

ADRIANE DO NASCIMENTO

**ESTUDO DA DINÂMICA DE CRISTALIZAÇÃO EM VIDROS BIOATIVOS DO
SISTEMA $60\text{B}_2\text{O}_3 - 8\text{CaO} - 4\text{P}_2\text{O}_5 - 18\text{Na}_2\text{O} - 10\text{CaF}_2$ TRATADOS
TERMICAMENTE**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora.

Aprovado em: Maringá, 22 de janeiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Francielle Sato
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof.^a Dr.^a Franciana Pedrochi
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof.^a Dr.^a Taiana Gabriela Moretti Bonadio
Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO

Prof. Dr. Ivair Aparecido dos Santos
Universidade Estadual de Maringá – UEM



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Adriane do Nascimento

Estudo da dinâmica de cristalização em
vidros bioativos do sistema
 $60\text{B}_2\text{O}_3 - 8 \text{CaO} - 4\text{P}_2\text{O}_5 - 18\text{Na}_2\text{O} - 10\text{CaF}_2$
tratados termicamente.

Maringá - PR

2021

Adriane do Nascimento

Estudo da dinâmica de cristalização em vidros
bioativos do sistema
 $60\text{B}_2\text{O}_3 - 8 \text{CaO} - 4\text{P}_2\text{O}_5 - 18\text{Na}_2\text{O} - 10\text{CaF}_2$
tratados termicamente.

*Tese de doutorado apresentada
ao Programa de Pós-graduação
em Física da Universidade
Estadual de Maringá para a
obtenção do título de Doutora
em Física.*

Orientadora: Profa. Dra. Francielle Sato

Coorientador: Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand

Maringá-PR

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Campus Regional de Cianorte - UEM, Cianorte – PR, Brasil)

N244e Nascimento, Adriane do
Estudo da dinâmica de cristalização em vidros bioativos do sistema $60\text{B}_2\text{O}_3 - 8\text{CaO} - 4\text{P}_2\text{O}_5 - 18\text{Na}_2\text{O} - 10\text{CaF}_2$ tratados termicamente / Adriane do Nascimento. -- Maringá, 2021.
89 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Francielle Sato.
Coorientador: Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, 2021.

1. Vidro bioativo - Tratamento térmico. 2. Cristalização de vidros. 3. Vitrocerâmicas. I. Sato, Francielle, orient. II. Weinand, Wilson Ricardo, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. IV. Título.

CDD 23. ed. 535.3

Marinalva Aparecida Spolon Almeida-CRB 9/1094

*“ Abre a janela para a vida
Deixa a luz do Sol entrar
Com seus raios de amor
E as gotas de esperança
Abre o teu sentimento
Pare então com essa dor
Muita fé no coração
E a certeza de viver feliz*

*Não deixe de cantar
Não deixe de sorrir
Cantando toda dor
O tempo levará
Não pare ainda não
Existe uma razão
A vida está em Cristo
Razão pra se viver*

*Vive hoje a liberdade
Que há dentro de teu ser
Com amor constrói a paz
Só assim serás feliz
Não te importes com o passado
Deus já nem se lembra mais
O presente que importa
E o futuro que à porta está “*

Oséias de Paula

*Dedico este trabalho à
minha família, que é meu
alicerce e meu porto
seguro.*

*Em especial, dedico ao
meu pai, in memoriam, Mário.*

AGRADECIMENTOS

Foram muitas as pessoas que estiveram ao meu lado durante esta caminhada e colaboraram para que eu pudesse alcançar mais esta conquista. Este trabalho é fruto de um verdadeiro esforço em equipe. Creio que por meio destas singelas palavras eu não consiga expressar toda a minha gratidão.

- À Deus, pela vida e por guiar meus caminhos;
- À minha mãe, Miriam, pelo seu amor incondicional. Por ser meu colo nos momentos difíceis, sempre me dando força para continuar, pelo seu apoio em todas as decisões que tomei para a vida. Tenha certeza que seria impossível expressar toda a minha gratidão por ter você em minha vida;
- Ao meu pai, *in memoriam*, Mário. Pai, obrigada por sempre me incentivar nos estudos, por todos os ensinamentos e conselhos que eu vou levar para vida! Estará para sempre no meu coração, levarei você sempre comigo em todas as minhas conquistas;
- Ao meu irmão, Lucas, pela sua amizade e apoio durante essa jornada. Pelos conselhos, pelas conversas e por sempre torcer por mim, muito obrigada!
- Ao meu namorado Eduardo, tenho duas considerações a fazer:
Pessoalmente, agradeço pelo seu amor, seu companheirismo, seu cuidado, apoio e força nos momentos mais difíceis, por torcer pelas minhas conquistas e sempre me incentivar e pela sua amizade, você torna meus dias mais felizes! Profissionalmente, agradeço por toda dedicação e contribuição para a realização deste trabalho. Pelas conversas e discussões, pela troca de experiências, por compartilhar comigo muitos de seus conhecimentos. Saiba que aprendi muito com você durante este processo. Obrigada pela sua parceria. Esta é uma conquista nossa!
- Agradeço à Professora Francielle Sato, pela oportunidade de tê-la como minha orientadora durante meu mestrado e doutorado. Por ser uma das pessoas responsáveis pela minha formação profissional, pelos ensinamentos, pela confiança e sua dedicação. Foi uma jornada árdua até aqui, mas aprendemos juntas a trabalhar em equipe, a respeitar o próximo e a se alegrar com nossas

conquistas. Que eu possa sempre contar com sua amizade, parceria e ensinamentos. Muito Obrigada!

- Ao Professor Wilson Ricardo Weinand, ao qual tive o prazer de tê-lo como meu co-orientador. Este trabalho não se realizaria sem seu apoio incondicional, seus ensinamentos e toda sua dedicação. Agradeço pelos sábios conselhos, suas palavras de apoio e pela confiança depositada em mim. Muitíssimo obrigada!
- Em especial, agradeço ao Professor Antonio Medina Neto, por toda sua dedicação e contribuição com este trabalho e também por todos os seus ensinamentos e sabedoria. Tive o prazer de tê-lo como meu professor desde a graduação e pós-graduação e admiro seu trabalho e competência! Obrigada pela confiança e paciência durante esta jornada;
- Agradeço também a todos os professores do departamento de Física e pós-graduação em Física, em especial aos Professores, Renio dos Santos Mendes, Luis Roberto Evangelista, Luis Carlos Malacarne e Ivair Ap. dos Santos, os quais contribuíram diretamente na minha formação com seus ensinamentos e exemplos de profissionalismo, muito obrigada!
- Aos Professores Franciana Pedrochi e Alysson Steimacher, pela parceria e por fornecer o vidro bioativo utilizado no estudo deste trabalho;
- À Professora Taiana Gabriela Bonadio, pela parceria e por realizar as medidas de análises térmicas fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho;
- Agradeço ao Professor Celso Vataru Nakamura, pela parceria e em especial à Nilma Fernandes e à Karina Miyuki Retamiro por realizarem os ensaios biológicos apresentados neste trabalho;
- Às minhas queridas amigas e parceiras “Raman Girls”, Lidiane, Mariana e Raquel! Vocês foram fundamentais durante esta trajetória. Obrigada pela amizade, apoio, conversas, horas a fio de laboratório, trabalho em equipe e por vibrarem comigo em mais uma conquista, saibam que vou levar nossa amizade pra vida;
- À minha querida amiga Camilla “Cá”! Minha parceira de jornada da pós - graduação. Cá, estivemos juntas desde o início do mestrado, nos apoiando em

todos os momentos e vibrando com as conquistas uma da outra. Obrigada pela sua amizade, por todo carinho e apoio nessa trajetória!

- Aos meus queridos amigos de longa data, Leandro e Flávia. Vocês acompanharam toda essa caminhada desde o início da graduação! Agradeço pela amizade, conselhos e apoio que sempre me deram!
- Ao meu psicólogo Felipe Almeida, pelos conselhos, pelo apoio e por me ajudar a manter a sanidade nos momentos mais difíceis que passei durante meu doutorado! Você me ajudou a me reconhecer e confiar no meu potencial! Muito obrigada Fê!
- A todos amigos e colegas do DFI, em especial, à “Galera da salinha”, pela troca de experiências, pelas conversas, pelos cafés! Vocês com certeza tornaram meus dias mais leves! Muito Obrigada!
- À Universidade Estadual de Maringá, onde realizei minha graduação e mestrado, que proporcionou meu aprendizado e tive a oportunidade de realizar meu doutorado;
- As agências de fomento: Capes, CNPq e Fundação Araucária pelo suporte financeiro;
- Ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP - UEM), pela disponibilização dos laboratórios e equipamentos;
- E ao Programa de Pós – Graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá. Em especial, à secretária do programa, Mônica Mucio Loiola, por sua dedicação e competência, sempre atenta e paciente frente aos assuntos burocráticos e atividades desempenhadas durante a pós – graduação.

RESUMO

A busca por materiais com propriedades físicas e com compatibilidade biológica para a fabricação de próteses e implantes segue em constante desenvolvimento. Dentre eles, os vidros bioativos se apresentam como uma excelente alternativa frente às suas propriedades físico-químicas. Entretanto, o processamento desses vidros bioativos para fabricação de implantes, demandam tratamento térmico que podem influenciar, ou mesmo modificar suas propriedades. Nesse sentido, o presente trabalho de tese investigou o efeito do tratamento térmico em diferentes temperaturas (518, 576, 634, 703, 773, 810 e 900 °C) para o vidro bioativo $60\text{B}_2\text{O}_3 - 8\text{CaO} - 4\text{P}_2\text{O}_5 - 18\text{Na}_2\text{O} - 10\text{CaF}_2$. Por meio das análises térmicas, entre temperatura ambiente e 900 °C, foi possível identificar as temperaturas características do vidro bioativo, bem como, observar que não houve degradação da amostra. A partir destas análises foram selecionadas as temperaturas para o tratamento térmico nas amostras. A técnica de difração de raios X indicou a formação de fases cristalinas CaNaB_5O_9 , $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ para as amostras tratadas entre 634 e 810 °C e das fases CaB_2O_4 , $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ e NaO_2 em 900 °C. Pela análise de espectroscopia Raman, observou-se no intervalo entre temperatura ambiente a 634 °C, a predominância de modos vibracionais de B-O. Entre 634 e 810 °C verificou-se a presença dos modos vibracionais relativos aos grupos fosfatos, mostrando também a presença da Fluorapatita. Em 900 °C foram identificadas a presença de anéis compostos de BO_3 e BO_4 , o que confirma a presença da fase borato de cálcio. As análises realizadas por microscopia eletrônica de varredura revelaram que o processo de densificação inicia-se a partir de 634 °C associado ao aparecimento de grãos com morfologias distintas sugerindo o surgimento de novas fases. Os mapeamentos químicos e análises de espectroscopia de energia dispersiva confirmaram a presença das fases identificadas pela difração de raios X e modos vibracionais pela espectroscopia Raman. O teste *in vitro* de citotoxicidade mostrou que as amostras apresentam viabilidade celular acima de 70%, sendo não citotóxicos, mostrando potencial para aplicação como biomaterial.

Palavras-chave: Vidro bioativo; cristalização; tratamento térmico; vitrocerâmicas.

ABSTRACT

The search for novel materials with enhanced physical properties and biocompatibility for the fabrication of prostheses and implants is still in constant development. Among them, bioactive glasses arise as an excellent alternative due to its physical and chemical properties. However, the processing of such materials, targeting implantable applications, requires some thermal treatment that possibly affects and/or modify its physical properties. In this sense, this doctoral thesis explored the effects of thermal treatment under different temperatures (518, 576, 634, 703, 773, 810 e 900 °C) for the $60\text{B}_2\text{O}_3 - 8\text{CaO} - 4\text{P}_2\text{O}_5 - 18\text{Na}_2\text{O} - 10\text{CaF}_2$ system. Thermogravimetric analysis revealed that, until 900 °C, it was possible to observe the thermal characteristic of the bioactive glass and no signals of sample degradation were observed. X-ray diffraction suggested the formation of CaNaB_5O_9 , $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ and $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ crystalline phases for the samples treated between 634 and 810 °C and CaB_2O_4 , $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ and NaO_2 at 900 °C. Raman spectroscopy, performed between room temperature and 634 °C showed the predominance of B-O vibration modes. For temperatures between 634 and 810 °C, it was observed the presence of vibrational modes characteristic of phosphates and also Fluorapatite. At 900 °C, it was observed BO_3 and BO_4 composite rings, confirming the presence of calcium borate phases. Scanning electron microscopy revealed that the crystallization process started from 634 °C associated with the formation of grains with several distinct morphologies, suggesting the formation of new phases. Energy dispersive spectroscopy confirmed the presence of all phases identified from the XRD patterns as well as vibrational modes. *In vitro* toxicity analysis showed that the samples presents cell viability above 70%, which means no toxicity, attesting the potential for biomedical applications.

Keywords: Bioactive glasses; crystallization; thermal treatment; vitrocereamics.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.1: Figura ilustrativa dos vitrais da catedral de Sainte-Chapelle, Paris [3].</i>	1
<i>Figura 1.2: Número de publicações com o termo “Vidro”, segundo pesquisa de dados realizada no portal de periódicos CAPES (dezembro, 2020).</i>	2
<i>Figura 2.1: Representação esquemática da faixa de transição vítrea e processo de cristalização. Adaptado de [17].</i>	6
<i>Figura 2.2: Representação esquemática das redes vítreas: (a) rede SiO_2; (b) rede modificada pela adição de Na_2O. Adaptado de [17].</i>	8
<i>Figura 2.3: Representações das unidades estruturais formadas por compostos binários. Adaptado de [29].</i>	10
<i>Figura 2.4: Diagrama da composição para ligação biovidro-osso. Adaptado de [30].</i>	12
<i>Figura 2.5: Comportamento das taxas de nucleação e de crescimento do cristal em função da temperatura. Adaptado de [46].</i>	18
<i>Figura 4.1: Curvas de DSC com taxa de $10^\circ/\text{min}$ para o processo de aquecimento (a), $3^\circ\text{C}/\text{min}$ para o resfriamento (b) e curva de perda de massa (c), no intervalo de 23 a 850°C. No detalhe: região da transição vítrea observada durante o resfriamento. As siglas T_g, T_x, T_p, T_{m1} e T_{m2} correspondem às temperaturas de transição vítrea, cristalização endotérmica, cristalização exotérmica, primeira etapa de fusão e segunda etapa de fusão, respectivamente.</i>	26
<i>Figura 4.2: Difratomogramas de raios X do VB-C obtido da referência [54] e das amostras VB-518, VB-576, VB-634, VB-703, VB-773, VB-810 e VB-900.</i>	31
<i>Figura 4.3: Difrátograma de Raios-X para a amostra VB-703, com a indexação das fases CaNaB_5O_9 (JCDPS # 078-0294), $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ (JCDPS # 078-0295) e $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ (JCDPS # 76-0558).</i>	32
<i>Figura 4.4: Difrátograma de raios X para as amostras VB-634 e VB-810, no intervalo de 2θ entre 20° e $32,5^\circ$, no qual foi evidenciado a presença dos picos (002), (211) e (112) para a Fluorapatita e o pico de maior intensidade (111) para o P_2O_5 observado para a amostra VB-634.</i>	33
<i>Figura 4.5: Difrátograma de raios X para a amostra VB-900, com a indexação das fases CaB_2O_4 (JCPDS # 076-0747), NaO_2 (JCPDS # 077-0209) e $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ (JCDPS # 76-0558). Detalhe: análise semiquantitativa pelo método RIR. Resultados obtidos utilizando a base de dados de acesso livre.</i>	34
<i>Figura 4.6: Difrátograma de raios X para a amostra VB-900, no intervalo de 2θ entre $32,5^\circ$ e 34°, no qual foi evidenciado a presença dos picos (220), (300) e (101) para as fases Borato de Cálcio, Fluorapatita e Óxido de Sódio, respectivamente.</i>	35
<i>Figura 4.7: Espectros Raman das amostras VB-C, VB-518 e VB-576. As linhas pontilhadas indicam o centro das bandas. No detalhe, destaque para banda em 430 cm^{-1}.</i>	36
<i>Figura 4.8: Espectros Raman geral das amostras em função do tratamento térmico para a região espectral de 1800 a 200 cm^{-1}. Destaque para a região pontilhada de 400 a 800 cm^{-1} das unidades BO_3 e BO_4 [79–81].</i>	39

<i>Figura 4.9: Comparação entre os espectros de espalhamento Raman das amostras VB-C e VB-634 e da Fluorapatita (RRUFF : R040098-3) [82].</i>	40
<i>Figura 4.10: Comparação entre os espectros de espalhamento Raman das amostras VB-634 e VB-703. As setas vermelhas indicam os picos presentes apenas no espectro da amostra tratada a 634 °C atribuídos ao P_2O_5 [85].</i>	41
<i>Figura 4.11: Comparação do espectro Raman para a amostra VB-900, o espectro para a Fluorapatita (RRUFF: R040098-3) e a indexação dos picos para a fase CaB_2O_4 obtidos na [86].</i>	42
<i>Figura 4.12: Imagens por MEV das superfícies das amostras VB-C (a), VB-518 (c), VB-576 (e) e VB-634(g).</i>	
<i>Imagens por MEV das fraturas das amostras VB-C (b), VB-518 (d), VB-576 (f) e VB-634 (h).</i>	44
<i>Figura 4.13: Imagens por MEV das superfícies das amostras VB-703 (a), VB-773 (c), VB-810 (e) e VB-900 (g).</i>	
<i>Imagens por MEV das fraturas das amostras VB-703 (b), VB-773 (d), VB-810 (f) e VB-900 (h).</i>	46
<i>Figura 4.14: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície referente a amostra VB-576 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.</i>	48
<i>Figura 4.15: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da fratura referente a amostra VB-576 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.</i>	49
<i>Figura 4.16: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície referente à amostra VB-634 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.</i>	50
<i>Figura 4.17: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da fratura referente a amostra VB-634 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.</i>	52
<i>Figura 4.18: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície referente a amostra VB-810 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.</i>	53
<i>Figura 4.19: (a) Superposição das imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície e dos mapeamentos químicos referente a amostra VB-810 e espectros de EDS das regiões (b) 1, (c) 2 e (d) 3.</i>	55
<i>Figura 4.20: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da fratura referente a amostra VB-810 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.</i>	56
<i>Figura 4.21: (a) Superposição das imagens de microscopia eletrônica de varredura da fratura e dos mapeamentos químicos referente a amostra VB-810 e (b) espectro de EDS da região 1.</i>	57
<i>Figura 4.22: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície referente a amostra VB-900 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.</i>	58
<i>Figura 4.23: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da fratura referente a amostra VB-900 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.</i>	60
<i>Figura 4.24: Viabilidade celular de osteoblastos após 24 h de incubação do biovidro 45S5 e das amostras VB-C, VB-518, VB-576, VB-634, VB-703, VB-773, VB-810 e VB-900.</i>	63

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 3.1: Composição dos reagentes em porcentagem em massa (% wt) e porcentagem em (% mol).</i>	20
<i>Tabela 3.2: Parâmetros utilizados no tratamento térmico.</i>	21
<i>Tabela 3.3: Nomenclatura das amostras de acordo com a temperatura de tratamento térmico.</i>	22
<i>Tabela 4.1: Valores das razões teóricas e experimentais para as fases CaNaB_5O_9, $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ para VB-810.</i>	54
<i>Tabela 4.2: Valores da MIC (Concentração inibitória mínima em $\mu\text{g/mL}$) e da MBC (Concentração bactericida mínima em $\mu\text{g/mL}$) para ensaio antibacteriano in vitro com os microrganismos <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) e <i>E. coli</i> (ATCC 25922).</i>	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	5
2.1	Vidros.....	5
2.1.1	Definição de vidros	5
2.1.2	Transição vítrea.....	6
2.1.3	Estrutura dos vidros.....	7
2.1.4	Vidros com base de borato	9
2.1.5	Vidros Bioativos.....	11
2.1.6	Vidros Bioativos com base de borato.....	12
2.2	Processamento térmico de vidros bioativos	15
2.2.1	Processos de cristalização	15
3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	20
3.1	Fabricação do Vidro Bioativo	20
3.2	Preparação das Amostras.....	20
3.3	Análises térmicas: Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TG)	22
3.4	Difratometria de raios X (DRX).....	22
3.5	Espectroscopia Raman	23
3.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	23
3.7	Ensaio Biológicos <i>in vitro</i>	23
3.7.1	Antibacterianos.....	23
3.7.2	Ensaio de Citotoxicidade	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	Caracterização do vidro bioativo	25
4.1.1	Caracterização Térmica – Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)	25
4.1.2	Caracterização Estrutural - Difratometria de raios X (DRX)	30
4.1.3	Caracterização Vibracional - Espectroscopia Raman	36
4.1.4	Análise Morfológica - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	43

4.1.5	Análises químicas – Mapeamentos por Energia dispersiva de Raios-X	47
4.2	Ensaio <i>in vitro</i>	62
4.2.1	Avaliação antibacteriana	62
4.2.2	Avaliação citotóxica	63
5	CONCLUSÃO	65
6	PERSPECTIVAS	66
7	Referências	67

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de materiais vítreos está intimamente ligado com a história da humanidade. Muito tempo antes da habilidade humana de manufaturar esse tipo de material, os vidros naturais resultantes do rápido resfriamento de lavas vulcânicas eram utilizados para a fabricação de ferramentas pontiagudas [1]. No Egito antigo onde foi descoberto que ao submeter uma mistura de areia, sal marinho juntamente com partículas de ossos de animais a altas temperaturas era formado o que hoje conhecemos como vidros soda-cal-sílica, amplamente utilizados em janelas [2]. No período da idade média, a tecnologia da fabricação de vidros já era relativamente avançada. Nesse período as pessoas começaram a explorar os aspectos estéticos dos vidros como podem ser vistos nos vitrais das catedrais construídas durante a época. A Figura 1.1 mostra os vitrais da catedral *Sainte-Chapelle* em Paris, que exemplifica esse período no qual a história dos vidros se funde com a história da arte e da humanidade.



Figura 1.1: Figura ilustrativa dos vitrais da catedral de *Sainte-Chapelle*, Paris [3].

Os avanços na indústria dos vidros foram estimulados pelo profundo entendimento das propriedades físicas e químicas destes materiais e as invenções de novas técnicas de produção e manufatura [4]. O avanço na tecnologia e controle da fabricação de vidros só foi possível devido ao aumento dos recursos investidos em pesquisa e inovação de produtos que pode ser observada no crescente número de publicações científicas.

Uma pesquisa de dados realizada usando ferramenta de busca no portal de periódicos da CAPES (dezembro de 2020), mostra que o número de publicações com o termo “Vidro” vem crescendo ano a ano como indicado no gráfico (Figura 1.2). A partir de 1969, algumas composições de vidros, que ficaram conhecidos como vidros bioativos, começaram a ser estudadas para fins biomédicos como, por exemplo, para a fabricação de próteses e implantes. Os principais requisitos para que um vidro seja utilizado para esses fins, é de que o material seja biocompatível e bioativo, ou seja, é importante que esse material favoreça a resposta celular em uma situação específica, além de não apresentar rejeição pelo corpo [5].

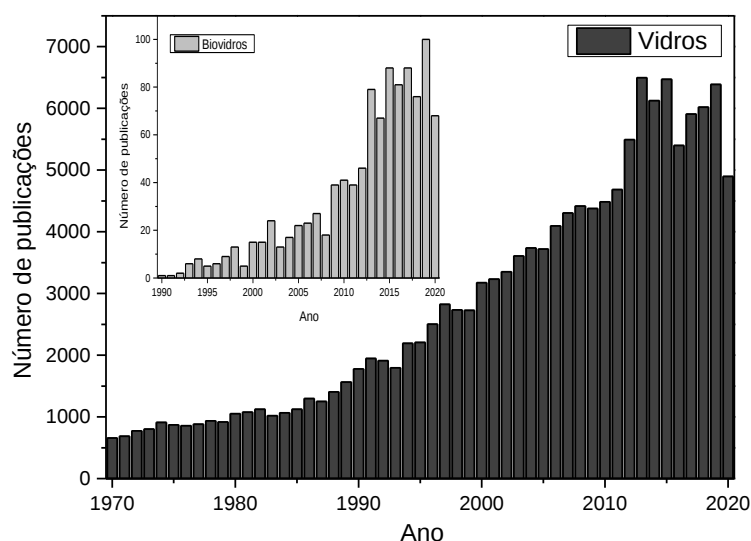


Figura 1.2: Número de publicações com o termo “Vidro”, segundo pesquisa de dados realizada no portal de periódicos CAPES (dezembro, 2020).

Apesar dos esforços realizados com pesquisa e desenvolvimento de vidros bioativos (Veja a inserção na Figura 1.2), há poucos disponíveis comercialmente para fins clínicos e a pesquisa para a melhoria de suas propriedades ainda se faz necessária.

É importante citar que, na grande maioria, os vidros usados como implantes e próteses possuem sua composição baseada em silício, como no caso do *Bioglass®* 45S5, mais conhecido por ter sido o primeiro vidro bioativo sintetizado.

Por outro lado, há evidências de que os vidros boratos bioativos podem apresentar reações de trocas de íons significativamente mais rápidas se comparados aos silicatos, que resultarão na formação do crescimento da camada de apatita no material e que pode ser uma vantagem a depender do tipo de implante. Como exemplo, podemos citar o trabalho publicado por Jung et al. [6] no qual foi mostrado que a cinética de reação para vidros borato pode ser de até cinco vezes mais rápida que nos vidros silicato.

Uma discussão mais aprofundada a respeito da história e propriedades dos vidros bioativos existentes atualmente será realizada no capítulo 2 (Revisão bibliográfica).

1.2 – Motivação

É bastante reconhecido o fato de que os vidros boratos apresentam forte tendência de cristalização durante o processo de tratamento térmico, muitas vezes necessário para a consolidação de próteses em 3 dimensões [7]. Em muitas composições a cristalização total ou parcial, como resultado de tratamentos térmicos a altas temperaturas, podem afetar a bioatividade de vidros bioativos como no caso do biovidro 45S5 [8]. Entretanto, deve-se analisar cuidadosamente a composição e a fase formada na cristalização. De acordo com [9–11], vidros com alto teor de fosfato apresentam a tendência a se cristalizarem em fases ricas em fosfato que podem incluir apatita, e/ou vitrocerâmicas que contém apatita como principal fase cristalina. Nesses casos, a bioatividade pode ser ainda maior que do que algumas composições de vidros puramente amorfos. Portanto, é importante salientar que o processo de cristalização nem sempre prejudicará a bioatividade do material. Além disso, um estudo aprofundado dos efeitos da temperatura em vidros bioativos é fundamental para aprimorar a fabricação de compósitos, como por exemplo vidro bioativo + hidroxiapatita (HAp), uma vez que a síntese deste tipo de material requer tratamento térmico em altas temperaturas [12]. Sendo assim, um estudo que contemple a dinâmica de cristalização e a correta identificação das fases cristalinas formadas durante o processo se faz necessário.

