

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

RAQUEL DA SILVA PALÁCIOS

**ESTUDO DE COMPÓSITOS DE VIDRO DE CÁLCIO-SÓDIO-BORATO E
HIDROXIAPATITA: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
BIOATIVIDADE *IN VITRO***

Maringá
2023

RAQUEL DA SILVA PALÁCIOS

**ESTUDO DE COMPÓSITOS DE VIDRO DE CÁLCIO-SÓDIO-BORATO E
HIDROXIAPATITA: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
BIOATIVIDADE *IN VITRO***

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

Orientadora: Profa Dra Francielle Sato
Coorientadora: Profa Dra Franciana Pedrochi

Maringá
2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

P154e Palácios, Raquel da Silva
Estudo de compósitos de vidro de Cálcio-Sódio-Borato e Hidroxiapatita: :
caracterização e avaliação da bioatividade in vitro / Raquel da Silva Palácios. -- Maringá,
PR, 2023.
143 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Francielle Sato.
Coorientadora: Profa. Dra. Franciana Pedrochi.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas,
Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, 2023.

1. Vidro bioativo. 2. Tratamento térmico. 3. Hidroxiapatita. 4. Bioatividade. 5.
Compósitos. I. Sato, Francielle, orient. II. Pedrochi, Franciana, coorient. III. Universidade
Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física. Programa de
Pós-Graduação em Física. IV. Título.

CDD 23.ed. 530.412

RAQUEL DA SILVA PALÁCIOS

**ESTUDO DE COMPÓSITOS DE VIDRO DE CÁLCIO-SÓDIO-BORATO E
HIDROXIAPATITA: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
BIOATIVIDADE *IN VITRO***

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

Aprovado em: Maringá, 20 de janeiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof.^a Dr.^a Andressa Novatski
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Vitor Santaella Zanuto
Universidade Estadual de Maringá

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me apoiaram durante esta etapa da minha vida, em especial aos meus pais Ramão e Irenilda, sou muito grata por tê-los comigo e poder dividir os momentos de conquista.

Aos meus irmãos, Fernando, Rafael, Rodrigo (*in memoriam*), Renato e Renan, embora hoje cada um siga seu caminho, sempre farão parte do que sou.

Ao Jean Michel, por estar sempre ao meu lado me apoiando.

À minha orientadora, Profa. Dra. Francielle Sato, a “chefa”, pela paciência, disposição e por sua dedicação e competência ao me orientar, por entender situações que outra pessoa não entenderia.

Ao Prof. Dr. Antonio Medina Neto, por toda a sua dedicação e contribuição com este trabalho.

Ao Prof. Dr. Wilson Ricardo Weinand, a quem tive o prazer de conhecer e trabalhar, sempre disposto a ajudar e partilhar seus conhecimentos, muito obrigada Professor!

Aos demais professores e integrantes do PFI que de alguma forma contribuíram nessa jornada, em especial à Mônica pela disposição e paciência em auxiliar nos assuntos relacionados à pós-graduação.

Aos amigos e colegas adquiridos no decorrer do doutorado, em especial a Adriane, Lidiane e Mariana que participaram e contribuíram em diversos momentos, são amizades que levarei para a vida.

Ao grupo LEOF, à Profa. Dra. Franciana Pedrochi e ao Prof. Dr. Alysson Steimacher da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) pela parceria e disponibilização das amostras.

Ao Dr. Eduardo Volnistem pelo auxílio com as micrografias.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, pela colaboração científica, e em especial, à Nilma Fernandes e Karina Miyuki Retamiro por realizarem os ensaios biológicos apresentados neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) pelo apoio financeiro.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), por toda infraestrutura disponível para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participar da defesa de doutorado e pelas contribuições acerca deste trabalho.

Enfim, agradeço de coração todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Obrigada!

RESUMO

O presente trabalho apresenta a preparação e caracterização de compósitos a partir de vidro bioativo borato ($60\text{BO}_3\text{-}8\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5\text{-}18\text{Na}_2\text{O-}10\text{CaF}_2$) e hidroxiapatita nas concentrações de 75, 50 e 25%, em massa, denominados 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25VB75HAp, respectivamente. Para a produção dos compósitos, os precursores fragmentados foram compactados e submetidos ao tratamento térmico em 810°C . Para comparação, também foram analisados os precursores individualmente nas mesmas condições que os compósitos. Nos compósitos foram identificadas as fases cristalinas $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$, CaNaB_5O_9 , fluorapatita, também presentes no vidro, NaCaPO_4 e CaB_2O_4 , resultantes da decomposição das fases de borato e reação com hidroxiapatita, além da hidroxiapatita, por meio da técnica de DRX. As espectroscopias vibracionais Raman e FTIR-ATR identificaram as mesmas fases cristalinas indexadas pela técnica de DRX, e adicionalmente, a fase β -TCP no compósito 25VB75HAp. As micrografias mostraram duas estruturas diferentes nos compósitos, referentes à hidroxiapatita e ao vidro, e mudanças na morfologia dependentes da composição dos compósitos. Os compósitos e precursores foram submetidos a teste de bioatividade *in vitro* com imersão em SBF durante 28 dias, e também foram avaliados em todos os períodos. Foi observado aumento no pH e perda de massa em todas as amostras no período avaliado, sendo a maior variação nas primeiras horas. As micrografias, no período pós-imersão, mostraram a formação de uma camada superficial nos compósitos com menos de um dia de imersão em SBF, corroborando com os resultados obtidos pela técnica de FTIR-ATR, que forneceu espectros da superfície dos compósitos com bandas associadas aos modos de vibração do fosfato de cálcio, inicialmente de características mais amorfas, e comportamento de cristalização em maiores períodos de imersão. A técnica de DRX mostrou a ausência das fases com borato nos compósitos, já nos primeiros períodos analisados, indicando que sua dissolução ocorre de maneira mais rápida, já a HAp se manteve presente em todos os períodos de imersão, enquanto a NaCaPO_4 diminuiu na ausência das fases de borato. Os compósitos apresentaram uma boa viabilidade celular e ação cicatrizante. Com as análises realizadas, os compósitos 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25VB75HAp, formados por fases cristalinas de borato e fosfato, se apresentaram bioativos, não citotóxicos e alguns potencialmente promissores como agentes cicatrizantes.

Palavras-chave: Vidro bioativo. Hidroxiapatita. Compósitos. Tratamento térmico. Bioatividade.

ABSTRACT

This work presents the preparation and characterization of composites from bioactive borate glass ($60\text{BO}_3\text{-}8\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5\text{-}18\text{Na}_2\text{O-}10\text{CaF}_2$) and hydroxyapatite at concentrations of 75, 50 and 25%, by weight, designated as 75VB25HAp, 50VB50HAp and 25VB75HAp, respectively. To prepare the composites, precursors, in powder, were compacted and thermal treated at 810°C . For comparison, the precursors were also analyzed individually under the same conditions as the composites. The crystalline phases $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$, CaNaB_5O_9 , fluorapatite, was also present in glass, NaCaPO_4 and CaB_2O_4 , resulting from the decomposition of the borate phases and reaction with hydroxyapatite. They were identified in the composites using the XRD technique. Hydroxyapatite was also identified. By means of vibrational Raman and FTIR-ATR spectroscopies, the same crystalline phases indexed by the XRD technique were identified, and additionally the β -TCP phase in the 25VB75HAp composite. The micrographs showed two different structures in the composites, referring to hydroxyapatite and glass, and changes in morphology dependent on the composition of the composites. The composites and precursors were submitted to an *in vitro* bioactivity test with immersion in SBF for 28 days. Post-immersion periods composites and precursors were evaluated. An increase in pH and loss of mass was observed in all samples over the evaluated period, with the major variation in the first hours. The micrographs in the post-immersion period showed the formation of superficial layer on the composites, before the one day of immersion in SBF, corroborating the results obtained by the FTIR-ATR technique, which provided surface spectra of the composites with bands associated to vibrational modes of calcium phosphate, initially with amorphous features, and crystallization behavior in longer periods of immersion. The XRD technique showed the absence of borate phases in the composites, already in the first analyzed periods, indicating that its dissolution occurs more quickly, since HAp remained present in all immersion periods, while NaCaPO_4 decreased in the absence of the borate phases. The composites showed good cell viability and healing action. With the analyzes carried out, the composites 75VB25HAp, 50VB50HAp and 25VB75HAp formed by crystalline phases of borate and phosphate showed to be bioactive, non-cytotoxic and some potentially promising as healing agents.

Keywords: Bioactive glass. Hydroxyapatite. Composites. Heat treatment. Bioactivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2. 1: Efeito da temperatura na entalpia durante o processo de resfriamento do vidro. Adaptado de [27].	18
Figura 2. 2: Representação das cinco principais unidades estruturais do Boro. (Em azul o Boro tetraédrico; em azul claro o Boro trigonal; em vermelho as pontes de Oxigênio e, em rosa, átomos de Oxigênio sem ponte). Adaptado de [32].	19
Figura 2. 3: Unidades superestruturais presentes nos vidros borato. Adaptado de [32]	20
Figura 2. 4: Ilustração do mecanismo de reação de formação de HCA na superfície de vidro bioativo à base de silicato. Adaptado de [47].	24
Figura 2. 5: Ilustração dos mecanismos de conversão de vidro de borato e silicato em HCA em solução de fosfato. Adaptado de [48].	25
Figura 2. 6: Estrutura 3D da molécula de Hidroxiapatita. Esferas azuis (Ca) – Cálcio, esferas roxas (P) – Fósforo, esferas vermelhas (O) – Oxigênio. Obtido com a ficha JCPDS no. 09-0432 no programa gratuito Vesta.	26
Figura 2. 7: Fluxograma dos processos para a sinterização.	28
Figura 2. 8: Esquema do processo de prensa da amostra (a) ilustra as partes da matriz, temos o punção inferior fixo, a câmara onde a amostra será acomodada e o punção superior, que é móvel e o que sofrerá deslocamento com a aplicação da pressão (b) ilustra a conformação da amostra enquanto a pressão é aplicada (c) ilustra o processo para retirar a amostra compactada da matriz.	29
Figura 2. 9: Estágio 1: Grãos antes da sinterização. Estágio 2: Estágios iniciais da sinterização, quando ocorrem contato dos grãos e o ângulo entre eles tornam-se mais raso e temos a formação de pescoços. Estágio 3: Estágio intermediário de sinterização, quando ocorre uma maior evolução do pescoço e poros difusos nos limites de grão (LG). Estágio 4: Estágio final da sinterização, no geral alguns poros são eliminados, isolados e poros fechados aparecem. A área de contato LG entre grãos aumenta gradativamente e ocorre densificação durante a sinterização. Adaptado de [66].	30
Figura 2. 10: Curva de expansão térmica. Adaptado de [67].	31
Figura 3. 1: Representação esquemática da metodologia adotada.	35
Figura 3. 2: Amostras após tratamento térmico. (VB _t : Vidro Bioativo tratado termicamente)	39
Figura 3. 3: Esquema do procedimento de imersão das amostras em SBF.	42
Figura 4. 1: Distribuição do tamanho de partículas das amostras de hidroxiapatita (HAp), vidro bioativo borato (VB _{st}) e dos compósitos de HAp e VB: 75HAp25VB, 50HAp50VB e 25HAp75VB, sem tratamento térmico.	45
Figura 4. 2: Imagens de MEV das amostras em pó, antes do tratamento térmico a) HAp, b) VB _{st} , c) 75HAp25VB, d) 50HAp50VB, e) 25HAp75VB.	46
Figura 4. 3: Termogramas das amostras em pó sem tratamento térmico: vidro bioativo borato (VB _{st}), hidroxiapatita (HAp) e compósitos HAp-VB: 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25VB75HAp.	48
Figura 4. 4: Difractogramas de raios X para (a) amostra de VB _t , com a indexação da fase CaNaB ₅ O ₉ (JCPDS # 078-0294), CaNa ₃ B ₅ O ₁₀ (JCPDS # 078-0295) e FAp (JCPDS # 071-0881), (b) amostra de HAp (JCPDS # 074-0565).	50
Figura 4. 5: Difractogramas de raios X para a amostra de 75VB25HAp, com a indexação da fase CaNaB ₅ O ₉ (JCPDS # 078-0294), FAp (JCPDS # 071-0881), NaCaPO ₄ (JCPDS # 076-1456) e HAp (JCPDS # 074-0565).	52
Figura 4. 6: Difractogramas de raios X para a amostra de 50VB50HAp, com a indexação da fase HAp (JCPDS # 074-0565), CaNaB ₅ O ₉ (JCPDS # 078-0294), CaB ₂ O ₄ (JCPDS # 076-0747), NaCaPO ₄ (JCPDS # 076-1456) e FAp (JCPDS # 076-0558).	54

Figura 4. 7: Difractogramas de raios X para a amostra de 75VB25HAp, com a indexação da fase HAp (JCPDS # 074-0565), CaB ₂ O ₄ (JCPDS # 076-0747), NaCaPO ₄ (JCPDS # 076-1456) e FAp(JCPDS # 076-0558).....	55
Figura 4. 8: Difractogramas das amostras (a) VB _t (em preto), 75VB25HAp (em laranja), 50VB50HAp (em verde), 25VB75HAp (em rosa) e HAp (em preto). Em vermelho, o difratograma do porta amostra e em azul, a área amorfa refratada calculada. (b) Índice de cristalinidade obtido para as amostras, a linha é apenas um guia visual.	57
Figura 4. 9: Espectro Raman da hidroxiapatita (HAp) à 810 ⁰ C. No detalhe a região espectral referente aos modos vibracionais do grupo químico fosfato (PO ₄ ³⁻).....	58
Figura 4. 10: Espectro Raman do vidro bioativo após tratamento térmico à 810°C (VB _t) com indexação fases CaNaB ₅ O ₉ (em vermelho) [93], CaNa ₃ B ₅ O ₁₀ (em azul) [118] e FAp (RRUFF R040098-3) (em roxo)[119].	59
Figura 4. 11: Espectros Raman dos compósitos (a) 75VB25HAp, (b)50VB50HAp e (c) 25VB75HAp com indexação das fases CaNaB ₅ O ₉ (em vermelho), CaNa ₃ B ₅ O ₁₀ [118] (em azul), FAp RUUFF R040098-3 [119] (em roxo), NaCaPO ₄ [126] (em preto) e CaB ₂ O ₄ [121] (em cinza). A HAp (em azul claro) está como indexação para melhor visualização.	61
Figura 4. 12: Espectros Raman dos materiais tratados termicamente à 810°C: vidro bioativo (VB _t) e dos compósitos 75VB25HAp, 50VB50HAp, 25VB75HAp na região espectral entre 980 e 940cm ⁻¹ , banda do modo vibracional $\nu_{s1}PO_4^{3-}$. As linhas tracejadas indicam as posições das bandas referentes à fluorapatita (FAp) RUUFF R040098-3 [119], hidroxiapatita (HAp) e β -tricálcio fosfato (β -TCP) [127]......	62
Figura 4. 13: Espectros Raman do a) vidro bioativo tratado (VB _t) à 810°C e compósitos: b)75VB25HAp, c)50VB50HAp e d)25VB75HAp na região entre 1570 e 1270cm ⁻¹ ajustados com funções gaussianas. Sendo as gaussianas hachuradas as fases identificadas em cada material: CaNaB ₅ O ₉ (vermelho), CaNa ₃ B ₅ O ₁₀ (azul) e CaB ₂ O ₄ (cinza). As gaussianas sem hachurar foram identificadas como sendo da CaNaB ₅ O ₉ e/ou CaNa ₃ B ₅ O ₁₀ . Os círculos abertos são os espectros Raman experimentais e a linha contínua em rosa a soma das funções gaussianas.	64
Figura 4. 14: Comparação entre a área da região dos espectros Raman entre 1035 e 1000cm ⁻¹ e o cálculo de RIR obtido pela técnica de DRX em função da concentração de vidro bioativo tratado termicamente (VB _t), referentes à presença da fase NaCaPO ₄ . No detalhe, a região espectral dos espectros Raman utilizada para o cálculo da área nos compósitos. A linha tracejada indica a posição da banda de NaCaPO ₄	64
Figura 4. 15: Espectros de FTIR-ATR da HAp à 810°C.	66
Figura 4. 16: Espectros de FTIR-ATR do VB _t à 810°C com indexação das fases CaNaB ₅ O ₉ (em vermelho) [93], CaNa ₃ B ₅ O ₁₀ (em azul) [118] e FAp (em roxo) (RRUFF ID: R040098.1) [119].	67
Figura 4. 17: Espectros de FTIR-ATR do VB _t comparado aos compósitos 75VB25HAp, 50VB50HAp, 25VB75HAp. Na parte inferior há a indexação da posição das bandas de absorção das fases identificadas: NaCaPO ₄ (na cor preta) [138], CaB ₂ O ₄ (na cor cinza) [139], CaNaB ₅ O ₉ (na cor vermelha) [93], CaNa ₃ B ₅ O ₁₀ (na cor azul) [118], FAp (na cor roxa) (RRUFF ID: R040098.1) [119], HAp (na cor azul claro) e β -TCP (na cor amarela) [117]. Os asteriscos estão coloridos da mesma cor que as indexações destacando bandas da reação entre o VB e HAp.	68
Figura 4. 18: Imagens de MEV obtidas para a amostra de HAp a) Superfície, b) Fratura.	71
Figura 4. 19: Imagens de MEV obtidas para a amostra de VB _t a) Superfície, b) Fratura.....	72
Figura 4. 20: Imagens de MEV obtidas para a amostra de 75VB25HAp a) Superfície, b) Fratura.....	73
Figura 4. 21: Imagens de MEV obtidas para a amostra de 50HAp50VB a) Superfície, b) Fratura.....	74

