes apresentam bandas largas e em mesma região de número de onda das bandas características de grupos boratos atribuídas nos espectros antes da imersão em SBF. Também é possível observar que as bandas características do grupo PO_4 se apresentam mais alargadas e sem definição.

A Figura 38 apresenta os espectros FTIR das amostras CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO após 28 dias de imersão em SBF.

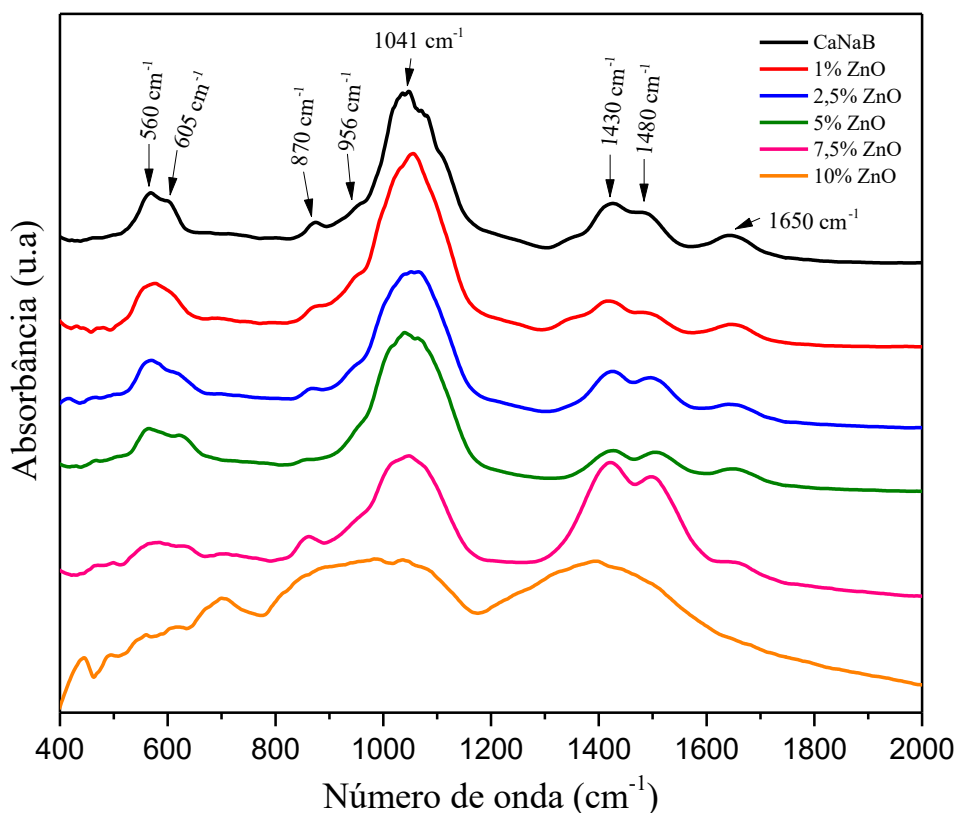


Figura 38- Espectros FTIR das amostras CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO após imersão em SBF por 28 dias.

Comparando os espectros FTIR de todas as amostras vítreas após o período de 28 dias de imersão é possível observar mais claramente o comportamento anteriormente mencionado, em que, com o aumento da concentração de ZnO adicionado à matriz vítrea se observa uma menor definição e intensidade das bandas características do PO_4 e bandas referentes aos

grupamentos boratos mais largas, principalmente as amostras 7,5% ZnO e 10% ZnO apresentam essas características.

Estes resultados são um indício que maiores concentrações de ZnO adicionadas na matriz vítrea podem diminuir a taxa de formação de HA, sendo necessário um maior tempo de imersão destas para se observar bandas características da formação de fosfato de cálcio amorfo e HA. Esta diminuição da taxa de formação de HA, com o aumento da concentração de zinco, em vidros boratos, pode estar relacionada com a diminuição da dissolução destes devido ao aumento da estabilidade química, como consequência da maior conectividade da rede pela inserção de zinco na matriz vítrea [14].

É apontado na literatura, a influência do zinco na cinética de formação da HA. Neščáková e colaboradores (2019) estudaram a influência da adição de 5% de ZnO em vidros mesoporosos de composição 70SiO₂ – 30CaO em % mol (MBGNs). Eles observaram que o vidro contendo zinco (Zn-MBGNs) não apresentou bandas características da formação de hidroxiapatita (560 e 603 cm⁻¹) após imersão em SBF por 14 dias, diferente do que foi observado para os vidros MBGNs, que não continham zinco [130].

4.13 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana das amostras vítreas estudadas nesse trabalho foi testada contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus Aureus* e contra a bactéria gram-negativa *Escherichia Coli*. Foi utilizada a metodologia de análise nomeada difusão em disco de ágar e para indicar a capacidade antibacteriana dos vidros, bem como também dos antibióticos Pen 10, Gen 10, Tet 30 e Van 05, foi observado o surgimento de zonas de inibição em formato de halo em volta dos discos de amostra. A Figura 39 apresenta as fotografias das placas de teste após decorrido 24 horas de contato dos discos dos antibióticos com a bactéria *S. Aureus*. A Figura 40 apresenta as placas de teste contendo os discos das amostras vítreas testadas por 24 horas também contra a bactéria *S. Aureus*.

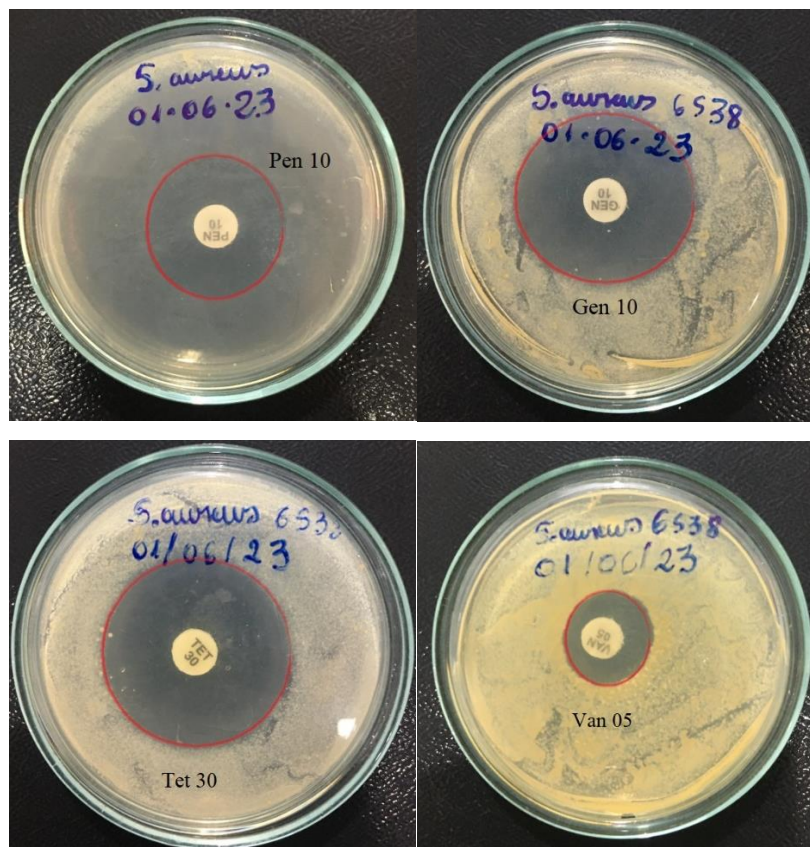


Figura 39- Fotografias das placas contendo 4 diferentes antibióticos testados por 24 horas contra a bactéria *S. Aureus*