1.3 – Objetivos

A presente tese tem como objetivo geral estudar a dinâmica de cristalização resultante do tratamento térmico realizado em vidro bioativo (VB) de composição $60\text{B}_2\text{O}_3 - 8\text{CaO} - 4\text{P}_2\text{O}_5 - 18\text{Na}_2\text{O} - 10\text{CaF}_2$ por meio de técnicas de análises térmicas (DSC-TG), análises estruturais (Espectroscopia Raman, Difratometria de raios X (DRX)), microestruturais (Microscopia eletrônica de varredura) e análises químicas (Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS)), além de avaliar a ação antibacteriana e citotóxica em função do tratamento térmico, por meio de testes *in vitro*.

De maneira específica, podemos pontuar os objetivos desta tese como segue:

- Realizar a análise térmica do pó do vidro bioativo do sistema $60\text{B}_2\text{O}_3 - 8\text{CaO} - 4\text{P}_2\text{O}_5 - 18\text{Na}_2\text{O} - 10\text{CaF}_2$;
- Produção de pastilhas a partir do pó do vidro bioativo por meio de compactação;
- Tratamento térmico em diferentes temperaturas definidas pelo estudo das análises térmicas;
- Estudar as propriedades estruturais e vibracionais;
- Estudar a evolução da microestrutura das amostras tratadas termicamente;
- Estudar a dinâmica do surgimento e da evolução de fases cristalinas proveniente do tratamento térmico;
- Avaliar a ação antibacteriana e citotóxica do vidro bioativo em função do tratamento térmico, por meio de testes biológicos *in vitro*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Vidros

2.1.1 Definição de vidros

Do conhecimento popular, o termo vidro é designado a uma substância transparente que possui alta dureza, rigidez e propriedades briteis, sendo essas características, também presentes em sólidos cristalinos. Por outro lado, os vidros também possuem propriedades que estão relacionadas ao estado líquido sendo, por vezes classificado como um líquido com alta viscosidade [13].

Devido à complexidade estrutural dos vidros, uma definição precisa que contemple todas as propriedades desse tipo de material é, por vezes, também complexa e inúmeras definições têm sido sugeridas ao longo dos anos. Uma definição amplamente aceita diz “vidros são substâncias inorgânicas produzidas como resultado da fusão na qual é resfriada à um estado rígido sem passar pelo processo de cristalização” [14]. Embora essa definição deixe de fora os vidros orgânicos e moleculares, produzidos atualmente, ela ainda contempla boa parte das propriedades encontradas na maioria dos vidros. Com os avanços nos estudos de vidros utilizando difrações de raios X, foi mostrado que os vidros não possuem um arranjo periódico de longo alcance e que todos os tipos de vidros exibem um comportamento de transição vítrea que depende do tempo. Nesse sentido, Varshneya e Mauro [15] propuseram uma definição científica de vidros como “um sólido que possui estrutura não cristalina, que se converte continuamente em líquido quando submetido ao aquecimento.” Em outra definição, ainda mais ampla, foi sugerida por Zarzycki [16], que diz: “Um vidro é um sólido não cristalino que exhibe o fenômeno de transição vítrea”. Essa é considerada uma boa definição, pois além de contemplar os vidros orgânicos/moleculares e inorgânicos, também diferencia os sólidos não-cristalinos em vidros e em outros materiais amorfs.

A seguir, será discutido o conceito de transição vítrea, fundamental para a compreensão da definição proposta por Zarzycki.

2.1.2 Transição vítrea

Grande parte dos vidros são formados pela solidificação a partir de um estágio de fusão. O resfriamento ocorre de maneira tão rápida que impossibilita o processo de cristalização. Com a diminuição da temperatura, a viscosidade continua a aumentar, resultando em um “congelamento” progressivo do líquido até a sua solidificação final. A estrutura de um vidro pode ser facilmente desvincilhada de um líquido, a partir do momento em que sua estrutura se torna independente da temperatura. A relação entre cristais, líquidos e vidros pode ser explicada a partir da relação entre o volume específico com a temperatura, como exemplificado na Figura 2.1.

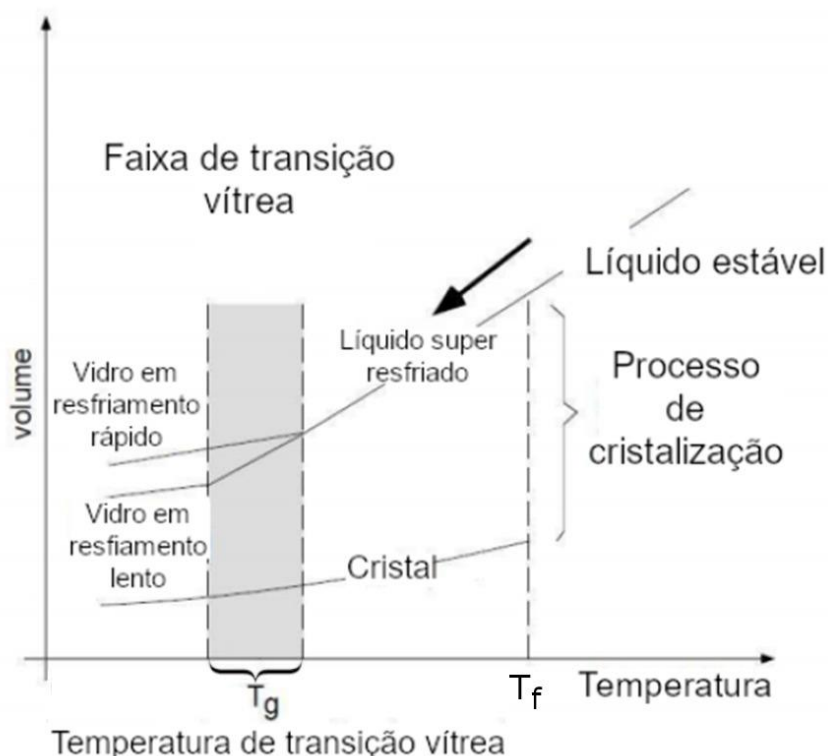


Figura 2.1: Representação esquemática da faixa de transição vítrea e processo de cristalização.
Adaptado de [17].

No processo de resfriamento a partir de altas temperaturas, no ponto de solidificação (ou “congelamento”), podem ocorrer dois fenômenos. Há uma mudança descontínua no volume no ponto de fusão caso o líquido se cristalice, ou o processo de cristalização é evitado e o líquido passa por um estado de super-resfriamento. No

último caso, o volume do líquido diminui continuamente até que haja uma diminuição no coeficiente de expansão em uma região denominada de região de transformação vítrea. Para temperaturas abaixo desse regime, a estrutura do vidro não relaxa e o coeficiente de expansão é, geralmente, o mesmo que aquele encontrado nos sólidos cristalinos. O ponto de intersecção entre a curva do estado vítreo e a curva do líquido super-resfriado é chamado de transição vítrea (T_g) [18]. A T_g pode variar com a taxa de resfriamento e, sendo assim, é mais conveniente chamar essa faixa de temperatura de região de transformação em vez de um ponto fixo. Tanto a temperatura de transição vítrea quanto o volume específico aumentam com o aumento da taxa de resfriamento.

2.1.3 Estrutura dos vidros

Diversos modelos estruturais têm sido propostos ao longo dos anos, dentre os quais podemos citar o modelo de cristalito e o modelo de rede aleatória, entre outros. No escopo dessa tese, discutiremos apenas o modelo de rede aleatória devido ao fato deste ser um modelo amplamente aceito.

2.1.3.1 Modelo de rede aleatória

Nesse modelo, os vidros são vistos como uma rede tridimensional, sem simetria e sem qualquer periodicidade, na qual nenhuma unidade estrutural se repete em um intervalo regular. No caso dos vidros óxidos, essas redes são compostas por poliedros de oxigênio. Assumindo que um vidro deve possuir energia similar a seu cristal correspondente, Zachariasen [19] propõe quatro regras para a formação de um vidro óxido:

1. Um átomo de oxigênio deve se ligar a, no máximo, dois átomos que formam o vidro.
2. O número de coordenação dos átomos formadores do vidro deve ser, no máximo, quatro.
3. Os poliedros de oxigênio compartilham somente os vértices e nunca as faces ou arestas.

4. Para redes em 3 dimensões, pelo menos três vértices de cada poliedro podem ser compartilhados.

A força de ligação responsável para a formação da estrutura de rede, como por exemplo na sílica cristalina (SiO_2), também são responsáveis pela formação de redes similares em vidros (Figura 2.2a) e por isso são considerados como um formador de rede. Os chamados silicatos alcalinos, podem facilmente formar vidros, e quando uma estrutura alcalina, como o Na_2O , é adicionada ao formador de rede (SiO_2 vítreo), os íons de sódio se tornam parte dessa estrutura e ocupam posições aleatórias distribuídas na rede com o propósito de neutralizar as cargas (Figura 2.2b).

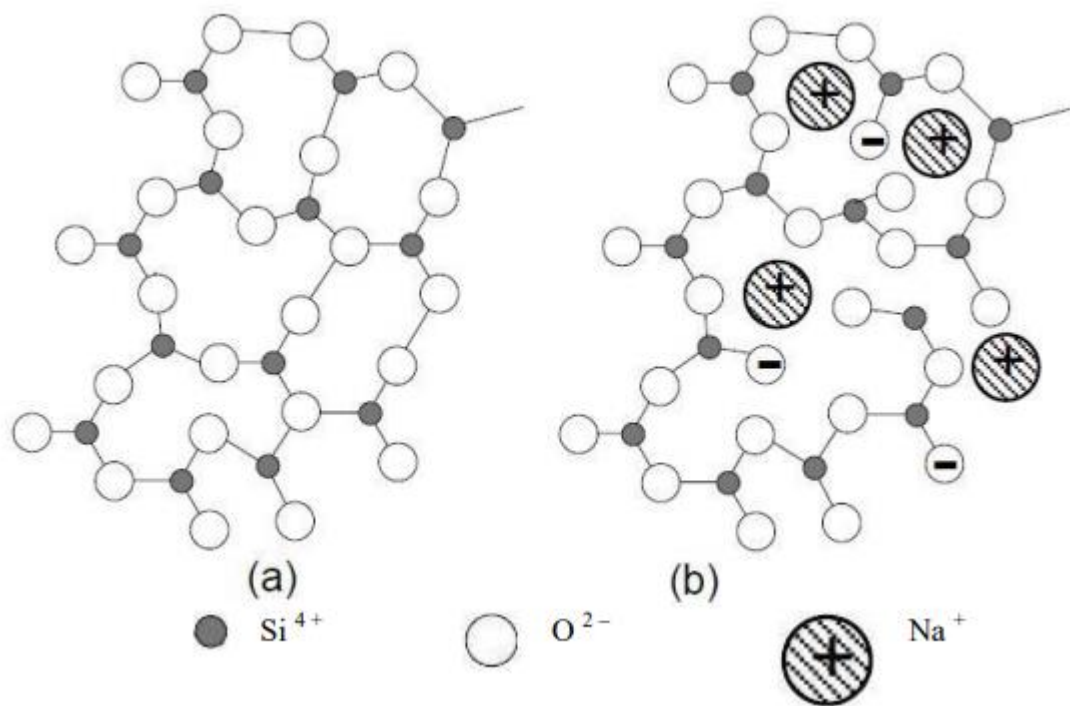


Figura 2.2: Representação esquemática das redes vítreas: (a) rede SiO_2 ; (b) rede modificada pela adição de Na_2O . Adaptado de [17].

Como o maior propósito desses óxidos alcalinos é prover íons de oxigênio adicionais que modificam a rede, esses são chamados de modificadores de rede. Com o aumento da concentração desses modificadores, a taxa oxigênio/silício também cresce ocasionando a quebra da rede tridimensional com a formação de oxigênios com apenas uma ligação que não participa da rede, reduzindo assim o tamanho da

cadeia. O principal efeito desses modificadores é a redução da temperatura de fusão e da temperatura de trabalho por meio da diminuição da viscosidade. Um excesso de modificadores pode tornar a fusão simples e móvel, fazendo com que o processo de cristalização ocorra preferencialmente durante a formação do vidro. Além disso, cátions de maior valência e baixo número de coordenação que os alcalinos e os metais alcalinos terrosos podem atuar tanto como formadores de rede quanto como modificadores e são denominados de intermediários [17].

2.1.4 Vidros com base de borato

Embora os vidros com base em sílica (silicatos) compreendam uma ampla gama de aplicações, os vidros com base em borato vêm sendo cada vez mais estudados devido às suas propriedades peculiares, principalmente a relação entre as propriedades térmicas e sua relação com a mudança dos átomos de oxigênio próximos ao Boro. Enquanto os vidros silicatos apresentam alta temperatura de transição vítrea ($T_g \sim 1100^\circ\text{C}$) e temperatura de fusão, T_m ($T_m \sim 1728^\circ\text{C}$), os vidros boratos mostram temperaturas significativamente inferiores ($T_g \sim 260^\circ\text{C}$ e $T_m \sim 450^\circ\text{C}$) [17,20].

Do ponto de vista tecnológico, os vidros boratos apresentam uma vasta gama de aplicações industriais como: selagem em dispositivos eletrônico [21,22], aplicações óticas e optoeletrônicas [23,24], além das aplicações biomédicas [25,26].

As propriedades estruturais dos vidros boratos vêm sendo estudadas desde a década de 70. A seguir faremos uma breve revisão histórica sobre os estudos da estrutura desse material.

Mozzi e Warren [27], utilizando as técnicas de difração de raios X e o método de excitação de fluorescência, propuseram que o vidro de óxido de boro é composto de anéis boroxol, nos quais todos os íons de boro estão coordenados triangularmente. Além disso, os mesmos autores concluíram que além das ligações entre os grupos boroxol, há também um pequeno número de unidades BO_3 ligadas aleatoriamente aos grupos boroxol e se encontravam fora desses anéis. Posteriormente, Krogh-Moe [28], concluíram que a adição de Na_2O nos vidros borato levava a uma transformação das unidades trigonais BO_3 para tetraedros BO_4 . Para comprovar a proposta de Mozzi e Warren, Krogh-Moe [28] estudaram o composto binário $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$, para

concentrações até 20 mol%, no qual predominaram os grupos boroxol e tetraborato. Para concentrações entre 20 mol% e 30 mol%, predominaram os grupos tetraborato e diborato. Após os estudos do composto binário $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3$, outros compostos alcalinos como K_2O , Cs_2O e Li_2O foram adicionados com o propósito de se compreender melhor a estrutura dos vidros boratos. Nesses estudos, foram descobertas novas unidades estruturais como os grupos (tri-, tetra-, e pentaborato). As representações estruturais desses grupos boratos estão apresentados na Figura 2.3 e serão úteis nas análises e discussões das espectroscopias Raman.

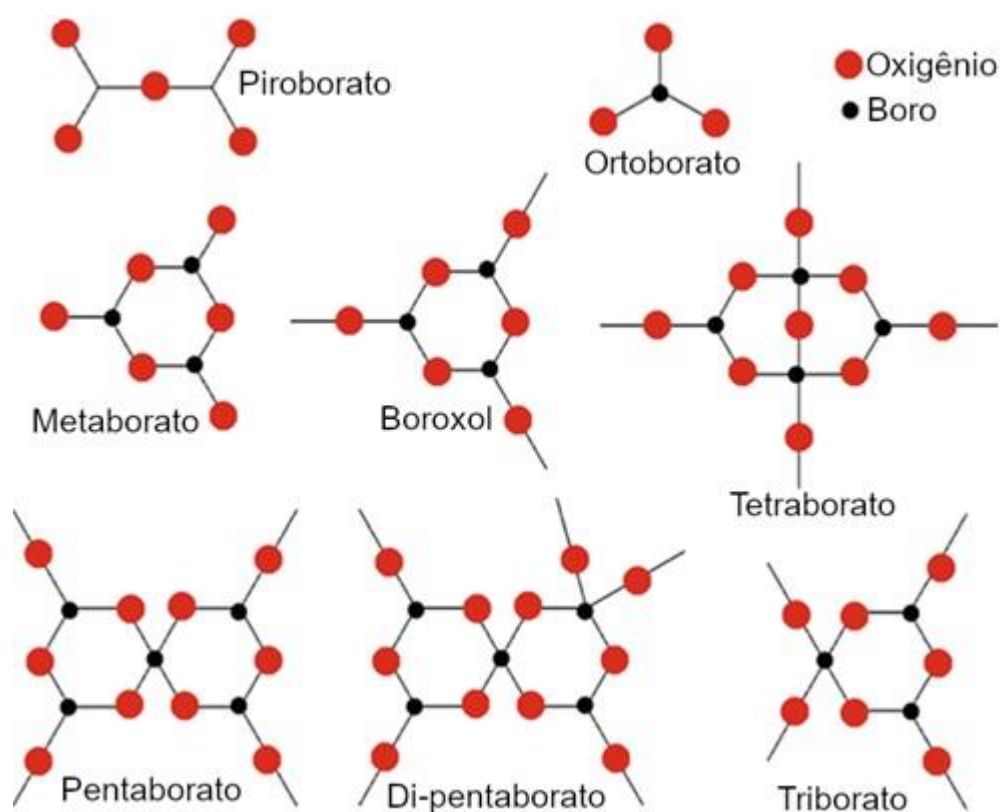


Figura 2.3: Representações das unidades estruturais formadas por compostos binários.
Adaptado de [29].

É importante ressaltar que os modelos estruturais propostos por Krogh-Moe são amplamente aceitos, visto que explicam os espectros Raman de maneira bastante eficaz.

2.1.5 Vidros Bioativos

O primeiro vidro bioativo, registrado com o nome de Biovidro 45S5 ®, foi sintetizado na década de 60 por Larry Hench [26,30]. Esse material foi desenvolvido com o objetivo de preencher falhas ósseas sem que houvesse rejeição do corpo humano. Composto basicamente por fósforo, cálcio e sódio ($\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5\cdot\text{SiO}_2$), o biovidro 45S5 possui excelente biocompatibilidade e a capacidade de realizar ligações com os ossos [30,31]. Ao ser implantado, o biovidro induz um processo conhecido como osteoindução. Nesse processo, as células progenitoras se diferenciam em células ósseas (osteoblastos) e ao se ligarem aos ossos, o biovidro induz o crescimento de novos ossos. De maneira geral, essa ligação é dada por meio da formação de uma camada do fosfato de cálcio, um composto inorgânico com composição semelhante as dos ossos conhecido também como hidroxicarbonato de apatita (HCA). Por meio de um processo celular, o colágeno encontrado nos ossos interage com a camada de HCA para criar uma forte ligação [32].

O diagrama de fase proposto por Hench (Figura 2.4), relaciona a composição do material com a capacidade de ligação entre o biovidro e o osso [30]. Nesse sistema pode-se dividir as possíveis formações (dependendo da concentração dos precursores) em 6 regiões. Na região cinza, não ocorre a formação do vidro. Já no topo da pirâmide (região azul) o vidro formado não é bioativo e sua reação com o osso é extremamente lenta. Na região amarela, também não ocorre a ligação com o osso, porém, ao contrário da região azul, a reatividade é muito alta. Por esses motivos, as composições contempladas por essas regiões (azul e amarela) podem ser boas candidatas como suporte temporário para regeneração óssea (região azul) ou para aplicação como carregadores de fármacos (região amarela). As regiões de maior interesse são as regiões verde, rosa e laranja. Na região verde, ocorre apenas a ligação com o osso, enquanto na região rosa ocorrem ligações tanto em ossos quanto em tecidos moles. A menor região do diagrama (laranja), contempla composição do biovidro comercial 45S5, proposto por Hench, que é até hoje um dos vidros mais bioativos disponíveis.

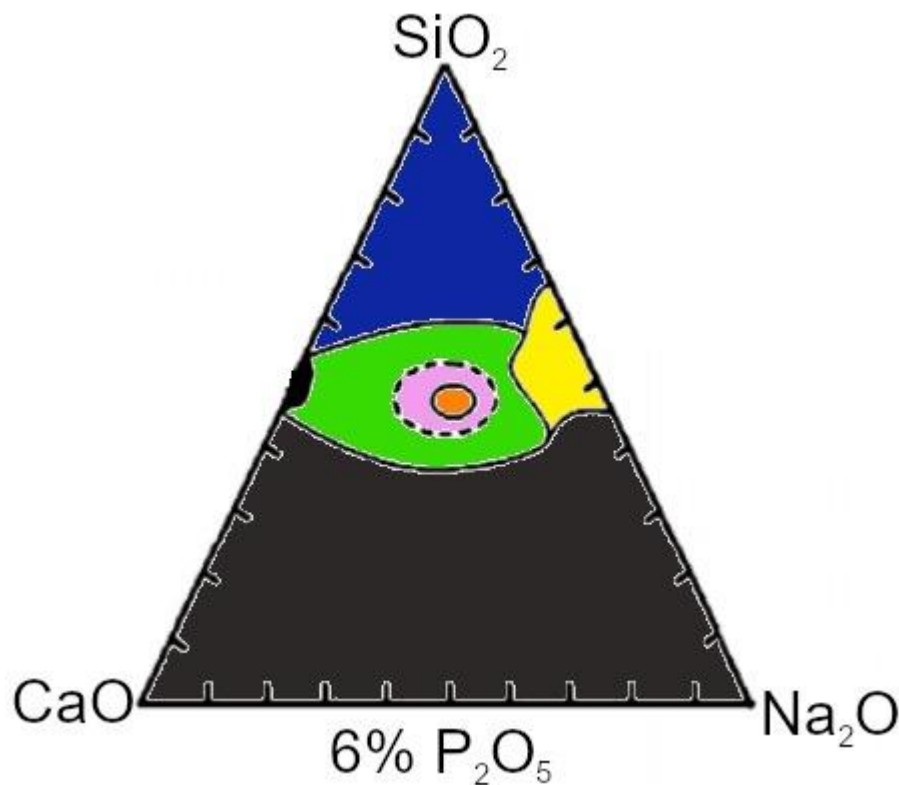


Figura 2.4: Diagrama da composição para ligação biovidro-osso. Adaptado de [30].

Apesar do biovidro 45S5 ser amplamente utilizado, muitos esforços estão sendo feitos para melhorar a atividade biológica de vidros bioativos. Nesse sentido, diversas estratégias têm apresentado resultados interessantes, das quais podemos citar a fabricação de compósitos [33], incorporação de íons metálicos [34]. Dentre essas estratégias, a substituição do SiO_2 por B_2O_3 tem surgido como uma opção e viável para diversas aplicações nas quais os vidros silicatos não apresentam bons resultados [35].

A seguir, faremos uma revisão da literatura científica a respeito dos vidros bioativos borato com foco na atividade bioativa para aplicações biomédicas.

2.1.6 Vidros Bioativos com base de borato

Assim como outros vidros bioativos sem silicato, os vidros com base de borato apresentam a tendência de baixa durabilidade química, o que aumenta a taxa de degradação, limitando diversas aplicações industriais [36,37]. Entretanto,

considerando potenciais aplicações dos vidros boratos na engenharia de tecidos, esses vidros têm demonstrado boa compatibilidade celular em testes *in vitro* e *in vivo*, apresentando osteogênese e exibindo uma rápida conversão em HCA [38].

Day *et al.* foi o primeiro autor a publicar uma revisão sistemática abordando a customização de vidros borato para aplicações biomédicas [25]. A partir de então, os vidros borato têm atraído a atenção da comunidade científica para o uso de vidros bioativos como potenciais aplicações. A maior parte das composições são baseadas em vidros silicatos como o biovidro 45S5 nos quais o silício é substituído total ou parcialmente por borato. Um dos primeiros vidros borato bioativos fabricados pela técnica de fusão seguida de resfriamento (*melt-quenching*) foi baseado na composição original do 45S5, nos quais o borato substitui totalmente, 1/3 ou 1/2 a massa molar de silício. Neste trabalho, os vidros foram moídos e separados em três grupos, de acordo com os tamanhos de partículas e, então, imersos em uma solução de K_2HPO_4 (uma solução alternativa ao SBF¹) a 37 °C. Foi constatado que quanto maior a concentração de borato na composição do vidro bioativo, maior é a taxa de conversão em HAp enquanto ao mesmo tempo ocorre uma redução do pH da solução de fosfato. Os vidros bioativos nos quais o silício foi totalmente substituído por boro com tamanho de partícula na faixa de 150-300 µm foram convertidos completamente em HAp após 4 dias, enquanto os vidros parcialmente substituídos não apresentaram uma conversão completa mesmo após 70 dias em imersão [37]. Os vidros 45S5 substituídos por borato também foram investigados por Ning e colaboradores [39]. As microesferas produzidas neste trabalho foram imersas também em solução de K_2HPO_4 e a viabilidade celular também foi testada usando o método MTT². Uma rápida conversão em HAp (~10 dias) juntamente com resultados positivos dos testes de MTT confirmaram o potencial dos vidros 45S5 substituídos por borato para aplicações em engenharia de tecidos ósseos [39]. Fu *et al.* fabricaram *scaffolds* utilizando os vidros 45S5 substituídos por borato para simular uma estrutura parecida com a estrutura de ossos trabeculares [40]. Os *scaffolds* formaram uma camada de HAp após 7 dias em solução de K_2HPO_4 . Os testes de viabilidade celular também sugeriram que esse tipo

¹ SBF: *Simulated Body Fluid*. Se baseia em uma solução com concentração iônica próxima a do plasma sanguíneo humano, mantida em condições de pH e temperatura idênticos.

² MTT: *MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio)*. Teste usado para medir a proliferação celular e a citotoxicidade. Se baseia na redução do MTT, um sal amarelo solúvel em água, pelo efeito da atividade metabólica celular.

de vidro bioativo se apresenta como uma composição promissora para aplicações em engenharia de tecidos ósseos.