Figura 4. 22: Imagens de MEV obtidas para a amostra de 25VB75HAp a) Superfície, b) Fratura.....	75
Figura 4. 23: Variação do pH da solução em função do tempo de imersão para as amostras (n =2) VB _t , HAp, 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25VB75HAp. As linhas são guias visuais.....	77
Figura 4. 24: Percentual de perda de massa função do tempo de imersão para as amostras (n =2) VB _t , HAp, 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25Vb75HAp. As linhas são guias visuais.	79
Figura 4. 25: Fotografia das amostras VB _t , HAp, 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25VB75HAp em todos os períodos de imersão.	81
Figura 4. 26: Micrografia de superfície de VB _t após imersão em SBF nos períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias. Controle é amostra sem imersão.	82
Figura 4. 27: Micrografia de superfície de HAp após imersão em SBF nos períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias. Controle é amostra sem imersão.	83
Figura 4. 28: Micrografia de superfície de 75VB25HAp após imersão em SBF nos períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias. Controle é amostra sem imersão.	84
Figura 4. 29: Micrografia de superfície de 50VB50HAp após imersão em SBF nos períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias. Controle é amostra sem imersão.	85
Figura 4. 30: Micrografia de superfície de 25VB75HAp após imersão em SBF nos períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias. Controle é amostra sem imersão.	86
Figura 4. 31: Espectros de FTIR-ATR da amostra VB _t após os períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): CaNaB ₅ O ₉ (em vermelho) [89], CaNa ₃ B ₅ O ₁₀ (em azul) [114] e FAp (em roxo) RRUFF ID: R040098.1 [115]. VB _t indica a amostra sem imersão e os pontos em preto destacam a formação da camada CaP.	89
Figura 4. 32: Espectros de FTIR-ATR da amostra HAp após os períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação da fase cristalina (linha na vertical) HAp (em azul claro) [33]. HAp indica a amostra sem imersão.	90
Figura 4. 33: Espectros de FTIR-ATR da amostra 75VB25HAp após os períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): CaNaB ₅ O ₉ (vermelho) [89], CaNa ₃ B ₅ O ₁₀ (azul escuro) [114], FAp (roxo) RRUFF ID: R040098.1[115] e a HAp (azul claro). 75VB25HAp indica a amostra sem imersão. As bandas indicadas por asteriscos destacam as bandas das fases que não apresentam sobreposição com bandas das outras fases. Pontos em preto destacam a formação da camada CaP.....	91
Figura 4. 34: Espectros de FTIR-ATR da amostra 50VB50HAp após os períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): NaCaPO ₄ (preto) [138], CaNaB ₅ O ₉ (vermelho) [93], CaNa ₃ B ₅ O ₁₀ (azul escuro) [118], FAp RRUFF ID: R040098.1[119] e a HAp (azul claro). 75VB25HAp indica a amostra sem imersão. As bandas indicadas por asteriscos destacam as bandas das fases que não apresentam sobreposição com bandas das outras fases. Pontos em preto destacam a formação da camada CaP.	93
Figura 4. 35: Espectros de FTIR-ATR da amostra 25VB75HAp após os períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): NaCaPO ₄ (preto) [138], CaB ₂ O ₄ (em cinza) [139] , FAp RRUFF ID: R040098.1 [119], HAp (azul claro) e a β-TCP (em amarelo). 25VB75HAp indica a amostra sem imersão. As bandas indicadas por asteriscos destacam as bandas das fases que não apresentam sobreposição com bandas das outras fases. O símbolo ◆ indica bandas relacionadas ao carbonato. Pontos em preto destacam a formação da camada CaP.....	95
Figura 4. 36: Difrátogramas da superfície de VB _t após 0,04; 1; 4; 14 e 28 dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. O símbolo * indica a indexação da fase cristalina CaNaB ₅ O ₉ (JCPDS # 078-0294).....	96

Figura 4. 37: Difratoogramas da superfície da amostra 75VB25H após 0,04, 1, 4 e 14 dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. Os símbolos *, Δ e ◦ indicam a indexação das fases cristalinas CaNaB ₅ O ₉ (JCPDS # 078-0294), NaCaPO ₄ (JCPDS # 076-1456) e Fap (JCPDS # 071-0881), respectivamente.....	98
Figura 4. 38: Difratoogramas da superfície da amostra 50VB50Hap após 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7 e 14, dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. Os símbolos *, Δ, ● e ◇ indicam a indexação das fases cristalinas CaNaB ₅ O ₉ (JCPDS # 078-0294), NaCaPO ₄ (JCPDS # 076-1456), Hap (JCPDS # 074-0565) e CaB ₂ O ₄ (JCPDS # 076-0747), respectivamente.	99
Figura 4. 39: Difratoogramas da superfície da amostra 25VB75HAp após 0,04, 1, 4, 14 e 28, dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. Os símbolos Δ, ● e ◇ indicam a indexação das fases cristalinas NaCaPO ₄ (JCPDS 076-1456), HAp (JCPDS 074-0565) e CaB ₂ O ₄ (JCPDS 076-0747), respectivamente.	100
Figura 4. 40: Difratoogramas da superfície da amostra HAp após 0,04, 1, 4, 14 e 28, dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. O símbolo ● indicam a indexação da fase HAp (JCPDS 074-0565)	101
Figura 4. 41: Viabilidade celular realizada em diferentes concentrações 100, 400, 700 e 1000 μg/mL das amostras VB _t , 75VB25HAp, 50VB50HAp, 25VB75HAp e HAp durante 24 horas de incubação. A concentração 0 μg/mL é o controle. Os símbolos *, ** e *** indicam que há diferença estatística entre as amostras e ns que não houve diferença (p<0,05). As barras de erro são referentes a n = 3.	103
Figura 4. 42: Imagens da prancha do ensaio de migração celular para avaliação da cicatrização.	106
Figura 4. 43: Porcentagem da capacidade de migração das células incubadas para as amostras HAp, 25VB75HAp, 50VB50HAp, 75VB25HAp e VB _t por 24 h de incubação. 0 μg/mL é o controle. As barras de erro são referentes a n = 3.	107
Figura A 1: Espectros de FTIR-ATR da amostra VB _t após os períodos de 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): CaNaB ₅ O ₉ (em vermelho) [90], CaNa ₃ B ₅ O ₁₀ (em azul) [118] e FAp (em roxo) RRUFF ID: R040098.1 [119]. VB _t indica a amostra sem imersão e os pontos em preto destacam a formação da camada CaP.	110
Figura A 2: Espectros de FTIR-ATR da amostra HAp após os períodos de 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação da fase cristalina (linha na vertical) HAp (em azul claro) [33]. HAp indica a amostra sem imersão.	111
Figura A 3: Espectros de FTIR-ATR da amostra 75VB25HAp após os períodos de 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): CaNaB ₅ O ₉ (vermelho) [93], CaNa ₃ B ₅ O ₁₀ (azul escuro) [118], FAp (roxo) RRUFF ID: R040098.1[119] e a HAp (azul claro). 75VB25HAp indica a amostra sem imersão. As bandas indicadas por asteriscos destacam as bandas das fases que não apresentam sobreposição com bandas das outras fases. Pontos em preto destacam a formação da camada CaP.	112
Figura A 4: Espectros de FTIR-ATR da amostra 50VB50HAp após os períodos de 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): NaCaPO ₄ (preto) [138], CaNaB ₅ O ₉ (vermelho) [93], CaNa ₃ B ₅ O ₁₀ (azul escuro) [118], FAp RRUFF ID: R040098.1[119] e a HAp (azul claro). 50VB50HAp indica a amostra sem imersão. As bandas indicadas por asteriscos destacam as bandas das fases que não apresentam sobreposição com bandas das outras fases. Pontos em preto destacam a formação da camada CaP.....	113
Figura A 5: Espectros de FTIR-ATR da amostra 25VB75HAp após os períodos de 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas	

(linhas na vertical): NaCaPO ₄ (preto) [138], CaB ₂ O ₄ (em cinza) [139], FAp RRUFF ID: R040098.1 [119], HAp (azul claro) e a β-TCP (em amarelo). 25VB75HAp indica a amostra sem imersão. As bandas indicadas por asteriscos destacam as bandas das fases que não apresentam sobreposição com bandas das outras fases. O símbolo ◆ indica bandas relacionadas ao carbonato. Pontos em preto destacam a formação da camada CaP.	114
Figura A 6: Difratomogramas da superfície de VB _t após 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. O símbolo * indica a indexação da fase cristalina CaNaB ₅ O ₉ (JCPDS # 078-0294).	115
Figura A 7: Difratomogramas da superfície da amostra HAp após 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28, dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. O símbolo ● indicam a indexação da fase HAp (JCPDS # 074-0565)	116
Figura A 8: Difratomogramas da superfície da amostra 75VB25H após 0,04,0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7 e 14 dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. Os símbolos *, Δ e ◦ indicam a indexação das fases cristalinas CaNaB ₅ O ₉ (JCPDS # 078-0294), NaCaPO ₄ (JCPDS # 076-1456) e FAp (JCPDS # 071-0881), respectivamente.	117
Figura A 9: Difratomogramas da superfície da amostra 50VB50HAp após 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. Os símbolos *, Δ, ● e ◆ indicam a indexação das fases cristalinas CaNaB ₅ O ₉ (JCPDS # 078-0294), NaCaPO ₄ (JCPDS # 076-1456), HAp (JCPDS # 074-0565) e CaB ₂ O ₄ (JCPDS # 076-0747), respectivamente.	118
Figura A 10: Difratomogramas da superfície da amostra 25VB75HAp após 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28, dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. Os símbolos Δ, ● e ◆ indicam a indexação das fases cristalinas NaCaPO ₄ (JCPDS # 076-1456), HAp (JCPDS # 074-0565) e CaB ₂ O ₄ (JCPDS # 076-0747), respectivamente	119
Figura B 1: DSC com fluxo de calor. Adaptado de [168]......	120
Figura B 2: Um exemplo de curva de DSC apresentando a mudança no calor específico na transformação do vidro, um pico exotérmico devido a cristalização do vidro (Tx) e um endotérmico devido a fusão (Tm). No detalhe um exemplo de como determinar a temperatura de transição vítrea (Tg). Adaptado de [27]......	120
Figura B 3: As 14 possíveis configurações espaciais das células unitárias. Sendo P a célula unitária primitiva ou simples; I a célula de corpo centrado; F de face centrada e C de célula centrada uma única face. Adaptado de [182].	122
Figura B 4: Esquema da difração de Bragg entre os planos cristalinos. Adaptado de [34]. .	122
Figura B 5: Exemplos de difratogramas característicos para amostra cristalina e amostra amorfa. Adaptado de [172]......	123
Figura B 6: Esquema dos tipos de espalhamento: inelástico Raman Stokes, elástico Rayleigh e inelástico Raman anti-Stokes. Adaptado de [108]......	125
Figura B 7: Diagrama esquemático do acessório de ATR para espectrômetro de FTIR. n ₁ e n ₂ são os índices de refração do cristal de ATR e da amostra, respectivamente (n ₁ > n ₂), e θ é o ângulo de incidência da radiação incidente. Adaptado de [178].	126
Figura B 8: Esquema de funcionamento do Microscópio Eletrônico de Varredura. Adaptado de [181]......	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1: Concentrações das amostras	38
Tabela 4. 1: Temperaturas e parâmetros obtidos por meio do DSC para as amostras em pó. .	49
Tabela 4. 2: Comparação de VB _t e compósitos com HAp para as concentrações testadas no teste de citotoxicidade <i>in vitro</i>	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -TCP	α -fosfato tricálcico
β -TCP	β -fosfato tricálcico
ACP	Fosfato de cálcio amorfo
CaB ₂ O ₄	Calciborite
CaNa ₃ B ₅ O ₁₀	Pentaborato Trissódico de Cálcio
CaNaB ₅ O ₉	Pentaborato de Sódio e Cálcio
CaP	Fosfato de Cálcio
COD	<i>Crystallography Open Database</i>
COMCAP	Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa
DRX	Difratometria de Raios-X
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DSL	<i>Dynamic Light Scattering</i>
FAP	Fluorapatita
FTIR-ATR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada a Reflectância Total Atenuada
HAp	Hidroxiapatita
HCA	Hidroxicarbonato apatita
Ic	Índice de cristalinidade
ICDD	<i>International Center for Diffraction Data</i>
ICSD	<i>Inorganic Crystal Structure Database</i>
JCPDS	<i>Joint Committee of Powder Diffraction Standards</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Na ₂ O	Óxido de sódio
NaCaPO ₄	Renanita
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
SBF	<i>Simulated Body Fluid</i>
T _g	Temperatura de transição vítrea
T _L	Temperatura de início de fusão
T _X	Temperatura de início de cristalização
T _m	Temperatura de fusão
U _s	Estiramentos simétricos
VB _{st}	Vidro bioativo sem tratamento térmico
VB _t	Vidro bioativo tratado termicamente

Sumário

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 - VIDROS	17
2.1.1 – Vidros Boratos.....	19
2.1.2 – Vidros Bioativos e Vitrocerâmicas.....	20
2.1.2.1 – Mecanismo de formação da camada de apatita	23
2.2 – HIDROXIAPATITA (HAP)	25
2.3 – COMPÓSITOS.....	27
3.4 – COMPÓSITOS BIOATIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 AMOSTRAS.....	36
3.1.1 Preparação dos precursores	36
3.1.2 Obtenção dos compósitos em diferentes concentrações de HAp e VB _{st}	37
3.2 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	39
3.2.1 Distribuição de tamanho de partícula	39
3.2.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	40
3.2.3 Difractometria de Raios X (DRX).....	40
3.2.4 Espectroscopia Raman.....	40
3.2.5 Espectroscopia FTIR-ATR	41
3.2.6 Microscopia de varredura eletrônica (MEV).....	41
3.3 TESTE DE BIOATIVIDADE IN VITRO	41
3.3.1 Imersão em Fluido Corporal Simulado (SBF).....	41
3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO	42
3.4.1 Avaliação da viabilidade celular <i>in vitro</i> pelo método colorimétrico MTT	43
3.4.2 Ensaio de Cicatrização de Feridas (<i>Wound Healing Assay</i> – WHA)	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 TAMANHO E MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS DOS PÓS DOS PRECURSORES E COMPÓSITOS SEM TRATAMENTO TÉRMICO	44
4.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	47
4.3 DIFRACTOMETRIA DE RAIOS X (DRX)	49
4.4 ESPECTROSCOPIA RAMAN	57
4.5 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR)	65
4.6 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	71
4.7 TESTES DE BIOATIVIDADE	76
4.7.1 Curvas de pH e perda de massa	76
4.7.2 Análise da superfície das amostras	80
4.7.2.1 MEV	81
4.7.2.2 FTIR-ATR	87
4.7.2.3 DRX.....	95
4.7.3 Teste de citotoxicidade e de cicatrização	102
5. CONCLUSÃO.....	108
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	109
7. APÊNDICE	110

A - INFORMAÇÕES ADICIONAIS RESULTADOS.....	110
B - TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	119
8. REFERÊNCIAS	129

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Em muitos casos, quando há lesão ou trauma em algum membro do corpo, se faz necessário a utilização de materiais com características específicas para substituir a perda, situações que eram comuns, por exemplo, em tempos de conflitos e guerras, quando muitos homens perdiam membros. Atualmente, tais perdas estão sendo ocasionadas em sua maioria devido à acidentes em processos industriais, acidentes de trânsito, uma maior expectativa de vida e até mesmo por questões estéticas, estimulando desta maneira o estudo de diversos materiais que podem ser utilizados quando se trata de substituição de membros [1-3]. Nesse sentido, pesquisas em biomateriais têm ganhado destaque entre pesquisadores e indústrias, pois cada vez se faz mais necessário materiais com aplicabilidade aprimorada para a sociedade [4,5].

As novas gerações de biomateriais têm sido desenvolvidas e, permitido processos de renovação e regeneração de tecidos vivos por meio de estímulos em nível molecular com a combinação das propriedades bioativas e reabsorvíveis [6,7]. As pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de novos tipos de materiais que estimulem uma reação bioquímica do tecido vivo, a fim de obter uma forte ligação química com integração biológica entre o material e o tecido [8,9]. O vidro bioativo 45S5 (Bioglass®) desenvolvido por Larry Hench em 1971 [10] é o mais antigo e explorado material nessa linha de materiais bioativos, com muitas aplicações biomédicas [11]. A partir do desenvolvimento deste material, diversas outras composições de vidro com base silicato foram produzidas e demonstraram ser bioativas, devido à capacidade de formação da camada de hidroxiapatita (HAp) em sua superfície quando imersos em fluido corporal simulado *Simulated Body Fluid* (SBF) [12,13].

Ainda que com o passar dos anos e desenvolvimento da tecnologia na área de engenharia de tecidos, campo interdisciplinar responsável por utilizar a engenharia e ciências para manter ou reparar a função do tecido [14], tenha sido enriquecido com diversas pesquisas desenvolvidas na área, há algumas restrições quando se trata de compatibilidade biológica e efeitos dos materiais utilizados a longo prazo em pacientes [15].

Desta forma, uma nova linha de pesquisa vem ganhando espaço no âmbito de vidros bioativos com a substituição ou adição de dopantes na sua composição, com o intuito de melhorar a resposta bioativa do material [16]. Uma opção bastante explorada quando se fala em vidros bioativo, é a substituição total e/ou parcial do SiO_2 por B_2O_3 , uma vez que a resposta observada para vidros boratos é mais rápida que a observada para vidros silicato [17]; outra vertente é a obtenção de vitrocerâmicas a partir do tratamento térmico de vidros bioativos com composição já conhecida [18]. A importância da bioatividade do material desenvolvido está na capacidade de formação de apatita, com composições e estruturas semelhantes a minerais

ósseos que são características decisivas para gerar um ambiente que promova a osteogênese, resultando em uma interface de ligação natural entre o tecido circundante e o material bioativo cujas características da camada, como tamanho, estrutura, e a morfologia interferem no desempenho biológico do material [21].

Outro material desenvolvido na classe de biomateriais são as biocerâmicas, cujo objetivo é restaurar a função dos tecidos danificados do corpo, como tratamentos periodontais, reconstrução do maxilar e até mesmo fraturas com deterioração e/ou defeito ósseo [22,23], sendo capaz de se integrar com o osso remanescente e gradualmente ser substituído pelo novo tecido. Entre as biocerâmicas, a HAp é a mais utilizada devido à semelhança com o componente mineral dos ossos, apresentando boa biocompatibilidade, osteocondutividade e comportamento bioativo, se ligando diretamente com o tecido ósseo. Entretanto, mesmo a HAp tendo boa compatibilidade, possui baixa taxa de degradação de maneira que não são reabsorvidas nem substituídas por novo tecido ósseo [24].

Por essa razão são desenvolvidos compósitos com a adição de uma fase vítrea, devido ao alto índice de bioatividade desses materiais quando comparados com a HAp, cuja composições permitem que o novo material compósito se ligue tanto com tecidos moles quanto com tecidos duros [25].

Além da biocompatibilidade, dependendo do tecido, se faz necessário que uma série de condições sejam obedecidas, como propriedades químicas e mecânicas e a biodegradabilidade devem ser consideradas, para que os mesmos possam ser utilizados como implantes [15,26].

Considerando o exposto, o presente trabalho tem como objetivo principal combinar as propriedades de biocompatibilidade e bioatividade por meio da preparação de compósitos de HAp com vidros bioativos de base borato tratados termicamente em 810°C. Após a obtenção do compósito HAp+vidro bioativo estes serão caracterizados quanto a estrutura formada, e posteriormente submetidos aos testes de bioatividade e biológicos *in vitro*; estes ensaios permitem avaliar o potencial dos compósitos para futuras aplicações em regeneração óssea.

Este trabalho está organizado em 5 capítulos: O primeiro trata de uma contextualização do presente estudo com o objetivo de interesse. O segundo aborda alguns conceitos sobre vidros, hidroxiapatita, compósitos e compósitos bioativos, fundamentais para a compreensão do tema abordado. O terceiro apresenta os materiais e métodos utilizados no trabalho. O quarto relaciona os resultados e discussão derivados da metodologia aplicada no capítulo anterior. Por fim, o quinto capítulo aborda as conclusões obtidas com o desenvolvimento do trabalho. Ademais, informações suplementares relacionadas ao trabalho e às técnicas utilizadas estão descritas no Apêndice.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo é apresentada uma breve fundamentação teórica com conceitos gerais sobre vidros, hidroxiapatita, compósitos e compósitos bioativos.