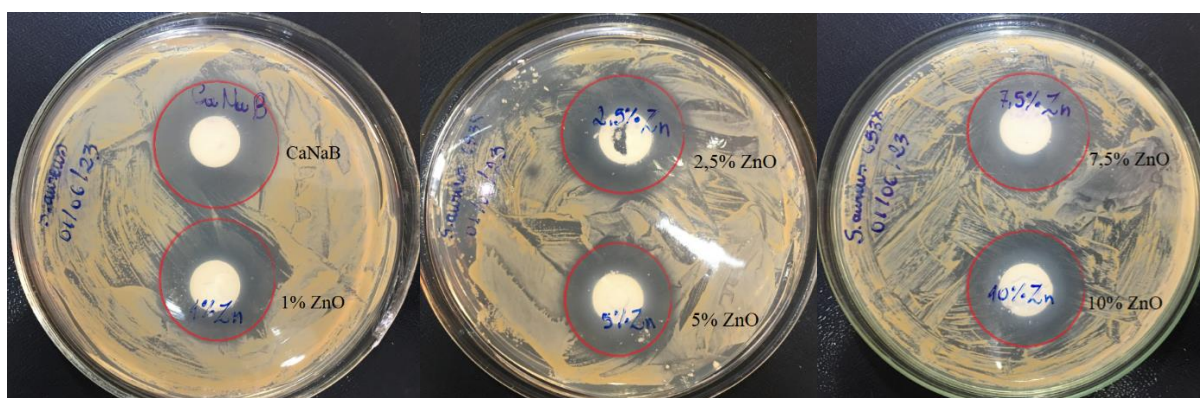


Figura 40- Fotografias das placas contendo as amostras vítreas testadas por 24 horas contra a bactéria *S. Aureus*.

Observando as fotografias apresentadas nas Figuras 39 e 40, é possível indicar que as amostras vítreas CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO, bem como os quatro antibióticos utilizados apresentaram efeito antibacteriano contra a bactéria *S. Aureus*. Isso pode ser afirmado devido a todos os discos das amostras vítreas e dos antibióticos terem

apresentado uma área de inibição do crescimento dessa bactéria ao seu redor. A presença dessa zona de inibição é considerada como uma comprovação da atividade antibacteriana do material [135].

A Figura 41 apresenta a fotografia dos antibióticos testados contra a bactéria *E. Coli*. Na Figura 42, são apresentadas as placas contendo os discos de todas as amostras vítreas após a análise contra a bactéria *E. Coli*.

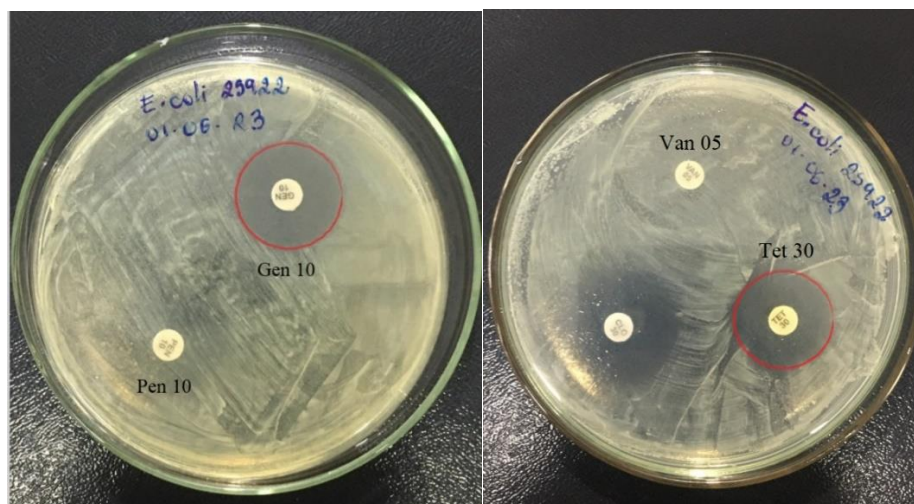


Figura 41 - Fotografias das placas contendo 4 diferentes antibióticos testados por 24 horas contra a bactéria *E. coli*.

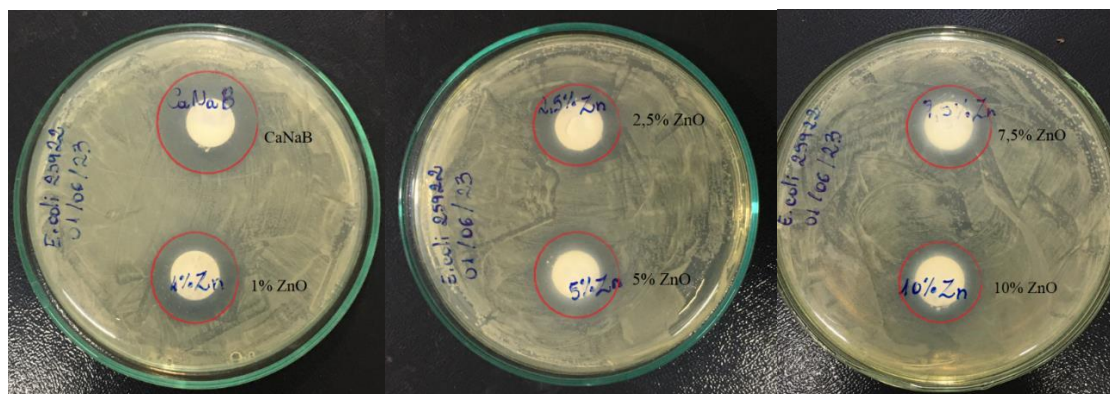


Figura 42- Fotografias das placas contendo as amostras vítreas testadas por 24 horas contra a bactéria *E. Coli*.

Observando a Figura 42 pode-se indicar que as amostras vítreas CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO também apresentaram atividade antibacteriana contra a bactéria *E. Coli*, pois é notável a presença de uma zona de inibição de crescimento bacteriano ao redor dos discos dessas amostras. Já, observando a Figura 41, é possível afirmar que apenas os antibióticos Gen 10 e Tet 30 apresentaram atividade antibacteriana frente a *E. Coli*. Isso pode

ser afirmado devido a apenas esses dois antibióticos terem apresentado uma zona de inibição do crescimento dessa bactéria ao redor deles; os antibióticos Pen 10 e Van 05 não apresentaram o surgimento da zona de inibição.