Os compostos vítreos ternários, do sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{B}_2\text{O}_3$, também foram estudados visando esse mesmo tipo de aplicação. Partículas na faixa de 212-355 μm foram compactadas em discos e imersas em solução de K_2HPO_4 de 1 e 7 dias nos quais uma conversão parcial (para 1 dia) quase total (para 7 dias) em fosfato de cálcio foi observada. Ainda nesse sistema, Liang et al. estudaram outra composição ternária de vidros borato (não especificada), na qual as partículas e microesferas de diferentes tamanhos foram compactadas e sinterizadas em diferentes temperaturas para formar estruturas tridimensionais com porosidade de aproximadamente 25-40% [41]. Uma total conversão do vidro em HAp foi constatada após 6 dias de imersão em K_2HPO_4 . A conversão de vidros borato em HAp também foi investigada por Han e Day, em que, partículas de morfologia variada e também microesferas baseadas no sistema (1 ou 2) CaO -(2) Na_2O -(6) B_2O_3 foram investigadas. Nesses testes foi constatado que para ambas as composições, a taxa de conversão em HAp pode ser controlada por uma variedade de fatores que incluem a temperatura, concentração de Ca no vidro e concentração de P na solução [42]. Além disso, Furlan et al. [43], verificaram o crescimento de grandes quantidades de hidroxiapatita após imersão em SBF.

Os vidros borato também indicaram resultados positivos com testes *in vivo*. Usando o vidro da composição 12-93B3, Bi et al. fabricaram *scaffolds* trabeculares, orientados e fibrosos [44]. Esses *scaffolds* foram implantados em calvárias de ratos e os resultados foram examinados após 12 semanas. De acordo com análises histomorfométricas e de microscopia eletrônica de varredura esses implantes foram capazes de aumentar em 33, 23 e 15 % a formação de novos ossos, respectivamente. Também foi observado que todos os *scaffolds* implantados apresentaram total conversão em HCA.

Nesse sentido, considerando aplicações comerciais, os vidros bioativos com base de borato se apresentam como excelentes candidatos a possíveis aplicações no que se refere a reconstituição de ossos e tecidos moles, além da possibilidade de aplicações na cicatrização de feridas.

2.2 Processamento térmico de vidros bioativos

2.2.1 Processos de cristalização

Como já citado, qualquer vidro livre de defeitos é amorfo, ou seja, não apresentam ordenamento de longo alcance como nos sólidos cristalinos [45]. Entretanto, todos os materiais vítreos passam por um processo de cristalização entre as temperaturas de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_m). O processo de cristalização em vidros acontece em duas etapas conhecidas como nucleação e crescimento de cristal, por meio da força oriunda da diferença na energia livre entre o cristal e o vidro ΔG_v , que cresce com o aumento da faixa do diagrama em que ocorre o líquido super-resfriado. Quando há a formação de um sólido em um líquido, uma interface é criada. A energia livre superficial é associada com essa interface. À medida que o sólido cresce, a energia livre total aumenta. Com esse decréscimo de temperatura, há uma competição entre dois efeitos: o aumento da diferença de energia livre entre o sólido e o líquido favorece a cristalização enquanto o aumento da viscosidade reduz a tendência de cristalização [46].

A nucleação é um processo tridimensional que envolve a formação de um arranjo atômico de longo alcance, enquanto o crescimento de cristais é bidimensional, ocorrendo na superfície de cristais já existentes.

Em geral, a nucleação é descrita em termos do balanço da energia livre entre a criação de novos cristais e novas superfícies associadas ao cristal. A formação de um pequeno núcleo menor que um determinado tamanho crítico causa um aumento inicial da energia livre como resultado da necessidade de criação de superfícies e, conseqüentemente, não é termodinamicamente favorável. Conforme os núcleos vão ficando maiores, a energia livre atinge um valor máximo e se torna negativa, deixando o núcleo estável. Tanto a taxa de nucleação (I_0) quanto a taxa de crescimento cristalino (U) dependem da viscosidade (η), bem como de ΔG_v .

A taxa de nucleação pode ser descrita matematicamente pela equação (1), a seguir [47]

$$I_0 = \left\{ \frac{k_1}{\eta} \right\} \exp \left(- \frac{g \alpha^3 \beta}{T_r \Delta T_r^2} \right) \quad (1)$$

na qual, k_1 é uma constante (em geral da ordem de 10^{30} dyne cm), g é um fator relacionado à geometria do núcleo ($g = \frac{16\pi}{3}$ para núcleos esféricos), e T_r é a temperatura reduzida, dada pelas equações (2) e (3)

$$T_r = \frac{T}{T_m} \quad (2)$$

$$\Delta T_r = \frac{T_m - T}{T_m} \quad (3)$$

em que, T_m é a temperatura de cristalização e os parâmetros adimensionais α e β são dados, respectivamente pelas equações (4) e (5)

$$\alpha = (N_A V_C^2)^{\frac{1}{3}} \frac{\sigma}{\Delta H_{fM}} \quad (4)$$

$$\beta = \frac{\Delta H_{fM}}{RT_m} \quad (5)$$

nas quais N_A é o número de Avogadro, V_C é o volume molar do cristal, σ é a área interface líquido-cristal e ΔH_{fM} é a entalpia molar da fusão.

Em geral, muitos cristais pequenos são formados inicialmente em um sistema, mas desaparecem lentamente. Em alguns casos, cristais grandes são formados por meio do chamado amadurecimento de Ostwald [48,49], que é um processo no qual há o crescimento de cristais maiores por meio da difusão dos cristais pequenos. Esse processo ocorre de maneira espontânea devido aos cristais grandes serem

energeticamente mais favoráveis de serem formados que os pequenos. Enquanto a formação de muitos cristais pequenos é cineticamente favorável (tendem a se formar mais facilmente), cristais grandes são termodinamicamente favoráveis. Assim, do ponto de vista da cinética, é mais fácil ocorrer a nucleação de pequenos cristais.

Entretanto, cristais pequenos possuem grande área superficial em relação ao volume quando comparados com cristais grandes. Desta forma, as moléculas na superfície são energeticamente menos estáveis que aquelas que já estão ordenadas e empacotadas no interior do núcleo. Cristais grandes, com sua alta razão de volume/área superficial, representam um estado de baixa energia. Assim, muitos cristais alcançarão um baixo estado energético se forem transformados em cristais grandes e é isso que ocorre no processo de amadurecimento de Ostwald. A nucleação de um grande número de pequenos cristais, entretanto, também reduz a quantidade de supersaturação e assim, os cristais grandes termodinamicamente favoráveis, por vezes nunca aparecem.

A taxa de crescimento dos cristais é expressa pela relação (6) [46]

$$U = f \left(\frac{RT}{3N_a a \pi \lambda^2 \eta} \right) \left(1 - \exp \left(- \frac{\Delta H_f M \Delta T}{RT T_m} \right) \right) \quad (6)$$

em que f é a fração da área na qual a transição vidro-cristal pode ocorrer na superfície do cristal e $\Delta T = T_m - T$. Quanto maior for a viscosidade η na temperatura de fusão, menor será a cristalinidade. Qualitativamente, essa tendência pode ser explicada pelo aumento da inibição da mobilidade ou arranjo molecular das unidades do material fundido com o aumento da viscosidade.

O processo de cristalização pode ser completamente controlado se as curvas da nucleação e da taxa de crescimento cristalino forem separadas. Por outro lado, em alguns casos, há uma faixa de temperatura em que ocorre uma sobreposição desses dois mecanismos como mostrado na Figura 2.5. Essa faixa de temperatura pode ser útil para determinação das temperaturas usadas no tratamento térmico de determinadas composições.

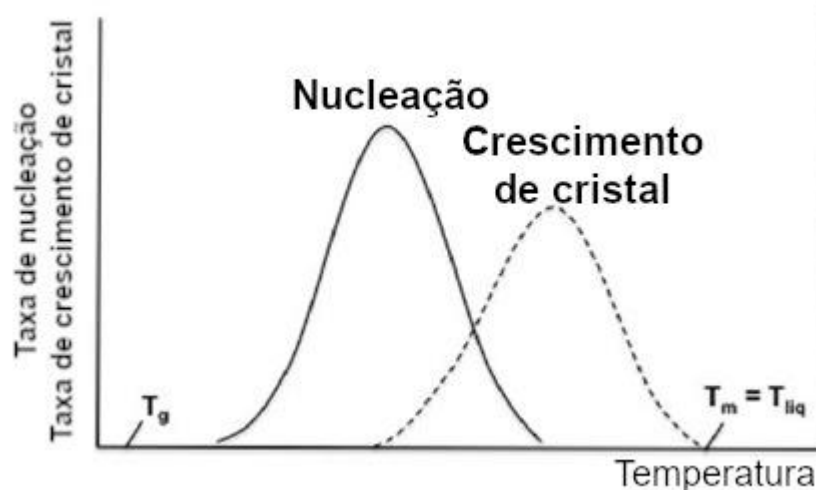


Figura 2.5: Comportamento das taxas de nucleação e de crescimento do cristal em função da temperatura. Adaptado de [46].

Na ausência de agentes catalizadores, a maioria dos líquidos super-resfriados cristalizam heterogeneamente a partir da superfície quando aquecidos. Apenas em poucos casos o sistema pode cristalizar volumetricamente. Considerando o caso mais comum (cristalização a partir da superfície), se ocorre a nucleação da superfície, os cristalitos tendem a crescer rapidamente. Para nucleações homogêneas, é observado que a temperatura de transição vítrea reduzida, $T_{gr} = \frac{T_g}{T_m}$, deve possuir valor baixo ($T_{gr} < 0,58$) e nesse caso o valor máximo da taxa de nucleação será máximo acima da T_g . Sabe-se também, que sistemas vítreos formados estequiometricamente podem ser separados em duas classes. A primeira possui a tendência de apresentar cristalização volumétrica (nucleação homogênea) e a temperatura de máxima taxa de nucleação é próxima de T_g . O comportamento oposto é verificado para composições em que ocorrem cristalização heterogênea na superfície, e a temperatura máxima da taxa de nucleação é significativamente menor que T_g ($T_{max} \ll T_g$). Para essa segunda classe de vidros, o tempo necessário na janela de temperatura na qual ocorre a nucleação pode ser muito longo. Consequentemente, nucleações homogêneas (volumétricas), se ocorrerem, podem ser praticamente indetectáveis. Quando a janela de transição vítrea ocorre em temperaturas relativamente altas ($T_{gr} > 0,60$), a energia fornecida ainda é muito grande para permitir a cristalização interna. Por outro lado,

nas interfaces ou regiões próximas, a barreira energética para nucleação e a viscosidade tendem a ser mais baixas que no interior do material.

Assim, é mais fácil que ocorra a cristalização superficial do que a cristalização interna. Desta forma, o cálculo da T_{gr} pode ser um bom fator para a determinação da tendência de cristalização de uma determinada composição de um vidro durante o processo de tratamento térmico. Para $T_{gr} > 0,60$ o material apresentará forte tendência de cristalização superficial enquanto para valores de $T_{gr} < 0,58$ o vidro apresentará maior tendência de cristalização volumétrica [50].

Experimentalmente, é muito difícil de se estimar as taxas de nucleação e de crescimento cristalino devido à impossibilidade de se medir diversos parâmetros necessários. Conhecer a temperatura de transição vítrea é de extrema importância para a determinação das temperaturas de tratamento térmico para preparação de vitro-cerâmicas. Usando as técnicas de DTA e DSC é possível determinar os valores da transição vítrea T_g , temperatura de cristalização T_x , e de fusão T_m .

2.2.1.1 Efeitos da cristalização em vidros bioativos

Como apresentado na seção de motivação, a cristalização de vidros bioativos possui influência direta sobre a bioatividade do material. Diversos trabalhos discutindo o impacto da cristalização sobre a bioatividade em vidros bioativos podem ser encontrados na literatura científica. O fenômeno da cristalização de vidros bioativos sob processamento térmico é bastante conhecido desde a primeira composição do biovidro 45S5 [51]. De acordo com Peilt *et al.* [52], a presença de fases cristalinas formadas durante o tratamento térmico pode aumentar o tempo de formação da camada de HAp durante testes *in vitro* [8]. Entretanto, atualmente sabe-se que dependendo das fases formadas, a bioatividade pode ser melhorada. Como exemplo, vidros bioativos que possuem fases de Hidroxiapatita e Fluorapatita [10,11,53] apresentam um aumento significativo na velocidade de formação da camada de apatita. Além disso, o entendimento dos mecanismos e fases envolvidas na cristalização, é fundamental para a fabricação de vitrocerâmicas, que podem ser sintetizadas por meio de um tratamento térmico controlado resultando na formação de fases específicas que melhorem as propriedades bioativas [10,53], como no caso de algumas vitrocerâmicas comerciais.

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Nesta seção serão descritos os processos de fabricação e preparação das amostras para o tratamento térmico e configurações utilizadas nas técnicas de caracterização e avaliação *in vitro*: antibacteriana e citotoxicidade, do vidro bioativo (VB) em função da temperatura.

3.1 Fabricação do Vidro Bioativo

A fabricação do vidro bioativo foi realizada no Laboratório de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (LEOF) da Universidade Federal do Maranhão – Campus Avançado, Imperatriz, na Unidade de Preparação e Caracterização de Materiais (UPCM), pela então mestrand Luana Feitosa Alves sob supervisão dos Professores Dr. Alysson Steimacher e Dra. Franciana Pedrochi.

O vidro bioativo foi sintetizado a partir dos reagentes iniciais, Pentóxido de Fósforo (P_2O_5); Carbonato de Cálcio ($CaCO_3$); Trióxido de Boro (B_2O_3); Carbonato de Sódio (Na_2CO_3) e Fluoreto de Cálcio (CaF_2), todos da marca Sigma-Aldrich (pureza >99-98%). O método escolhido para sintetização do material vítreo $60 B_2O_3 - 8 CaO - 4 P_2O_5 - 18 Na_2O - 10 CaF_2$ foi o método de fusão/resfriamento (*melt-quenching*). Os valores de porcentagem em massa (% wt) foram convertidos para porcentagem em mol (% mol), que foram obtidos por Alves e colaboradores na fabricação do VB [54] e estão apresentados na Tabela 3.1:

Tabela 3.1: Composição dos reagentes em porcentagem em massa (% wt) e porcentagem em (% mol).

Amostra	B ₂ O ₃ (%)		CaO (%)		P ₂ O ₅ (%)		Na ₂ O (%)		CaF ₂ (%)	
	wt	mol	wt	mol	wt	mol	wt	mol	wt	mol
VB	60	59,44	8	9,79	4	1,93	18	20	10	8,83

3.2 Preparação das Amostras

Após a fabricação, o VB obtido foi submetido às seguintes etapas de preparação: pulverização do VB, controle de tamanho de partícula e compactação, e tratamento

térmico. Para a pulverização, o VB foi macerado manualmente em um triturador do tipo pilão, e em seguida, pulverizado manualmente em pedra de ágata. Na segunda etapa, para controle do tamanho de partícula, o pó obtido foi peneirado, de forma a garantir que as partículas ficassem com tamanho menor que 45 µm e compactado, sendo 0,10 g de material prensado por 10 minutos à 3,5 MPa.

Na terceira etapa, as pastilhas obtidas foram alocadas em cadinho de platina e levadas a um forno tubular para tratamento térmico, em atmosfera de ar, nas temperaturas de 518, 576, 634, 703, 773, 810 e 900 °C, consistindo em duas etapas de aquecimento, uma de patamar, e outra de resfriamento, como segue na Tabela 3.2. Os intervalos de temperatura foram escolhidos de acordo com as análises térmicas realizadas no VB.

Tabela 3.2: Parâmetros utilizados no tratamento térmico.

Amostra	Temp.1 (°C)	Taxa Aq.1 (°C/min)	Temp.2 (°C)	Taxa Aq.2 (°C/min)	Tempo Patamar	Temp.3 (°C)	Taxa Resf. (°C/min)
VB-518	493	3	518	1	10	25	3
VB-576	551	3	576	1	10	25	3
VB-634	609	3	634	1	10	25	3
VB-703	678	3	703	1	10	25	3
VB-773	748	3	773	1	10	25	3
VB-810	785	3	810	1	10	25	3
VB-900	875	3	900	1	10	25	3

Com a finalidade de simplificar a discussão dos resultados as amostras serão referidas conforme a Tabela 3.3, de acordo com as temperaturas utilizadas no tratamento térmico.

Tabela 3.3: Nomenclatura das amostras de acordo com a temperatura de tratamento térmico.

Nomenclatura	Temperatura de Tratamento (°C)
VB-C	Sem tratamento
VB-518	518
VB-576	576
VB-634	634
VB-703	703
VB-773	773
VB-810	810
VB-900	900

3.3 Análises térmicas: Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TG)

As análises térmicas foram realizadas pela Professora Taiana Bonadio na Universidade Estadual do Centro Oeste - Unicentro, em um calorímetro T.A. *instruments* (SDT Q600 V20.9), com taxa de aquecimento de 10 °C /min, taxa de resfriamento de 3 °C /min e fluxo de ar comprimido de 100 ml/min. A amostra foi alocada em cadinho de platina, na forma de pastilha, no intervalo de temperatura de 30 a 900 °C.

3.4 Difratometria de raios X (DRX)

As análises de DRX foram realizadas em um difratômetro Shimadzu (XRD-7000), pertencente ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP-UEM), utilizando radiação CuK α ($\lambda = 1,54439 \text{ \AA}$) na amostra em pastilha sobre porta amostra com zero *background*. A medida para identificação de fase foi realizada em modo *standard* com velocidade de varredura de 5 graus/min no intervalo 2 θ de 10° a 80° à temperatura ambiente. Para identificação das fases, os difratogramas obtidos foram tratados com a remoção da linha de base e foram analisados utilizando a base de dados de acesso livre. As fases identificadas foram comparadas com as fichas padrão da base de dados de difração JCPDS: *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS 078-0294, 078-0295, 076-0558, 076-0747, 077-0209) [2].

3.5 Espectroscopia Raman

As análises de espectroscopia Raman foram realizadas em um microscópio Raman confocal, Bruker, modelo Senterra, pertencente ao COMCAP-UEM, com excitação em 532 nm e potência nominal de 20 mW. Cada espectro foi uma média de 60 varreduras em um mesmo ponto na amostra, sendo realizados quatro pontos em cada amostra, de forma a se ter uma média dos espectros obtidos com resolução espectral de 3-5 cm^{-1} , no intervalo de 100 a 3700 cm^{-1} . O laser de excitação foi focado por uma objetiva de 20X de aumento. A detecção do espalhamento Raman das amostras é feita por meio de uma câmera CCD (*charged-coupled device*) refrigerada a -84 °C, com tempo de integração de 3 s para cada uma das 60 varreduras.

3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para as análises de MEV foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Company (QUANTA 250), pertencente ao COMCAP-UEM, na qual foram feitas aquisições das imagens de superfície e fratura. As análises químicas, que incluem espectroscopia pontual e mapeamento, foram realizadas por energia dispersiva de Raios-X, utilizando um detector de energia dispersiva de Raios-X (Oxford) acoplado ao microscópio eletrônico de varredura.

3.7 Ensaio Biológicos *in vitro*

As análises biológicas foram realizadas em colaboração científica com o grupo de Ciências Farmacêuticas Coordenado pelo Professor Celso Nakamura da UEM.

3.7.1 Antibacterianos

A avaliação da atividade antibacteriana do vidro bioativo controle, ou seja, sem tratamento térmico, foi realizada em culturas de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922). Também foi avaliada a atividade antibacteriana do vidro bioativo 45S5, usado como padrão para comparação. Para definir a concentração inibitória mínima

(MIC), examinou-se visualmente cada tipo de bactéria em diluições, em séries duplas das amostras em caldo Mueller-Hinton (caldo MH) baseado em suspensão bacteriana padronizada de $1,5 \times 10^8$ UFC / mL. As suspensões do inóculo foram diluídas (1:10) em meio de cultura MH para obter uma suspensão bacteriana de $1,5 \times 10^7$ UFC / mL.

Foi realizado um intervalo de diluição em série de 1000 µg / mL a 3,9 µg / mL. Volumes de 5 µL da suspensão bacteriana (10^7 UFC / mL) foram adicionados a cada poço. As microplacas foram incubadas em câmara úmida a 37 °C por 24 horas. A MIC foi definida como a menor concentração das amostras que inibiram completamente o crescimento da cepa. Foi avaliada também a concentração bactericida mínima (MBC) das amostras, na qual, 10 µL da placa de ensaio MIC foram acrescentados em placas de petri contendo caldo MH. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A leitura foi averiguada por meio do crescimento bacteriano. O MBC foi definido como a menor concentração de cada amostra que impediu totalmente o crescimento microbiano nas placas. A estreptomicina foi utilizada como controle positivo e para cada amostra os testes foram realizados três vezes.

3.7.2 Ensaio de Citotoxicidade

A avaliação da atividade citotóxica das amostras tratadas termicamente foi realizada em linhagem celular de osteoblastos (MC3T3-E1). Para isso, as células foram ressuspensas à concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL em meio α -MEM (*Minimum Essential Medium*) acrescido de 10% de SFB (Soro fetal bovino), adicionado 100 µL nos poços da placa de 96 poços, e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. As amostras testadas foram diluídas em concentrações decrescentes (1000, 700, 400 e 100 µg/mL), adicionados sobre a monocamada celular e incubados por 24 h, nas mesmas condições. Após a incubação, foi adicionado 50 µL de solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) à 2 mg/mL. A placa foi incubada por 4 h a 37°C com 5% de CO₂ (protegido da luz) e adicionados 150 µL de DMSO. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (BIO-TEK Power Wave XS) a 570 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados, análises e discussão referentes ao estudo da dinâmica de cristalização do vidro bioativo do sistema $60 \text{ B}_2\text{O}_3 - 8 \text{ CaO} - 4 \text{ P}_2\text{O}_5 - 18 \text{ Na}_2\text{O} - 10 \text{ CaF}_2$, em função do tratamento térmico, pela aplicação das técnicas: Análises térmicas (DSC/TG), espectroscopia Raman, difratometria de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), análises químicas (EDS) e ensaios *in vitro* antibacterianos e de citotoxicidade.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO VIDRO BIOATIVO

4.1.1 Caracterização Térmica – Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)

As técnicas de DSC e TG foram utilizadas para avaliar o comportamento térmico do VB, possibilitando a determinação de suas temperaturas de transição vítrea (T_g), cristalização (T_x) e fusão (T_m), além dos eventos de perda de massa pela amostra durante aquecimento. A partir destes valores foram definidas as temperaturas de tratamento térmico nas quais o VB foi submetido.

Os termogramas do VB estão apresentados na Figura 4.1 para o intervalo de temperatura entre 23 °C (ambiente) a 850 °C. Nesta figura são mostradas as curvas de DSC para os processos de aquecimento (a), resfriamento (b), e a curva de TG (c) obtidas para amostra VB-C.

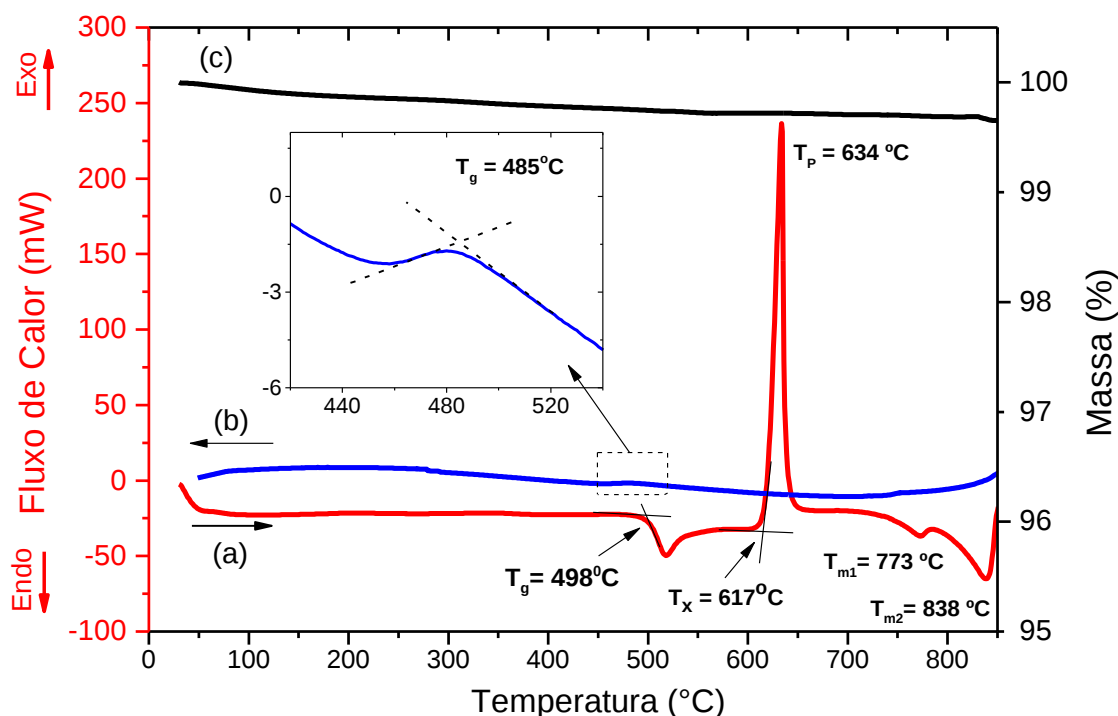


Figura 4.1: Curvas de DSC com taxa de 10 °/min para o processo de aquecimento (a), 3 °C/min para o resfriamento (b) e curva de perda de massa (c), no intervalo de 23 a 850 °C. No detalhe: região da transição vítrea observada durante o resfriamento. As siglas T_g , T_x , T_p , T_{m1} e T_{m2} correspondem às temperaturas de transição vítrea, cristalização endotérmica, cristalização exotérmica, primeira etapa de fusão e segunda etapa de fusão, respectivamente.

A análise TG mostra uma redução de massa de aproximadamente 0,35 %, em todo o intervalo de temperatura estudado, sendo que 0,3 % da perda de massa foi observada entre a temperatura ambiente e 600 °C, o que pode ser atribuído a perda de água superficial adsorvida, perda de OH estrutural, oriundo do processo de produção do vidro em atmosfera ambiente e possíveis resíduos do processo de calcinação.

Para a região de alta temperatura não foi observada variação significativa de massa ($\Delta m \sim 0,05$ %), comprovando que não houve degradação da amostra até 850 °C. Desta forma, podemos concluir que os eventos observados na curva de DSC são decorrentes de transições estruturais ou de fases do sistema vítreo.

Este resultado nos garante que os tratamentos térmicos a serem realizados nas amostras, neste intervalo de temperatura, não resultarão em degradação.