2.1 - Vidros

Os seres humanos produzem vidros há milhares de anos, sendo os vidros egípcios de pelo menos 7000 a.C. Porém, nas últimas décadas, estão tão presentes no cotidiano, como em vitrais e janelas, componentes eletrônicos e mesmo em objetos de decoração, que sequer reparamos sua presença. Acredita-se que os primeiros vidros foram obtidos de maneira acidental, mas que logo o homem percebeu que poderia produzir intencionalmente, sendo então utilizado para produzir ferramentas que necessitavam de bordas afiadas, como lanças e pontas de flechas. Com o passar do tempo, o método para produção controlada foi desenvolvido, passando então a matéria-prima a ser escolhida com o intuito de minimizar impurezas, obtendo vidros translúcidos, aumentando a gama de aplicações desses materiais [27].

Estruturalmente os vidros não possuem um arranjo atômico periódico de longo alcance, o que faz com que se pareçam, microscopicamente, como líquidos, por isso, por vezes, são chamados de líquidos super-resfriados ou sólidos não cristalinos, uma vez que, em temperatura ambiente, se comportam como sólidos. Cada vidro exibe um comportamento de transformação dependente da temperatura, este comportamento ocorre em uma região conhecida como transição vítrea [28, 29].

O comportamento para esta transformação do vidro pode ser visualizado em diagramas de entalpia ou volume em função da temperatura, conforme Figura 2.1. Qualquer material que possua comportamento de transformação vítrea é considerado vidro, estando um material vítreo, em estado líquido em temperaturas acima do seu valor de temperatura de fusão (T_m), ao sofrer resfriamento a estrutura atômica do fundido se altera gradualmente, resultando na conversão para um material cristalino com ordenamento atômico de longo alcance, devido à uma abrupta queda na entalpia. Contudo, se o líquido for resfriado de forma rápida, sem que cristalize, a temperatura do material decai e a viscosidade aumenta, limitando o rearranjo atômico e provocando um decaimento na entalpia, dando origem a materiais amorfos [27].

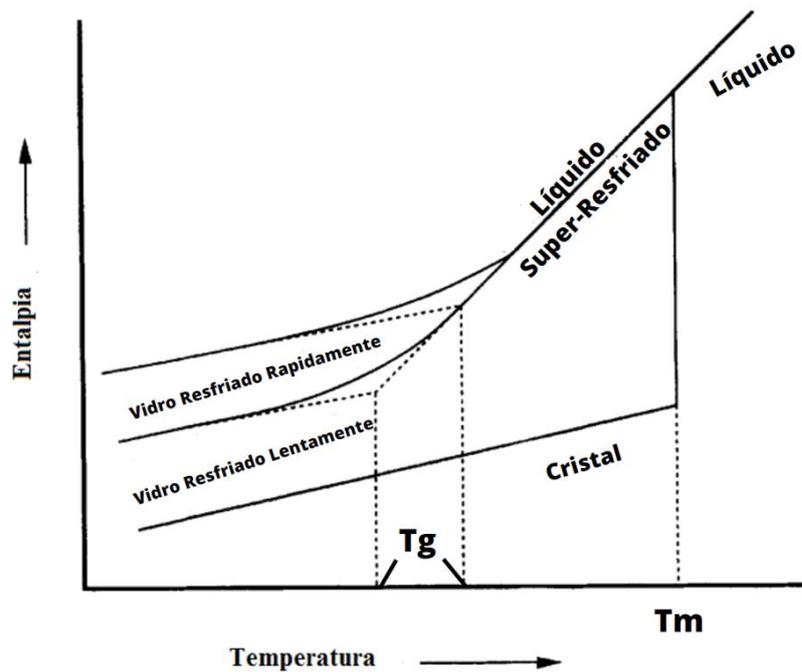


Figura 2. 1: Efeito da temperatura na entalpia durante o processo de resfriamento do vidro. Adaptado de [27].

O material formado dependerá de como ocorreu o processo de resfriamento, sendo a região entre o líquido super-resfriado e o sólido a transição (T_g), que é a temperatura na qual o aumento da mobilidade molecular resulta em mudanças significativas nas propriedades térmicas do material [30].

Os vidros podem ser produzidos por fusão e resfriamento (*melt-quenching*), no qual os componentes misturados são aquecidos em altas temperaturas atingindo o estado líquido, em seguida é resfriado rapidamente obtendo então o material vítre. Os vidros tradicionais são inorgânicos e não metálicos [27]. Na produção de vidros via fusão e resfriamento os precursores adotados são importantes, pois podem desempenhar funções específicas. Em geral há um agente formador de rede que é responsável por conectar à rede como um todo, sendo SiO_2 , B_2O_3 e P_2O_5 os mais comuns; e um modificador que tem função de modificar a rede, alterando características específicas do material como redução do ponto de fusão e/ou viscosidade; e os intermediários, que podem atuar tanto como formador como modificador, como a alumina, que em vidros silicatos atuam como modificador, mas é formador em vidros aluminatos [27,31].

2.1.1 – Vidros Boratos

Ainda que os vidros não possuam arranjo atômico de longo alcance, os precursores utilizados como formadores de rede são capazes de gerar estruturas fundamentais no material. Entender os mecanismos de formação é de grande importância, uma vez que a adição de modificadores pode ocasionar em variação de suas características fundamentais. Os vidros com base de Boro, são produzidos em uma ampla gama de composições. No modelo proposto por Zachariasean [31], o Boro tende a conectar-se com 3 unidades de Oxigênio formando o BO_3 com uma coordenação triangular. Estas estruturas conectam-se entre si por pontes de Oxigênio, resultando nos conhecidos anéis de boroxol B_3O_6 , que podem se ligar uns aos outros por ligações de Oxigênio em comum. A Figura 2.2 representa os tipos de ligações que o Boro pode apresentar.

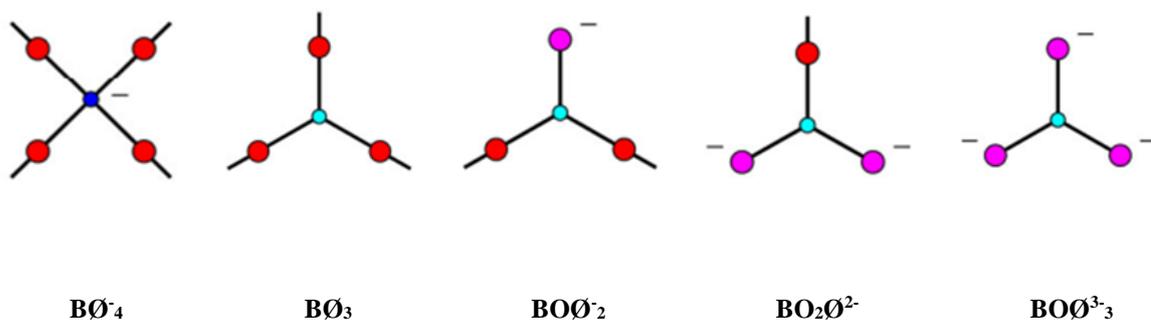


Figura 2. 2:Representação das cinco principais unidades estruturais do Boro. (Em azul o Boro tetraédrico; em azul claro o Boro trigonal; em vermelho as pontes de Oxigênio e, em rosa, átomos de Oxigênio sem ponte). Adaptado de [32].

Em vidros boratos, ao adicionar modificadores na rede, ao contrário do que se esperava, as pontes de oxigênio não são quebradas, como ocorre em vidros silicatos, por exemplo, em vez disso, grupos trigonais BO_3 mudam a coordenação e passam a formar grupos tetraédricos BO_4 , sendo que O indica átomos de Oxigênio ligados. Essas unidades tetraédricas podem formar anéis ao se ligar com uma ou duas unidades de BO_4 e até mesmo com estruturas maiores como diborato, conforme Figura 2.3.

Estas estruturas formam estruturas tridimensionais, o que torna a matriz polimerizada com o aumento da conectividade. Entretanto, se a adição de modificadores continuar, a matriz será despolimerizada, visto que as unidades tetraédricas voltam a formar grupos trigonais, mas agora os Oxigênios formam pontes não ligantes (NBO'S) e assim novas conformações são observadas como cadeias de metaborato e piroborato. Essas alterações na rede borato ao

adicionar modificadores, provocam alterações não lineares nas propriedades e características físicas do vidro, o que é conhecido como anomalia do Boro [27, 32].

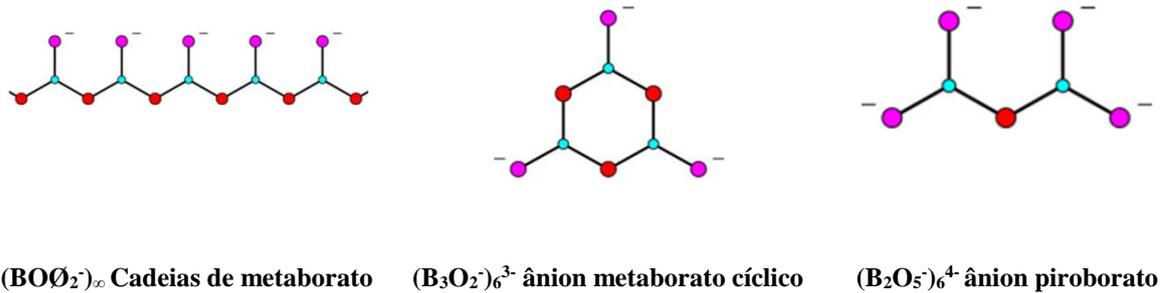


Figura 2. 3: Unidades superestruturais presentes nos vidros borato. Adaptado de [32]

2.1.2 – Vidros Bioativos e Vitrocerâmicas

Os biomateriais têm sido tradicionalmente utilizados com a intenção de substituir tecidos que foram de alguma forma danificados. Inicialmente se utilizavam materiais que permaneciam inertes, de forma a reduzir a formação de tecido cicatricial na interface com tecidos hospedeiros. Até então, os materiais utilizados, em geral, eram metálicos, e estes eventualmente sofriam corrosão devido à natureza dos fluidos corporais, que agredem os materiais metálicos, o que levou os pesquisadores a buscarem materiais que pudessem resistir à agressividade química do organismo humano. Desta forma, em 1969 foi desenvolvido pelo cientista Larry L. Hench, o vidro bioativo 45S5, o que permitiu outra opção para implantes, pois o mesmo forma uma ligação interfacial com o tecido hospedeiro, impelindo a regeneração e reparo tecidual utilizando as propriedades bioativas; esse vidro bioativo foi denominado de *Bioglass*® [33,34].

Para que o material seja considerado bioativo é necessário que o mesmo apresente uma resposta biológica satisfatória de forma que ocorra uma ligação entre o material utilizado e o tecido biológico. No geral, vidros bioativos tem base de silicato, podendo conter em sua composição Cálcio e Fósforo, que são considerados materiais bioativos, pois quando interagem com fluidos fisiológicos podem formar ligações com os ossos. Esta ligação pode ser observada por meio da formação de camadas de apatita na superfície do material, cuja a composição é análoga a dos ossos, e quando essa camada cristaliza forma a HAp [35]. Para que ocorra a formação desta camada sobre as superfícies do vidro bioativo é necessário que ocorra à liberação de íons solúveis de Si, Ca, P e Na, de maneira que ocorram respostas intracelulares e

extracelulares que facilitem a formação óssea [35, 43]. Nos materiais compósitos há um material formador e um modificador de rede [33, 34]. Uma característica que define a estabilidade do vidro é a diferença de temperatura da região do começo da transição T_g e quando ocorre a cristalização (T_x), essas temperaturas podem ser obtidas por análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC), mas a determinação exata de T_g e T_x está sujeita à preferência do experimentador e na escolha da taxa de aquecimento [27].

A composição do *Bioglass*® 45S5 é de 45% de SiO_2 , 24,5% de Na_2O , 24,5% de CaO e 6% de P_2O_5 , em massa, [34]. Outras composições foram desenvolvidas com o intuito de aperfeiçoar o material, a fim de obter uma melhor resposta biológica, uma das estratégias adotadas foi o método de dopagem, pois os vidros bioativos não possuem uma boa resistência mecânica e a dopagem viria como uma alternativa para tentar reparar essa desvantagem [106].

Os vidros bioativos comerciais mais explorados são de base silicato, borato e fosfato; eles possuem diferenças importantes, como a estrutura de rede, os boratos têm a estrutura triangular com boratos tetraédricos em diferentes configurações, constituindo os grupos borato, sendo eles diborato, triborato, tetraborato, pentaborato e também metaborato ou ortoborato. Em contrapartida os de silicato e fosfato possuem grupos de tetraedro em quase todas as suas composições [33, 36].

Um dos materiais que podem ser utilizados nos compósitos é a HAp, pois esta é biocompatível com organismos biológicos, visto que sua composição é similar à encontrada nos ossos. No momento em que um vidro composto por $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ é misturado com HAp e sinterizado, as fases do novo material, suas propriedades física, químicas e resposta biológica irão depender da metodologia adotada. Estas características podem variar de acordo com os parâmetros de sinterização adotados, como a temperatura de sinterização, a pressão da compactação e o tamanho de partículas da mistura. No geral, quando a HAp é empregada como dopante com o objetivo de formar novas fases, como os fosfatos tricálcicos, (β -TCP) e (α -TCP), pois estes são mais solúveis quando comparados com a HAp, o que os tornam mais reabsorvíveis pelo sistema biológico [33].

No atual cenário de pesquisas, os vidros bioativos são obtidos com diversas composições, para uma série de aplicações, e cada vez mais são desenvolvidas pesquisas focando em propriedades específicas, com o objetivo de melhorá-los visando sua aplicabilidade, como no campo da medicina e da odontologia [37]. Evidentemente, os pontos fracos devido à baixa resistência mecânica e resistência à fratura ainda limitam o emprego deste material, e muitas das atuais pesquisas buscam solucionar justamente essa fraqueza que restringe seu emprego em

áreas que necessitam de uma maior resistência por parte do material bioativo, como no caso de próteses em que há aplicação de carga sobre a peça [36,38-40].

Para que seja possível a aplicação clínica do vidro bioativo em maior escala, o mesmo deve não só apresentar compatibilidade com o sistema biológico, de modo a promover a reestruturação e crescimento do novo tecido, como também ter uma certa resistência à aplicação de cargas [33]. No geral, se espera que o material seja reabsorvido pelo organismo no decorrer do tempo, no entanto, esta característica de melhor integração com o tecido hospedeiro é que prejudica a resistência do material, cuja saída vem sendo a opção de dopantes visto que essas propriedades podem ser alteradas de acordo com os materiais precursores e com a metodologia da síntese adotada [41].

As limitações na aplicação de vidros bioativos decorrem da sua baixa resistência mecânica, de modo que as aplicações mais comuns são em situações que não requerem grande resistência, como periodontia e reconstrução maxilo-facial e otorrinolaringológicas [42]. Embora as respostas bioativas de algumas composições sejam eficientes, a aplicação é limitada, desta forma surgem as vitrocerâmicas, com o intuito de melhorar essa deficiência de aplicabilidade de vidros bioativos.

Para melhorar as propriedades mecânicas, desenvolveu-se tratamentos térmicos das matrizes vítreas para nucleação e cristalização controlada, que foram aplicadas em sistemas vítreos de diversas composições. Originando materiais cristalinos, denominados vitrocerâmicas, que possuem propriedades físicas e químicas diferentes do material de partida, contendo fase vítrea residual e uma ou mais fases cristalinas incorporadas. A produção de vitrocerâmicas, de composições semelhantes aos vidros bioativos consolidados no mercado, com o controle da cristalização vem sendo analisada com o intuito de combinar as propriedades mecânicas das vitrocerâmicas sem a perda da eficiência da bioatividade dos vidros bioativos. Composições semelhantes ao 45S5, por exemplo, deram origem a um novo material denominado Biosilicato que é um material cristalino que exhibe alta bioatividade e possui uma melhor resposta mecânica [42].

Uma forma de avaliar o potencial bioativo de vidros e vitrocerâmicas bioativos é com relação à resposta bioativa que eles apresentam. Geralmente essa resposta é observada pela formação de uma camada de apatita em sua superfície, devido à reação biológica quando os mesmos são submetidos a ensaios *in vitro* com imersão em soluções tamponantes e que simulam fluidos corpóreos [35]. Assim, a próxima subseção apresenta os mecanismos de formação dessa camada.

2.1.2.1 – Mecanismo de formação da camada de apatita

Em geral, as reações *in vitro*, em testes de bioatividade de materiais bioativos, como vidro bioativo, são estudadas em soluções tamponadas como o SBF, para avaliar se ocorre a precipitação do fosfato de cálcio amorfo (ACP) na superfície da amostra, visto que a mesma é usada como indicação de bioatividade [45]. O mecanismo de dissolução e reação, levando à precipitação dessa camada de ACP, ocorre por ação da troca de íons do material em imersão e da solução. A camada de ACP é constituída com a migração dos grupos Ca^{2+} e PO_4^{3-} da superfície do vidro bioativo e pela incorporação de íons e fosfatos de cálcio solúveis da solução, que com o passar do tempo cristalizam formando a HAp [35].

Durante o período de formação da camada, um vidro silicato pode sofrer dez processos, conforme descrito por Hench e Anderson [46]. As cinco primeiras etapas estão representadas na Figura 2.4, sendo etapa 1) lixiviação seletiva de alguns elementos com as trocas iônicas entre alcalinos e alcalinos terrosos (Na^+ e Ca^{2+}) com cátions da solução (H^+ e H_3O^+), que depende do íon modificador; 2) dissolução da sílica da rede do vidro por ataque dos íons de hidroxila que são os responsáveis por quebrar as ligações do Si-O-Si formando o silanol na superfície do vidro; 3) condensação e polimerização de uma camada rica em SiO_2 ; 4) migração de grupos Ca^{2+} e PO_4^{3-} da rede do vidro para a camada rica em SiO_2 levando à formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e 5) cristalização da camada de ACP e a incorporação de íon em sua estrutura cristalina, como CO_2^{-3} , OH^- ou F^- , formando hidroxicarbonato apatita (HCA), hidroxiapatita (HAp) ou fluorapatita (FAp).

As outras cinco etapas descritas pelos autores [46], ocorrem apenas quando na presença de tecidos vivos, sendo 6) adsorção de proteínas específicas; 7) ação de macrófagos; 8) adesão e diferenciação celular; 9) formação de matriz extracelular e 10) mineralização da matriz.