A Tabela 05 apresenta os diâmetros das zonas de inibição do crescimento bacteriano que cada amostra vítrea e antibiótico provocou quando testado contra as bactérias *S. Aureus* e *E. Coli* por 24 horas.

Tabela 5 - Antibióticos e amostras vítreas testadas e seus respectivos diâmetros da zona de inibição do crescimento bacteriano, em milímetros, contra as bactérias *S. Aureus* e *E. Coli*.

Antibióticos e amostras vítreas	Diâmetro da zona de inibição (mm)	
	<i>S. Aureus</i>	<i>E. Coli</i>
Pen 10	13,3	0
Gen 10	17,2	12
Tet 30	17,95	12,8
Van 05	9,8	0
CaNaB	17,8	15,17
1% ZnO	10,86	11,57
2,5% ZnO	15,07	8,95
5% ZnO	13,55	9
7,5% ZnO	13,25	9,25
10% ZnO	13,35	9,7

A partir dos resultados obtidos, que estão apresentados na Tabela 05, e considerando as comparações pareadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%, que estão disponíveis na Tabela A-1 do Apêndice A, é possível afirmar que os valores dos diâmetros das zonas de inibição de crescimento bacteriano das amostras vítreas CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10 % ZnO, do teste contra a bactéria *S. Aureus*, não apresentaram diferença significativa entre si. Indicando assim, que a incorporação de ZnO na rede vítrea não influenciou significativamente no efeito antibacteriano do material.

Babu e colaboradores (2023) afirmaram que a atividade antibacteriana está relacionada à composição do material, à sua taxa de dissolução e liberação de íons antibacterianos e a mudanças nos valores de pH [136]. Possivelmente, a pouca variação nos valores dos diâmetros

das zonas de inibição com a inserção do zinco, que é conhecido na literatura por ter efeito antibacteriano [14,17,27,28], ocorreu devido ao aumento da estabilidade química do material e diminuição da taxa de dissolução deste com o aumento da concentração de ZnO adicionado à rede vítrea, comportamento indicado nos resultados de perda de massa medidas de pH apresentados anteriormente. A menor taxa de dissolução do vidro acarreta em uma menor taxa de liberação de íons para o meio, e por conseguinte, uma menor taxa de íons antibacterianos, como íons de zinco e boro, são liberados.

Observando os valores dos diâmetros das zonas de inibição do crescimento bacteriano das amostras vítreas perante a bactéria *E.Coli*, também presentes na Tabela 05, é possível indicar que as amostras CaNaB e 1% ZnO obtiveram os maiores valores, não diferindo significativamente entre si, como mostrado na Tabela A-1 do apêndice A. Já as amostras 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO apresentaram valores menores que o da amostra CaNaB. Esse comportamento também pode ser explicado devido à menor liberação de íons antibacterianos, como zinco e boro, devido a maior estabilidade da rede vítrea e menor dissolução do material pela maior incorporação de zinco a este.

Hameed e colaboradores (2015), ao estudarem a atividade antibacteriana de vidros bioativos contendo zinco, também observaram que a inserção de zinco na matriz vítrea teve pouco ou nenhum efeito sobre a ação antibacteriana. Eles relacionaram este comportamento à baixa concentração de zinco liberado no meio devido à capacidade deste de aumentar a estabilidade da rede quando adicionado ao material vítreo [137]

No que diz respeito à comparação da zona de inibição das amostras vítreas com a dos antibióticos testados, na análise com a bactéria *S.Aureus*, é possível observar que não houve diferença significativa entre as zonas de inibição dos vidros e dos antibióticos Pen 10, Gen 10 e Tet 30. Porém, a amostra CaNaB apresentou zona de inibição maior do que a apresentada pelo antibiótico Van 05. Já na análise com a bactéria *E.Coli* é observado que todas as amostras vítreas não apresentam diferença significativa com os antibióticos Gen 10 e Tet 30, porém todas as amostras vítreas apresentaram melhores resultados de zona de inibição quando comparado aos antibióticos Pen 10 e Van 05. Sendo essa uma comprovação de que todas as amostras vítreas apresentaram atividade antibacteriana melhor ou equiparável a dos antibióticos testados.

Ainda é observado na Tabela 05 que os valores dos diâmetros da zona de inibição obtidos, após o teste com a bactéria *S.Aureus*, são maiores que os obtidos após o teste com a bactéria *E.Coli*. É possível indicar que as amostras tiveram um maior efeito de inibição nas bactérias gram-positivas *S.Aureus* do que nas bactérias gram-negativas *E.Coli*. Isso provavelmente ocorreu devido ao grupo que cada uma dessas duas bactérias é classificada.

Yazdi e colaboradores (2017) indicaram que os íons de zinco são mais efetivos na inibição do crescimento de bactérias gram-positivas do que no crescimento de gram-negativas. Eles associaram esta diferença de suscetibilidade à desproporcionalidade da camada de peptidoglicano entre esses dois tipos de bactérias e ao conteúdo de constituintes de proteína integradas à parede celular das bactérias Gram-positivas [27]

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram produzidos vidros cálcio-sódio-boratos adicionados de ZnO, substituindo o B₂O₃, em concentrações de 0; 1; 2,5; 5; 7,5 e 10% molar, a fim de investigar a influência do ZnO na bioatividade e demais propriedades do material. Os resultados obtidos para densidade, volume molar e N₄ indicaram que o aumento da adição de zinco causou modificações na matriz vítrea, tornando-a mais compacta, indicando uma maior conectividade de rede. Os dados de DTA mostraram aumento da Tx e da estabilidade térmica com a adição de ZnO, o que representa um aumento da faixa de trabalho desse material vítreo, benéfica para aplicações desse como peças termicamente moldadas. A radiopacidade das amostras aumentou com a adição de zinco, em que as amostras 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO apresentaram radiopacidade maiores que a dentina. Os testes de viabilidade celular de macrófagos mostraram que nenhuma das amostras apresenta citotoxicidade.

Os espectros FTIR e os difratogramas DRX das amostras, obtidos após a imersão em SBF, indicaram a bioatividade do material pela formação de hidroxiapatita nas amostras CaNaB, 2,5% ZnO e 5% ZnO; na amostra 1% ZnO não foi possível confirmar a formação de hidroxiapatita após os tempos de imersão adotados no presente trabalho. As amostras 7,5% ZnO e 10% ZnO não apresentaram indicações de formação de HA nesses tempos de imersão, indicando a menor taxa de dissolução e degradação dessas amostras devido à maior concentração de ZnO adicionado. As medidas de pH indicaram que as amostras com menor teor de zinco apresentaram trocas iônicas mais rápidas em até 28 dias de imersão, o que indica que estas tiveram uma maior degradação em solução, o que foi confirmada pela análise de perda de massa.

A partir dos resultados de perda de massa, medidas de pH, FTIR e DRX é possível concluir que maiores concentrações de óxido de zinco adicionadas aos vidros aumentou a estabilidade química destes, diminuindo a degradação e taxa de formação de HA destes quando imersos em SBF. Todas as amostras vítreas apresentaram caráter antibacteriano contra a bactéria Gram positiva *S.Aureus* e contra a bactéria Gram negativa *E.Coli*.