Analisando as curvas referentes a análise de DSC, observou-se, para o processo de aquecimento, uma primeira transição cuja temperatura de início ocorre em aproximadamente 480 °C com uma temperatura máxima, pico endotérmico, em 518 °C. Esta região corresponde ao intervalo de temperatura no qual ocorre a transição vítrea do VB. Esta transição corresponde à mudança do estado vítreo para o estado líquido super-resfriado, em que o sistema apresenta alta viscosidade.

A transição vítrea é um processo que envolve dois estados fora do equilíbrio termodinâmico, que ocorre em um intervalo de temperatura, o qual depende das condições de medida, tais como a taxa de aquecimento (ou resfriamento), quantidade de amostra, etc. e da história térmica da amostra, como por exemplo, a taxa de resfriamento durante o choque térmico e tratamento térmico prévio [55]. Por convenção utiliza-se a temperatura de “*onset*” como a temperatura característica denominada de temperatura de transição vítrea (T_g). Para o aquecimento obteve-se o valor de $T_{onset} = T_g = 498$ °C.

O pico em 518 °C, conhecido como “*overshoot*”, é comumente observado nas curvas de DSC durante o primeiro aquecimento e, está associado a recuperação da entalpia perdida durante o choque térmico ou tratamento térmico [55].

Com o aumento da temperatura, verificou-se um pico exotérmico com início por volta de 600 °C e com máximo em 634 °C ($T_p = 634$ °C, cristalização exotérmica). Este pico corresponde ao processo de cristalização do VB, no qual o líquido super-resfriado passa para o estado sólido cristalino. Este processo de cristalização também ocorre em um intervalo de temperatura e, convencionou-se tomar a temperatura de cristalização (T_x) como a temperatura de “*onset*”, $T_x = 617$ °C.

Pelos valores das temperaturas de transição vítrea e cristalização é possível calcular o parâmetro de estabilidade térmica dado por $(T_x - T_g)$, que para o caso do VB pastilhado tratado termicamente, obteve-se um valor igual a 119°C. De acordo com Gressler e Shelby [56] para vidros borato, uma boa formação vítrea se dá para valores de janelas térmicas iguais ou acima de 70 °C, e quanto maior essa diferença mais fácil sua formação, o que facilita sua sinterização [57]. Isto mostra que o vidro bioativo possui ótima estabilidade térmica.

Há a presença de dois picos endotérmicos, o primeiro com máximo na temperatura em 773 °C ($T_{m1} = 773$ °C) e o segundo em 838 °C ($T_{m2} = 838$ °C), os quais são

associados ao processo de fusão da amostra, mostrando que o mesmo ocorre em duas etapas.

Este comportamento é comumente observado em sistemas vítreos com multicomponentes [58] para os quais, dependendo da concentração dos reagentes podem ser formadas várias fases cristalinas em alta temperatura, cada uma com suas diferentes temperaturas de fusão (ou temperatura de *liquidus*). Ou ainda, devido às dopagens realizadas durante o processo de fabricação dos vidros, como por exemplo para vidros borato dopados com fósforo, estudados por Portes [59], na qual em diferentes concentrações de dopagem foi observado que o processo de fusão ocorreu em duas etapas. Comportamento semelhante foi também observado por Bajaj e colaboradores [60], para vidros borato de bismuto dopados com íons trivalentes (Al^{3+} , Y^{3+} , Nd^{3+} , Sm^{3+} e Eu^{3+}), os quais observaram que para diferentes tipos e concentrações de dopantes o processo de fusão ocorre em duas ou mais temperaturas.

Este resultado é uma clara evidência que neste sistema vítreo o processo de cristalização ocorre com a formação de várias fases cristalinas.

Para o resfriamento, não foram observados picos de solidificação (cristalização), sendo observada uma transição de segunda ordem, com temperatura de “onset” de 485 °C, como mostra detalhe da Figura 4.1.

Se considerarmos o material em alta temperatura, na fase líquida e fizermos o resfriamento lento do material o mesmo se cristaliza passando pela transição líquido-sólido (cristalino), no entanto se resfriarmos o sistema rapidamente este passa a um estado metaestável (líquido super-resfriado) e posteriormente solidifica formando o vidro. A temperatura na qual a solidificação do vidro acontece depende da taxa de resfriamento, e quanto mais rápido o resfriamento maior será esta temperatura [61].

Para a produção do vidro foi realizado um choque térmico, que possui uma taxa de resfriamento bastante alta, muito maior que 3 °C/min, e observamos na curva de aquecimento a temperatura da transição vítrea $T_g = 498$ °C. Ao atingir o estado líquido (em 850 °C) e com o resfriamento a 3 °C/min, o sistema volta a vitrificar com a temperatura de transição mais baixa. Esta transição pode ser interpretada como a transição vítrea obtida pelo parâmetro $T_x - T_g$, discutido anteriormente.

Com base na discussão dos resultados de DSC acima, foram escolhidas as temperaturas para tratamento térmico do VB, de tal forma que estes sejam

representativos dos diferentes estados e fases que o sistema pode apresentar. Assim foram escolhidas as seguintes temperaturas: $T_{\text{amb}} = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ (controle, temperatura ambiente), $T_1 = 518\text{ }^{\circ}\text{C}$ (próximo a T_g), $T_2 = 576\text{ }^{\circ}\text{C}$ (entre T_g e T_x), $T_3 = 634\text{ }^{\circ}\text{C}$ (T_p), $T_4 = 703\text{ }^{\circ}\text{C}$ (entre a cristalização e a primeira fusão), $T_5 = 773\text{ }^{\circ}\text{C}$ (primeira fusão), $T_6 = 810\text{ }^{\circ}\text{C}$ (segunda fusão) e $T_7 = 900\text{ }^{\circ}\text{C}$ (estado líquido).

4.1.2 Caracterização Estrutural - Difratometria de raios X (DRX)

Para a caracterização estrutural do VB, todas as amostras foram avaliadas por Difração de raios X. Estes resultados estão apresentados na Figura 4.2.

Os difratogramas de raios X para as amostras VB-C, VB-518 e VB-576 apresentam características de materiais amorfos, ou seja, materiais que não apresentam ordem estrutural atômica de longo alcance [54]. Assim, são observados halos alargados e de baixa intensidade, comumente encontrados em vidros boratos e silicatos [62], sem a presença de picos de difração [39,63].

Com o aumento da temperatura do tratamento térmico, quando o VB passa pela temperatura de cristalização ($T_3 = 634\text{ °C}$), fica evidente que ocorre a formação de um material policristalino, pois o difratograma passa apresentar diversos picos bem definidos. Difratogramas semelhantes também podem ser observados para as amostras VB-703, VB-773 e VB-810.

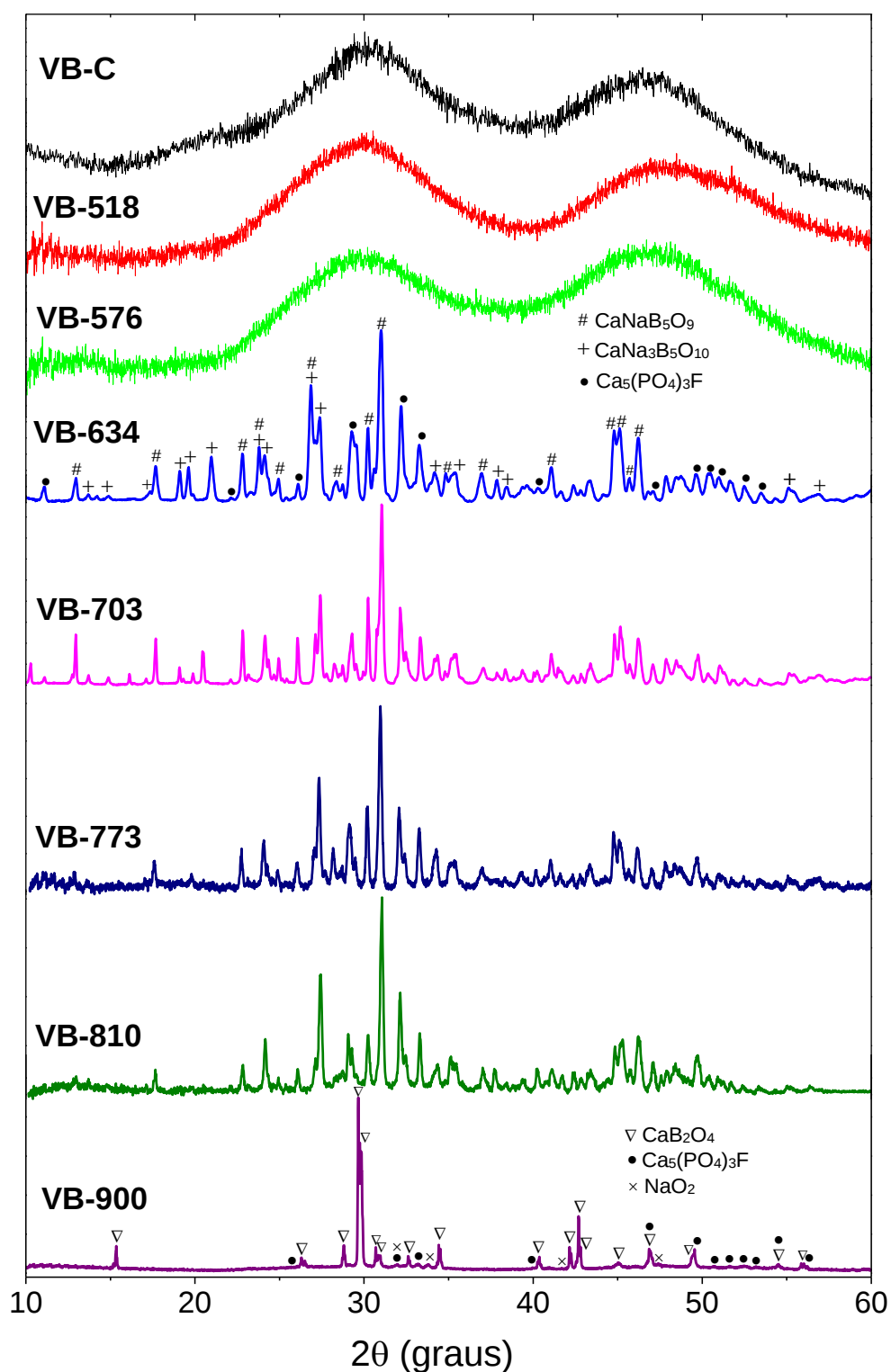


Figura 4.2: Difratogramas de raios X do VB-C obtido da referência [54] e das amostras VB-518, VB-576, VB-634, VB-703, VB-773, VB-810 e VB-900.

Para estas temperaturas, entre 634 °C e 810 °C, denominou-se como uma região intermediária, na qual foi identificada a presença de três fases cristalinas

principais: o Pentaborato de Sódio e Cálcio (CaNaB_5O_9) (JCDPS # 078-0294) de estrutura monoclinica (grupo espacial: $P21/c$), o Pentaborato Trissódico de Cálcio ($\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$) (JCDPS # 078-0295) de estrutura triclinica (grupo espacial: $P-1$) e a Fluorapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) (JCPDS # 076-0558) que possui estrutura hexagonal (grupo espacial: $P63/m$).

Na Figura 4.3 é mostrado um exemplo da indexação do difratograma com estas três fases obtidas para a amostra tratada a 703 °C. As demais temperaturas de tratamento da região intermediária não estão mostradas, já que, seus difratogramas apresentam as mesmas fases. No detalhe da Figura 4.3 é mostrado um diagrama com o percentual de cada fase calculada, usando analisados utilizando a base de dados de acesso livre, pelo método semiquantitativo RIR (*Reference Intensity Ratio*) [64,65].

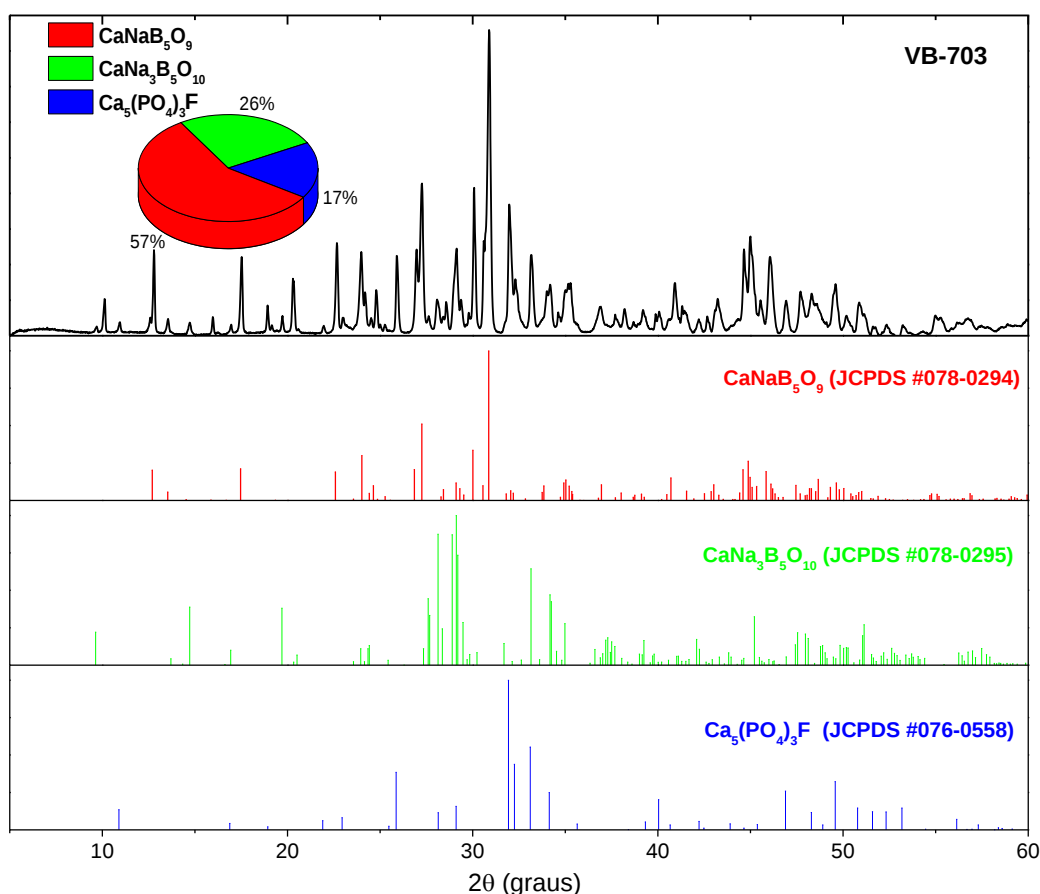


Figura 4.3: Difratograma de Raios-X para a amostra VB-703, com a indexação das fases CaNaB_5O_9 (JCDPS # 078-0294), $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ (JCDPS # 078-0295) e $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ (JCPDS # 76-0558). Detalhe: análise semiquantitativa pelo método RIR. Resultados obtidos utilizando a base de dados de acesso livre.

Apesar de o método RIR ser semiquantitativo, pois utiliza a intensidade relativa dos picos de difração das fases identificadas, ele nos fornece uma estimativa das quantidades relativas das fases. Pode-se observar que para esta temperatura, majoritariamente são formadas as fases de Pentaborato de Sódio e Cálcio (CaNaB_5O_9) (57%) e Pentaborato Trissódico de Cálcio ($\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$) (26%), e uma menor quantidade (17%) de Fluorapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$).

A análise dos difratogramas é prejudicada pela superposição dos picos de difração das diferentes fases, no entanto, a presença da Fluorapatita pode ser comprovada pelos picos de difração (002), (211) e (112) que ocorrem na região de 2θ entre 25° e 33° , como mostra a Figura 4.4.

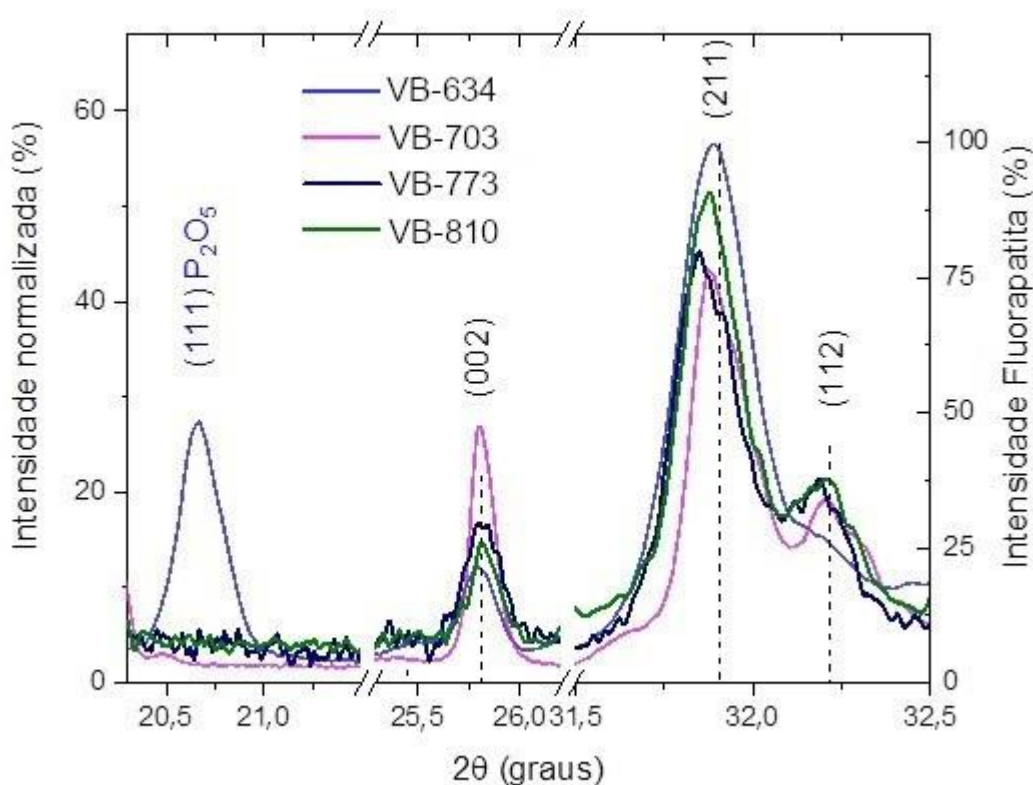


Figura 4.4: Difratograma de raios X para as amostras VB-634 e VB-810, no intervalo de 2θ entre 20° e $32,5^\circ$, no qual foi evidenciado a presença dos picos (002), (211) e (112) para a Fluorapatita e o pico de maior intensidade (111) para o P_2O_5 observado para a amostra VB-634.

A Figura 4.4 mostra também que, para a amostra VB-634, observa-se um pico em $2\theta = 20,7^\circ$ o qual pode ser atribuído ao pico de maior intensidade (111) do P_2O_5 . A análise pelo método RIR mostra a presença de uma pequena quantidade desta fase

(~2%), quando a amostra é tratada próximo a temperatura de cristalização. Sendo que para temperaturas de tratamento mais altas esta fase não foi encontrada.

Para a amostra VB-900, tratamento térmico acima da temperatura de fusão, uma completa mudança no padrão de difração dos raios X pode ser observada na Figura 4.2, indicando o surgimento de uma nova fase cristalina.

Seguindo o mesmo procedimento adotado para as demais amostras, foi identificado que a fase predominante na amostra VB-900 é o Borato de Cálcio (CaB_2O_4) (JCPDS # 076-0747) de estrutura ortorrômbica (grupo espacial: $Pnca$), como mostrado na Figura 4.5.

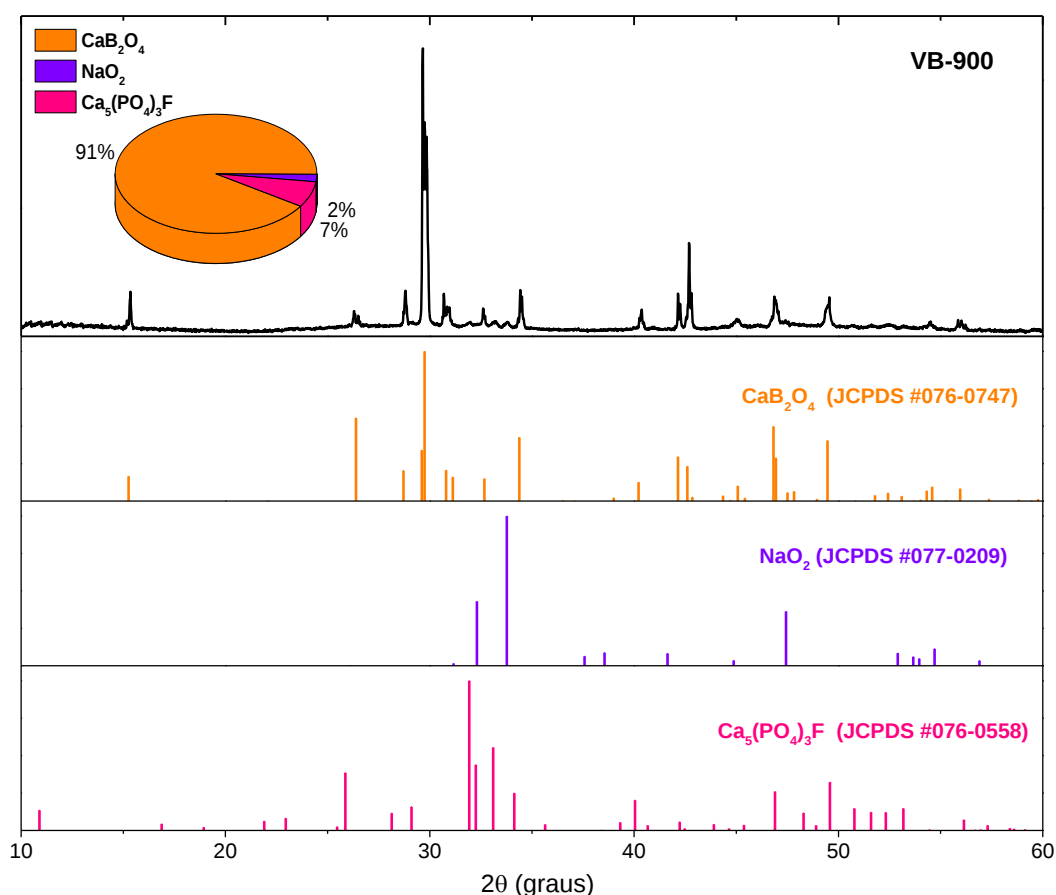


Figura 4.5: Difratoograma de raios X para a amostra VB-900, com a indexação das fases CaB_2O_4 (JCPDS # 076-0747), NaO_2 (JCPDS #077-0209) e $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ (JCPDS # 76-0558). Detalhe: análise semiquantitativa pelo método RIR. Resultados obtidos utilizando a base de dados de acesso livre.

A análise semiquantitativa por RIR mostra aproximadamente 91% da fase de Borato de Cálcio, e pequenas quantidades de Fluorapatita (~7%) e Óxido de sódio (~2%). Como mencionado anteriormente, esta análise é prejudicada pela

superposição de picos e por efeitos de direção preferencial na amostra (conforme poderá ser observado nas análises de microscopia), mas nos permite inferir sobre a fase predominante e a existência das demais.

A presença das três fases é comprovada pelos picos de difração na região de 2θ entre $32,5^\circ$ e 34° , na qual pode-se observar picos de cada uma das fases sem superposição, como ilustrada na Figura 4.6.

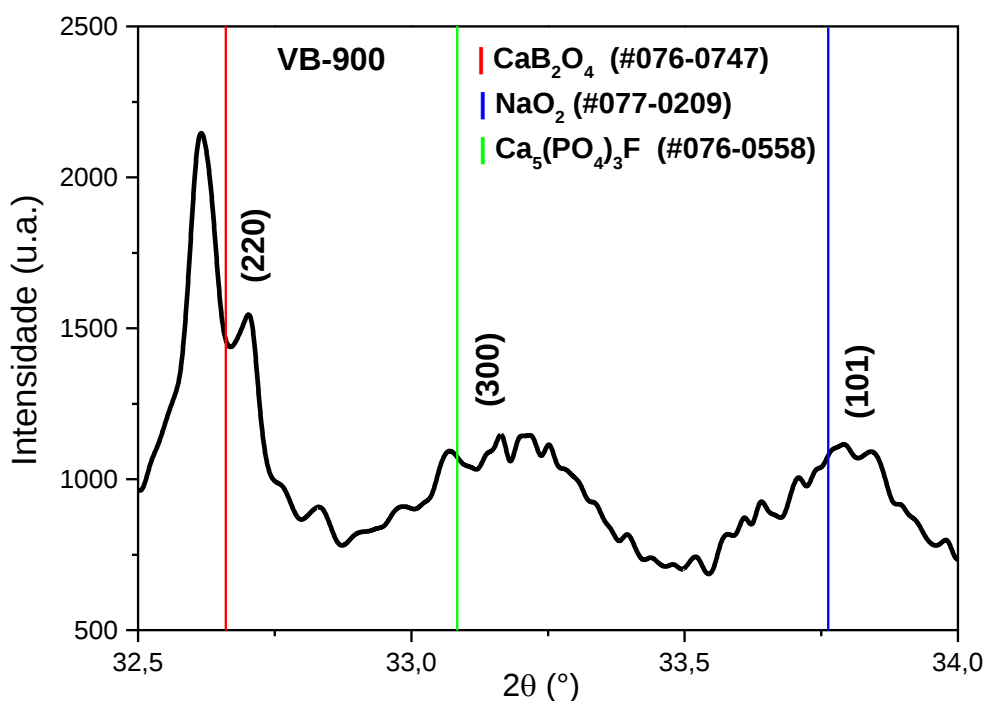


Figura 4.6: Difratoograma de raios X para a amostra VB-900, no intervalo de 2θ entre $32,5^\circ$ e 34° , no qual foi evidenciado a presença dos picos (220), (300) e (101) para as fases Borato de Cálcio, Fluorapatita e Óxido de Sódio, respectivamente.

Dessa forma, de acordo com os difratogramas de raios X, o processo de tratamento térmico resulta na transformação do vidro bioativo, em um material intermediário policristalino composto de três fases: Pentaborato de Sódio e Cálcio (CaNaB_5O_9), Pentaborato Trissódico de Cálcio ($\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$) e a Fluorapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$), sendo que após sua completa fusão ocorre a formação da fase de Borato de Cálcio (CaB_2O_4).

4.1.3 Caracterização Vibracional - Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman fornece informações referentes aos modos vibracionais das ligações químicas e grupos funcionais pertencentes ao material que está sendo estudado, o que permite a caracterização do mesmo [66].