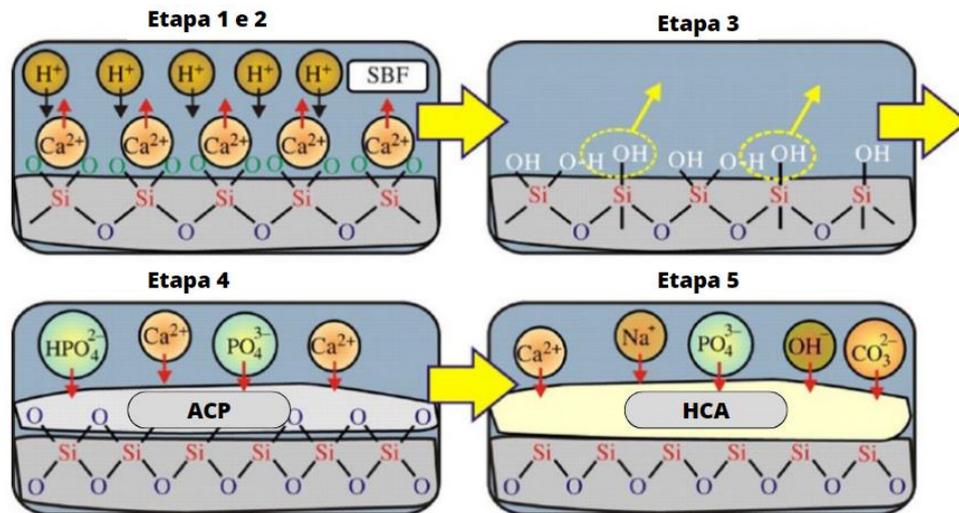


Figura 2. 4: Ilustração do mecanismo de reação de formação de HCA na superfície de vidro bioativo à base de silicato. Adaptado de [47].

Vidros bioativos à base de boro seguem o mesmo mecanismo de formação da camada de apatita descrito para vidros com base silicato, com exceção da formação de camada rica em SiO_2 [48,49]. A taxa de dissolução do vidro borato é mais rápida quando comparada com a do vidro silicato. Os mecanismos de conversão da camada na superfície de vidros borato são apresentados na Figura 2.5. Quando vidros borato estão imersos em soluções tamponantes, inicialmente ocorre a dissolução de íons de Na^+ e BO_3^{3-} da estrutura do vidro na solução, supõe-se que os íons de PO_4^{3-} do meio reajam com os íons Ca^{2+} levando à nucleação e crescimento de apatita HCA e, neste caso, o processo continua até que o vidro esteja completamente convertido em HCA [50].

Liang e colaboradores (2006) [50] compararam a bioatividade de um vidro borato e um silicato, demonstrando que o vidro borato reagiu mais rápido que o vidro silicato em uma solução de 0,25M K_2HPO_4 . Enquanto no vidro borato, a camada já foi observada com 24hrs, no vidro silicato, esta não foi identificada mesmo após 7 dias de imersão no mesmo meio. Além disso, a conversão do vidro borato em camada foi descrita como concluída em 4 dias, enquanto o vidro silicato converteu-se parcialmente (~50%) após 70 dias de teste.

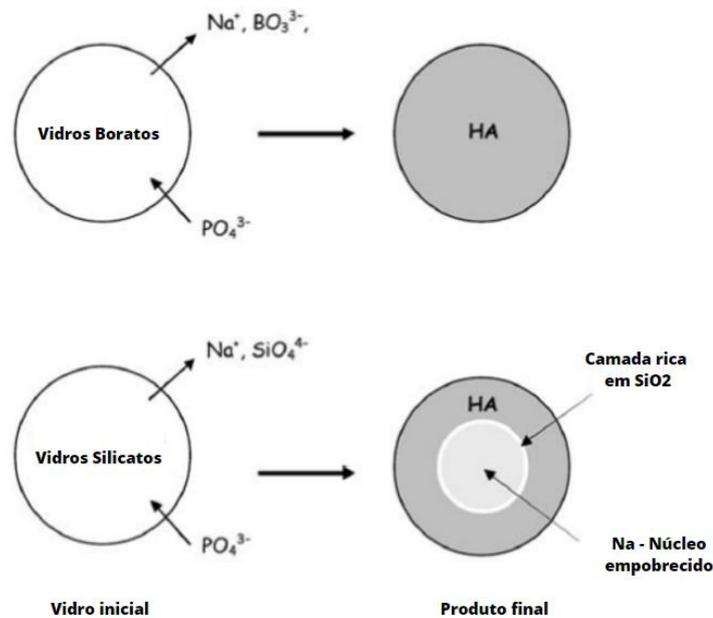


Figura 2. 5: Ilustração dos mecanismos de conversão de vidro de borato e silicato em HCA em solução de fosfato. Adaptado de [48].

De maneira geral, os processos que regem a degradação de vidros borato são similares com aos que ocorrem com os silicatos, com duas principais diferenças: i) vidros boratos não possuem a capacidade de repolimerizar como os de silicato na formação da camada rica em SiO_2 , embora a depender da composição da matriz vítrea alguns autores relatam a formação de uma camada B-OH devido à hidrólise das pontes B-O-B, que desempenharia papel semelhante à camada rica em SiO_2 [51]; ii) o processo de degradação dos vidros ocorre de forma simultânea e contínua com a hidratação e hidrólise da rede vítrea, o que faz com que esses vidros apresentem dissolução mais rápida com maiores valores observados no pH do meio nos períodos iniciais, indicando serem mais reativos em imersão quando comparados aos de silicato [51].

2.2 – Hidroxiapatita (HAp)

Hidroxiapatita é um fosfato de Cálcio hidratado, Figura 2.6, que compõe os minerais encontrados nos tecidos ósseos e dos dentes. Sua fórmula química é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sendo a razão molar ideal entre Cálcio e Fósforo (Ca/P) igual a 1,67 Ca/P. No geral, a HAp obtida sinteticamente apresenta propriedades que a tornam biocompatível, desta forma a HAp é uma boa candidata em várias áreas com aplicações na medicina e na odontologia. A HAp biológica apresenta alguns íons que também estão presentes nos fluidos corpóreos, desta maneira, uma

forma para diferenciar a HAp biológica da estequiométrica seria de acordo com sua composição, e por suas propriedades físicas e mecânicas [33,52].

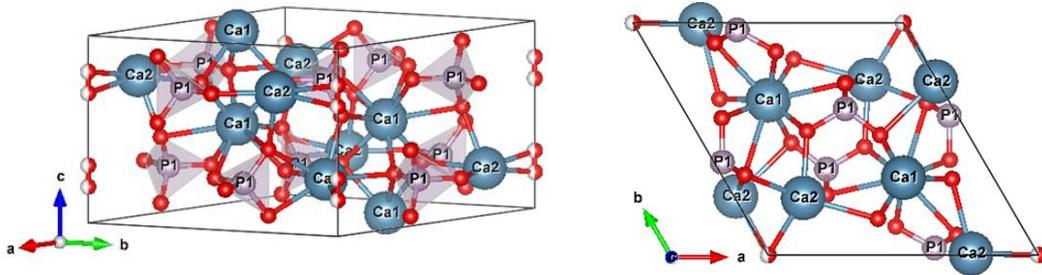


Figura 2. 6: Estrutura 3D da molécula de Hidroxiapatita. Esferas azuis (Ca) – Cálcio, esferas roxas (P) – Fósforo, esferas vermelhas (O) – Oxigênio. Obtido com a ficha JCPDS no. 09-0432 no programa gratuito Vesta¹.

Por sua formação química análoga à fase mineral encontrada nos tecidos ósseos, a HAp é um dos materiais que possui uma maior biocompatibilidade e bioatividade, o que contribui para o crescimento do tecido ósseo, pois realiza ligações químicas com o tecido ósseo do paciente [33]. A HAp pertence à família da apatita, sendo uma das formas mais comuns do fosfato de cálcio. A variabilidade das propriedades da HAp muda de acordo com o método de obtenção sintético, o que possibilita a utilização da mesma em inúmeras aplicações. Dos sais de fosfato de cálcio, a HAp é a forma mais estável, sua estrutura cristalina é hexagonal (Figura 2.6) pertencendo ao grupo espacial $P6_3/m$. Os parâmetros de rede são: $a = b = 9,432$, $c = 6,881$ Å e $\gamma = 120^\circ$, as células unitárias da HAp estão dispostas ao longo do eixo c [33, 53].

A HAp é um material que pode modificar a velocidade de uma reação química e dependendo da sua aplicação, pode ajudar em alguns problemas ou necessidades, quando se fala em substituição de tecidos. Além disso, a HAp pode ter outras aplicações, como material para célula de combustível ou para uma adsorção e estabilização de matriz para resíduos radioativos e metais, as inúmeras pesquisas com a HAp resultaram em diversas publicações e patentes [52].

Embora seja bastante explorada como um biomaterial, a HAp apresenta algumas desvantagens, principalmente com relação às suas propriedades mecânicas, pois ela apresenta uma baixa resistência, sendo um material que retrata uma certa fragilidade, principalmente quando se pensa em implantes, este é um dos principais motivos para a utilização de metais e polímeros para implantes, [33,54]. Com a intenção de aperfeiçoar as características mecânicas

¹ Programa gratuito, disponível em: <<https://jp-minerals.org/vesta/en/download.html>>

da HAp, têm-se buscado adicionar novas fases ao dopar a HAp com outros materiais, como por exemplo alumínio, titânio e zircônia [33,53].

Essas dopagens só são possíveis devido à estrutura da HAp permitir substituições catiônicas e aniônicas, desta forma, o Ca^{2+} pode ser substituído por metais, tal qual os citados acima, como por Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} . As hidroxilas podem ser substituídas por flúor e cloro, os grupos de fosfato podem ser substituídos por carbonatos e vanadatos (categoria dos minerais) [55,56]. As substituições com esses materiais podem alterar as características finais da HAp, como cristalinidade, estabilidade e também as suas propriedades mecânicas e bioativas.

2.3 – Compósitos

Entende-se por material compósito, ou apenas compósito, um material constituído por duas ou mais fases, cujas propriedades físicas e químicas sejam distintas e que sua combinação possa originar características específicas ou mesmo promover uma terceira fase. No geral, estes materiais possuem divisões sendo representadas por uma fase contínua denominada matriz, que é a fase que envolve a segunda fase, que geralmente é denominada de fase dispersa, que é relacionada a fases utilizadas como modificador ou reforço, cujas propriedades finais observadas são adquiridas com a associação das propriedades dos precursores individuais. [57,58].

A obtenção de compósitos pode ocorrer pelo processo denominado metalurgia do pó, que consiste em modificar pós metálicos e não metálicos em uma peça final. O principal objetivo da metalurgia do pó é transformar sem fundir os pós envolvidos, usando pressão e calor com um tratamento térmico, comumente conhecido como o processo de sinterização. Este tratamento representa a fusão adotada em outras metodologias, a sinterização no geral ocorre com um tratamento térmico abaixo do valor do ponto de fusão do material mais importante da mistura; em geral o material mais importante e que rege a temperatura é aquele que pode sofrer algum tipo de alteração, como fusão e/ou degradação [59,60]. Há relatos na literatura que a solda por forja foi a precursora do processo de sinterização, devido ao fato de juntar fragmentos de materiais diferentes com o calor da forja. O posterior desenvolvimento dessa técnica ocorreu pela necessidade de se obter materiais que seriam impossíveis de se conseguir de outra maneira se não pela sinterização [59, 61].

A metalurgia do pó compreende alguns processos, estes são:

- ❖ Obtenção dos pós precursores;

- ❖ Mistura dos pós;
- ❖ Conformação;
- ❖ Sinterização;
- ❖ Tratamentos.

Nos processos básicos via metalurgia do pó, como mostrado na Figura (2.7) realiza-se a mistura dos materiais precursores seguido da compactação, na qual se utiliza determinadas pressões, que podem ser adotadas de acordo com os materiais base, depois de compactado se obtém a peça “verde”. Seguida da compactação há o processo de sinterização, no qual a peça “verde” é aquecida a uma temperatura abaixo do ponto de fusão do material mais importante da mistura, para provocar a união das partículas entre si, fechando os poros entre os materiais e dando à peça final resistência suficiente para sua aplicação. Além da temperatura também são controlados, o tempo de permanência na temperatura de sinterização, e a velocidade de aquecimento e resfriamento. [59, 60]. Durante a sinterização, os materiais são conduzidos de modo que ocorra o fechamento dos poros, nesse sentido há dois tipos principais de sinterização: a sinterização por fase sólida, cuja condução dos materiais ocorrem sem a presença de um líquido, e a sinterização por fase líquida, no qual ocorre a formação de líquido na estrutura do material, geralmente em casos cujo um dos componentes se funde na temperatura de sinterização. Esta fase líquida tem de ser um processo controlado, de forma que a peça mantenha a forma obtida durante a compactação, ambos os processos ocorrem quando a estrutura dos materiais se densificam de forma parcial ou total [59, 62].

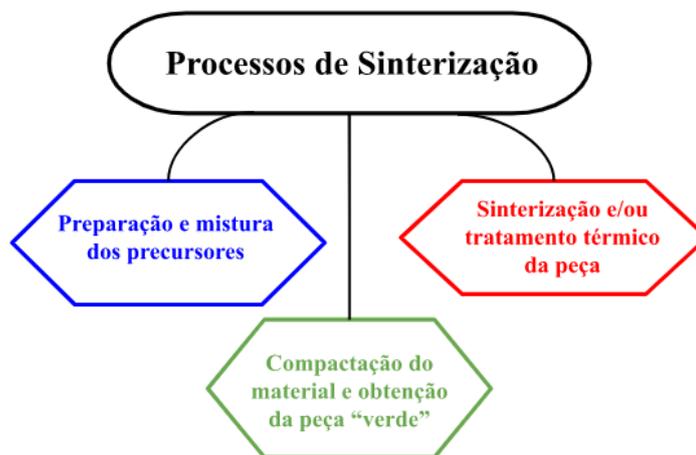


Figura 2. 7: Fluxograma dos processos para a sinterização.

A técnica de sinterização permite uma maleabilidade no que se diz respeito às propriedades físicas do material final, como na questão da forma e dimensões das partículas, além das propriedades químicas, visto que, podemos adicionar materiais nas misturas de acordo com sua composição para obter a resposta química desejada. Outro fator importante neste processo é a compactação, a forma mais comum utilizada é a compactação de simples efeito, sendo então as amostras compactadas uniaxialmente em uma matriz rígida, de cavidade cilíndrica, por dois punções, com o superior móvel e inferior fixo, como representado na Figura 2.8.

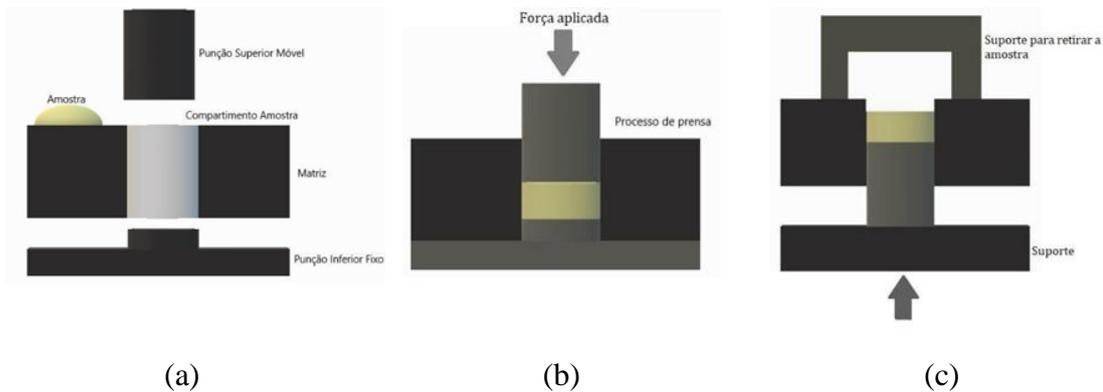


Figura 2. 8: Esquema do processo de prensa da amostra (a) ilustra as partes da matriz, temos o punção inferior fixo, a câmara onde a amostra será acomodada e o punção superior, que é móvel e o que sofrerá deslocamento com a aplicação da pressão (b) ilustra a conformação da amostra enquanto a pressão é aplicada (c) ilustra o processo para retirar a amostra compactada da matriz.

Com o desenvolvimento da tecnologia na área de materiais é cada vez mais comum materiais que são obtidos via compósitos, não só na metalurgia do pó como nas mais diversas áreas de materiais [63], tal fato decorre devido à técnica se mostrar vantajosa para obter componentes homogêneos e que em muitas vezes é a única solução para o material final que se almeja conseguir. Há diferentes aplicações para materiais compósitos, como na indústria nuclear, militar e nos setores de materiais compostos e cerâmicas [59]. Existem uma série de fatores que corroboram para a atual situação de que esse método seja indispensável, tais como: a utilização de maneira mais eficiente das matérias-primas, com perda mínima; controle da composição química do material final; homogeneidade das suas propriedades e estrutura; o consumo de energia é menor quando comparadas com outras técnicas; a contaminação do material sinterizado é baixa; o custo para produzir um novo material sinterizado é menor que em outros processos de produção; pouco provável que apareçam métodos de conformação novos no mercado que possam competir com esse método [59, 61, 64].

Durante o processo de sinterização ocorre a união das partículas dos pós precursores em uma estrutura regular e predominantemente sólida devido aos efeitos que ocorrem na escala atômica. A interação causa uma maior resistência do sistema com uma menor energia, ocorrendo a densificação dos materiais, neste caso um aumento na sua densidade, que pode ter efeitos em suas propriedades mecânicas, térmicas e mesmo elétricas [60].

No decorrer da sinterização, a ligação entre as partículas fica visível nas estruturas com a formação de pescoço, decorrente da interação crescente, as interações no nível atômico são causadoras da sinterização das partículas que tentam minimizar a energia da superfície nas quais interagem. Esse processo de sinterização é dividido em etapas, como descrito na Figura 2.9, no momento em que os pós são misturados, antes da compactação da peça “verde”, as partículas têm contato, mas com uma distribuição aleatória entre si. No estágio inicial de sinterização ocorre o aumento da interação das partículas em um contato inicial num único ponto. No estágio intermediário, o volume dos poros existentes entre as partículas começa a diminuir e acontece a densificação do material compactado, os poros sofrem um arredondamento e os grãos aumentam de tamanho. No último estágio de sinterização ocorre a migração e o isolamento dos poros [65].

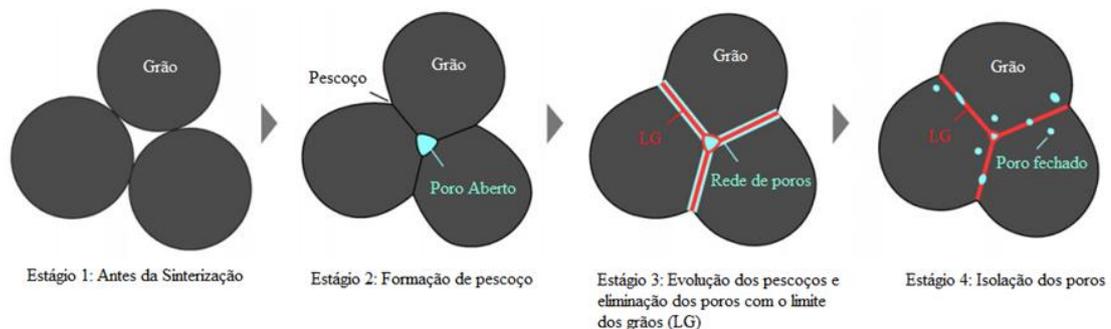


Figura 2. 9: Estágio 1: Grãos antes da sinterização. Estágio 2: Estágios iniciais da sinterização, quando ocorrem contato dos grãos e o ângulo entre eles tornam-se mais raso e temos a formação de pescoços.