De modo geral, as amostras apresentaram relevante potencial para aplicações em tratamentos de tecidos ósseos. Apresentaram ainda bons indícios, como boa atividade antibacteriana e citocompatibilidade, para aplicações também na regeneração de tecidos moles, mas sendo necessário testes adicionais para comprovar essa capacidade.

Devido à maior concentração de ZnO as amostras 7,5% ZnO e 10% ZnO não apresentaram formação de HA nos períodos de imersão em SBF adotados, mas não sendo descartada a possibilidade de ser observado a bioatividade destas, e da amostra 1% ZnO, a partir de períodos maiores de imersão. A amostra 5% ZnO apresentou um melhor desempenho dentre as amostras vítreas estudadas, ela apresentou boa bioatividade, a melhor porcentagem de viabilidade celular, boa atividade antibacteriana e bom nível de radiopacidade.

PERSPECTIVAS

- Realizar testes de cicatrização *in vitro* utilizando queratinócitos a fim de observar a capacidade dos materiais vítreos contendo zinco serem usados em recuperação de tecidos moles, mas especificamente em cicatrização de feridas de grande tamanho.
- Preparação de *scaffolds* a partir das amostras vítreas CaNaB, 1% ZnO, 2,5% ZnO, 5% ZnO, 7,5% ZnO e 10% ZnO, que foram estudadas nesse trabalho.
- Cristalização controlada das amostras vítreas a fim de produzir vitrocerâmicas bioativas.

REFERÊNCIAS

- [1] J. Chen, L. Zeng, X. Chen, T. Liao, J. Zheng, Preparation and characterization of bioactive glass tablets and evaluation of bioactivity and cytotoxicity in vitro, *Bioact Mater* 3 (2018) 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.11.004>.
- [2] M.N.M. Walter, K.T. Wright, H.R. Fuller, S. MacNeil, W.E.B. Johnson, Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays, *Exp Cell Res* 316 (2010) 1271–1281. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.026>.
- [3] S. Zhao, L. Li, H. Wang, Y. Zhang, X. Cheng, N. Zhou, M.N. Rahaman, Z. Liu, W. Huang, C. Zhang, Wound dressings composed of copper-doped borate bioactive glass microfibers stimulate angiogenesis and heal full-thickness skin defects in a rodent model, *Biomaterials* 53 (2015) 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.112>.
- [4] J. Leon-Villapalos, M. Eldardiri, P. Dziwulski, The use of human deceased donor skin allograft in burn care, *Cell Tissue Bank* 11 (2010) 99–104. <https://doi.org/10.1007/s10561-009-9152-1>.
- [5] X. Cui, W. Huang, J. Zhou, H. Wang, N. Zhou, D. Wang, X. Cui, C. Huang, Z. Yu, L. Wang, W. Liu, T. Wang, H. Pan, Y. Zhang, M.N. Rahaman, M.N. Rahaman, Evaluation of an injectable bioactive borate glass cement to heal bone defects in a rabbit femoral condyle model, *Materials Science and Engineering C* 73 (2017) 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.101>.
- [6] X. Cui, Y. Zhang, H. Wang, Y. Gu, L. Li, J. Zhou, S. Zhao, W. Huang, N. Zhou, D. Wang, H. Pan, M.N. Rahaman, An injectable borate bioactive glass cement for bone repair: Preparation, bioactivity and setting mechanism, *J Non Cryst Solids* 432 (2016) 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2015.06.001>.
- [7] H. Yin, C. Yang, Y. Gao, C. Wang, M. Li, H. Guo, Q. Tong, Fabrication and characterization of strontium-doped borate-based bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering, *J Alloys Compd* 743 (2018) 564–569. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.01.099>.

- [8] L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee, Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials, *J.Biomed.Mater.Res.Symposium* 2 (1971) 117–141.
- [9] 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>.
- [10] J.R. Jones, D.S. Brauer, L. Hupa, D.C. Greenspan, Bioglass and Bioactive Glasses and Their Impact on Healthcare, *Int J Appl Glass Sci* 7 (2016) 423–434. <https://doi.org/10.1111/ijag.12252>.
- [11] D.M. Liu, H.M. Chou, Formation of a new bioactive glass-ceramic, *J Mater Sci Mater Med* 5 (1994) 7–10. <https://doi.org/10.1007/BF00121146>.
- [12] F. Nu, Sintering effects on mechanical properties of glass-reinforced hydroxyapatite composites, 28 (2002) 617–621.
- [13] R.K. Samudrala, S. Patel, V. Penugurthi, B. Manavathi, A.A. P, In vitro studies of B₂O₃–SiO₂–Na₂O–CaO–ZnO bioactive glass system, *J Non Cryst Solids* 574 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2021.121164>.
- [14] K. Schuhladen, X. Wang, L. Hupa, A.R. Boccaccini, Dissolution of borate and borosilicate bioactive glasses and the influence of ion (Zn, Cu) doping in different solutions, *J Non Cryst Solids* 502 (2018) 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.08.037>.
- [15] K. MacDonald, M.A. Hanson, D. Boyd, Modulation of strontium release from a tertiary borate glass through substitution of alkali for alkali earth oxide, *J Non Cryst Solids* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2016.04.024>.
- [16] A.M. Abdelghany, H. Kamal, Spectroscopic investigation of synergetic bioactivity behavior of some ternary borate glasses containing fluoride anions, *Ceram Int* 40 (2014) 8003–8011. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.12.151>.
- [17] N. Mutlu, F. Kurtuldu, I. Unalan, Z. Neščáková, H. Kaňková, D. Galusková, M. Michálek, L. Liverani, D. Galusek, A.R. Boccaccini, Effect of Zn and Ga doping on bioactivity, degradation, and antibacterial properties of borate 1393-B3 bioactive glass, *Ceram Int* 48 (2022) 16404–16417. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.02.192>.

- [18] A. Yao, D. Wang, W. Huang, Q. Fu, M.N. Rahaman, D.E. Day, In vitro bioactive characteristics of borate-based glasses with controllable degradation behavior, *Journal of the American Ceramic Society* 90 (2007) 303–306. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2006.01358.x>.
- [19] 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>.
- [20] H. Fu, Q. Fu, N. Zhou, W. Huang, M.N. Rahaman, D. Wang, X. Liu, In vitro evaluation of borate-based bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication method, *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 2275–2281. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.05.013>.
- [21] 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 A* 102 (2014) 254–274. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34690>.
- [22] X. Liu, Z. Xie, C. Zhang, H. Pan, M.N. Rahaman, X. Zhang, Q. Fu, W. Huang, Bioactive borate glass scaffolds: In vitro and in vivo evaluation for use as a drug delivery system in the treatment of bone infection, *J Mater Sci Mater Med* 21 (2010) 575–582. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3897-8>.
- [23] S. Naseri, S.N. Nazhat, Bioactive and soluble glasses for wound-healing applications, in: *Bioactive Glasses*, Elsevier, 2018: pp. 381–405. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100936-9.00019-8>.
- [24] S. Naseri, W.C. Lepry, S.N. Nazhat, Bioactive glasses in wound healing: Hope or hype?, *J Mater Chem B* 5 (2017) 6167–6174. <https://doi.org/10.1039/c7tb01221g>.
- [25] S.A. Hussein, R. Roshdy, M. Ezzeldien, M.S.A. El-sadek, Effect of mixed ions of (Zr + 2 and Ti + 2) on the physical properties of B₂O₃-SiO₂-P₂O₅-Na₂O-CaO as bioactive glass system, (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2021.121324>.
- [26] H. Hu, Y. Tang, L. Pang, C. Lin, W. Huang, D. Wang, W. Jia, Biological and Medical Applications of Materials and Interfaces Angiogenesis and full-thickness wound healing efficiency of copper doped borate bioactive glass / poly (lactic-co-glycolic acid)