A Figura 4.7 apresenta os espectros Raman das amostras VB-C, VB-518 e VB-576 na região espectral entre 200 a 1800 cm^{-1} .

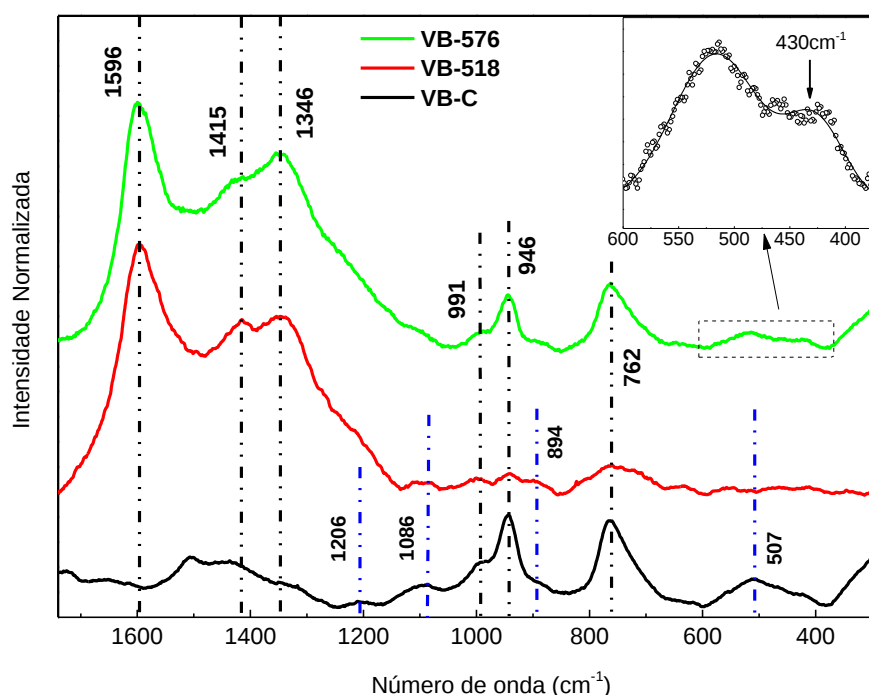


Figura 4.7: Espectros Raman das amostras VB-C, VB-518 e VB-576. As linhas pontilhadas indicam o centro das bandas. No detalhe, destaque para banda em 430 cm^{-1} .

Estudos a respeito de vidros bioativos formados por bases de borato, indicam que a rede formadora é composta por unidades estruturais BO_3 e BO_4 , que podem coexistir e formar as chamadas superestruturas do boro, como a formação de anéis de boroxol e grupos di, tri, tetra, penta, orto e metaborato e as concentrações dessas estruturas podem ser alteradas conforme se muda os modificadores da rede [67].

As bandas observadas para a amostra VB-C são características de vidros boratos, e corroboram com os difratogramas apresentados na seção anterior, em que ainda se tem a presença de uma estrutura vítrea no início do tratamento térmico. Elas

são compostas por grupos isolados de diboratos, presentes nas regiões de 500 cm^{-1} e 1000 a 1110 cm^{-1} [68–71]. E por grupos ortoboratos e piroboratos das unidades BO_3 para as bandas centradas em 894 e 1206 cm^{-1} , respectivamente [68,69,72,73].

Outra característica presente em vidros borato é a presença de uma banda intensa encontrada em 806 cm^{-1} atribuída aos modos de respiração simétrica de anéis boroxol [74]. Alguns trabalhos como o de Kamitsos e Chrysikos [75] e Konijnendijk e Stevels [68] mostram que com a adição de óxidos alcalinos à rede, esta banda reduz sua intensidade e ocorre o surgimento de uma nova banda presente em $\sim 770\text{ cm}^{-1}$ que desloca para números de onda menores à medida que os teores desses óxidos são adicionados à rede. Os autores também desenvolveram um modelo semiquantitativo que sugere que se a composição vítrea possui até 20 % molar de óxido alcalino, os anéis boroxol são convertidos principalmente por grupos tetraboratos ao passo que, para valores maiores de 20 % molar de óxidos alcalinos adicionados ao sistema vítreo, os grupos tetraboratos são convertidos em grupos diboratos.

Para as amostras VB-C, VB-518 e VB-576 destaca-se a banda centrada em 762 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao modo de respiração simétrica das estruturas dos anéis triborato, tetraborato ou pentaborato com um tetraedro da unidade BO_4^- [74]. Como citado anteriormente, geralmente em vidros bioativos à base de boro, existe a presença de uma banda centrada na região de 806 cm^{-1} que é atribuída aos modos de respiração simétrica dos anéis boroxol. Mas, à medida que óxidos alcalinos e alcalinos terrosos são acrescentados à matriz vítrea estas estruturas dos anéis boroxol podem ser modificadas em grupos diborato, triborato, tetraboratos ou pentaboratos e uma nova banda centrada em aproximadamente 770 cm^{-1} aparece. Esta se desloca para números de onda menores, com o aumento da quantidade de modificador, resultando assim na banda observada em 762 cm^{-1} neste sistema [67–69,74].

A banda centrada em 946 cm^{-1} , também observada no biovidro 45S5 [76], é atribuída ao estiramento simétrico (ν_s) da ligação P-O⁻ do tetraedro de ortofosfato (PO_4^{3-}) isolado [77]. Paralelamente à observação desta banda espera-se observar a banda em $\sim 430\text{ cm}^{-1}$, assinatura do modo de vibração de deformação $\delta(\text{PO}_4^-)$ das ligações O-P-O das unidades Q_0 , mais evidente nas temperaturas de 23 e 576°C . O detalhe na Figura 4.7 destaca a banda de 430 cm^{-1} .

O ombro observado em 991 cm^{-1} é característico de grupos ortoboratos, enquanto a banda centrada em 1346 cm^{-1} é atribuída às unidades trigonais BO_2O^- ligadas a unidades de BO_4^- [69]. As mesmas unidades trigonais foram atribuídas a esta região espectral para outras composições de vidros borato [70,71]. E as bandas presentes em 1415 e 1596 cm^{-1} são atribuídas aos modos de estiramento da ligação de B-O⁻ dos anéis e cadeias de metaboratos [69].

Um outro estudo, realizado por Walrafen e colaboradores [78], mostra que com o aumento da temperatura, triângulos das unidades BO_3 em anéis de boroxol se transformam em triângulos BO_3 em uma rede aleatória. Segundo os pesquisadores, vidros a base de borato são compostos predominantemente de anéis de boroxol, mas a concentração destes pode diminuir com o aumento da temperatura, o que pode acarretar mudanças espectrais.

Com o aumento da temperatura de tratamento térmico observou-se alterações significativas nos espectros de espalhamento Raman e para uma melhor visualização dos resultados, e acompanhamento mais preciso das mudanças ocorridas nas amostras em função do tratamento térmico, os espectros Raman foram indexados e justapostos e estão apresentados na Figura 4.8. De forma geral, observa-se que com o tratamento térmico o VB ocorre o aparecimento de picos e bandas com características de vitrocerâmicas, em que se observam fases cristalinas presentes nas amostras.

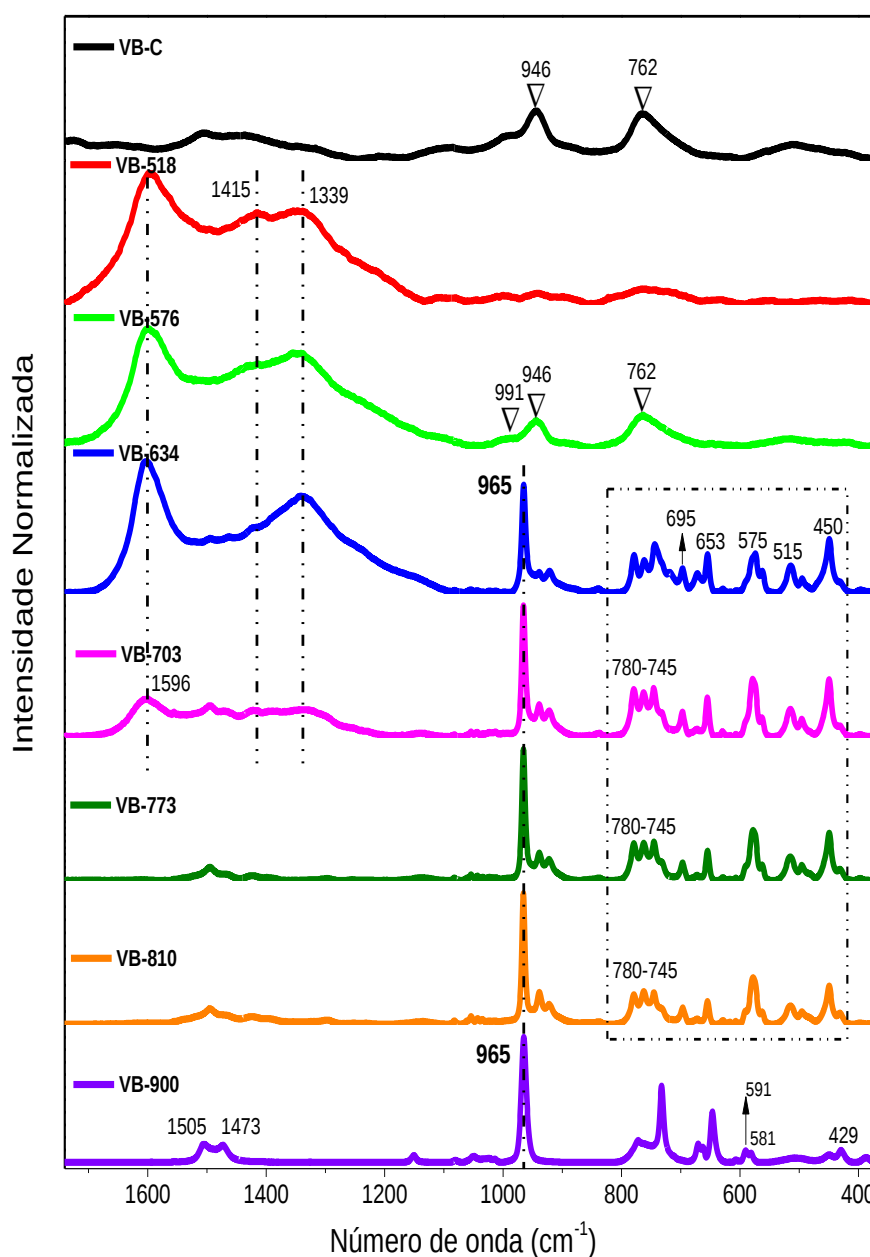


Figura 4.8: Espectros Raman geral das amostras em função do tratamento térmico para a região espectral de 1800 a 200 cm^{-1} . Destaque para a região pontilhada de 400 a 800 cm^{-1} das unidades BO_3 e BO_4 [79–81].

A comparação dos espectros das amostras VB-C e VB-634 (Figura 4.9) mostra a formação dos picos estreitos referentes às fases cristalinas, em acordo com os resultados da análise térmica e da difratometria de raios X, discutidos anteriormente. O primeiro ponto a ser destacado é o estreitamento e deslocamento da banda de estiramento do ortofosfato (PO_4^{3-}) de 946 cm^{-1} para 965 cm^{-1} , a qual corresponde ao modo ν_1 da Fluorapatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, cujo espectro é mostrado na Figura 4.9 [82]. As

bandas atribuídas aos demais modos vibracionais da Fluorapatita (v_2 , v_3 e v_4) apresentam intensidades muito baixas e aparecem sobrepostas a outros picos do espectro.

Estes picos associados a Fluorapatita são observados em todos os espectros das amostras tratadas em temperaturas superiores a 634 °C, confirmando a presença desta fase cristalina, em acordo com os resultados de DRX discutidos anteriormente.

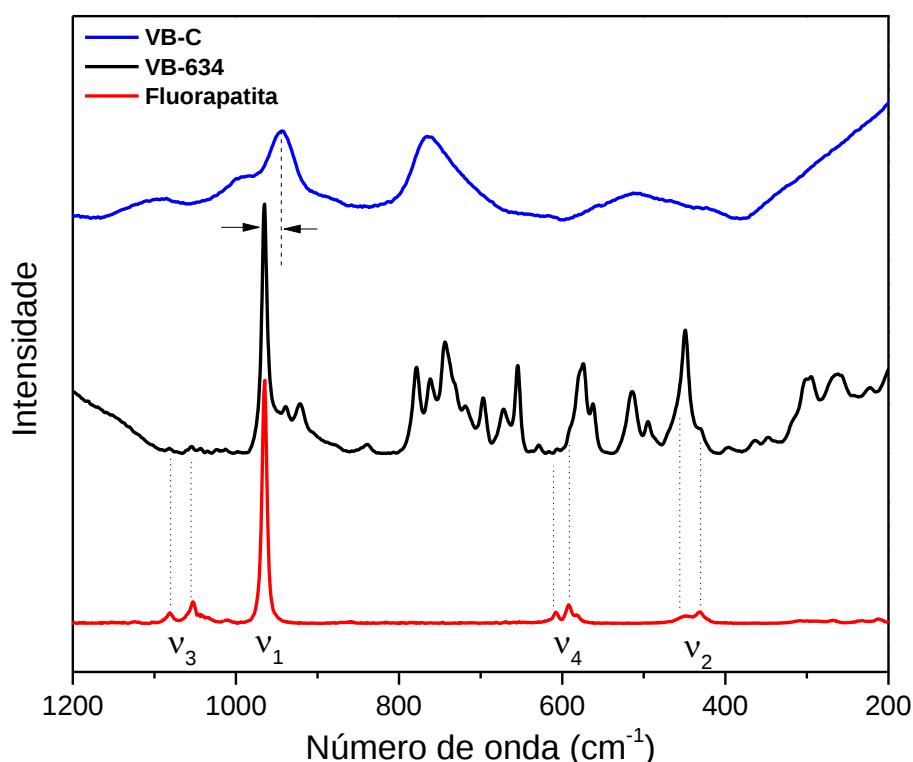


Figura 4.9: Comparação entre os espectros de espalhamento Raman das amostras VB-C e VB-634 e da Fluorapatita (RRUFF : R040098-3) [82].

A complexa estrutura de picos entre 400 e 800 cm^{-1} , observados para todos os espectros na região intermediária (entre $T = 634\text{ °C}$ e $T = 810\text{ °C}$), pode ser atribuída a modos de estiramento e de deformação das unidades BO_3 e BO_4 [79,81].

Fayos e colaboradores [83], mostraram que o Borato de Sódio e Cálcio CaNaB_5O_9 apresenta uma estrutura complexa de folhas de átomos de B e O, as quais são construídas por blocos unitários de $[\text{B}_5\text{O}_9]^{3-}$. Estas estruturas formam dois anéis compostos de unidades triangulares BO_3 e unidades tetraédricas BO_4 . Os mesmos autores [84] mostram que a fase $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ é composta por unidades poliônicas

$[\text{B}_5\text{O}_{10}]^{5-}$, a qual forma um par de anéis contendo duas unidades triangulares BO_3 conectadas por unidade tetraédrica BO_4 .

Este resultado mostra que as fases de Borato de Sódio e Cálcio CaNaB_5O_9 e $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ identificados pela difratometria de raios X, podem ser as responsáveis pela estrutura de picos observados nos espectros Raman. No entanto, como ambas são formadas pelas mesmas unidades básicas (BO_3 e BO_4) não é possível identificar e separar cada uma delas nos espectros.

A comparação do espectro Raman da amostra VB-634 com temperaturas mais altas como ilustrado na Figura 4.10, na qual foi comparado com a amostra VB-703 mostra o desaparecimento (ou redução) de pelo menos quatro picos de espalhamento indicados pelas setas na figura. Estes picos podem ser atribuídos às fases polimórficas do P_2O_5 [85], o que está em acordo com o resultado de DRX, no qual foi observado uma pequena quantidade desta fase para temperatura de tratamento de 634 °C.

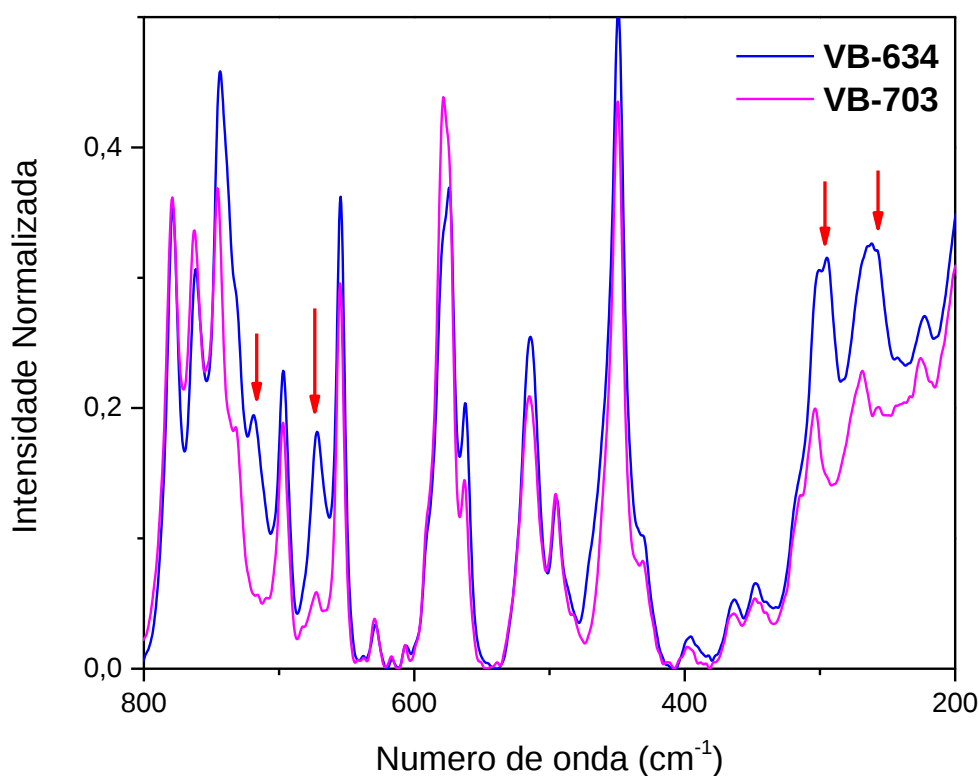


Figura 4.10: Comparação entre os espectros de espalhamento Raman das amostras VB-634 e VB-703. As setas vermelhas indicam os picos presentes apenas no espectro da amostra tratada a 634 °C atribuídos ao P_2O_5 [85].

Para a temperatura de 900 °C, verificou-se significativas mudanças espectrais, como a inversão nas intensidades das bandas em 429 e 450 cm^{-1} , o desaparecimento das bandas centradas em 494 e 515 cm^{-1} , o surgimento de uma banda em 581 cm^{-1} e a banda presente em 591 cm^{-1} que para as temperaturas anteriores foi identificada como um ombro, e para 900 °C apresenta uma maior contribuição.

De acordo com a análise térmica, nesta temperatura a amostra já passou pela fusão (Figura 4.1) e após a solidificação, de acordo com as fases encontradas por DRX (Figura 4.5), foi identificada como predominante a fase de borato de cálcio (~91%), e a presença de uma menor porcentagem da fase de Fluorapatita (~7%), confirmadas pela análise semiquantitativa RIR.

A figura 4.11 mostra o espectro obtido para a amostra VB-900, o espectro para a Fluorapatita [82] (RRUFF: R040098-3) e a indexação dos picos para a fase CaB_2O_4 obtidos por Rulmont e Almou [86], na qual podemos observar a ótima concordância com os dados experimentais, comprovando os resultados obtidos pelo DRX.

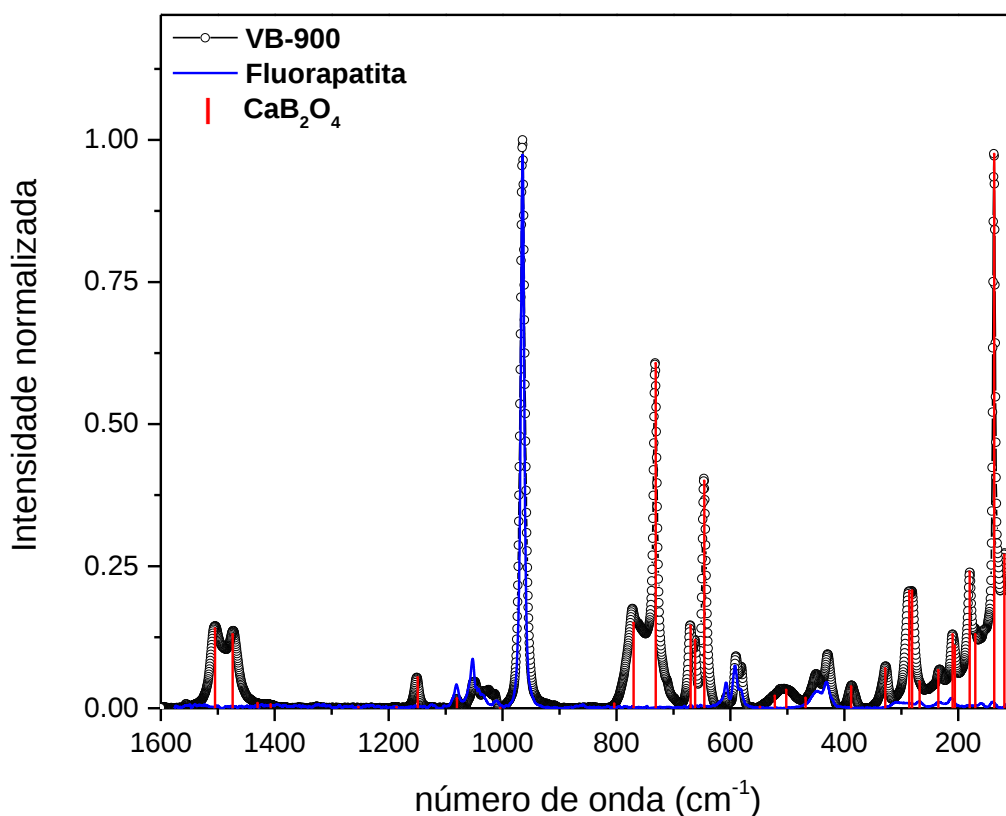


Figura 4.11: Comparação do espectro Raman para a amostra VB-900, o espectro para a Fluorapatita (RRUFF: R040098-3) e a indexação dos picos para a fase CaB_2O_4 obtidos na [86].

4.1.4 Análise Morfológica - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura das amostras foi avaliada por MEV. Na Figura 4.12 são apresentadas as micrografias de superfície e fratura da amostra VB-C, ou seja, simplesmente compactado a pressão de 3,5 MPa e das amostras VB-518, VB-576 e VB-634. Observa-se na micrografia de superfície da VB-C, Figura 4.12 (a), que as partículas, após a conformação, apresentam tamanhos que variam da ordem de 1 até 50 μm e forma irregular. Na micrografia de fratura, Figura 4.12 (b), são observados aglomerados de partículas e a presença de microporosidade.

A Figura 4.12 (c) mostra a micrografia de superfície da VB-518, no pico endotérmico que corresponde a temperatura de transição vítrea, na qual se observa a presença de partículas individuais com tamanhos entre 1 e 50 μm , com diferentes formas e morfologias compatível com um estágio inicial de sinterização. A imagem de fratura da amostra, Figura 4.12 (d), apresenta regiões mais densificadas e uma diminuição da microporosidade em relação à micrografia da amostra VB-C (Figura 4.12 (b)).

Para a amostra VB-576, entre a transição vítrea e a cristalização, a superfície, Figura 4.12 (e), apresenta uma morfologia uniforme, não sendo possível distinguir as partículas individualmente (ver inserção). A presença de bolhas na superfície, possivelmente está relacionada à temperatura e à formação de gases no processo de *softness*. Com relação à fratura da amostra, Figura 4.12 (f), observa-se uma maior densificação do material e diminuição da microporosidade.

A Figura 4.12 (g) mostra a micrografia de superfície para a amostra VB-634, na temperatura de cristalização. São observadas regiões mais densas com a presença de grãos na forma de pequenos prismas retangulares e, nos microporos, também a presença de estruturas na forma cilíndrica (ver destaque ampliado), ambas associadas a formação de novas fases no material. Na Figura 4.12 (h), observa-se uma evolução na morfologia da fratura, em relação às temperaturas anteriores, com a formação de camadas superpostas, com aparente formação de camadas mais densificadas e, entre estas, a presença das estruturas cilíndricas.

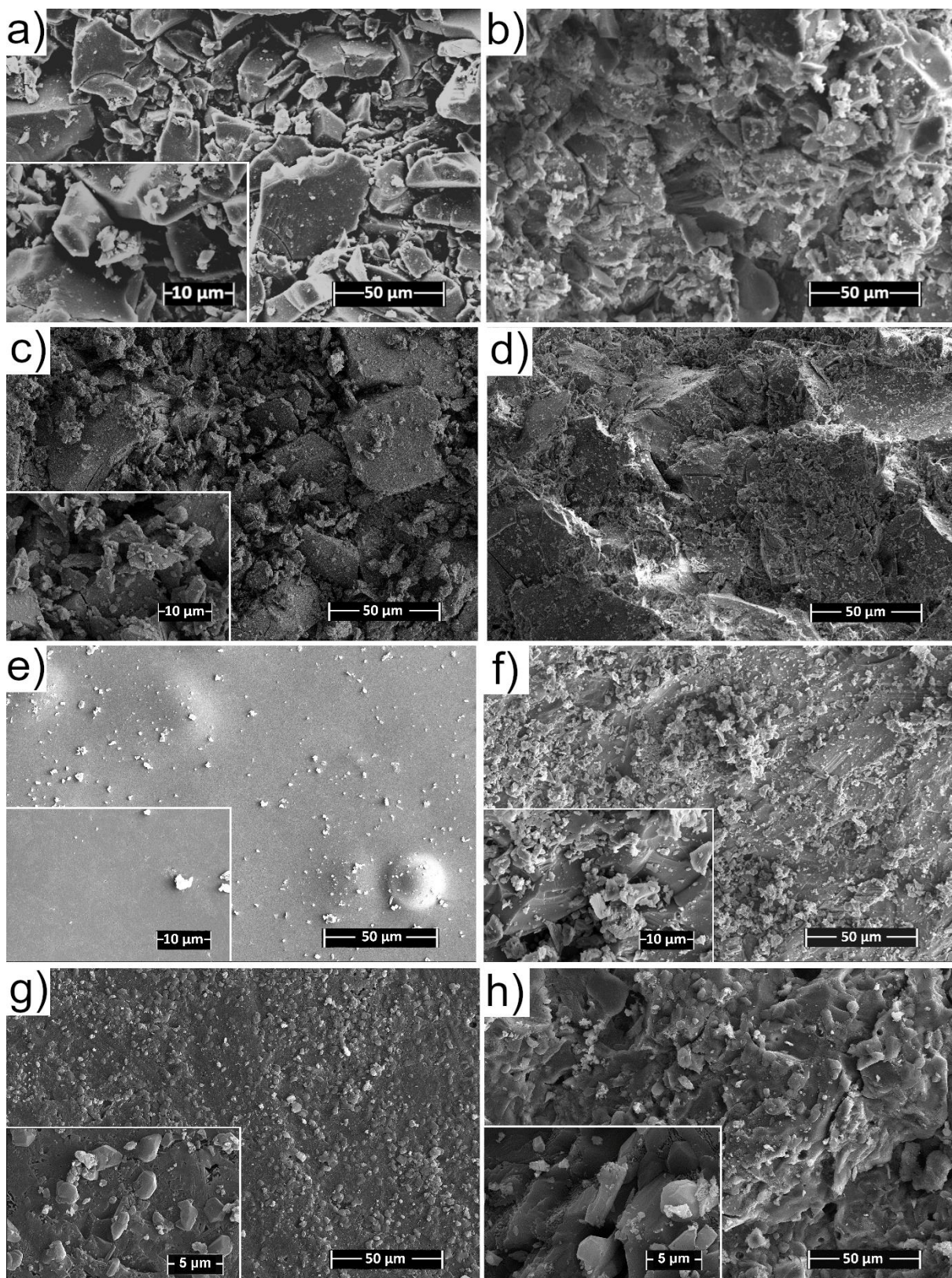


Figura 4.12: Imagens por MEV das superfícies das amostras VB-C (a), VB-518 (c), VB-576 (e) e VB-634(g).
Imagens por MEV das fraturas das amostras VB-C (b), VB-518 (d), VB-576 (f) e VB-634 (h).