Estágio 3: Estágio intermediário de sinterização, quando ocorre uma maior evolução do pescoço e poros difusos nos limites de grão (LG). Estágio 4: Estágio final da sinterização, no geral alguns poros são eliminados, isolados e poros fechados aparecem. A área de contato LG entre grãos aumenta gradativamente e ocorre densificação durante a sinterização. Adaptado de [66].

Um material compósito é a combinação de materiais diferentes, e que juntos podem alcançar determinadas características para funções específicas. As misturas podem ser de materiais de uma mesma classe como (dois metais) ou mesmo de classes diferentes (vidro e polímero) [67, 68].

Por serem consequência de uma mistura, os compósitos permitem uma combinação única e específica das propriedades dos precursores para que o compósito resultante possua

características específicas, e que em alguns casos podem ser observadas por mudanças no decorrer do tempo. A Figura 2.10 apresenta um exemplo de variação do coeficiente de expansão com relação à concentração de carboneto de silício numa matriz de alumínio. Observa-se que com a variação da concentração de carboneto de silício na matriz de alumínio o coeficiente de expansão térmica do compósito se aproxima de valores similares a de outros materiais [67].

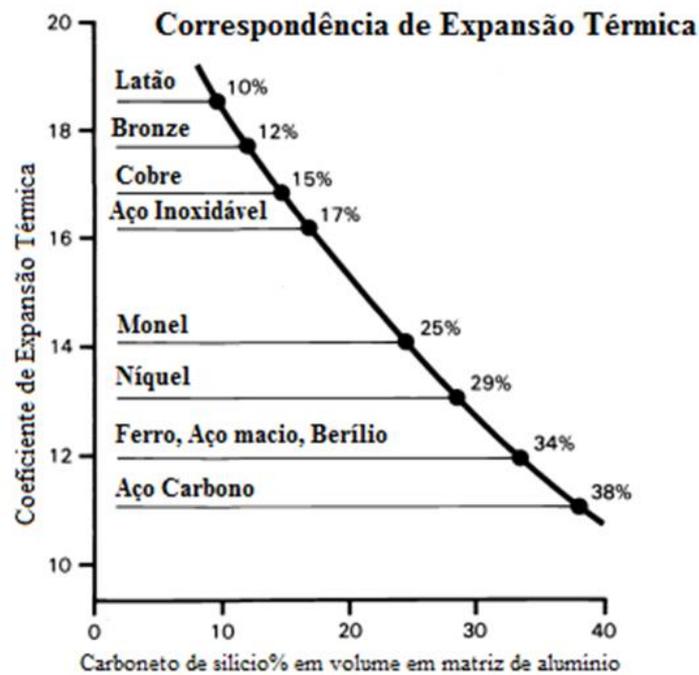


Figura 2. 10: Curva de expansão térmica. Adaptado de [67]

Uma das características mais destacáveis quando se trabalha com compósitos, está no fato de ser possível alcançar propriedades físicas e químicas com as misturas que não poderiam ser obtidas dos materiais precursores de forma isolada, essa característica do ponto de vista das propriedades mecânicas desperta interesse na área de materiais por ser uma opção para novas aplicações [67, 69].

3.4 – Compósitos Bioativos

Os tecidos biológicos como pele, dente, ossos e tendões são formados por componentes específicos, que por vezes tem morfologia e propriedades que determinam a atuação do mesmo no organismo. Compósitos obtidos de biomateriais podem ser utilizados como próteses com o intuito de substituir os tecidos biológicos, combinando suas propriedades específicas com o objetivo de restaurar as funções do tecido danificado [70]. Nesse sentido, biomateriais, assim como, compósitos de biomateriais são investigados para aplicações médicas, e seguem esse conceito de utilizar biomateriais para alterar ou mesmo obter compósito da mistura dos mesmos

para aperfeiçoar o material final obtido [71]. Diferentes materiais são aperfeiçoados para desempenhar funções semelhantes, cuja combinação dos materiais base podem proporcionar uma série de diferentes aplicações e/ou funções [72].

Thian e colaboradores (2012) [73] utilizaram a HAp, que tem baixa taxa de osseointegração e baixa atividade bacteriana, dopada com zinco para obter um biomaterial alternativo (ZnHA) que continha 1,6% em peso de Zn, obtido por uma reação de co-precipitação entre hidróxido de cálcio, ácido ortofosfórico e hexa-hidrato de nitrato de zinco. O trabalho mostrou que em cultura de células *in vitro* o material ZnHA apresentou uma melhor resposta bioativa e além disso, o material também apresentou atividade antibacteriana e antimicrobiana.

Soundrapandian e colaboradores (2011) [75] produziram materiais com vidro bioativo contendo óxido de zinco (ZnO) em sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ e compósito com nanopartículas de hidroxiapatita (HAp), e aplicaram como revestimento em substratos de Ti-6Al-4V. As amostras não foram citotóxicas e apresentaram promissora biocompatibilidade e bioatividade *in vitro*. A adição de partículas nanométricas de HAp melhorou as propriedades mecânicas do revestimento de vidro bioativo sem afetar a bioatividade *in vitro*.

Chatzistavrou e colaboradores (2006) [76] prepararam amostras compósito HAp/BG para investigar o comportamento bioativo das misturas bifásicas não aquecidas e sinterizadas, observaram o aparecimento de novas fases nos compósitos sinterizados, enquanto foi detectada uma formação de camada de apatita mais rápida nas amostras não aquecidas. Comportamento atribuído à maior solubilidade das amostras não aquecidas. Além disso, observaram que a sinterização em temperaturas altas, resulta numa maior cristalinidade, causando um retardo da resposta bioativa.

Greish e Brown (2000) [77] estudaram os efeitos nas propriedades mecânicas e estruturais do compósito de HAp-Ca poliacrilato com a adição de um vidro bioativo em proporções de até 50%. Observaram que tanto a resistência à tração quanto o módulo de elasticidade aumentam com a adição de até 10% de vidros bioativos, com valores superiores as propriedade mecânicas do material diminuem, além disso observaram que quando submetidos a ensaios *in vitro* com imersão em SBF ocorre a formação de camada de apatita na superfície desses compósitos.

Bellucci e colaboradores (2015) [78] produziram compósitos de vidro bioativo e HAp com diferentes proporções de HAp. Devido à composição do vidro que utilizaram, os compósitos foram preparados em temperaturas baixas, para evitar alterar os precursores e que tiveram efeitos positivos em termos de bioatividade *in vitro*. Obtiveram um material compósito com uma resistência mecânica melhor que o vidro bioativo de referência (45S5), e as amostras

(precursores e compósitos) não demonstraram nenhum efeito negativo na viabilidade celular e não causaram inibição em crescimento celular.

Vários biomateriais também já foram explorados para a cicatrização de feridas [2]. As possibilidades da utilização de compósitos formados a partir de materiais bioativos, que podem atender um conjunto de requisitos pré-determinados, representam uma nova visão para o desenvolvimento de novos materiais com melhorias em suas propriedades, como rigidez, resistência química, estabilidade mecânica e uma melhor resposta bioativa [1, 74].

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo será descrita a metodologia experimental adotada, apresentando os procedimentos utilizados na realização deste trabalho, expondo os passos de preparação das amostras e as especificações das técnicas utilizadas.

Para o presente estudo foram utilizadas para caracterização das amostras em pó, antes do tratamento térmico, as técnicas de *Dynamic Light Scattering* - (DLS) para avaliação da distribuição dos tamanhos de partículas, e a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para avaliar a morfologia do pó. As amostras também foram avaliadas em pó após tratamento térmico nas técnicas de Difractometria de Raios-X - (DRX), Espectroscopia Raman e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada a Reflectância Total Atenuada - (FTIR-ATR). Para avaliar a morfologia das amostras, após o tratamento térmico, foi utilizada a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) nas amostras em peça avaliando a superfície e fratura das mesmas.

Considerando o viés deste trabalho de estudo de materiais bioativos, foram realizados testes de citotoxicidade nas amostras em pó, após o tratamento térmico, e bioatividade *in vitro* com imersão das peças, após tratamento térmico, em fluido corporal simulado - *Simulated Body Fluid* (SBF). Foram analisados, tanto os processos da interação das amostras, quanto os processos de formação da camada de apatita no material após imersão avaliados por FTIR-MEV, FTIR-ATR e DRX.

A Figura 3.1 é um fluxograma que sintetiza o desenvolvimento experimental realizado neste trabalho.

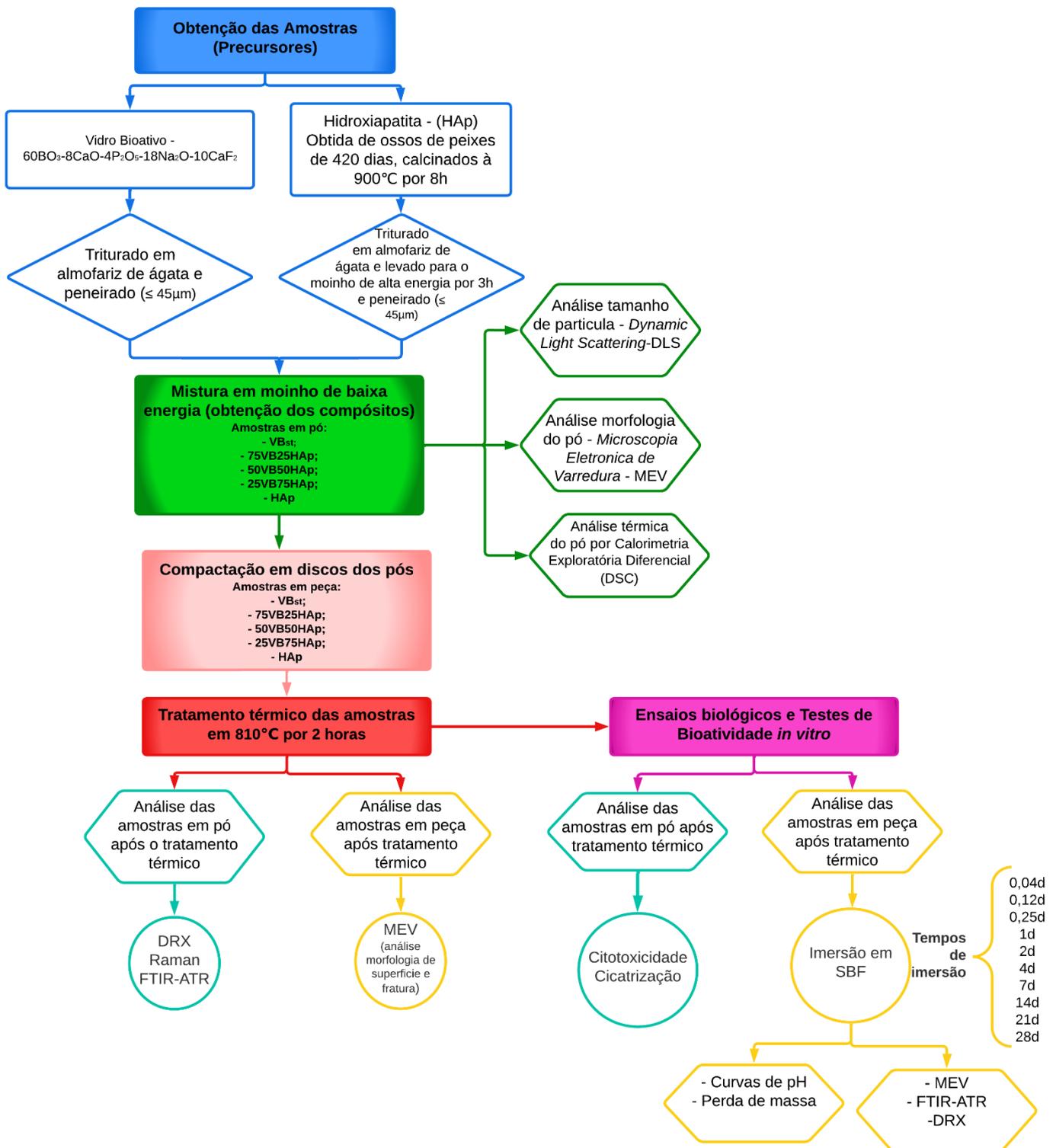


Figura 3. 1: Representação esquemática da metodologia adotada.

3.1 Amostras

3.1.1 Preparação dos precursores

As amostras de vidro bioativo utilizadas neste trabalho para a obtenção dos compósitos de vidro com HAp foram produzidas na Universidade Federal do Maranhão no Campus de Imperatriz, sob a supervisão da Professora Dra. Franciana Pedrochi. A amostra de vidro desenvolvida tem a base de borato e pertence ao sistema vítreo $60\text{BO}_3\text{-}8\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5\text{-}18\text{Na}_2\text{O-}10\text{CaF}_2$, sendo todos os reagentes utilizados com um grau de pureza de 98-99,99% (Sigma Aldrich®).

Os reagentes tiveram a massa medida em balança analítica para a obtenção de amostras com 7g, sendo que o CaCO_3 passou pelo processo de desgaseificação a 900°C , com o intuito de liberar o CO_2 do composto formando então o Óxido de Cálcio (CaO), após esse processo todos os reagentes foram homogeneizados e colocados em cadinho de platina, o processo de sinterização adotado foi o de fusão/resfriamento conhecido como *melt-quenching*, na qual a amostra é levada ao forno de atmosfera de ar permanecendo por cerca de 2 horas na temperatura de sinterização para uma melhor homogeneização.

Depois de fundida, a amostra é vertida em um molde de aço inoxidável previamente aquecido, em temperatura abaixo da temperatura de transição vítrea (T_g), passando por um rápido resfriamento, logo após, a amostra é levada ao forno para tratamento térmico, permanecendo em 450°C por 4 horas para minimizar os efeitos do estresse mecânico.

Para a preparação das amostras utilizadas no presente trabalho, a peça de vidro bioativo foi triturada manualmente em um triturador, em seguida o material triturado passou pelo processo de controle de tamanho de partícula, obtendo assim o pó do vidro sem tratamento (VB_{st}), com um tamanho de partícula $\leq 45\mu\text{m}$.

Para a obtenção da HAp foi utilizado ossos de peixes adultos com 420 dias de idade, da espécie tilápia provenientes de água doce, sendo esse material cedido pelo Centro de Piscicultura do Departamento de Zootecnia-UEM. Os peixes foram alimentados e criados em tanques-rede na Estação do Rio do Corvo no Campus Regional de Diamante do Norte/UEM.

Do material fornecido, comumente se utiliza todas as partes do esqueleto, entretanto as vértebras são partes mais fáceis de manipular no processo de limpeza para a retirada do material orgânico, que se divide em duas etapas. Na primeira parte, os esqueletos são fervidos em recipientes contendo água, e em seguida são lavados em água corrente. Na segunda etapa é

necessária uma limpeza mecânica para a remoção de partes mais duras como a cartilagem, após essas duas etapas os ossos são levados para secar ao ar livre por 48 horas.

Após secagem, os ossos são submetidos ao processo de calcinação, no qual é realizado um tratamento térmico em altas temperaturas, mas abaixo do ponto de fusão, esse tratamento antecipa possíveis reações químicas como a eliminação de água e CO₂ e outros gases presentes no material. A temperatura e o tempo de calcinação variam de acordo com o tipo material submetido ao tratamento, pois a estrutura do mesmo pode sofrer alterações afetando as propriedades do material calcinado.

No presente trabalho a calcinação do osso de peixe foi realizada em um forno (Quimes, modelo mufla) que opera no intervalo de 0 a 1200°C. O material, após seco em temperatura ambiente, foi condicionado em um recipiente de alumina e levado ao forno para a calcinação, realizada por 8 horas em uma temperatura de 900°C, pois em temperaturas superiores podem ocorrer a formação de outras fases da HAp, já mencionadas previamente.

A taxa de aquecimento adotada na calcinação foi de 6° C/min e o forno permaneceu fechado durante o processo. Após a calcinação o material obtido foi inicialmente triturado manualmente em um almofariz de ágata, e em seguida foi levado para o processo de moagem em um moinho de alta energia (Retsch - PM100) no qual a amostra foi depositada em um jarro de moagem com esferas de zircônia, com uma razão de bolas/massa de 6:1. O moinho funciona com atmosfera a ar em temperatura ambiente, a velocidade de rotação adotado foi de 300rpm num ciclo de 30min com uma pausa de 10min a cada ciclo, o tempo total de moagem foi de 3 horas, resultando então no pó de HAp, que também foi submetido ao controle de tamanho de partículas, passando pelo mesmo processo que o vidro, obtendo também pó com granulometria $\leq 45\mu\text{m}$.

3.1.2 Obtenção dos compósitos em diferentes concentrações de HAp e VB_{st}

Para a confecção das amostras via metalurgia do pó, é necessário o conhecimento da densidade teórica da amostra desejada, ou seja, da amostra final, essa propriedade física pode ser descrita pelas leis das misturas:

$$\rho_{af} = \sum_{j=1}^n p_j \rho_j \quad (3.1)$$

sendo ρ_{af} a densidade teórica do material final; p_j o percentual em volume de cada elemento; ρ_j a densidade de cada elemento e n o número de elementos presentes na amostra.

Com o valor da densidade da mistura determinada pode-se determinar a quantidade de amostra necessária de cada elemento para a confecção dos compósitos em diferentes proporções, sendo o volume da amostra final (V_{af}) determinada pela equação:

$$M_{af} = \rho_{af} V_{af}. \quad (3.2)$$

As propriedades do material final são determinadas em relação ao volume de cada elemento (V_j), o qual corresponde ao volume da amostra final multiplicado pelo percentual de cada componente, de modo que:

$$V_j = p_j V_{af}. \quad (3.3)$$

Para determinar a massa de cada elemento (M_j) a ser utilizada, multiplica-se o valor da densidade de cada um na equação (3.3), ou seja,

$$M_j = \rho_j V_j. \quad (3.4)$$

Determinada a quantidade em massa de cada elemento, os mesmos foram peneirados para padronização do tamanho de partícula, tiveram a massa aferida em uma balança analítica (Tecnologia Unibloc AUW-220D) de precisão 0,00001g. O passo seguinte é um processo de cautela, a mistura dos pós, pois o objetivo é a obtenção de uma distribuição homogênea dos elementos evitando a formação agregados, efeitos que alterem as propriedades físicas do material. A mistura se trata de uma operação que se realiza em estado sólido, e por essa razão, condições como heterogeneidade e tamanho de partículas adotados na mistura interferem diretamente na densidade do material final obtido [33].