- dressing loaded with vitamin E in vivo and in vitro, (2018).
<https://doi.org/10.1021/acsami.8b04903>.
- [27] A. Rahimnejad Yazdi, M. Towler, The effect of the addition of gallium on the structure of zinc borate glass with controlled gallium ion release, *Mater Des* 92 (2016) 1018–1027.
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2015.12.082>.
- [28] S. Kaya, M. Cresswell, A.R. Boccaccini, *Materials Science & Engineering C* Mesoporous silica-based bioactive glasses for antibiotic-free antibacterial applications, *Materials Science & Engineering C* 83 (2018) 99–107.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.003>.
- [29] T. Mehrabi, A.S. Mesgar, In vitro biomineralization potential in simulated wound fluid and antibacterial efficacy of biologically-active glass nanoparticles containing B₂O₃/ZnO, *Colloids Surf B Biointerfaces* 212 (2022) 112338.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112338>.
- [30] M. Yamaguchi, Role of Zinc in Bone Formation and Bone Resorption, *J. Trace Elem. Exp. Med* 11 (1998) 119–135.
- [31] W.R. Wagner, *Biomaterials Science*, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816137-1.01001-1>.
- [32] M. Vallet-Regí, Evolution of Biomaterials, *Front Mater* 9 (2022) 1–5.
<https://doi.org/10.3389/fmats.2022.864016>.
- [33] J. Park, R.S. Lakes, *Biomaterials: An introduction: Third edition*, 2007.
<https://doi.org/10.1007-978-0-387-37880-0>.
- [34] D.F. Williams, Biomaterials On the nature of biomaterials q, *Biomaterials* 30 (2009) 5897–5909. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027>.
- [35] L.L. Hench, *Biomaterials : a forecast for the future*, 19 (1998) 1419–1423.
- [36] I. Farooq, S. Ali, S. Husain, E. Khan, R.G. Hill, 17. Bioactive glasses—structure and applications, Elsevier Ltd, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102476-8.00017-7>.
- [37] F. Baino, Bioactive glasses – When glass science and technology meet regenerative medicine, *Ceram Int* (2018) 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.05.180>.

- [38] I. Kulinets, *Biomaterials and their applications in medicine*, Woodhead Publishing Limited, 2015. <https://doi.org/10.1533/9780857099204.1>.
- [39] M. Gutierrez, M.A. Lopes, N.S. Hussain, A.T. Cabral, L. Almeida, *Substitutos Ósseos Conceitos Gerais e Estado Actual*, (2006).
- [40] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castan, J.A. Planell, *Biomaterials in orthopaedics*, (2008) 1137–1158. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0151>.
- [41] E.T. Hanson, R.L. Lewis, R. Auerbach, J.A. Thomson, B. Applica-, *Third-Generation Biomedical Materials*, 295 (2002) 1014–1017.
- [42] E. Fiume, J. Barberi, E. Vern, F. Baino, *Bioactive Glasses: From Parent 45S5 Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies*, (2018). <https://doi.org/10.3390/jfb9010024>.
- [43] L.L. Hench, *Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications*, *New Journal of Glass and Ceramics* 03 (2013) 67–73. <https://doi.org/10.4236/njgc.2013.32011>.
- [44] Yoshinori Onuki, Upkar Bhardwaj, Fotios Papadimitrakopoulos, and Diane J. Burgess, *A Review of the Biocompatibility of Implantable Devices: Current Challenges to Overcome Foreign Body Response*, *J Diabetes Sci Technol* 2 (2008) 1003–1015.
- [45] F.J.O. Brien, *Biomaterials & scaffolds Every day thousands of surgical procedures are performed to replace*, *Materials Today* 14 (2011) 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X).
- [46] D. Zhu, Z. Jiang, N. Li, X. Wang, L. Ren, Y. Ye, Y. Pan, G. Yang, *Insights into the use of genetically modified decellularized biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine*, *Adv Drug Deliv Rev* 188 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114413>.
- [47] K. Zhang, B. Ma, K. Hu, B. Yuan, X. Sun, X. Song, J. García, A.G. Mikos, J.M. Anderson, X. Zhang, *Bioactive Materials Evidence-based biomaterials research*, 15 (2022) 495–503. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.04.014>.
- [48] J.E. Shelby, *Introduction To Glass Science and Technology*, 2^o Edition, 2013.

- [49] W.H. Zachariasen, The atomic arrangement in glass, *J Am Chem Soc* 54 (1932) 3841–3851. <https://doi.org/10.1021/ja01349a006>.
- [50] J. Crush, A. Hussain, K.T.M. Seah, W.S. Khan, Bioactive Glass : Methods for Assessing Angiogenesis and Osteogenesis, 9 (2021) 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.643781>.
- [51] L.L. Hench, Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc.* 1993;72:93-98., *Journal of the American Ceramic Society* 74 (1991) 1487–1510.
- [52] M.A. Sainz, P. Pena, S. Serena, A. Caballero, Influence of design on bioactivity of novel $\text{CaSiO}_3\text{-CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ bioceramics: In vitro simulated body fluid test and thermodynamic simulation, *Acta Biomater* 6 (2010) 2797–2807. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.003>.
- [53] S. Haimi, G. Gorianc, L. Moimas, B. Lindroos, H. Huhtala, S. Rätty, H. Kuokkanen, G.K. Sándor, C. Schmid, S. Miettinen, R. Suuronen, Characterization of zinc-releasing three-dimensional bioactive glass scaffolds and their effect on human adipose stem cell proliferation and osteogenic differentiation, *Acta Biomater* 5 (2009) 3122–3131. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.04.006>.
- [54] S.M. Salman, S.N. Salama, H.A. Abo-Mosallam, The role of strontium and potassium on crystallization and bioactivity of $\text{Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ glasses, *Ceram Int* 38 (2012) 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.06.037>.
- [55] S. Chajri, S. Bouhazma, S. Herradi, H. Barkai, S. Elabed, S.I. Koraichi, B. El Bali, M. Lachkar, Studies on preparation and characterization of $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, 6 (2015) 1882–1897.
- [56] 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>.
- [57] S. Kargozar, S. Hamzehlou, F. Baino, Can bioactive glasses be useful to accelerate the healing of epithelial tissues?, *Materials Science and Engineering C* 97 (2019) 1009–1020. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.028>.