Na Figura 4.13 são apresentadas as micrografias de superfície e fratura das amostras VB-703, VB-773, VB-810 e VB-900.

Na superfície da amostra VB-703, que corresponde a temperatura entre a cristalização e a primeira etapa de fusão do material, Figura 4.13 (a), observam-se duas morfologias predominantes. A primeira formada por grãos com formas irregulares e a segunda por grãos na forma de bastonetes cilíndricos (ver destaque), associadas as fases resultantes, do processo de tratamento térmico. Com relação a fratura, Figura 4.13 (b), verifica-se um aumento da densificação do material e a presença de microporosidade.

Para a superfície da amostra VB-773, relativa à primeira etapa da fusão, Figura 4.13 (c), ocorre um aumento no tamanho dos grãos em relação às temperaturas menores. A imagem de fratura, Figura 4.13 (d), mostra fragmentação do material, apresentando trincas, conforme destacado, e microporosidade.

Para a micrografia de superfície da amostra VB-810, Figura 4.13 (e) correspondente ao *in set* da segunda etapa de fusão, observa-se um aumento do tamanho de grãos em relação as temperaturas menores. A imagem de fratura, Figura 4.13 (f), mostra a ocorrência de fragmentação do material e um aumento da microporosidade (ver destaque).

A Figura 4.13 (g) corresponde à superfície da amostra VB-900, após fusão. Verifica-se a presença de grãos nas formas retangulares e cilíndricas, com tamanhos maiores que 100 μm e da ordem de 20 μm , respectivamente. Na imagem ampliada, inserida na micrografia da Figura 4.13 (g), também se observa a presença de grãos com diferentes formas e tamanhos incorporados a matriz resultante do tratamento térmico com fase líquida. Na micrografia de fratura, Figura 4.13 (h), nota-se a presença de trincas e de microporos na forma esférica, os quais estão possivelmente associados a coalescência de poros [87] em virtude da ocorrência de fase líquida.

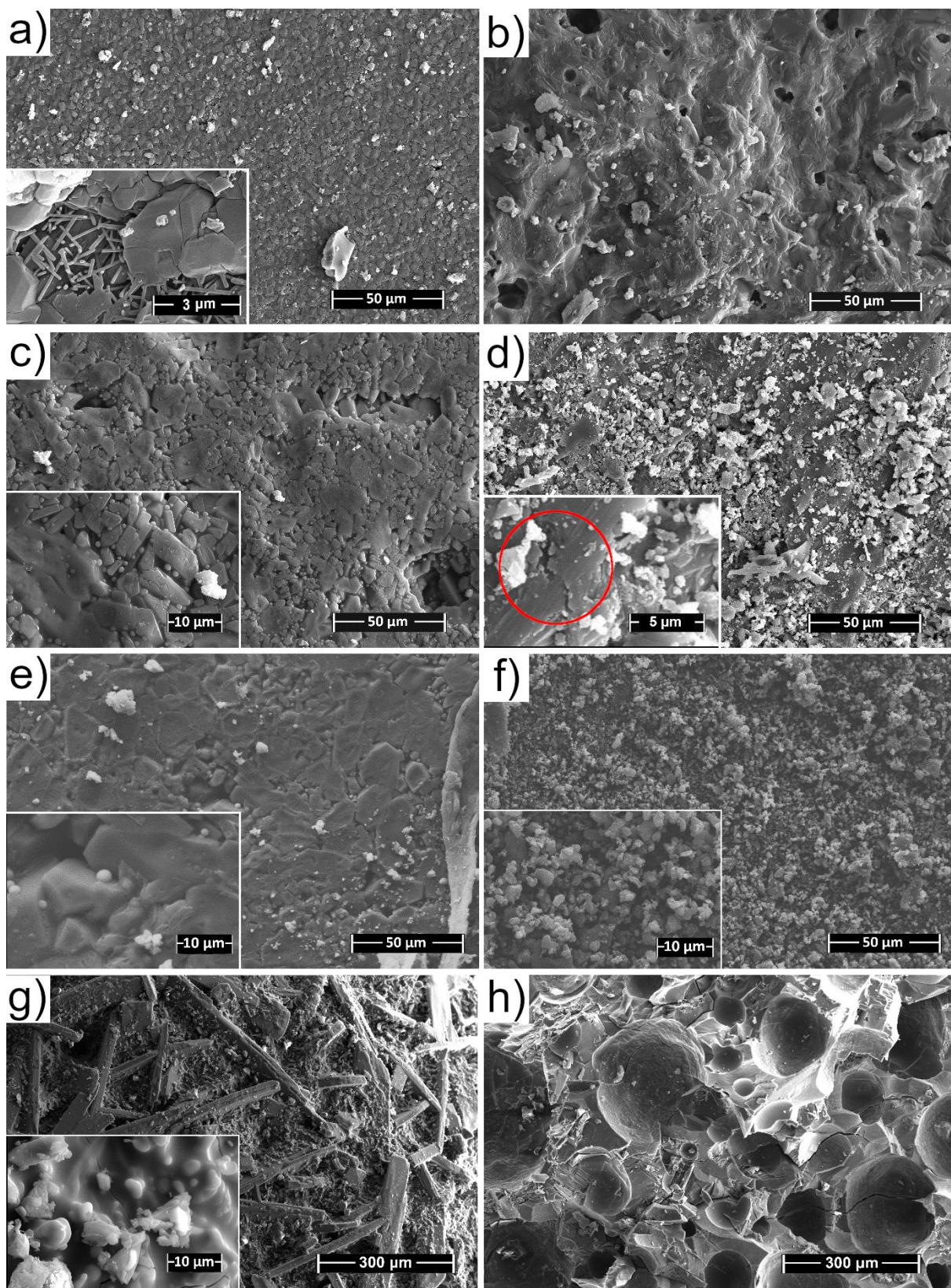


Figura 4.13: Imagens por MEV das superfícies das amostras VB-703 (a), VB-773 (c), VB-810 (e) e VB-900 (g). Imagens por MEV das fraturas das amostras VB-703 (b), VB-773 (d), VB-810 (f) e VB-900 (h).

4.1.5 Análises químicas – Mapeamentos por Energia dispersiva de Raios-X

Com o propósito de auxiliar a identificação e a dinâmica da formação das fases no material em função do processo de tratamento térmico, foram realizados mapeamentos de EDS nas amostras VB-576 (amorfo), VB-634 (início da cristalização), VB-810 e VB-900 (acima da temperatura de fusão (T_{L2})), que são amostras que apresentaram formação de fases relevantes de acordo com as análises de DRX. As amostras intermediárias não serão apresentadas nesse trabalho por apresentarem características semelhantes à amostra VB-634. É importante citar que a técnica de EDS, principalmente para análises semiquantitativas, pode apresentar resultados muito diferentes da realidade para os elementos de baixo peso atômico ($n < 10$). Dentre eles, estão os elementos Boro e Flúor, presentes na composição do vidro bioativo estudado nessa tese. Por esse motivo, as análises serão feitas com base nas medidas dos elementos Ca, Na e P e a razão entre eles, uma vez que apresentam maior confiabilidade nos resultados sem comprometer a identificação das fases, visto que, em todas as fases identificadas via DRX verificou-se pelo menos um ou dois dos elementos analisados.

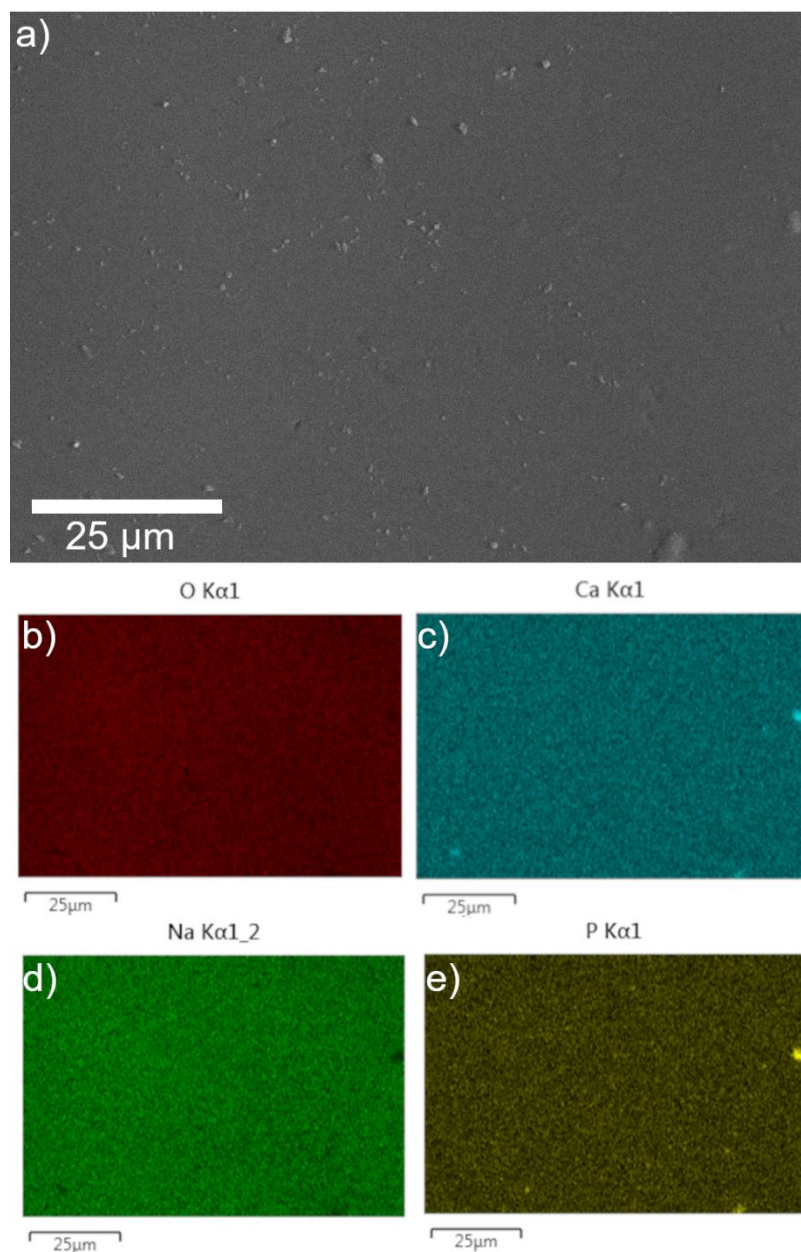


Figura 4.14: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície referente a amostra VB-576 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.

A Figura 4.14 mostra o mapeamento dos elementos O, Na, Ca e P. Observa-se que há uma distribuição homogênea desses elementos por toda a área analisada indicando que não há a presença de estruturas morfológicas de caráter cristalino, corroborando com as análises realizadas por DRX.

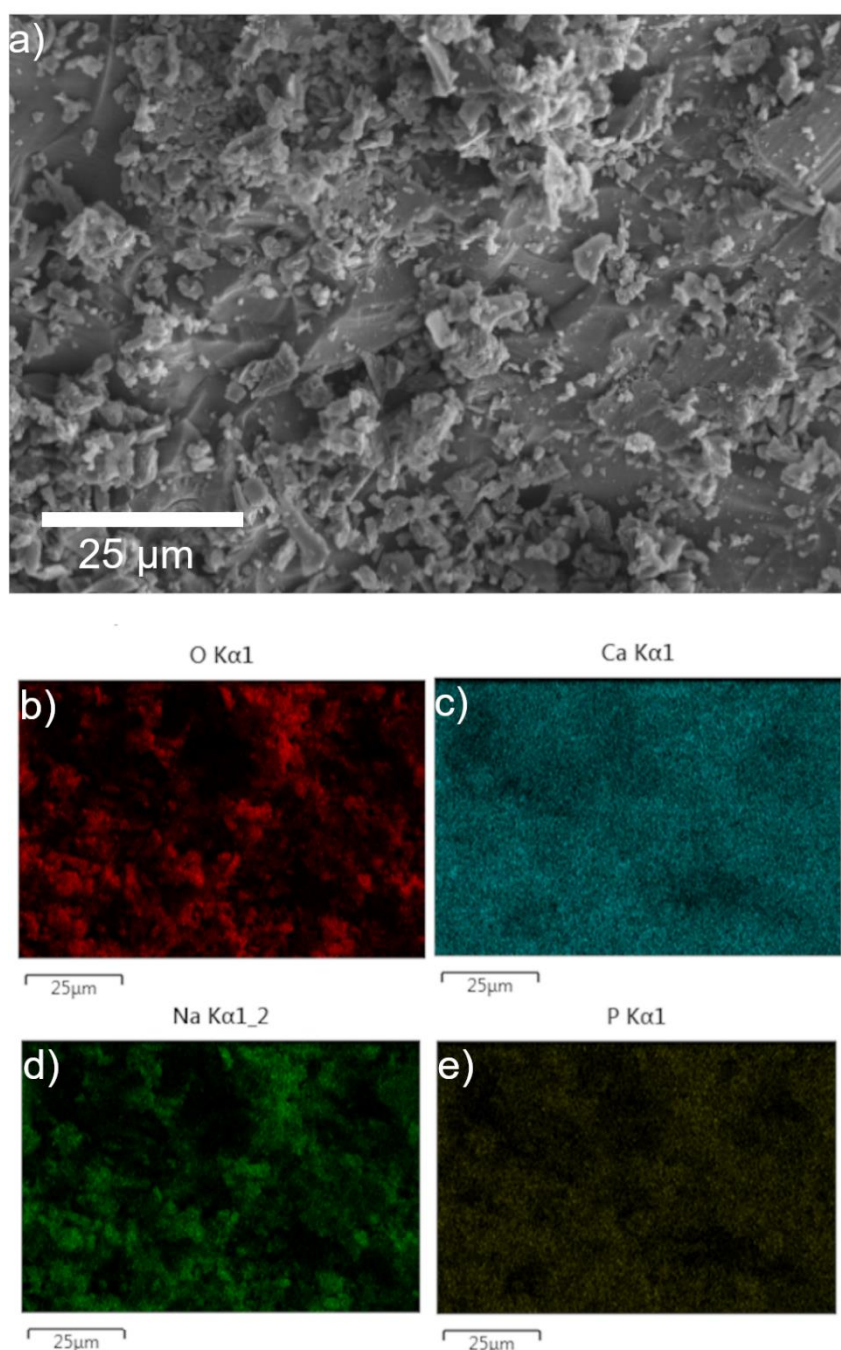


Figura 4.15: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da fratura referente a amostra VB-576 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.

O mesmo ocorre para o mapeamento químico realizado na fratura da amostra VB-576 (Figura 4.15). Todos os elementos encontram-se distribuídos homogeneamente mostrando que, nessa temperatura, não há a ocorrência de qualquer processo de cristalização superficial ou volumétrica (no interior da amostra).

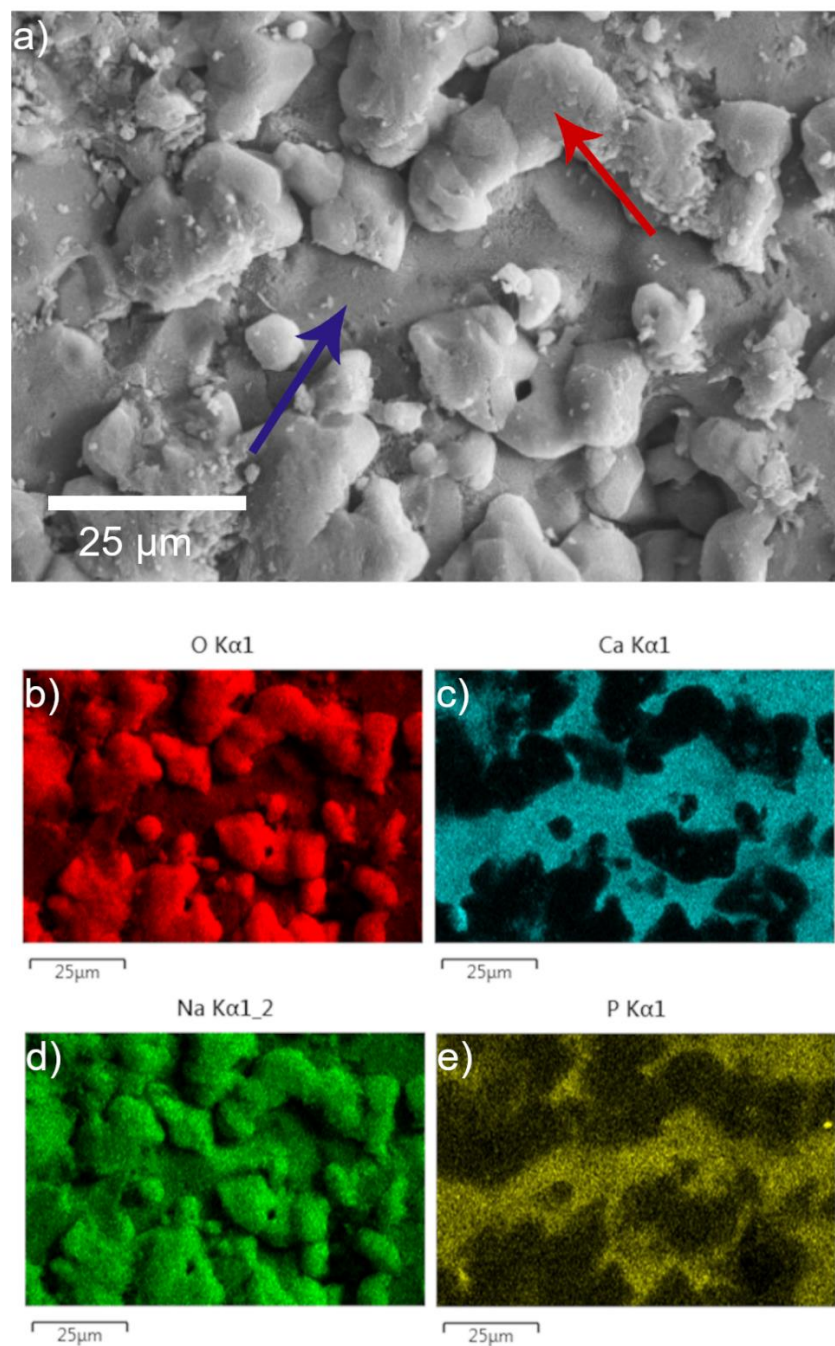


Figura 4.16: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície referente à amostra VB-634 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.

Na superfície da amostra VB-634 (Figura 4.16), de acordo com os mapeamentos, é possível observar claramente a formação de duas fases, uma de morfologia arredondada (seta vermelha) rica em Na e com baixo teor de P, e outra fase formando uma camada inferior de superfície lisa (seta azul). Comparando esses dados com os obtidos por DRX, os mesmos sugerem que as estruturas arredondadas

podem estar associadas às fases CaNaB_5O_9 ou $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$. É importante notar que a ausência de cálcio observada no mapeamento se deve a sua baixa concentração nessas fases, quando comparadas com a concentração de cálcio no VB. Devido às limitações da técnica empregada associada ao fato de não ser possível observar morfologias distintas entre essas fases (na região analisada) não é possível distingui-las. É importante citar que embora o mecanismo envolvido na cristalização dos vidros bioativos baseados em borato vem sendo amplamente estudado, ainda faltam estudos para um completo entendimento. De fato, o comportamento complexo do precursor B_2O_3 , e consequentemente das estruturas BO_3 e BO_4 interferem sensivelmente no processamento desse tipo de vidro bioativo e merecem um estudo mais aprofundado.

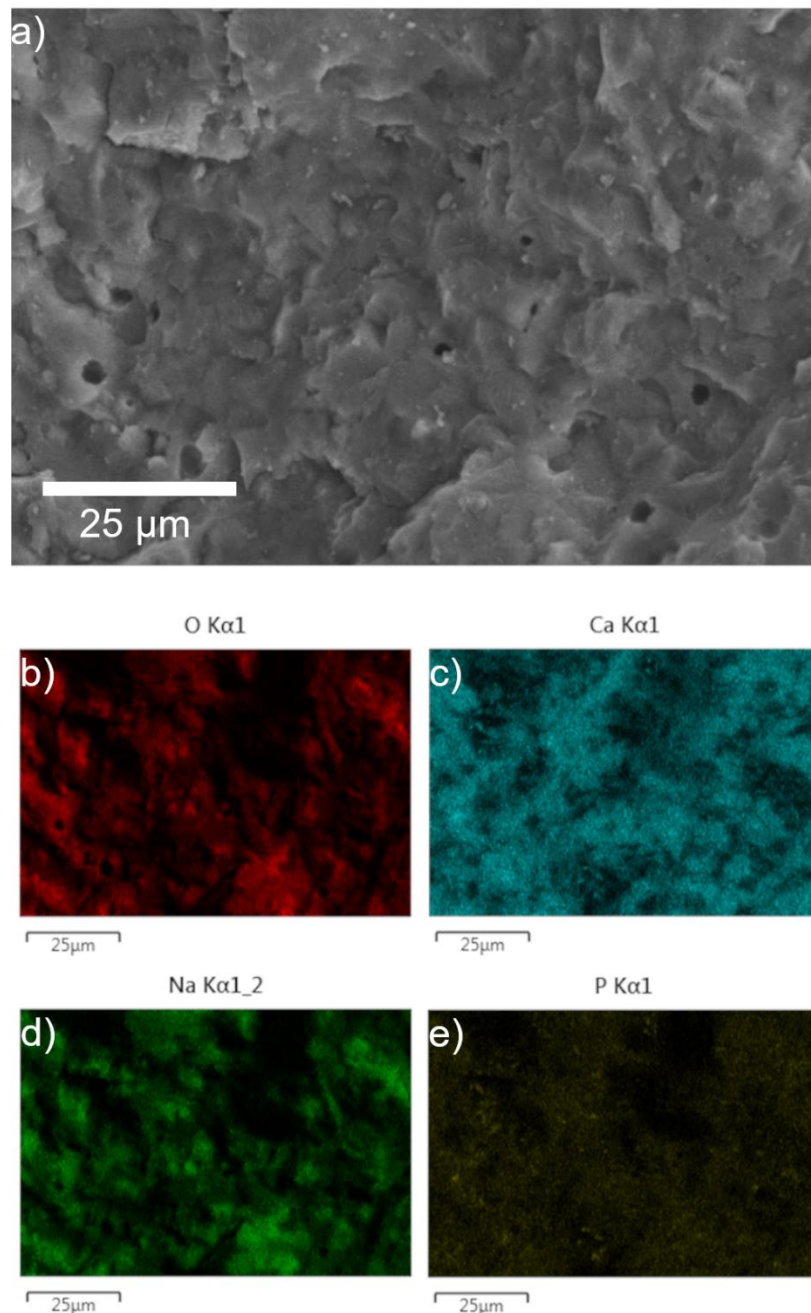


Figura 4.17: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da fratura referente a amostra VB-634 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.

O mapeamento realizado na fratura da amostra VB-634 é apresentado na Figura 4.17. Apesar de ser possível observar pequenas regiões com maiores concentrações de Ca e Na indicando a presença das fases CaNaB_5O_9 ou $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ também no interior da amostra, a separação dessas fases é bem menos evidente que na superfície. Esse fenômeno ocorre devido à cristalização de superfície, bastante discutido nos estudos de cristalização de vidros bioativos. De acordo com James [88]

e Zanoto [89], é possível determinar a tendência de cristalização em vidros silicatos, baseando-se no valor da transição vítrea reduzida T_{gr} , dada por T_g/T_{L2} . Assumindo que o mesmo comportamento ocorra para o caso dos boratos, o valor obtido para o sistema estudado nesse trabalho apresenta o $T_{gr} = 0,65$ o que favorece que a cristalização ocorra, em maior parte, na superfície do material. Por isso, a separação das fases fica menos evidente nos mapeamentos da fratura.