Desta forma os pós de HAp e VB_{st}, com tamanho de partícula $\leq 45\mu\text{m}$, foram misturados em diferentes proporções (em massa) para a preparação dos compósitos VB-HAp. A Tabela 3.1 apresenta as nomenclaturas e as concentrações (%) das amostras.

Tabela 3. 1: Concentrações das amostras

<i>Amostras</i>	<i>% de VB</i>	<i>% de HAp</i>
VB_{st}	100	0
75VB25HAp	75	25
50VB50HAp	50	50
25VB75HAp	25	75
HAp	0	100

Após uma homogeneização inicial mecânica dos pós, as amostras foram submetidas ao processo de mistura em um moinho de baixa energia com uma rotação de 20rpm durante 1 hora.

Após a mistura, as amostras foram compactadas uniaxialmente a 55 MPa, em discos de 5mm de diâmetro e espessura de 2mm, em seguida os discos foram acondicionados em cadinhos de platina e tratados termicamente.



Figura 3. 2: Amostras após tratamento térmico. (VB_t: Vidro Bioativo tratado termicamente)

As peças de 25VB75HAp e 50VB50HAp visualmente se assemelha à peça de HAp não indicando visualmente alterações significativas, já a peça de 75VB25HAp sofre deformação possivelmente devido ao fato de que uma das fases presentes no material possa ter atingido a fase líquida, característica que por vezes é explorado na fabricação dos compósitos durante o processo de sinterização [59, 60, 79].

A escolha do vidro para produção dos compósitos com HAp foi baseada em estudos anteriores, mostrando que a adição de 10% Fluoreto de Cálcio no vidro obteve a melhor resposta da bioatividade [43] e a temperatura de tratamento térmico em 810°C no vidro propiciou a formação de fases cristalinas biotivas e não citotóxicas [80]

Dessa forma a temperatura de 810°C foi adotada para o tratamento térmico das misturas citadas na Tabela 4.1, além disso para que a HAp tenha energia de ativação uma temperatura próxima de 800°C poderia ter melhores efeitos sobre a mistura dos pós [33].

A taxa de aquecimento teve um aumento inicial da temperatura de 3°C/min até atingir uma temperatura 20°C abaixo da temperatura do tratamento térmico, subindo então de 1 em 1°C até 810°C e permanecendo nessa temperatura por 2 horas. Em seguida, o forno foi resfriando gradativamente, inicialmente 3°C/min e a partir de ~200°C por inércia térmica. As amostras após o tratamento térmico foram analisadas íntegras por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e em pó pelas técnicas de espectroscopia Raman, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR-ATR) e difração de raios x (DRX).

3.2 Técnicas Experimentais

3.2.1 Distribuição de tamanho de partícula

A análise de distribuição (%) do tamanho de partícula foi realizada em um equipamento *Dynamic Light Scattering* (DLS) (Anton Paar, *Litesizer 500*) pertencente ao COMCAP-UEM. Para as análises, as partículas do pó foram submetidas a banho ultrassônico em acetona por 5

minutos para minimizar os efeitos de agregação das partículas. São realizadas três medidas de tamanho de partículas em três ângulos diferentes através de dispersão de luz dinâmica.

3.2.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

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

3.2.3 Difractometria de Raios X (DRX)

As análises de DRX foram realizadas nas amostras em pó após tratamento térmico e também nas amostras em peça, após imersão em SBF, em um difratômetro (Bruker, D8 Advanced), pertencente ao COMCAP-UEM, utilizando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54439 \text{ \AA}$) na amostra em peça sobre porta amostra zero *background*. A medida foi realizada com velocidade de varredura de 0,29°/min no intervalo de 10° a 60° à temperatura ambiente.

3.2.4 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman das amostras em pó, após o tratamento térmico foram uma média de três medidas realizadas em três porções distintas da amostra, obtidos utilizando um microscópio Raman confocal (Bruker, Senterra), pertencente ao COMCAP-UEM, com excitação em 532nm e potência nominal de 20mW. Cada espectro Raman foi uma média de 60 varreduras em um mesmo ponto na amostra, no qual o laser de excitação é focado por uma objetiva de 20X de aumento, com resolução espectral de 3-5 cm^{-1} , obtido no intervalo entre 400 e 4000 cm^{-1} . A detecção do espalhamento Raman das amostras é feita por meio de uma câmera CCD (*charged-coupled device*) refrigerada à -85°C, com tempo de integração de 5s para cada uma das 60 varreduras.

3.2.5 Espectroscopia FTIR-ATR

Os espectros de absorção no infravermelho das amostras em pó, após o tratamento térmico e também das amostras em peça após imersão em SBF, sendo uma média de três medidas realizadas em três porções distintas da amostra (em pó) e três posições diferentes da peça (em discos), foram obtidos em um espectrômetro de FTIR com o acessório para reflectância total atenuada (FTIR-ATR) (Bruker, Vertex 70V), pertencente ao COMCAP-UEM. Cada espectro é a média de 128 varreduras, na região entre 400 e 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} .

3.2.6 Microscopia de varredura eletrônica (MEV)

Para a obtenção das imagens de micrografia da superfície e fratura das amostras tratadas termicamente em 810°C, e também das peças após os períodos de imersão em SBF, foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Varredura (FEI, Quanta 250), pertencente ao COMCAP-UEM. As amostras foram recobertas com um filme metálico, e as imagens foram captadas em diferentes magnificações com uma aceleração do feixe de elétrons em 20KeV.

3.3 Teste de bioatividade *in vitro*

Para os testes *in vitro*, as peças obtidas após tratamento térmico foram submetidas a imersão em solução de SBF para avaliação da sua capacidade de troca iônica na formação da camada de apatita.

3.3.1 Imersão em Fluido Corporal Simulado (SBF)

A solução utilizada neste ensaio foi preparada de acordo com os procedimentos descritos por Kokubo e Takadama [45]. Para a imersão, foram utilizados tubos plásticos, do tipo falcon, de fundo cônico, com uma razão do volume de SBF baseada na área superficial da amostra, adotando então uma razão de 0,1ml/mm² [45]. Para que a amostra não tivesse contato com o tubo, foi acomodada em prendedores de plástico, o tubo foi vedado e mantido em banho térmico à temperatura de 36,5°C \pm 0,1°C, conforme ilustra o esquema na Figura 3.3.

As peças foram retiradas do SBF nos períodos de 0,04; 0,12; 0,25; 1; 2; 4; 7; 14; 21 e 28 dias. O valor do pH da solução foi aferido em cada um dos períodos, sendo o resultado uma média de 2 peças imersas para cada tempo.

As amostras foram retiradas da solução de SBF, lavadas suavemente com água ultrapura, com o intuito de cessar as atividades entre as peças e o SBF, logo após foram acondicionadas e secas em temperatura ambiente ($\sim 24^{\circ}\text{C}$) e armazenadas até o momento no qual foram submetidas às análises.

As massas de todas as peças foram aferidas antes e após o período de imersão utilizando uma balança analítica de precisão 0,01 mg (A&D Company, Série 202), para avaliar a perda de massa e a velocidade de dissolução. Com o auxílio de um *smartphone*, as amostras foram fotografadas antes e após imersão, todas em um mesmo ambiente.

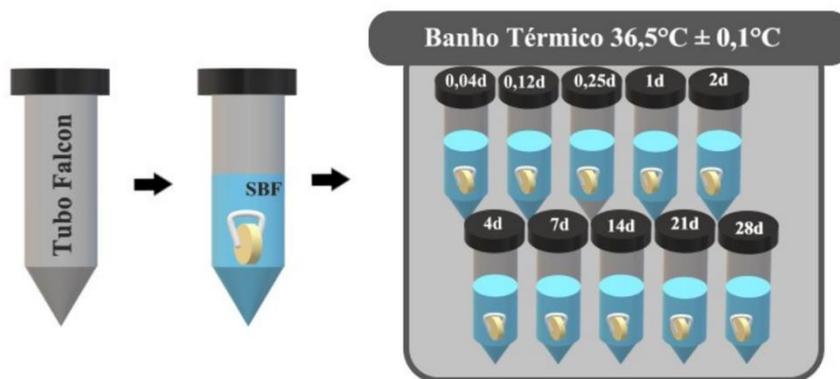


Figura 3. 3: Esquema do procedimento de imersão das amostras em SBF.

As medidas de pH durante o processo de produção do SBF, assim como antes e depois da imersão das peças nas diferentes concentrações e períodos analisados no ensaio *in vitro*, foram realizados com um pHmetro (MS TecnoPON® Instrumentação, mPA210) com precisão de $\pm 0,005$. As medidas foram realizadas sempre na mesma temperatura, cerca de $36,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (temperatura na qual as peças são mantidas em SBF) e a calibração do eletrodo foi realizada previamente antes de cada medida, com três pontos de referência, com tampões nos valores de pH 4, 7 e 10.

3.4 Ensaio biológicos *in vitro*

Os ensaios de viabilidade celular e cicatrização de feridas foram realizadas no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos da UEM sob

supervisão do Professor Dr. Celso Vataru Nakamura. Foram avaliadas as amostras tratadas termicamente na forma de pó.

3.4.1 Avaliação da viabilidade celular *in vitro* pelo método colorimétrico MTT

A avaliação da atividade citotóxica das amostras foi realizada com células de pré-osteoblastos, da linhagem MC3T3-E1, ressuspendidas à concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL em meio α -MEM acrescido de 10% de SFB, adicionado 100 μ L nos poços da placa de 96 poços, e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. As amostras tratadas termicamente em pó foram diluídas (1000, 700, 400 e 100 μ g/mL), adicionadas sobre a monocamada celular e incubadas por 24 h, nas mesmas condições. Após a incubação, foi adicionado 50 μ L de solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) à 2mg/mL. A placa foi incubada por 4 h a 37°C com 5% de CO₂ (protegido da luz) e adicionados 150 μ L de DMSO. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (BIO-TEK Power Wave XS) em 570nm.

3.4.2 Ensaio de Cicatrização de Feridas (*Wound Healing Assay* – WHA)

Para o ensaio de cicatrização de feridas, as células MC3T3-E1 foram cultivadas em placas de 24 poços a $0,5 \times 10^6$ células/mL até atingir a confluência. A monocamada foi ferida em linha reta com uma ponteira de 200 μ L e lavadas três vezes com tampão PBS. O meio de cultura com as amostras, nas concentrações de 0,4 e 0,1 mg/mL foram adicionados aos poços e incubados a 37°C e 5% CO₂. Após 24 horas de incubação, a área da ferida foi analisada usando um modelo de microscópio de contraste de fase Olympus® CKX41. A taxa de cicatrização da ferida foi calculada como a porcentagem da ferida inicial até o fechamento completo da ferida em diferentes momentos com o *software* Image J [81].

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados e análises obtidos por meio das técnicas de análises térmicas (DSC), espectroscopia Raman, difratometria de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ensaios antibacterianos e de citotoxicidade pelo método colorimétrico MTT nos compósitos de hidroxiapatita (HAp) e vidro bioativo borato tratado termicamente (VB_t), em diferentes proporções

4.1 Tamanho e morfologia das partículas dos pós dos precursores e compósitos sem tratamento térmico

A heterogeneidade de forma e tamanho das partículas, assim como de aglomerados, pode influenciar na densidade do material produzido interferindo nas características finais dos compósitos obtidos. Estabelecer o tamanho e a forma das partículas de HAp e do VB_{st} possibilita o conhecimento da existência de partículas separadas ou aglomerados, sabendo que as misturas para a obtenção dos compósitos podem ter aglomerados devido à metodologia adotada. Foram realizadas análises nos precursores, HAp e VB_{st} e nos compósitos de HAp+VB [33, 82].

A Figura 4.1 mostra a distribuição do tamanho de partícula obtida pela técnica espalhamento de luz dispersiva (*Dynamic Light Scattering* - DLS) para as amostras, em pó, de HAp, VB_{st} e nas três composições de compósitos: 25HAp75VB, 50HAp50VB e 75HAp55VB, sem tratamento térmico.

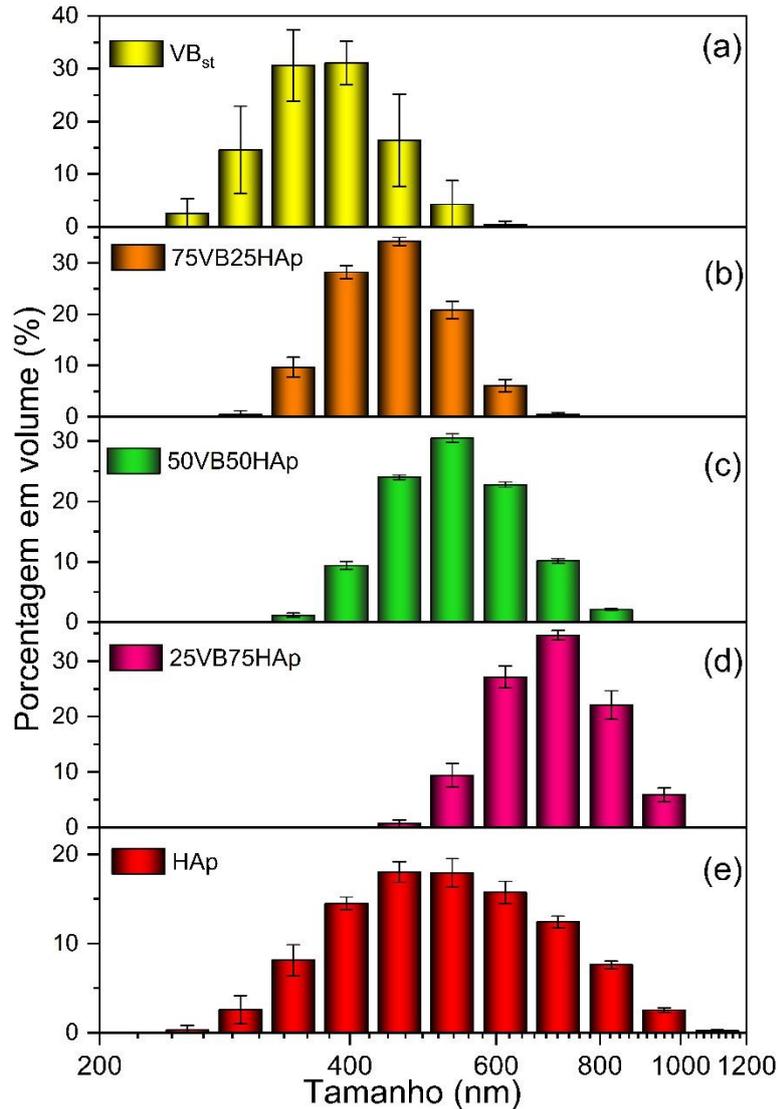


Figura 4. 1: Distribuição do tamanho de partículas das amostras de hidroxiapatita (HAp), vidro bioativo borato (VB_{st}) e dos compósitos de HAp e VB: 75HAp25VB, 50HAp50VB e 25HAp75VB, sem tratamento térmico.

A Figura 4.1(e) mostra a distribuição do tamanho de partícula para a HAp entre 220 e 1200nm, com um centro em ~500nm. A Figura 4.1(a) apresenta para o VB_{st} uma distribuição entre 230 e 650nm com centro em ~390nm. Para os compósitos temos uma variação entre o mesmo intervalo dos precursores, sendo o centro para 25VB75HAp próximo de 720nm, 50VB50HAp em 530nm e 75VB25HAp em 460nm.

Os pós de HAp e VB_{st} foram submetidos a controle de tamanho da partícula antes da preparação dos compósitos, de modo a obter partículas com tamanho $\leq 45000\text{nm}$ ($45\mu\text{m}$). A forma e o tamanho de partículas obtidas são provenientes de um processo manual de trituração, visto que as amostras foram trituradas em almofariz de ágata. Ainda assim, as partículas se apresentaram bem menores do que se presumia, e os tamanhos das partículas são propriedades

importantes no processo de obtenção de materiais, pois, podem influenciar nas características finais dos mesmos [83].

A Figura 4.2 apresenta as micrografias realizadas nas amostras com o intuito de observar a morfologia das partículas do pó de HAp, VB_{st} e dos compósitos. Nota-se que a HAp (Fig. 4.2-a) apresenta partículas arredondadas de diferentes tamanhos formando aglomerados, já o VB_{st} (Fig. 4.2-b) apresenta partículas com fraturas irregulares, características de materiais vítreos, também é possível observar pequenas partículas devido ao processo de trituração.

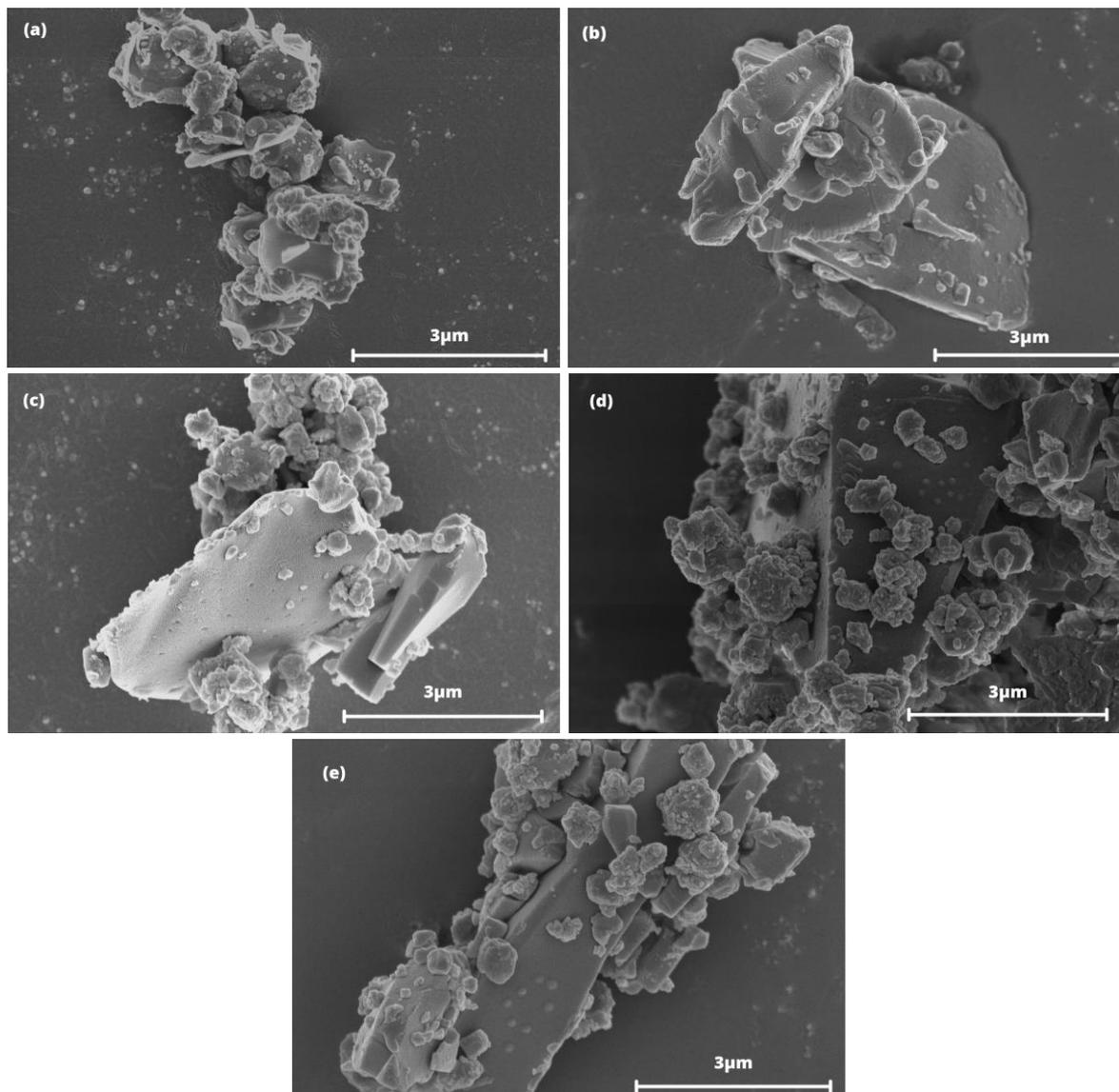


Figura 4. 2: Imagens de MEV das amostras em pó, antes do tratamento térmico a) HAp, b) VB_{st}, c) 75HAp25VB, d) 50HAp50VB, e) 25HAp75VB.