- [58] A.R. Amini, C.T. Laurencin, S.P. Nukavarapu, Bone tissue engineering: Recent advances and challenges, *Crit Rev Biomed Eng* 40 (2012) 363–408. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i5.10>.
- [59] M. Montazerian, E.D. Zanotto, Review Article History and trends of bioactive glass-ceramics, (2016) 1231–1249. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35639>.
- [60] J.R. Jones, *Acta Biomaterialia* Review of bioactive glass : From Hench to hybrids, *Acta Biomater* 9 (2013) 4457–4486. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.023>.
- [61] J. Sonatkar, B. Kandasubramanian, Bioactive glass with biocompatible polymers for bone applications, *Eur Polym J* 160 (2021) 110801. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110801>.
- [62] V. Aina, G. Malavasi, A. Fiorio Pla, L. Munaron, C. Morterra, Zinc-containing bioactive glasses: Surface reactivity and behaviour towards endothelial cells, *Acta Biomater* 5 (2009) 1211–1222. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.10.020>.
- [63] A.R. Boccaccini, D. Ph, Effect of Bioactive Glasses on Angiogenesis : A Review of In Vitro and In Vivo Evidences, 16 (2010).
- [64] P. Balasubramanian, T. Büttner, V. Miguez Pacheco, A.R. Boccaccini, Boron-containing bioactive glasses in bone and soft tissue engineering, *J Eur Ceram Soc* 38 (2018) 855–869. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2017.11.001>.
- [65] 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>.
- [66] A.A. Gorustovich, Biological performance of boron-modified bioactive glass particles implanted in rat tibia bone marrow omulo L Cabrini, (2006). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/1/3/002>.
- [67] M. Brink, T. Turunen, R. Happonen, A. Yli-urpo, Compositional dependence of bioactivity of glasses in the system Na₂O-K₂O-MgO-CaO-B₂O₃-P₂O₅-SiO₂, (1996).

- [68] 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>.
- [69] L. Bi, M.N. Rahaman, D.E. Day, Z. Brown, C. Samujh, X. Liu, A. Mohammadkhah, V. Dusevich, J.D. Eick, L.F. Bonewald, *Acta Biomaterialia* Effect of bioactive borate glass microstructure on bone regeneration , angiogenesis , and hydroxyapatite conversion in a rat calvarial defect model, *Acta Biomater* 9 (2013) 8015–8026. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.04.043>.
- [70] 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>.
- [71] Q. Fu, M.N. Rahaman, H. Fu, X. Liu, Silicate, borosilicate, and borate bioactive glass scaffolds with controllable degradation rate for bone tissue engineering applications. I. Preparation and in vitro degradation, *J Biomed Mater Res A* 95 (2010) 164–171. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32824>.
- [72] L. Bi, S. Jung, D. Day, K. Neidig, V. Dusevich, D. Eick, L. Bonewald, Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds, *J Biomed Mater Res A* 100 A (2012) 3267–3275. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34272>.
- [73] D. Ege, K. Zheng, A.R. Boccaccini, Borate Bioactive Glasses (BBG): Bone Regeneration, Wound Healing Applications, and Future Directions, *ACS Appl Bio Mater* 5 (2022) 3608–3622. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00384>.
- [74] J. Zhou, H. Wang, S. Zhao, N. Zhou, L. Li, W. Huang, D. Wang, C. Zhang, In vivo and in vitro studies of borate based glass micro- fi bers for dermal repairing, 60 (2016) 437–445. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.068>.
- [75] F. Kermani, S. Nazarnezhad, Z. Mollaei, S. Mollazadeh, A. Ebrahimzadeh-Bideskan, V.R. Askari, R.K. Oskuee, A. Moradi, S.A. Hosseini, Z. Azari, F. Baines, S. Kargozar, Zinc- and Copper-Doped Mesoporous Borate Bioactive Glasses: Promising Additives

- for Potential Use in Skin Wound Healing Applications, *Int J Mol Sci* 24 (2023). <https://doi.org/10.3390/ijms24021304>.
- [76] C.D.M. Valeriano, P. Henrique, A. Dias, M.D.O. Carvalho, M. Heilbron, Zinco e chumbo, (2019).
 - [77] A.B.G. Lansdown, U. Mirastschijski, N. Stubbs, E. Scanlon, M.S. Ågren, Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects, *Wound Repair and Regeneration* 15 (2007) 2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2006.00179.x>.
 - [78] Z.Y. Yao, D. Möncke, E.I. Kamitsos, P. Houizot, F. Célarié, T. Rouxel, L. Wondraczek, Structure and mechanical properties of copper – lead and copper – zinc borate glasses, *J Non Cryst Solids* 435 (2016) 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2015.12.005>.
 - [79] P. Balasubramanian, L.A. Strobel, U. Kneser, A.R. Boccaccini, Zinc-containing bioactive glasses for bone regeneration, dental and orthopedic applications, *Biomedical Glasses* 1 (2015) 51–69. <https://doi.org/10.1515/bglass-2015-0006>.
 - [80] M. Stefanidou, C. Maravelias, A. Dona, C. Spiliopoulou, Zinc: A multipurpose trace element, *Arch Toxicol* 80 (2006) 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0009-5>.
 - [81] A.B.G. Lansdown, Influence of zinc oxide in the closure of open skin wounds, *Int J Cosmet Sci* 15 (1993) 83–85.
 - [82] M. Kietzmann, Improvement and retardation of wound healing: Effects of pharmacological agents in laboratory animal studies, *Vet Dermatol* 10 (1999) 83–88. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.1999.00155.x>.
 - [83] A.J. Salinas, S. Shruti, G. Malavasi, L. Menabue, M. Vallet-Regí, Substitutions of cerium, gallium and zinc in ordered mesoporous bioactive glasses, *Acta Biomater* 7 (2011) 3452–3458. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.033>.
 - [84] D. Campoccia, L. Montanaro, C. Renata, Biomaterials A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, *Biomaterials* 34 (2013) 8533–8554. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.089>.
 - [85] M.M. Babu, P.V. Rao, R.K. Singh, ZnO incorporated high phosphate bioactive glasses for guided bone regeneration implants: Enhancement of in vitro bioactivity and antibacterial activity ZnO incorporated high phosphate bioactive glasses for guided bone