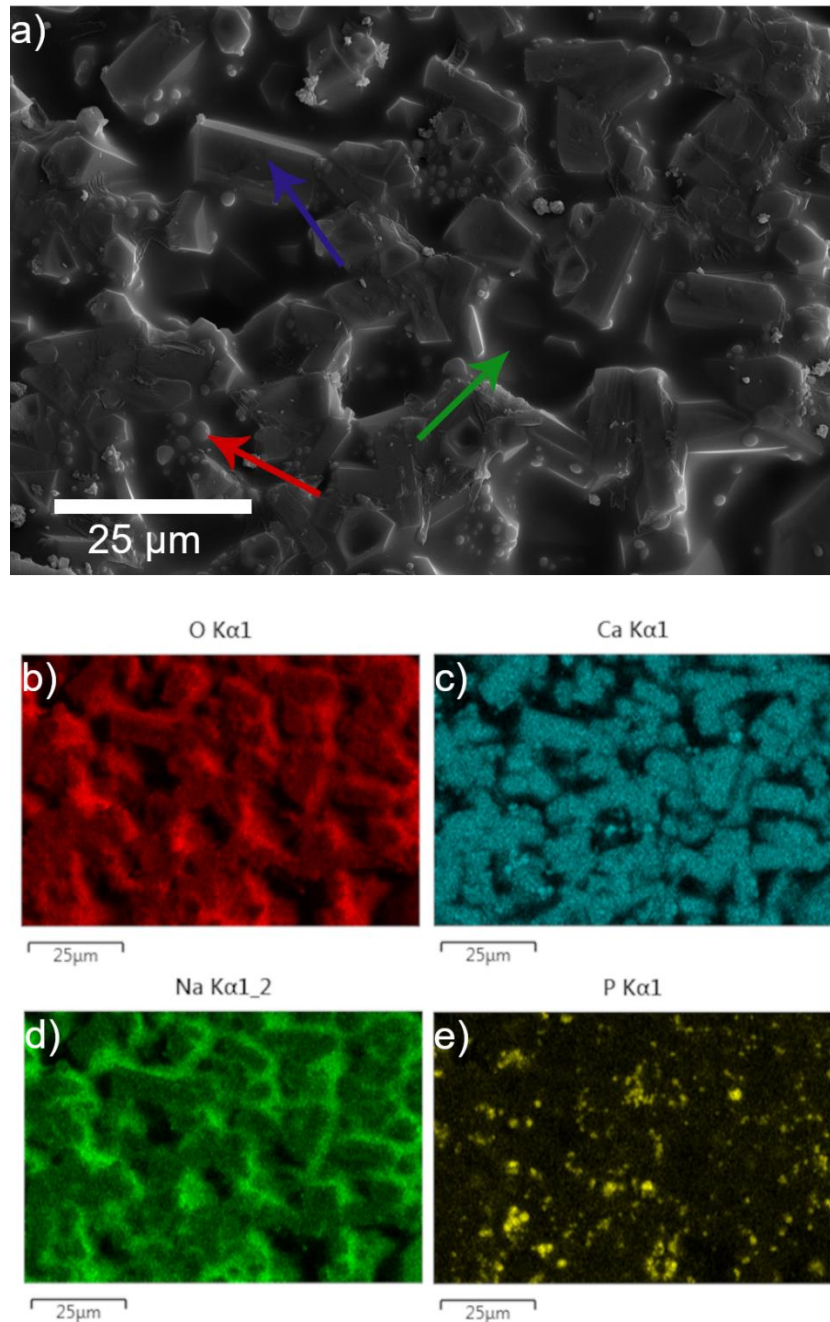


Figura 4.18: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície referente a amostra VB-810 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.

A partir de 810 °C, a morfologia da superfície muda drasticamente, apresentando grãos em forma de blocos, agulhas e esferas. A segregação de fases fica ainda mais evidente no mapeamento químico mostrado nas Figura 4.18 (b-e). Na imagem é possível verificar pelo menos três morfologias diferentes. Uma estrutura em forma de blocos, assim como observada nas análises de MEV, apresentando alta concentração de Ca e Na (seta azul) sem a presença visível de P e abaixo das estruturas de blocos, também foi observada uma camada lisa, típica da formação de fase líquida (seta verde), conforme identificado na Figura 4.18a. De acordo com o mapeamento químico, essa fase é rica em Na e com menor presença de Ca e P, sugerindo a presença de uma fase formada apenas por óxido de sódio. Já as estruturas em formas esféricas sugerem uma fase rica em Ca e P (seta vermelha). Analisando esses dados juntamente com as análises realizadas por DRX, é possível dizer que essas estruturas sejam referentes a fase Fluorapatita. Para uma análise mais detalhada das fases sugeridas qualitativamente por meio dos mapeamentos, a Figura 4.19 apresenta os resultados das análises de EDS nas três regiões citadas (marcadas na Figura 4.19 a). A Tabela 4.1 apresenta os valores das razões teóricas e as obtidas experimentalmente entre Ca e Na para as fases CaNaB_5O_9 e $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e entre Ca e P para a fase $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$. Nessa análise semiquantitativa é possível observar valores muito próximos dos esperados teóricamente, confirmando a presença das fases identificadas por DRX e sugerindo uma completa cristalização da superfície.

Tabela 4.1: Valores das razões teóricas e experimentais para as fases CaNaB_5O_9 , $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ para VB-810.

Fase	Razão Ca:Na	Razão Ca:P	Razão experimental
CaNaB_5O_9	1	-	1,03
$\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$	0,33	-	0,42
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	-	1,66	1,79

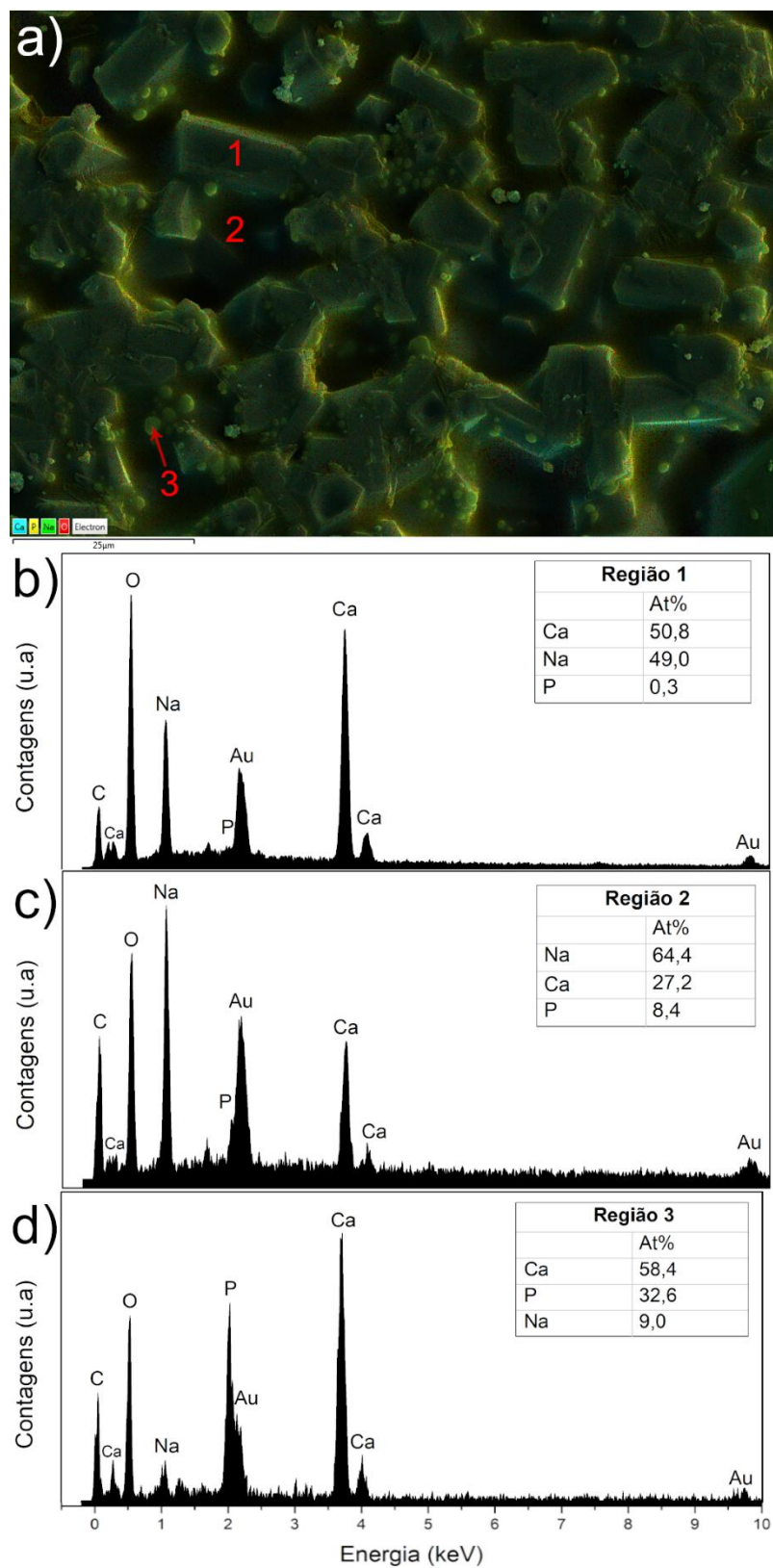


Figura 4.19: (a) Superposição das imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície e dos mapeamentos químicos referente a amostra VB-810 e espectros de EDS das regiões (b) 1, (c) 2 e (d) 3.

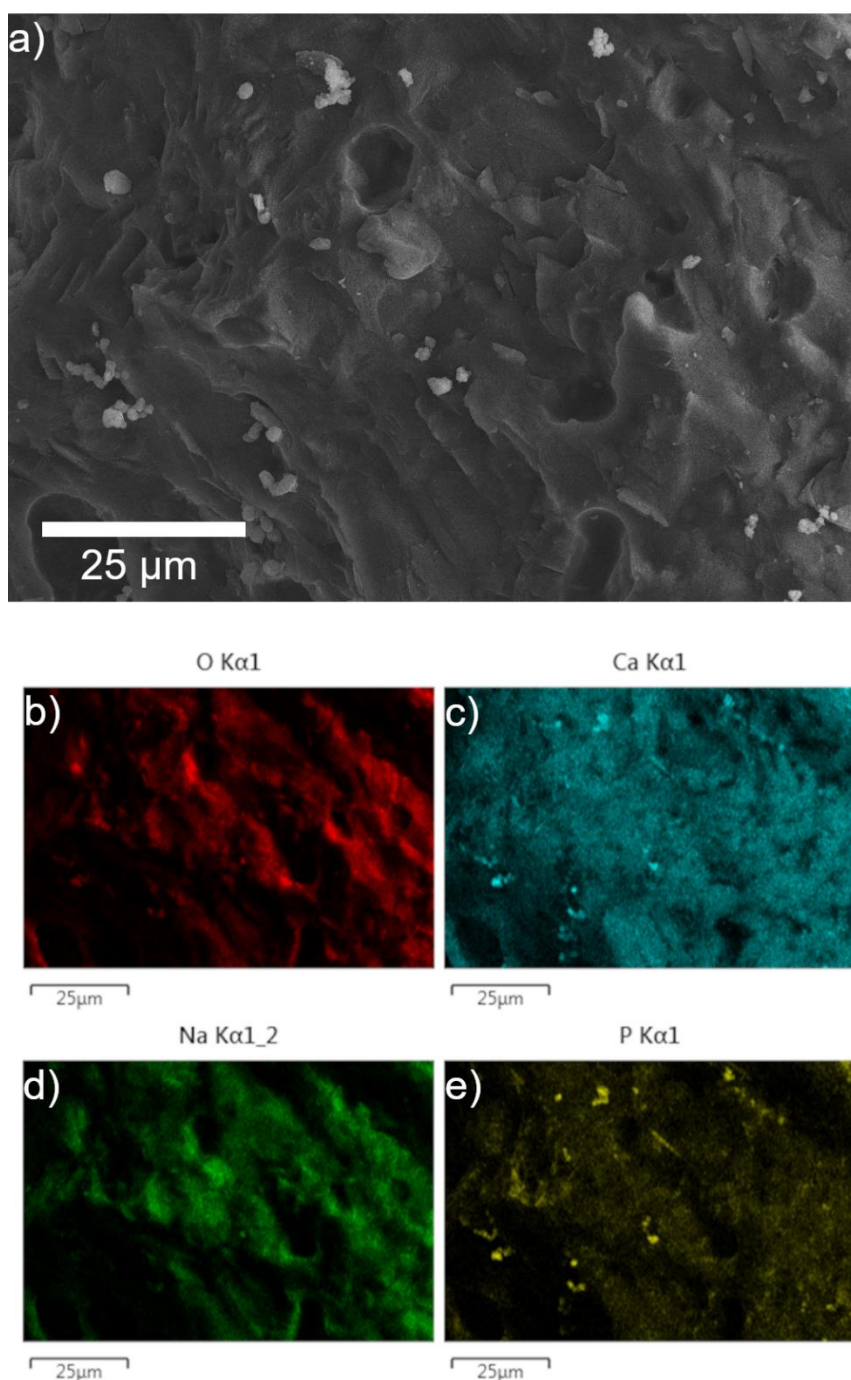


Figura 4.20: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da fratura referente a amostra VB-810 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.

De acordo com o mapeamento da fratura, na amostra VB-810, (Figura 4.20), é possível identificar pontos esféricos ricos em Ca e P, o que indica o início do processo de cristalização no interior da amostra. Esse fenômeno ocorre devido à alta temperatura do tratamento térmico que faz com que a amostra atinja temperaturas

maiores em seu interior favorecendo o início da cristalização. A razão Ca:P obtida para essas estruturas arredondadas foi de 1,79 (Figura 4.21), a mesma obtida para as estruturas arredondadas da superfície.

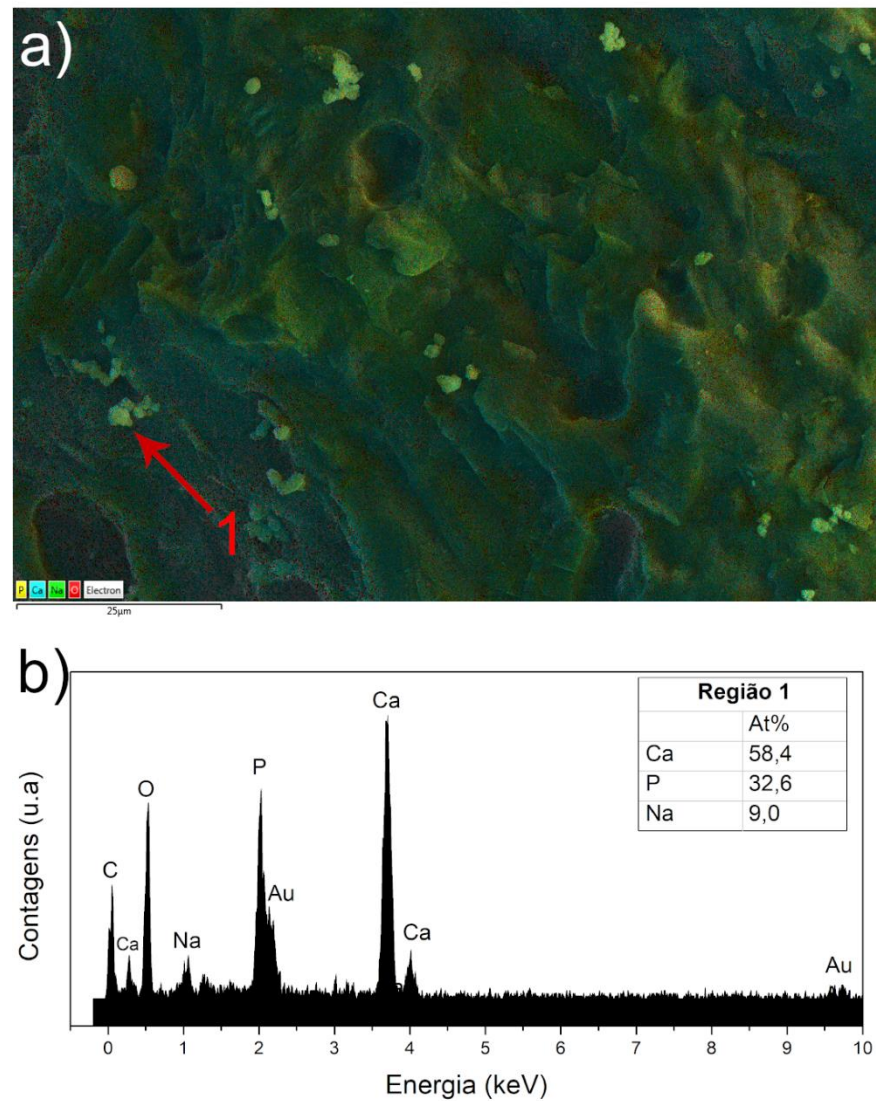


Figura 4.21: (a) Superposição das imagens de microscopia eletrônica de varredura da fratura e dos mapeamentos químicos referente a amostra VB-810 e (b) espectro de EDS da região 1.

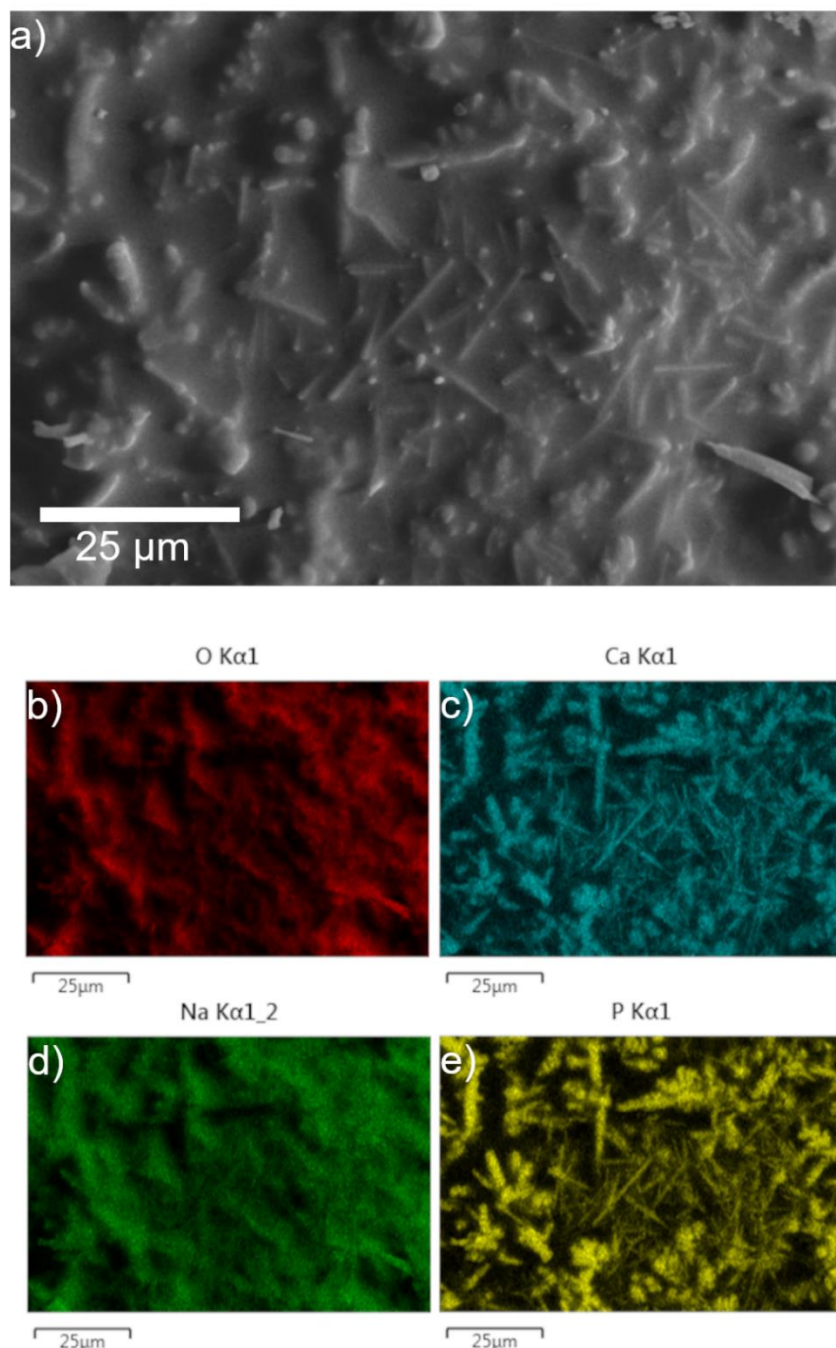


Figura 4.22: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície referente a amostra VB-900 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.

A Figura 4.22 apresenta os resultados do mapeamento químico para a superfície da amostra VB-900. Na imagem, Figura 4.22a, é possível verificar estruturas com morfologia em forma de agulhas. Nos mapeamentos químicos, observou-se que essas estruturas apresentam claramente um excesso de Ca (Figura 4.22c) e P (Figura 4.22e), indicando que essa fase seja composta por Fluorapatita. De fato, a Fluorapatita pode apresentar estruturas em forma de agulha por possuir um

hábito de crescimento de grão na direção c da célula unitária [90] a depender de diversos fatores como temperatura empregada no tratamento térmico, razão Ca:P e dos métodos de síntese empregados [91,92]. Também é possível observar uma camada lisa, assim como a observada na amostra VB-810, rica em Na (Figura 4.22d). Essa fase pode ser proveniente da separação de fase que ocorre durante o tratamento térmico em altas temperaturas.

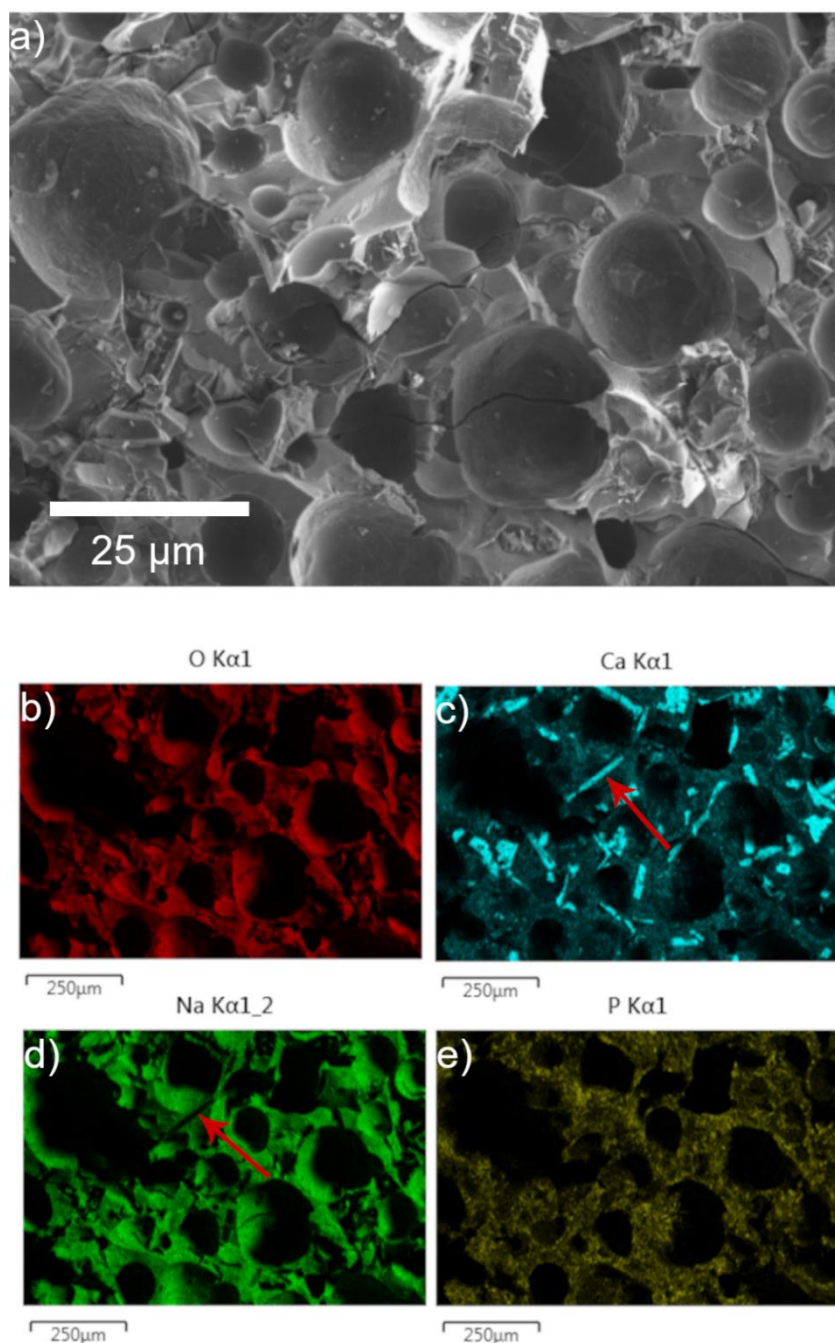


Figura 4.23: (a) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da fratura referente a amostra VB-900 e mapeamento químico por meio de EDS dos elementos (b) O, (c) Ca, (d) Na e (e) P.

A Figura 4.23 apresenta os resultados do mapeamento químico para a fratura da amostra VB-900. Nas imagens do mapeamento dos elementos, observa-se a presença de estruturas retangulares (agulhas), como as presentes na superfície, com alta concentração de Ca e P e baixa ou nenhuma concentração de Na (veja setas vermelhas). A presença dessas estruturas no interior da amostra, são mais evidentes

que as observadas na amostra VB-810 e corroboram com a hipótese de que, para altas temperaturas, inicia-se o processo de cristalização no interior da amostra.

4.2 Ensaios *in vitro*

4.2.1 Avaliação antibacteriana

A avaliação antibacteriana tem como objetivo investigar o quanto um material possui capacidade de impedir a proliferação de bactérias. Para isso, a atividade antimicrobiana é feita por meio de testes como a MIC (Concentração inibitória mínima) e MBC (Concentração bactericida mínima). A concentração inibitória mínima pode ser definida como a menor concentração necessária para que um agente antimicrobiano bacteriostático impeça o crescimento visível de bactérias. Já a concentração bactericida mínima é dada pela concentração mais baixa necessária de um agente antibacteriano para que mate uma bactéria num período fixo, como por exemplo 24 horas [93].

Nos testes de avaliação antibacteriana realizados com os microrganismos *S. aureus* e *E. coli*, não foi observado potencial antibacteriano associado à amostra VB-C. Podemos observar que para a Estreptomicina, que foi usada como controle, para concentração inibitória mínima de 3,9 µg/mL já existe atividade antibacteriana. No entanto, para a amostra VB-C estudada neste trabalho, assim como para o biovidro 45S5 (Bioglass®), que foi usado como um vidro bioativo comparativo já bem conhecido com boa viabilidade celular [94], à concentração de 1000 µg/mL que é o maior valor de concentração utilizado, as bactérias continuam vivas, ou seja, não apresentam ação antibacteriana. Os resultados obtidos para MIC e MBC estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Valores da MIC (Concentração inibitória mínima em µg/mL) e da MBC (Concentração bactericida mínima em µg/mL) para ensaio antibacteriano *in vitro* com os microrganismos *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922).