As imagens apresentadas não representam necessariamente a disposição das partículas visto que temos um intervalo de tamanhos, ainda que se tenha feito uso de peneira para controle. As imagens foram obtidas em uma magnificação de 50000x, em que nota-se nas misturas para obtenção dos compósitos, que as partículas de HAp ficaram aderidas às do VB_{st}, de diferentes formatos e de tamanhos irregulares. Esta característica, possivelmente, é devido à distribuição não uniforme de partículas, mesmo com a metodologia adotada, na qual os pós para os compósitos foram submetidos a um processo de mistura, por cerca de 1h. Esta morfologia dos pós dos compósitos pode influenciar quando a amostra for compactada e submetida ao tratamento térmico.

4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Utilizando a técnica de DSC, foram obtidas as temperaturas características de transição vítrea (T_g), início de cristalização (T_x), pico de cristalização (T_c), início de fusão (T_L), e pico de fusão (T_{m1} e T_{m2}) das amostras VB_{st}, HAp e dos compósitos HAp+VB em pó e sem tratamento térmico. Os termogramas obtidos estão apresentados na Figura 4.3 e as temperaturas características na Tabela 4.1.

Em estudo anterior, no qual foi estudado o mesmo vidro em diferentes temperaturas de tratamento térmico, Nascimento (2021) [80] relata que o mesmo não se funde até a temperatura de 850°C, indicando que os eventos térmicos observados nos termogramas de DSC são resultantes de transições estruturais ou de fases do sistema vítreo. O vidro apresenta T_g em 498°C, temperatura na qual ocorre a transição do estado vítreo para o estado super-resfriado. O início do processo de cristalização se dá em T_x = 617°C com máximo em T_c = 634°C, pico exotérmico, e dois picos endotérmicos em 773 e 838°C, T_{m1} e T_{m2}, respectivamente, os quais podem estar associados a um processo de fusão em duas etapas ou decomposição de fases cristalinas formadas.

O comportamento térmico da HAp durante tratamento térmico pode ser afetado pela composição e morfologia, entre outras propriedades que dependam das condições de síntese. Em baixas temperaturas é observada a evolução da água adsorvida, entretanto este fato não afeta os parâmetros de rede da HAp [84]. A remoção da água da rede cristalina da HAp é observada com o aumento da temperatura e leva a contração do parâmetro de rede “a” [85]. Além disso, o fósforo de superfície é reativo podendo formar os grupos P-OH, que são desidroxilados quando aquecidos para formar grupos P-O-P na superfície [86]. A desidroxilação da HAp começa com a liberação de OH entre 850 e 900°C [84], levando à formação de vacâncias na posição dos grupos hidroxilas na estrutura da HAp. Como resultado,

há a formação de oxihidroxiapatita. Este processo é afetado por fatores cinéticos, taxa de aquecimento e a pressão parcial de vapor de água. Quando todos os grupos OH^- são extintos da estrutura da HAp é formada a oxapatita. Tanto a reação para formação da oxihidroxiapatita quanto da oxapatita são reversíveis, podendo ocorrer em um processo de resfriamento, levar a incorporação de OH as estruturas formadas [87].

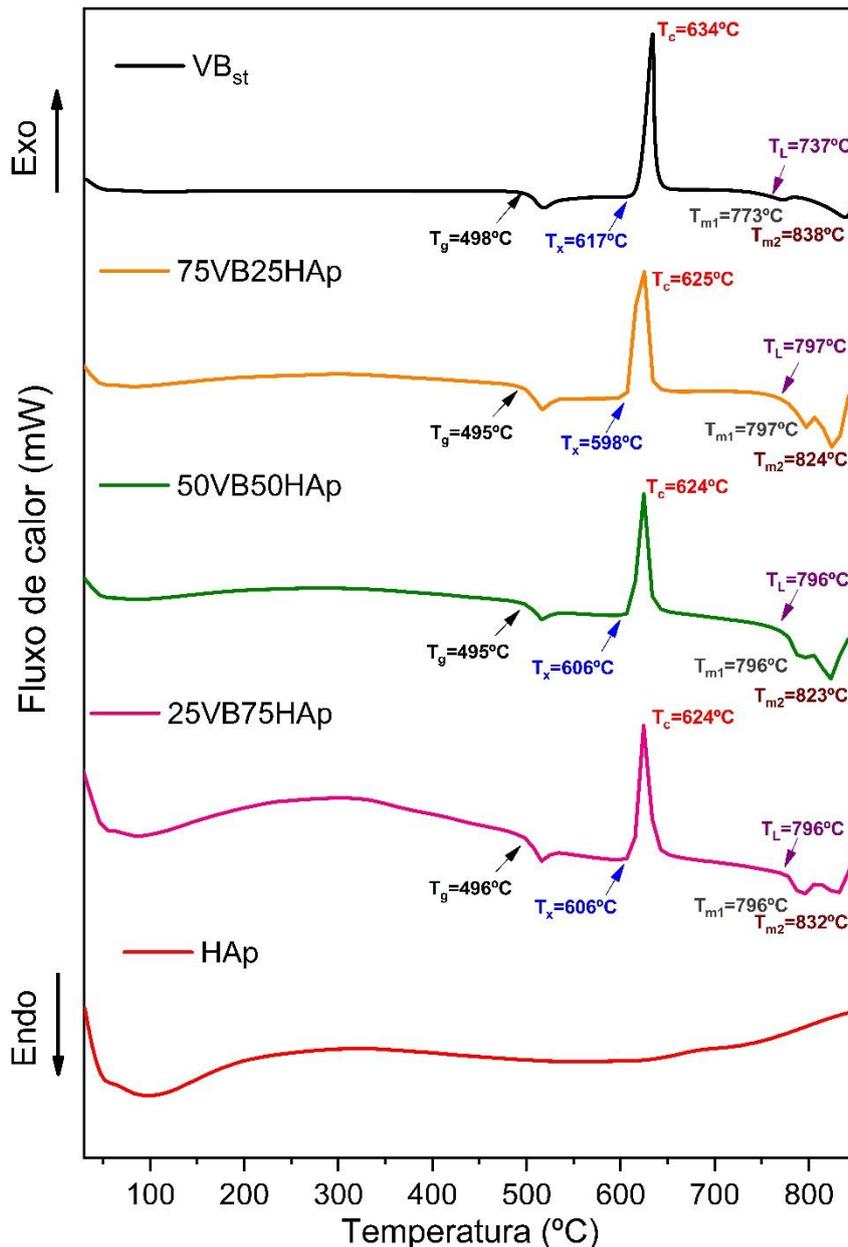


Figura 4. 3: Termogramas das amostras em pó sem tratamento térmico: vidro bioativo borato (VB_{st}), hidroxiapatita (HAp) e compósitos HAp-VB: 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25VB75HAp

No termograma obtido para HAp, acima de 700°C, observa-se o início de um processo exotérmico que pode estar associado a desidroxilação da HAp. Somente para temperaturas

acima de 1300°C há decomposição da HAp, na forma de oxipatita, em fases tricálcio fosfato, tetracálcio fosfato e óxido de cálcio [84, 88].

Nas curvas dos termogramas dos compósitos é possível observar os mesmos picos do VB_{st}, com pequenos deslocamentos (Tabela 4.1), e a presença do halo da HAp, entre 150 e 500°C. Este comportamento indica que a mistura dos pós de VB_{st} e HAp, nas diferentes concentrações, resulta em um compósito com características de seus precursores, sem a formação de novas estruturas. Este comportamento reforça as micrografias apresentadas anteriormente, que mostravam as estruturas da HAp aderidas às de VB_{st}. Cabe ressaltar que fases cristalinas que podem se formar no vidro e a decomposição da HAp em outras fases podem ocorrer decorrente do tratamento térmico nos compósitos.

As características térmicas foram obtidas por dois parâmetros identificados nas curvas de DSC, os quais nos permitiram calcular o parâmetro de estabilidade térmica (ΔT) dado por $\Delta T = T_x - T_g$, esse parâmetro implica na estabilidade contra desvitrificação.

Tabela 4. 1: Temperaturas e parâmetros obtidos por meio do DSC para as amostras em pó.

Amostra	($T_g \pm 5$)°C	($T_x \pm 5$)°C	($T_c \pm 2$)°C	($T_L \pm 5$)°C	($T_{m1} \pm 2$)°C	($T_{m2} \pm 2$)°C	($\Delta T \pm 1$)°C
VB _{st}	498	617	634	737	773	838	119
75VB25HAp	495	598	625	772	797	824	103
50VB50HAp	495	606	624	776	796	823	111
25VB75HAp	496	606	624	778	796	832	110
HAp	–	–	–	–	–	–	–

4.3 Difractometria de raios X (DRX)

Para a caracterização estrutural, todas as amostras tratadas termicamente à 810°C foram avaliadas por DRX, cujos difratogramas são apresentados a seguir.

A Figura 4.4-a apresenta o difratograma do VB_t com picos bem definidos, mostrando a cristalinidade do material resultante do tratamento térmico, diferente do difratograma de vidros que exibem halos amorfos, característicos de materiais que não apresentam ordem estrutural de longo alcance [89, 90]. Ainda na mesma figura, há a indexação das fases identificadas.

Foi possível identificar três fases cristalinas principais, este fato ocorre devido à cristalização do material, visto que, para o vidro adotado, a temperatura de cristalização é próxima de 630°C. Geralmente a fase que será formada depende da composição do vidro bioativo, bem como da metodologia do tratamento térmico adotado [91, 92]. Segundo Ouis e colaboradores (2012) [18], a adição de óxidos modificadores como o P₂O₅ na rede cristalina

dos vidros pode promover a nucleação e cristalização durante o tratamento térmico, que agem como pontos para nucleação heterogênea de fases.

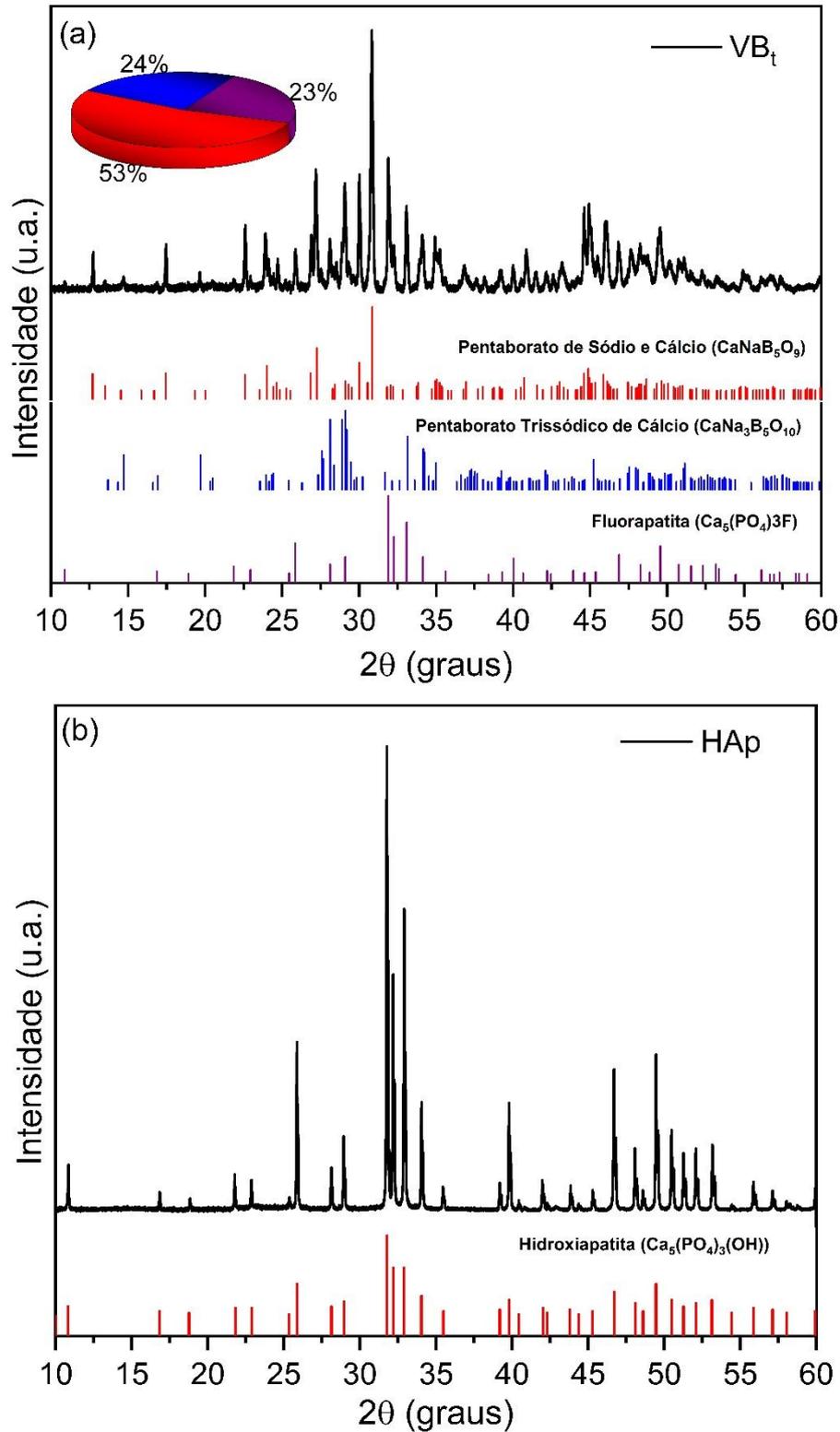


Figura 4. 4: Difratomogramas de raios X para (a) amostra de VB_t , com a indexação da fase $CaNaB_5O_9$ (JCPDS # 078-0294), $CaNa_3B_5O_{10}$ (JCPDS # 078-0295) e FAp (JCPDS # 071-0881), (b) amostra de HAp (JCPDS # 074-0565).

As fases cristalinas presentes no VB_t, com tratamento em 810°C, foram identificadas como o Pentaborato de Sódio e Cálcio (CaNaB₅O₉) (JCDPS # 078-0294) de estrutura monoclinica (grupo espacial: P21/c), o Pentaborato Trissódico de Cálcio (CaNa₃B₅O₁₀) (JCDPS # 078-0295) de estrutura triclinica (grupo espacial: P-1), e a Fluorapatita (FAP) Ca₅(PO₄)₃F (JCPDS # 071-0881), que possui estrutura hexagonal (grupo espacial: P63/m). Estas também foram relatadas em vidros bioativos de trabalhos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa, do mesmo sistema vítreo Cálcio-Sódio-Borato, com diferentes temperaturas de tratamento térmico [80, 93]. Hudon e colaboradores [94, 95] relatam que, em vidros contendo B₂O₃, pode se formar outras fases como Fosfato de Sódio, assim como o Fosfato de Cálcio, já que a presença de elementos como o Ca²⁺ na amostra induz à separação de fases em vidros com base borato para a formação de fases com o P₂O₅, naturalmente é esperado a formação de uma fase, ou outra, de acordo com os componentes constituintes do vidro [18]. No presente estudo, estas outras fases não foram identificadas para o VB_t, possivelmente em razão de serem minoritárias, quando comparadas às duas principais. No detalhe da Figura 4.4-a é mostrado um cálculo percentual de cada fase indexada, no qual foi obtido 53% de Pentaborato de Sódio e Cálcio (CaNaB₅O₉), 24% de Pentaborato Trissódico de Cálcio (CaNa₃B₅O₁₀) e 23% de FAP. Foi utilizado o método semiquantitativo RIR (*Reference Intensity Ratio*), utilizando a base de dados de acesso livre ICDD (*International Center for Diffraction Data*). O método de RIR é baseado na avaliação da intensidade de difração da fase não caracterizada com base na difração de um material usado como referência I/I_c, na maioria das vezes o material referência é o corindo [96]. Vale ressaltar que existem erros significativos associados na obtenção desse parâmetro via essa automatização, como no caso da amostra possuir fases não cristalinas, fases em menor quantidade ou mesmo com picos sobrepostos, assim como elementos não identificados [97].

A Figura 4.4-b mostra o difratograma obtido para a HAp, após o tratamento térmico. A ficha cristalográfica com a indexação da fase Ca₅(PO₄)₃(OH) (JCPDS # 074-0565) de estrutura hexagonal com (grupo espacial: P63m) mostrando que a HAp tratada termicamente não contém fases adicionais.

Para os compósitos em diferentes proporções de HAp e vidro, a indexação inicial dos picos foi a partir das fases observadas para os precursores e, em seguida, de outras fases que pudessem vir a se formar devido à possível interação entre os materiais no processo para a obtenção dos compósitos. As Figuras 4.5; 4.6 e 4.7 apresentam os difratogramas dos compósitos, as indexações com as fichas cristalográficas e análise pelo método RIR.

Foi possível indexar a maior parte dos picos do difratograma da amostra 75VB25HAp (Fig. 4.5) com as fases CaNaB_5O_9 e FAp, presentes também no VB_t , e adicionalmente a HAp (JCPDS # 074-0565) e NaCaPO_4 (JCPDS # 076-1456) de estrutura ortorrômbica (grupo espacial $\text{Pn}21a$), conhecida como renanita. O percentual de cada fase neste compósito, pelo método RIR, foi 55% de CaNaB_5O_9 , 15% de FAp, 15% de HAp e 15% de NaCaPO_4 .