- regeneration implants : enhancement , (2022).
<https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.08.020>.
- [86] Z. Neščáková, K. Zheng, L. Liverani, Q. Nawaz, D. Galusková, H. Kaňková, M. Michálek, D. Galusek, A.R. Boccaccini, Multifunctional zinc ion doped sol – gel derived mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications, *Bioact Mater* 4 (2019) 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.002>.
- [87] S. Inaba, S. Fujino, Empirical Equation for Calculating the Density of Oxide Glasses, 220 (2010) 217–220. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2009.03363.x>.
- [88] 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 †, 9 (2011) 29–36. <https://doi.org/10.2298/FUPCT1101029C>.
- [89] H. Doweidar, Y.B. Saddeek, FTIR and ultrasonic investigations on modified bismuth borate glasses, *J Non Cryst Solids* 355 (2009) 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2008.12.008>.
- [90] R.R. Reddy, Y.N. Ahammed, P.A. Azeem, K.R. Gopal, Absorption and emission spectral studies of Sm 3 + and Dy 3 + doped alkali uoroborate glasses, 77 (2003) 149–163.
- [91] E. Wers, H. Oudadesse, Thermal behaviour and excess entropy of bioactive glasses and Zn-doped glasses, *J Therm Anal Calorim* 115 (2014) 2137–2144. <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3280-3>.
- [92] J.P. Souza, J.R. Martinelli, Evaluation of aluminosilicate glass sintering during differential scanning calorimetry, *Ceram Int* 41 (2015) 7296–7301. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.02.013>.
- [93] ISO 10993, Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity., (n.d.).
- [94] S.O. Rogero, T.I. Ikeda, Teste in vitro de Citotoxicidade : Estudo Comparativo entre Duas Metodologias, 6 (2003) 317–320.
- [95] T. Mosmann, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, 65 (1983) 55–63.

- [96] Y. Yang, S.M. Dorsey, M.L. Becker, S. Lin-Gibson, G.E. Schumacher, G.M. Flaim, J. Kohn, C.G. Simon, X-ray imaging optimization of 3D tissue engineering scaffolds via combinatorial fabrication methods, *Biomaterials* 29 (2008) 1901–1911. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.042>.
- [97] H.O. Ylänen, *Bioactive glasses: Materials, properties and applications*, 2011.
- [98] J. Epp, *X-Ray Diffraction (XRD) Techniques for Materials Characterization*, Elsevier Ltd, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00004-3>.
- [99] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamum, surface-structure changes in bioactive, 24 (1990) 721–734.
- [100] M. Vallet-Regí, *Ceramics for medical applications*, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* (2001) 97–108. <https://doi.org/10.1039/b007852m>.
- [101] B.D. Cullity, *Elements of x-ray diffraction*, (2014). <http://lib.hpu.edu.vn/handle/123456789/29008>.
- [102] W.D. Jr Callister, D.G. Rethwisch, *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma introdução*, 8^o Edition, 2012.
- [103] A.M. Abdelghany, H.A. Elbatal, F.M. Ezzeldin, Bone bonding ability behavior of some ternary borate glasses by immersion in sodium phosphate solution, *Ceram Int* 38 (2012) 1105–1113. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.08.038>.
- [104] A. Dutta, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Elsevier Inc., 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46140-5.00004-2>.
- [105] Y. Moustafa, H. Doweidar, *Utilisation of Infrared Spectroscopy to Determine the Fraction of the Four Coordinated Borons in Borate Glasses*, n.d. <https://www.researchgate.net/publication/216734007>.
- [106] H. Othman, D. Valiev, E. Polisadova, Structural and mechanical properties of zinc aluminoborate glasses with different content of aluminum oxide, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 28 (2017) 4647–4653. <https://doi.org/10.1007/s10854-016-6103-z>.

- [107] NCCLS, Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Difusão: Norma Aprovada, 8^o Edition, 2003.
- [108] B. Topper, D. Mo, R.E. Youngman, C.P.E. Varsamis, modelling of the composition-dependence, (2023) 5967–5988. <https://doi.org/10.1039/d2cp05517a>.
- [109] F. Ahmad, E. Hassan Aly, M. Atef, M.M. Elokr, Study the influence of zinc oxide addition on cobalt doped alkaline earth borate glasses, *J Alloys Compd* 593 (2014) 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.01.067>.
- [110] K. O’Connell, M. Hanson, H. O’Shea, D. Boyd, Linear release of strontium ions from high borate glasses via lanthanide/alkali substitutions, *J Non Cryst Solids* 430 (2015) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2015.09.017>.
- [111] F. Guimarães Neto, R. da S. Palácios, F. Sato, N. de S. Fernandes, K. Miyuki, C.V. Nakamura, A. Steimacher, F. Pedrochi, Investigation of the influence of SrO addition on the bioactivity of CaO Na₂O-P₂O₅-B₂O₃ glass system, *Materialia (Oxf)* 26 (2022) 101582. <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2022.101582>.
- [112] A.M. Abdelghany, M.A. Ouis, M.A. Azooz, H.A. Elbatal, G.T. El-Bassyouni, Role of SrO on the bioactivity behavior of some ternary borate glasses and their glass ceramic derivatives, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 152 (2016) 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.07.072>.
- [113] A.M. Deliormanli, Size-dependent degradation and bioactivity of borate bioactive glass, *Ceram Int* 39 (2013) 8087–8095. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.03.081>.
- [114] D.C. Clupper, J.J. Mecholsky, G.P. LaTorre, D.C. Greenspan, Bioactivity of tape cast and sintered bioactive glass-ceramic in simulated body fluid, *Biomaterials* 23 (2002) 2599–2606. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00398-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00398-2).
- [115] P. Tarte, J. Preudhomme, Infra-red spectrum and cation distribution in spinels, *Acta Crystallogr* 16 (1963) 227–227. <https://doi.org/10.1107/s0365110x63000530>.
- [116] J. Tanguay, X. Hou, The Structural Analysis of Zinc Borate Glass by Laboratory EXAFS and X-Ray Diffraction Measurements, (1999).
- [117] A.T.G. Kullberg, A.A.S. Lopes, J.P.B. Veiga, M.M.R.A. Lima, R.C.C. Monteiro, Formation and crystallization of zinc borosilicate glasses: Influence of the ZnO/B₂O₃

- ratio, J Non Cryst Solids 441 (2016) 79–85.
<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2016.03.022>.
- [118] Y. Yang, L. Wu, Y. Teng, F. Jiang, J. Lei, H. Chen, J. Cheng, Effect of ZnO content on microstructure, crystallization behavior, and thermal properties of $x\text{ZnO}-30\text{B}_2\text{O}_3-(65-x)\text{Bi}_2\text{O}_3-5\text{BaO}$ glass, J Non Cryst Solids 511 (2019) 29–35.
<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.12.036>.
- [119] S. Kehoe, E. Tonkopi, R.J. Abraham, D. Boyd, Predicting the thermal responses and radiopacity of multicomponent zinc-silicate bioglasses: A focus on ZnO, La_2O_3 , SiO_2 and TiO_2 , J Non Cryst Solids 358 (2012) 3388–3395.
<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2012.08.024>.
- [120] R.R. Vivan, R. Ordinola-Zapata, C.M. Bramante, N. Bernardineli, R.B. Garcia, M.A. Hungaro Duarte, I.G. de Moraes, Evaluation of the radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials, Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology 108 (2009) e35–e38.
<https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.07.037>.
- [121] C. Pimentel, L. Costa, F. Guimar, F. Sato, K. Miyuki, N. Souza, S. Pal, C. Vataru, F. Pedrochi, A. Steimacher, The role of Ag_2O on antibacterial and bioactive properties of borate glasses, 554 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2020.120611>.
- [122] A. Wajda, W.H. Goldmann, R. Detsch, A.R. Boccaccini, M. Sitarz, Influence of zinc ions on structure, bioactivity, biocompatibility and antibacterial potential of melt-derived and gel-derived glasses from $\text{CaO}-\text{SiO}_2$ system, J Non Cryst Solids 511 (2019) 86–99.
<https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.12.040>.
- [123] 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 $\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2-\text{B}_2\text{O}_3-\text{ZnO}$ bioactive glasses, Sci Rep 4 (2014) 1–14.
<https://doi.org/10.1038/srep04392>.
- [124] A. Ansari, F. Moztarzadeh, D. Bizari, M. Ashuri, M. Tahriri, Ion release behavior and apatite-forming ability of sol-gel derived 70S30C bioactive glass with magnesium/ zinc substitution, Key Eng Mater 493–494 (2012) 55–60.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.493-494.55>.