<i>E. coli</i> (-) 25922			<i>S. aureus</i> (+)	
Amostra	MIC µg/mL	MBC µg/mL	MIC µg/mL	MBC µg/mL
45S5	1000	>1000	>1000	>1000
VB-C	1000	>1000	>1000	>1000
Estreptomicina	3.9	3.9	8	8

4.2.2 Avaliação citotóxica

Ensaio de citotoxicidade são amplamente utilizados em pesquisas e pela indústria farmacêutica para rastrear o quanto um material, ou composto bioativo pode ser nocivo em nível celular. Alguns dos efeitos das substâncias podem ser a inibição enzimática, morte celular e variações na permeabilidade das membranas celulares [87]. O teste de citotoxicidade pelo método direto MTT³ é um ensaio quantitativo da atividade mitocondrial, determinando assim a interrupção da função bioquímica de determinado biomaterial [87]. Desenvolvido por Mosmann [95], ele se baseia na detecção de células vivas capazes de metabolizar o sal de tetrazólio formando cristais de formazan, estes cristais são dissolvidos e quantificados por meio da medida de sua absorbância em um espectrofotômetro [96].

Os resultados obtidos para avaliação da citotoxicidade do vidro bioativo 45S5 e das amostras, por meio de teste *in vitro* com osteoblastos da linhagem MC3T3-E1, estão apresentados na Figura 4.24.

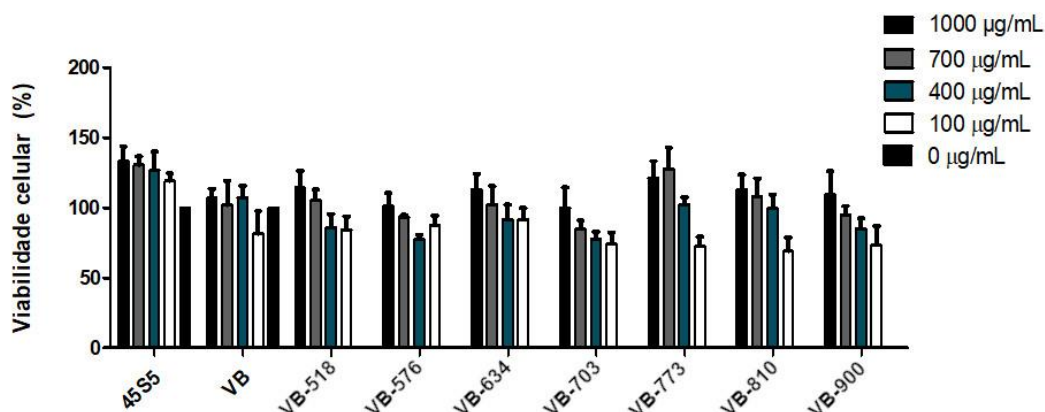


Figura 4.24: Viabilidade celular de osteoblastos após 24 h de incubação do biovidro 45S5 e das amostras VB-C, VB-518, VB-576, VB-634, VB-703, VB-773, VB-810 e VB-900.

A Figura 4.24 mostra a porcentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações das amostras em fibroblastos cultivados em meio α -MEM⁴ acrescido

³ MTT: MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). Teste usado para medir a proliferação celular e a citotoxicidade. Se baseia na redução do MTT, um sal amarelo solúvel em água, pelo efeito da atividade metabólica celular.

⁴ α -MEM: Meio de cultura celular sintético composto por piruvato de sódio e todos os 21 aminoácidos essenciais e 5 vitaminas adicionais.

de 10% de SFB (Soro fetal bovino). Após 24 horas de incubação, a análise de MTT foi utilizada para obter a viabilidade das células para as amostras tratadas termicamente em comparação com o controle VB-C, e o biovidro padrão 45S5.

Analisando a viabilidade celular de acordo com as concentrações e em função da temperatura, verificou-se que na concentração de 100 µg/ml, para a amostra VB-C, assim como para todas tratadas termicamente, a viabilidade celular se apresenta acima de 70%, indicando baixa toxicidade. Para a concentração de 400 µg/ml, a viabilidade celular apresenta um aumento ou permanece igual aos resultados obtidos na concentração de 100 µg/ml em todas as amostras, exceto para 576 °C, na qual observou-se uma pequena diminuição em sua porcentagem, no entanto, seus níveis continuam acima de 70%. Para as concentrações de 700 µg/ml e 1000 µg/ml, observou-se uma tendência no aumento da porcentagem da viabilidade celular, em todas as temperaturas de tratamento térmico, com 100% ou mais. Isto sugere, que para as maiores concentrações ocorreu uma indução no crescimento celular, indicando que estes biomateriais podem induzir a proliferação celular.

De forma geral, os resultados obtidos se mostraram positivos em relação a viabilidade celular, que quantifica o número de células vivas após o ensaio de citotoxicidade, pois para as diferentes concentrações analisadas a viabilidade apresentou-se acima de 70%, indicando a não citotoxicidade e a indução de proliferação celular do material para as diferentes temperaturas de tratamento térmico estudadas em cultura de osteoblastos.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram atingir os objetivos inicialmente propostos de estudar a dinâmica de cristalização resultante do tratamento térmico realizado no vidro bioativo da composição $60\text{B}_2\text{O}_3 - 4\text{P}_2\text{O}_5 - 18\text{Na}_2\text{O} - 10\text{CaF}_2$ por meio de técnicas de análises térmicas (DSC-TG), análises estruturais (Espectroscopia Raman, Difratometria de raios X (DRX)), microestruturais (Microscopia eletrônica de varredura) e análises químicas (Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS)), e de avaliar a ação antibacteriana e citotóxica por meio de testes *in vitro*.

Sendo assim, pode-se concluir o vidro bioativo estudado apresenta ser bastante sensível ao tratamento térmico mesmo em baixas temperaturas. Dessa forma, o tratamento térmico controlado nessa composição vítrea, pode ser utilizado como uma ferramenta para se obter vitrocerâmicas com fases cristalinas desejadas. Finalmente, mesmo com a formação das fases cristalinas, a não citotoxicidade das amostras indicam o potencial de aplicação dessa composição para fabricação de próteses e implantes.

6 PERSPECTIVAS

Durante a construção dessa tese, novas ideias surgiram para o aprofundamento das discussões aqui realizadas, bem como, para o avanço dessa linha de pesquisa, como segue:

- Estudo da cinética de cristalização, para a determinação de parâmetros de cristalização que são fundamentais para uma melhor compreensão da dinâmica de formação das fases cristalinas;
- Estudo da bioatividade e biocompatibilidade, por meio de imersão em fluído corporal simulado (SBF);
- Avaliação das propriedades mecânicas em função das temperaturas aplicadas;
- Produção de compósitos de VB+HAp, para potencial aplicação em implantes ósseos.

7 REFERÊNCIAS

- [1] S. Editor, S.C. Rasmussen, How Glass Changed, 2012.
- [2] S.B. Maia, O Vidro e Sua Fabricação - Coleção Interdisciplinar, 1st ed., 2003.
- [3] Paris Guia, (n.d.). <http://www.parisguia.com.br/ile-de-la-cite-Sainte-Chapelle.aspx> (accessed December 22, 2020).
- [4] E. Axinte, Glasses as engineering materials: A review, Mater. Des. 32 (2011) 1717–1732. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2010.11.057>.
- [5] D.F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility, Biomaterials. 29 (2008) 2941–2953. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>.
- [6] S. Jung and D. E. Day, Conversion Kinetics of Silicate, Borosilicate, and Borate Bioactive Glasses to Hydroxyapatite, Phys. Chem. Glas. Eur. J. Glas. Sci. Technol. Part B. 50 (n.d.) 85–88.
- [7] S. Jung, Borate Based Bioactive Glass Scaffolds for Hard and Soft Tissue Engineering, Dr. Diss. (2010) 1–350.
- [8] J. Chevalier, L. Gremillard, Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years, J. Eur. Ceram. Soc. 29 (2009) 1245–1255. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2008.08.025>.
- [9] M.D. O'Donnell, S.J. Watts, R. V. Law, R.G. Hill, Effect of P₂O₅ content in two series of soda lime phosphosilicate glasses on structure and properties - Part II: Physical properties, J. Non. Cryst. Solids. 354 (2008) 3561–3566. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2008.03.035>.
- [10] P.G. Galliano, J.M. Porto López, Thermal behaviour of bioactive alkaline-earth silicophosphate glasses, J. Mater. Sci. Mater. Med. 6 (1995) 353–359. <https://doi.org/10.1007/BF00120304>.
- [11] D.S. Brauer, M.N. Anjum, M. Mneimne, R.M. Wilson, H. Doweidar, R.G. Hill, Fluoride-containing bioactive glass-ceramics, J. Non. Cryst. Solids. 358 (2012) 1438–1442. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2012.03.014>.
- [12] D. Bellucci, A. Sola, A. Anesi, R. Salvatori, L. Chiarini, V. Cannillo, Bioactive glass/hydroxyapatite composites: Mechanical properties and biological evaluation, Mater. Sci. Eng. C. 51 (2015) 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.02.041>.
- [13] P.W. McMillan, Glass-ceramics, Academic Press, 1964.
- [14] ASTM, Compilation of ASTM Standard Definitions, 7th ed., Philadelphia, 1990.

- [15] A. Varshneya, J. Mauro, Comment on misconceived ASTM definition of “Glass” by A. C. wright, *Glas. Technol. - Eur. J. Glas. Sci. Technol. Part A.* 51 (2010) 28–30.
- [16] J. Zarzycki, *Glasses and the Vitreous State*, First, Cambridge, 1991.
- [17] J.E. Shelby, *Introduction to Glass Science and Technology*, The Royal Society of Chemistry, 2021.
- [18] B. Kingery, H.K. Bowen, Uhlmann, *Introduction to Ceramics*, 1976.
- [19] W.H. Zachariasen, The atomic arrangement in glass, *J. Am. Chem. Soc.* 54 (1932) 3841–3851. <https://doi.org/10.1021/ja01349a006>.
- [20] N.M. Bobkova, Thermal expansion of binary borate glasses and their structure, *Glas. Phys. Chem.* 29 (2003) 501–507. <https://doi.org/10.1023/A:1026351416382>.
- [21] G.E. Rachkovskaya, G.B. Zakharevich, Vitrification, properties, and structure of lead-tellurite borate glasses, *Glas. Ceram. (English Transl. Steklo i Keramika)*. 59 (2002) 123–126. <https://doi.org/10.1023/A:1019588214933>.
- [22] Y. Cheng, H. Xiao, W. Guo, Influence of compositions on sealing temperature and properties of lead borate non-crystallizing sealing glasses, *Mater. Sci. Eng. A.* 464 (2007) 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.msea.2007.01.146>.
- [23] F. Gan, L. Xu, *Photonics Glasses*, Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2006.
- [24] O. Deparis, F.P. Mezzapesa, C. Corbari, P.G. Kazansky, K. Sakaguchi, Origin and enhancement of the second-order non-linear optical susceptibility induced in bismuth borate glasses by thermal poling, *J. Non. Cryst. Solids.* 351 (2005) 2166–2177. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2005.06.004>.
- [25] D.E. Day, J.E. White, R.F. Brown, K.D. McMenamin, Transformation of Borate Glasses Into Biologically Useful Materials, *Glas. Technol. - Eur. J. Glas. Sci. Technol. Part A.* 44 (2003) 75–81.
- [26] J.R. Jones, A.G. Clare, *Bio-Glasses: an itroduction*, John Wiley and Sons, Ltd., 2012.
- [27] R.L. Mozzi, B.E. Warren, Structure of Vitreous Silica, *J. Appl. Crystallogr.* 2 (1969) 164–172. <https://doi.org/10.1107/S0021889869006868>.
- [28] J.K. Moe, The Structure of Vitreous and Liquid Boron Oxide, *J. Non. Cryst. Solids.* 1 (1969) 269–284.
- [29] L.D. Pye, V.D. Fréchette, N.J. Kreidl, *Borate Glasses Structure, Properties,*

Applications, New York, USA, 1978.

- [30] 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>.
- [31] L.L. Hench, J. Wilson, *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific, 1993.
- [32] A.L.R. Pires, A.C.K. Bierhalz, Â.M. Moraes, Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado, *Quim. Nova.* 38 (2015) 957–971. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>.
- [33] S. Verrier, J.E. Gough, A.R. Boccaccini, *Bioactive glass containing composites for bone and musculoskeletal tissue engineering scaffolds*, Woodhead Publishing Limited, 2011. <https://doi.org/10.1533/9780857093318.2.162>.
- [34] S.M. Rabiee, N. Nazparvar, M. Azizian, D. Vashaei, L. Tayebi, Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review, *Ceram. Int.* 41 (2015) 7241–7251. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.02.140>.
- [35] M. Bengisu, Borate glasses for scientific and industrial applications: a review, *J. Mater. Sci.* 51 (2016) 2199–2242. <https://doi.org/10.1007/s10853-015-9537-4>.
- [36] 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, *J. Am. Ceram. Soc.* 90 (2007) 303–306. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2006.01358.x>.
- [37] 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>.
- [38] R.F. Brown, M.N. Rahaman, A.B. Dwilewicz, W. Huang, D.E. Day, Y. Li, B.S. Bal, Effect of borate glass composition on its conversion to hydroxyapatite and on the proliferation of MC3T3-E1 cells, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 88 (2009) 392–400. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31679>.
- [39] J. Ning, A. Yao, D. Wang, W. Huang, H. Fu, X. Liu, X. Jiang, X. Zhang, Synthesis and in vitro bioactivity of a borate-based bioglass, *Mater. Lett.* 61 (2007) 5223–5226. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.04.089>.
- [40] 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, *Mater. Sci. Eng. C.* 29 (2009) 2275–2281.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.05.013>.

- [41] W. Liang, M.N. Rahaman, D.E. Day, N.W. Marion, G.C. Riley, J.J. Mao, Bioactive borate glass scaffold for bone tissue engineering, *J. Non. Cryst. Solids*. 354 (2008) 1690–1696. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2007.10.003>.
- [42] 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>.
- [43] R.G. Furlan, W.R. Correr, A.F.C. Russi, M.R. da Costa Iemma, E. Trovatti, É. Pecoraro, Preparation and characterization of boron-based bioglass by sol-gel process, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 88 (2018) 181–191. <https://doi.org/10.1007/s10971-018-4806-8>.
- [44] L. Bi, M.N. Rahaman, D.E. Day, Z. Brown, C. Samujh, X. Liu, A. Mohammadkhah, V. Dusevich, J.D. Eick, L.F. Bonewald, 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>.
- [45] M. Yamane, Y. Asahara, *Glasses for Photonics*, Cambridge University Press, 2000. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511541308>.
- [46] D.R. Neuville, L. Cormier, D. Caurant, L. Montagne, *From glass to crystal*, EDP Sciences, Les Ulis, France, 2017.
- [47] V. Marghussian, *Nano-Glass Ceramics: Processing, Properties and Applications*, 2015. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-01294-4>.
- [48] I. M. Lifshitz and V. V. Slyozov, The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions, *J. Phys. Chem. Solids*. Vol. 19, (1961) 35–50. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-3697\(61\)90054-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-3697(61)90054-3).
- [49] V.C. Wagner, Theorie der alterung von niederschlägen durch umlosen, *Z. Elektrochem.* 65 (1961) 581–591.
- [50] V.M. Fokin, E.D. Zanotto, J.W.P. Schmelzer, Homogeneous nucleation versus glass transition temperature of silicate glasses, *J. Non. Cryst. Solids*. 321 (2003) 52–65. [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(03\)00089-9](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(03)00089-9).
- [51] L.L. Hench, Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc.* 1993;72:93-98., *J. Am. Ceram. Soc.* 74 (1991) 1487–1510.
- [52] O.P. Filho, G.P. Latorre, L.L. Hench, Effect of crystallization on apatite-layer

- formation of bioactive glass 45S5, *J. Biomed. Mater. Res.* 30 (1996) 509–514. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199604\)30:4<509::AID-JBM9>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199604)30:4<509::AID-JBM9>3.0.CO;2-T).
- [53] O. Peitl, E. Zanotto, L. Hench, Highly bioactive P_2O_5 – Na_2O – CaO – SiO_2 glass-ceramics, *J. Non. Cryst. Solids.* 292 (2001).
- [54] L.C. Feitosa Alves, Estudo da influência do fluoreto de cálcio na bioatividade de vidros borato, Universidade Federal do Maranhão, 2017.
- [55] Q. Zheng, Y. Zhang, M. Montazerian, O. Gulbiten, J.C. Mauro, E.D. Zanotto, Y. Yue, Understanding Glass through Differential Scanning Calorimetry, *Chem. Rev.* 119 (2019) 7848–7939. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00510>.
- [56] C.A. Gressler, J.E. Shelby, Properties and structure of PbO – PbF_2 – B_2O_3 glasses, *J. Appl. Phys.* 66 (1989) 1127–1131. <https://doi.org/10.1063/1.343452>.
- [57] M.D. O'Donnell, P.L. Candarlioglu, C.A. Miller, E. Gentleman, M.M. Stevens, Materials characterisation and cytotoxic assessment of strontium-substituted bioactive glasses for bone regeneration, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 8934–8941. <https://doi.org/10.1039/c0jm01139h>.
- [58] E.B. Ferreira, M.L. Lima, E.D. Zanotto, DSC method for determining the liquidus temperature of glass-forming systems, *J. Am. Ceram. Soc.* 93 (2010) 3757–3763. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2010.03976.x>.
- [59] P.N. Portes, Caracterização e avaliação da bioatividade in vitro do sistema vítreo: $60B_2O_3$ - $5CaF_2$ - $(20-x)Na_2O$ - $(15-x)CaO$ - $2xP_2O_5$ ($x= 0, 1, 2$), Universidade Estadual De Maringá, 2018.
- [60] A. Bajaj, A. Khanna, N.K. Kulkarni, S.K. Aggarwal, Effects of doping trivalent ions in bismuth borate glasses, *J. Am. Ceram. Soc.* 92 (2009) 1036–1041. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2009.03017.x>.
- [61] V. Viallet, V. Seznec, A. Hayashi, M. Tatsumisago, A. Pradel, Glasses and Glass-Ceramics for Solid-State Battery Applications, 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-319-93728-1_50.
- [62] A.R. Boccaccini, Q. Chen, L. Lefebvre, L. Gremillard, J. Chevalier, Sintering, crystallisation and biodegradation behaviour of Bioglass[®]-derived glass-ceramics, *Faraday Discuss.* 136 (2007) 27–44. <https://doi.org/10.1039/b616539g>.
- [63] A. Saranti, I. Koutselas, M.A. Karakassides, Bioactive glasses in the system

- CaO-B₂O₃-P₂O₅: Preparation, structural study and in vitro evaluation, *J. Non. Cryst. Solids.* 352 (2006) 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2006.01.042>.
- [64] X. Zhou, D. Liu, H. Bu, L. Deng, H. Liu, P. Yuan, P. Du, H. Song, XRD-based quantitative analysis of clay minerals using reference intensity ratios, mineral intensity factors, Rietveld, and full pattern summation methods: A critical review, *Solid Earth Sci.* 3 (2018) 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.sesci.2017.12.002>.
- [65] C.R. Hubbard, R.L. Snyder, RIR — Measurement and Use in Quantitative XRD, *Powder Diffr.* 3 (1988) 74–77. <https://doi.org/10.1017/S0885715600013257>.
- [66] O. Sala, *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*, 2 Edição, 2008.
- [67] B.N. Meera, J. Ramakrishna, Raman spectral studies of borate glasses, *J. Non. Cryst. Solids.* 159 (1993) 1–21. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(93\)91277-A](https://doi.org/10.1016/0022-3093(93)91277-A).
- [68] W.L. Konijnendijk, J.M. Stevels, The structure of borate glasses studied by Raman scattering, *J. Non. Cryst. Solids.* 18 (1975) 307–331. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(75\)90137-4](https://doi.org/10.1016/0022-3093(75)90137-4).
- [69] A.K. Yadav, P. Singh, A review of the structures of oxide glasses by Raman spectroscopy, *RSC Adv.* 5 (2015) 67583–67609. <https://doi.org/10.1039/c5ra13043c>.
- [70] V. Timar, R. Lucăcel-ciceo, I. Ardelean, glasses by FT-IR and Raman spectroscopies, *Quantum Electron.* 11 (2008) 221–225.
- [71] S.R. Rejisha, P.S. Anjana, N. Gopakumar, N. Santha, Synthesis and characterization of strontium and barium bismuth borate glass-ceramics, *J. Non. Cryst. Solids.* 388 (2014) 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2014.01.037>.
- [72] Q. Jiao, X. Yu, X. Xu, D. Zhou, J. Qiu, Relationship between Eu³⁺ reduction and glass polymeric structure in Al₂O₃-modified borate glasses under air atmosphere, *J. Solid State Chem.* 202 (2013) 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2013.03.005>.
- [73] J. Ramakrishna, B.N. Meera, Raman spectral studies of borate glasses, *J. Non. Cryst. Solids.* 159 (1993) 1–21.
- [74] T.W. Bril, *Raman Spectroscopy of Crystalline and Vitreous Borates*, Philips Res Rep Suppl. (1976). <https://doi.org/10.6100/IR127808>.

- [75] E.I. Kamitsos, G.D. Chryssikos, Borate glass structure by Raman and infrared spectroscopies, *J. Mol. Struct.* 247 (1991) 1–16. [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(91\)87058-P](https://doi.org/10.1016/0022-2860(91)87058-P).
- [76] I. Notingher, J.R. Jones, S. Verrier, I. Bisson, P. Embanga, P. Edwards, J.M. Polak, L.L. Hench, Application of FTIR and Raman spectroscopy to characterisation of bioactive materials and living cells, *Spectroscopy*. 17 (2003) 275–288. <https://doi.org/10.1155/2003/893584>.
- [77] M. Anastasopoulou, K.C. Vasilopoulos, D. Anagnostopoulos, I. Koutselas, D.K. Papayannis, M.A. Karakassides, Structural and Theoretical Study of Strontium Borophosphate Glasses Using Raman Spectroscopy and ab Initio Molecular Orbital Method, *J. Phys. Chem. B*. 121 (2017) 4610–4619. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b01563>.
- [78] G.E. Walrafen, S.R. Samanta, P.N. Krishnan, Raman investigation of vitreous and molten boric oxide, *J. Chem. Phys.* 72 (1980) 113–120. <https://doi.org/10.1063/1.438894>.
- [79] S. Solgi, M.J. Tafreshi, M.S. Ghamsari, A novel method for synthesis of CaB_4O_7 compound using ammonium pentaborate, *Mater. Res. Express*. 6 (2019). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab098c>.
- [80] L. Jun, X. Shuping, G. Shiyang, FT-IR and Raman spectroscopic study of hydrated borates, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* 51 (1995) 519–532. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(94\)00183-C](https://doi.org/10.1016/0584-8539(94)00183-C).
- [81] B.R.W. Openka, J.O.H.N.J.F. Reeman, E.D.G. Rew, Raman spectroscopic identification of B-free and B-rich kornerupine (prismatine), 84 (1999) 550–554.
- [82] B. Lafuente, R.T. Downs, H. Yang, N. Stone, The power of databases: The RRUFF project, *Highlights Mineral. Crystallogr.* (2016) 1–29. <https://doi.org/10.1515/9783110417104-003>.
- [83] J. Fayos, R.A. Howie, F.P. Glasser, Structure of calcium sodium pentaborate, *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 41 (1985) 1394–1396. <https://doi.org/10.1107/s0108270185007909>.
- [84] J. Fayos, R.A. Howie, F.P. Glasser, Structure of calcium trisodium pentaborate, *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 41 (1985) 1396–1398. <https://doi.org/10.1107/s0108270185007910>.
- [85] H. Mohmoh, M. Ouchetto, M. Couzi, J.P. Chaminade, E. Arbib, B. Elouadi,

- Structural Relationship Between Vitreous P_2O_5 and Its Relevant Crystalline Polymorphs By Raman Spectroscopy, *Phosphorus Res. Bull.* 13 (2002) 187–192. https://doi.org/10.3363/prb1992.13.0_187.
- [86] A. Rulmont, M. Almou, Vibrational spectra of metaborates with infinite chain structure: $LiBO_2$, CaB_2O_4 , SrB_2O_4 , *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* 45 (1989) 603–610. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(89\)80013-3](https://doi.org/10.1016/0584-8539(89)80013-3).
- [87] S.O. Rogero, A.B. Lugão, T.I. Ikeda, Á.S. Cruz, Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias, *Mater. Res.* 6 (2003) 317–320. <https://doi.org/10.1590/s1516-14392003000300003>.
- [88] P.F. James, Kinetics of crystal nucleation in silicate glasses, *J. Non. Cryst. Solids.* 73 (1985) 517–540. [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(85\)90372-2](https://doi.org/10.1016/0022-3093(85)90372-2).
- [89] E.D. Zanotto, M.C. Weinberg, Trends in homogeneous crystal nucleation in oxide glasses, *Phys. Chem. Glas.* 30 (1989) 186–192.
- [90] J. Shen, B. Jin, Q. ying Jiang, Y. min Hu, X. yan Wang, Morphology-controlled synthesis of fluorapatite nano/microstructures via surfactant-assisted hydrothermal process, *Mater. Des.* 97 (2016) 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2016.02.091>.
- [91] Y.J. Wu, Y.H. Tseng, J.C.C. Chan, Morphology control of fluorapatite crystallites by citrate ions, *Cryst. Growth Des.* 10 (2010) 4240–4242. <https://doi.org/10.1021/cg100859m>.
- [92] C. Moisescu, G. Carl, R. Keding, W.D. Heerdegen, Influence of the Ca / P ratio on the morphology of fluorapatite crystals in $SiO_2-Al_2O_3-CaO-P_2O_5-K_2O$ glass-ceramics, *J. Non. Cryst. Solids.* 289 (2001).
- [93] E.A. Ostrosky, M.K. Mizumoto, M.E.L. Lima, T.M. Kaneko, S.O. Nishikawa, B.R. Freitas, Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais, *Rev. Bras. Farmacogn.* 18 (2008) 301–307. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2008000200026>.
- [94] M. Bellantone, H.D. Williams, L.L. Hench, Broad-Spectrum Bactericidal Activity of Ag_2O -Doped Bioactive Glass. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (2002) 1940–1945. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1940>.
- [95] T. Mosmann, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunological Methods*.

- (1983) 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [96] P.P. Lopes, B.J.M. Leite Ferreira, P.S. Gomes, R.N. Correia, M.H. Fernandes, M.H.V. Fernandes, Silicate and borate glasses as composite fillers: A bioactivity and biocompatibility study, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (2011) 1501–1510. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4331-6>.