- [125] C.P.O. Sio, A. Balamurugan, G. Balossier, S. Kannan, J. Michel, A.H.S. Rebelo, J.M.F. Ferreira, Development and in vitro characterization of sol – gel derived, 3 (2007) 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.09.005>.
- [126] J. Bejarano, P. Caviedes, H. Palza, Sol-gel synthesis and in vitro bioactivity of copper and zinc-doped silicate bioactive glasses and glass-ceramics, Biomedical Materials (Bristol) 10 (2015). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/2/025001>.
- [127] L.D. Guillen-Romero, M.T. Oropeza-Guzmán, E.A. López-Maldonado, A.L. Iglesias, J.A. Paz-González, T. Ng, E. Serena-Gómez, L.J. Villarreal-Gómez, Synthetic hydroxyapatite and its use in bioactive coatings, J Appl Biomater Funct Mater 17 (2019). <https://doi.org/10.1177/2280800018817463>.
- [128] 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>.
- [129] P. Phatai, C.M. Futralan, S. Utara, P. Khemthong, S. Kamonwannasit, Structural characterization of cerium-doped hydroxyapatite nanoparticles synthesized by an ultrasonic-assisted sol-gel technique, Results Phys 10 (2018) 956–963. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2018.08.012>.
- [130] Z. Ne, K. Zheng, L. Liverani, Q. Nawaz, D. Galusková, H. Ka, M. Michálek, A.R. Boccaccini, Bioactive Materials Multifunctional zinc ion doped sol – gel derived mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications, 4 (2020) 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.002>.
- [131] W.E. Klee, G. Engel, I.R. spectra of the phosphate ions in various apatites, Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry 32 (1970) 1837–1843. [https://doi.org/10.1016/0022-1902\(70\)80590-5](https://doi.org/10.1016/0022-1902(70)80590-5).
- [132] S. Koutsopoulos, Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals : A review study on the analytical methods, (2002) 31–34. <https://doi.org/10.1002/jbm.10280>.
- [133] B. Fowler, Infrared Studies of Apatites .1. Vibrational Assignments for Calcium, Strontium, and Barium Hydroxyapatites Utilizing Isotopic-Substitution, Inorg Chem 13 (1974) 194–207. <https://doi.org/10.1021/ic50131a039>.

- [134] E. Biazar, Synthesis of fluorapatite – hydroxyapatite nanoparticles and toxicity investigations, (2011) 197–201. <https://doi.org/10.2147/IJN.S15461>.
- [135] P. Naruphontjirakul, P. Kanchanadumkerng, P. Ruenraroengsak, Multifunctional Zn and Ag co-doped bioactive glass nanoparticles for bone therapeutic and regeneration, *Sci Rep* 13 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34042-w>.
- [136] M. Mohan Babu, J. Bhemarajam, A.M. Lakshmi, S. Murimadugula, T.I. Devi, M. Sroda, M. Özcan, P. Venkateswara Rao, P. Syam Prasad, Exploring the Potential of Silica Mixed Zinc Phosphate Bioactive Glasses for Bone Regeneration: In Vitro Bioactivity and Antibacterial Activity Analysis, n.d. <https://ssrn.com/abstract=4480928>.
- [137] A.S. Hameed, A. Muhammed, A. Luma, J. Hamood, I.A. Obaid, Effect of Zinc on Antibacterial Action of Bioactive Glass Coating for Dental Implant, 2015. <http://www.medicaljb.com>.

APÊNDICE A – Tabela das comparações pareadas, pelo método de Tukey com nível de significância de 5%, entre os resultados obtidos na análise de atividade antibacteriana.

A Tabela A-1 apresenta as comparações pareadas dos diâmetros médios de zona de inibição entre todas as amostras vítreas e os antibióticos contra as bactérias *S. Aureus* e *E. Coli*. Essas comparações foram obtidas pelo teste de Tukey e indicam se há diferença significativa ou não entre os dados com nível de significância de 5%. Na Tabela A-1, se a diferença entre duas amostras é significativa, essa é indicada pelo número 1, já se essa diferença não é significativa essa é indicada pelo número 0.

Tabela A- 1 - Comparações pareadas entre o diâmetro da zona de inibição bacteriana de todas as amostras, e indicação se há diferença significativa entre estes pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Amostras comparadas	Diferença significativa	
	<i>S. Aureus</i>	<i>E.Coli</i>
Pen 10 e CaNaB	0	1
Pen 10 e 1% ZnO	0	1
Pen 10 e 2,5% ZnO	0	1
Pen 10 e 5% ZnO	0	1
Pen 10 e 7,5% ZnO	0	1
Pen 10 e 10% ZnO	0	1
Gen 10 e CaNaB	0	0
Gen 10 e 1% ZnO	0	0
Gen 10 e 2,5% ZnO	0	0
Gen 10 e 5% ZnO	0	0
Gen 10 e 7,5% ZnO	0	0
Gen 10 e 10% ZnO	0	0
Tet 30 e CaNaB	0	0

Tet 30 e 1% ZnO	0	0
Tet 30 e 2,5% ZnO	0	0
Tet 30 e 5% ZnO	0	0
Tet 30 e 7,5% ZnO	0	0
Tet 30 e 10% ZnO	0	0
Van 05 e CaNaB	1	1
Van 05 e 1% ZnO	0	1
Van 05 e 2,5% ZnO	0	1
Van 05 e 5% ZnO	0	1
Van 05 e 7,5% ZnO	0	1
Van 05 e 10% ZnO	0	1
CaNaB e 1% ZnO	0	0
CaNaB e 2,5% ZnO	0	1
CaNaB e 5% ZnO	0	1
CaNaB e 7,5% ZnO	0	1
CaNaB e 10% ZnO	0	1
1% ZnO e 2,5% ZnO	0	0
1% ZnO e 5% ZnO	0	0
1% ZnO e 7,5% ZnO	0	0
1% ZnO e 10% ZnO	0	0
2,5% ZnO e 5% ZnO	0	0
2,5% ZnO e 7,5% ZnO	0	0
2,5% ZnO e 10% ZnO	0	0

5% ZnO e 7,5% ZnO	0	0
5% ZnO e 10% ZnO	0	0
7,5% ZnO e 10% ZnO	0	0