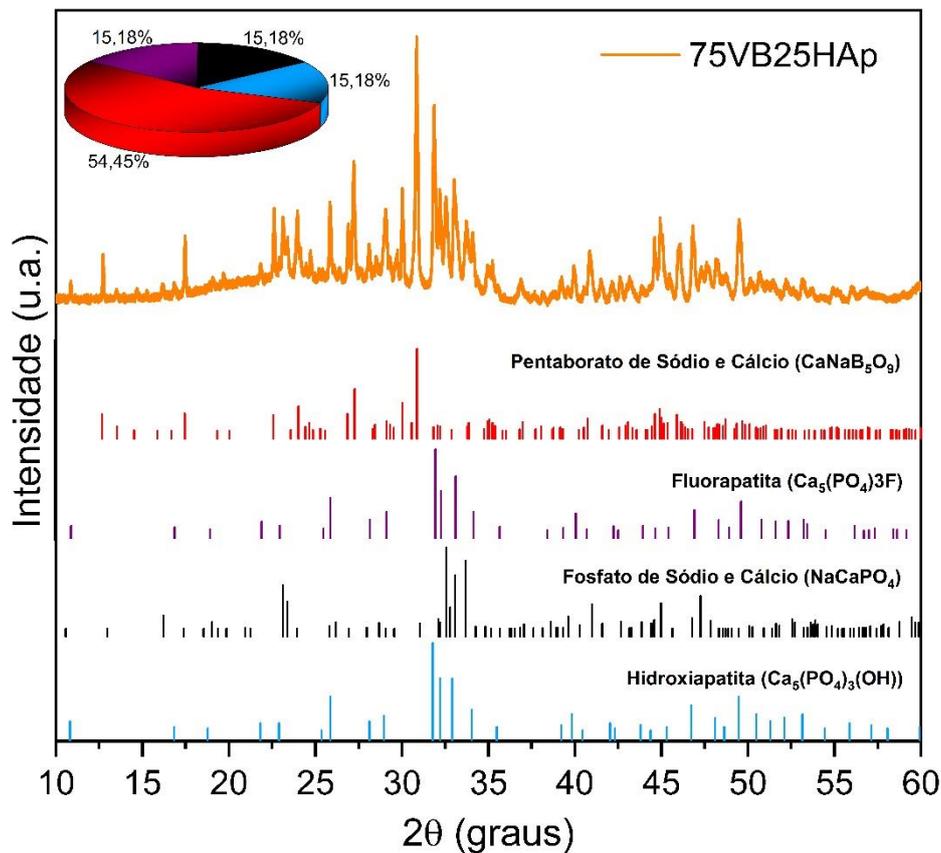


Figura 4. 5: Difratogramas de raios X para a amostra de 75VB25HAp, com a indexação da fase CaNaB_5O_9 (JCPDS # 078-0294), FAp (JCPDS # 071-0881), NaCaPO_4 (JCPDS # 076-1456) e HAp (JCPDS # 074-0565).

A HAp é esperada devido à sua presença na composição do compósito (25%), já a fase cristalina NaCaPO_4 , pode ser decorrente de reações entre as fases cristalinas do VB_t e a HAp, neste processo químico pode ter ocorrido difusão de íons Na do VB_t para a estrutura da HAp. Como consequência, a HAp se torna deficiente em Ca, resultando na formação da fase NaCaPO_4 . Modelos similares foram propostos em estudos de compósitos de vidros bioativo silicato com HAp [98, 99]. A fase $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ presente no difratograma de VB_t , não foi identificada no compósito, pois, possivelmente, esta foi decomposta na fase CaNaB_5O_9 liberando os íons de Na para a formação da fase NaCaPO_4 . Avaliando os resultados obtidos

pelo método RIR, o esperado seria uma redução nas fases de Cálcio, Sódio e Boro, entretanto, a fase CaNaB_5O_9 se manteve constante (~53%), enquanto a fase $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ não foi detectada nos difratogramas, reforçando que houve decomposição do $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ em CaNaB_5O_9 . Outro produto que poderia ser decorrente desta decomposição é o óxido de sódio (Na_2O), que por sua vez forneceria os íons Na para formação NaCaPO_4 . Além disso, o percentual de HAp não corresponde ao total do compósito, indicando o consumo de HAp, por meio da deficiência de Ca, para a formação de NaCaPO_4 . O NaCaPO_4 é biocompatível e bioativo, com taxa de biodegradação menor que a $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (β -tricálcio fosfato ou β -TCP) e pode ser utilizado para o aumento da densificação em compósitos a base de HAp [98].

Nesta proporção entre VB e HAp, a FAp mostrou-se dependente da quantidade de VB, possivelmente, não contribuindo para a formação da fase NaCaPO_4 , uma vez que na análise de RIR os percentuais de FAp foram 23% e 15%, para VB_t e $75\text{VB}25\text{HAp}$, respectivamente. Ainda resultante da interação do VB e a HAp pode ocorrer a formação de outras fases minoritárias, decorrentes da degradação da HAp, tais como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e CaO , além da liberação de água, visto que aditivos, podem alterar a estrutura da HAp [85, 100]. Ashuri e colaboradores (2012) [101], relatam a presença da fase β -TCP em seu estudo de compósitos de vidro bioativo com base de silicato e hidroxiapatita, resultado da sinterização de compósitos em temperaturas superior à 800°C , já que nessa temperatura a HAp não estequiométrica pode sofrer decomposição térmica.

O difratograma do compósito $50\text{VB}50\text{HAp}$ com sua indexação e análise de RIR está mostrado na Fig. 4.6. Foram identificadas as fases cristalinas CaNaB_5O_9 (27%), HAp (28%), NaCaPO_4 (17%), CaB_2O_4 (19%) (JCPDS # 076-0747) de estrutura ortorrômbica (grupo espacial Pnca) e a FAp (9%). Nesta concentração há a presença de uma de uma fase não identificada no compósito anterior, o CaB_2O_4 . Esta fase pode ser proveniente da decomposição da CaNaB_5O_9 em CaB_2O_4 e Na_2O , o que poderia justificar a diminuição da CaNaB_5O_9 de 55% para 27% e constância da fase NaCaPO_4 de 15% para 17%, quando comparados aos compósitos $75\text{VB}25\text{HAp}$ e $50\text{VB}50\text{HAp}$, respectivamente. Neste processo, o CaNaB_5O_9 disponibilizaria Na, por meio de sua decomposição, e a HAp o Ca para formação de NaCaPO_4 . A FAp se mantém dependente da concentração de VB, já que seu percentual no compósito $50\text{VB}50\text{HAp}$ é de 9%, o que corresponde, aproximadamente, a 50% da quantidade que há em VB_t .

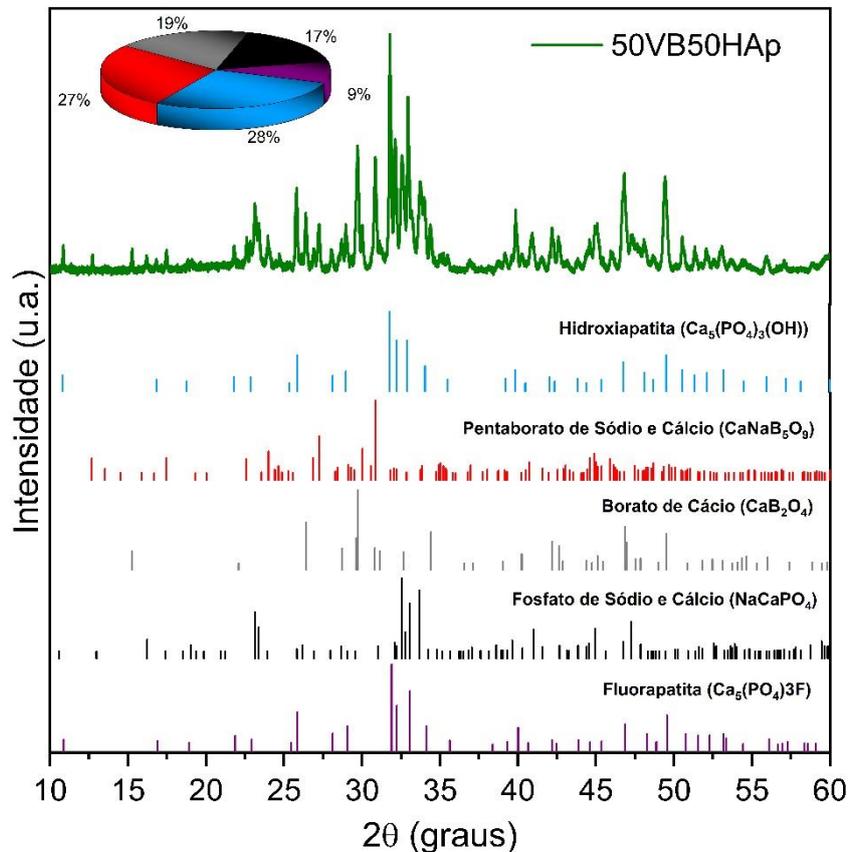


Figura 4. 6: Difratomogramas de raios X para a amostra de 50VB50HAp, com a indexação da fase HAp (JCPDS # 074-0565), CaNaB₅O₉ (JCPDS # 078-0294), CaB₂O₄ (JCPDS # 076-0747), NaCaPO₄ (JCPDS # 076-1456) e FAp(JCPDS # 076-0558).

Cabe ressaltar que, em trabalhos anteriores em nosso grupo de pesquisa [80, 93], bem como na literatura [102-105], foi relatado que a decomposição da fase cristalina CaNaB₅O₉ em CaB₂O₄, obtida por meio de tratamento térmico a partir de 900°C em minerais e vidros boratos. Desta forma, a adição de HAp ao VB borato propiciou a formação desta fase sem a necessidade de uma alta temperatura para o tratamento térmico, o que pode promover melhora na bioatividade, propriedades mecânicas e não apresenta citotoxicidade [106, 107].

Nos compósitos 25VB75HAp foram identificadas as fases cristalinas HAp (60%), CaB₂O₄ (19%), NaCaPO₄ (12%) e FAp (9%). O difratograma, as indexações e quantificação pelo método de RIR estão mostrados na Figura 4.7. Nota-se a presença das mesmas fases presentes no compósito 50VB50HAp, exceto da CaNaB₅O₉, indicando que toda a fase se decompôs em CaB₂O₄ e Na₂O, pois o percentual de CaB₂O₄ manteve-se constante e o de NaCaPO₄ diminuiu, uma vez que a quantidade de íons Na disponíveis para sua formação também sofreu uma diminuição.

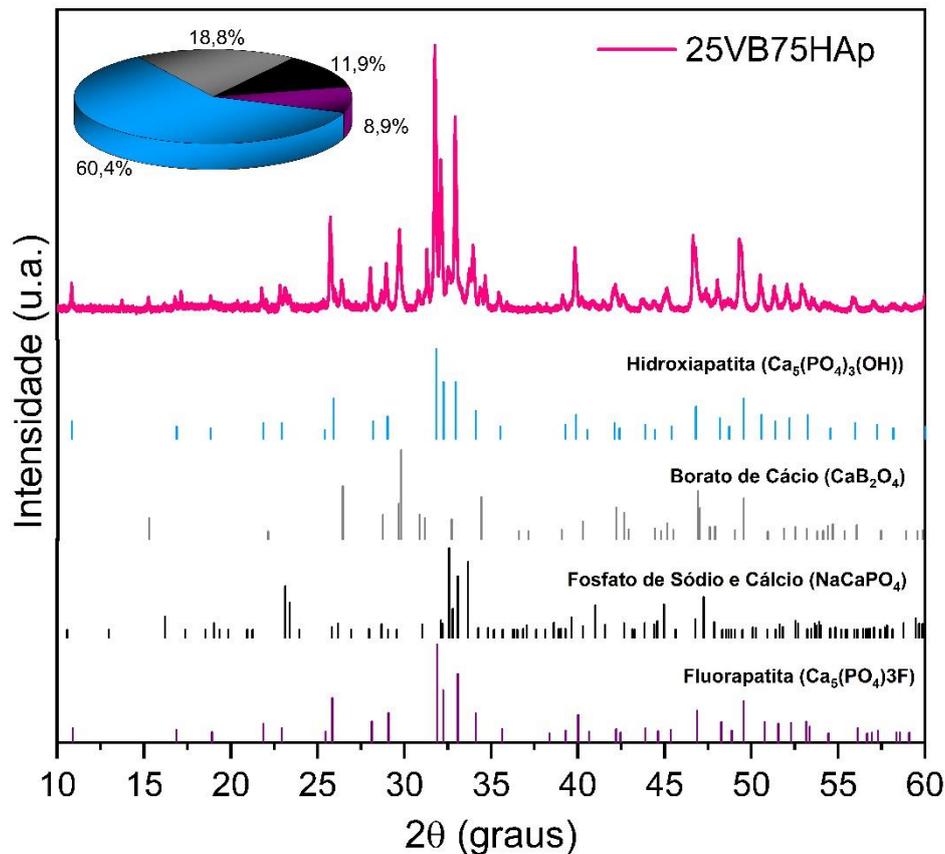


Figura 4. 7: Difratomogramas de raios X para a amostra de 75VB25HAp, com a indexação da fase HAp (JCPDS # 074-0565), CaB₂O₄ (JCPDS # 076-0747), NaCaPO₄ (JCPDS # 076-1456) e FAp(JCPDS # 076-0558).

A HAp é a fase majoritária no compósito 25VB75HAp devido à sua maior quantidade na composição. A redução na disponibilidade de Na para a formação de NaCaPO₄ também colabora no aumento da quantidade de HAp comparada ao compósito 50VB50HAp. A FAp é fase que se mantém presente para as três composições de compósitos, e sua quantidade depende da quantidade de VB nos compósitos. Entretanto para o compósito 25VB75HAp há uma pequena variação com relação a proporcionalidade com VB, pois sua quantidade se manteve constante comparada com a amostra 50VB50HAp. Este comportamento pode ser resultado de um favorecimento de substituição de OH por F na HAp, resultando na formação de FAp [108,109].

As reações químicas, entre VB e HAp nos compósitos, propostas neste trabalho, consideram a formação de fases cristalinas minoritárias, como tricálcio fosfato (TCP), relatado na literatura como resultado da degradação da HAp no processo de desidroxilação [101, 110] e de material amorfo, as quais não foram identificadas.

Com relação à presença dessas contribuições amorfas, que podem ser percebidas nos difratogramas em dois halos amorfos observados para as amostras, a parcela cristalizada pode ser calculada pela equação 4.1:

$$I_c = \frac{A_c}{A_a + A_c} \cdot 100, \quad (4.1)$$

sendo I_c o índice de cristalinidade (%), A_c a área cristalina difratada e A_a a parte amorfa difratada [111]. A área cristalina é calculada obtendo a integral apenas para os picos de difração, enquanto que a área amorfa é calculada pela integral da linha de base do difratograma. Como o porta-amostra utilizado é constituído de vidro silicato, para determinar a parte amorfa, foi descontado o valor obtido para o porta-amostra, chegando então em uma estimativa da porção cristalina das amostras apresentadas na Figura 4.8.

Este método é uma estimativa da fração cristalizada na amostra, e indica que há um aumento do índice de cristalinidade conforme aumenta a proporção de HAp nos compósitos, uma vez que a HAp é cristalina. Outro ponto a ser considerado é que há um residual amorfo presente nas amostras devido à contribuição do VB, mesmo este tendo sofrido cristalização durante o processo de tratamento térmico.

Foram empregadas as espectroscopias Raman e FTIR, com o intuito de avaliar os modos vibracionais das amostras, visto que, estas análises podem proporcionar informações moleculares e químicas de maneira a corroborar com os resultados de DRX até aqui apresentados.

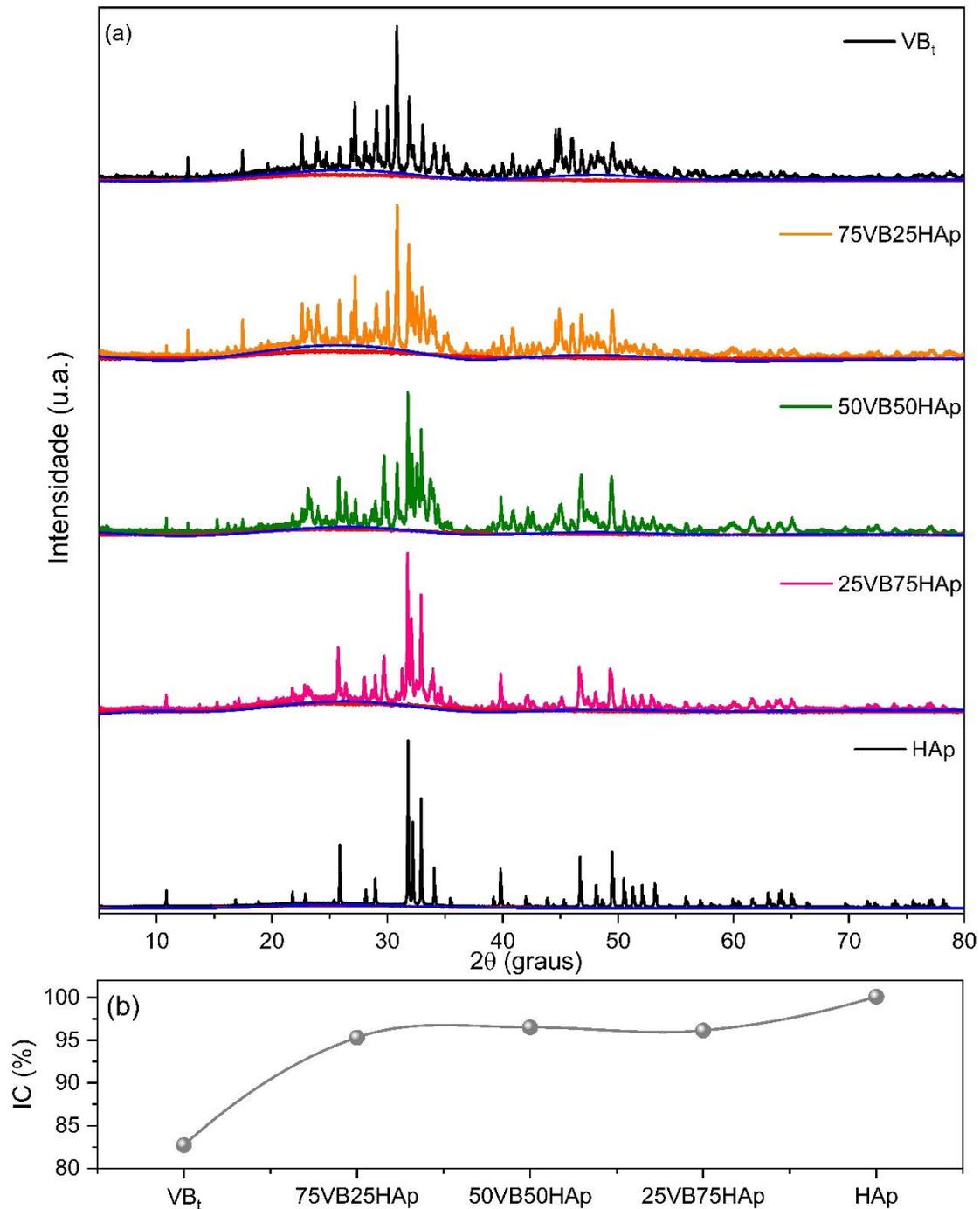


Figura 4. 8: Difratogramas das amostras (a) VB_t (em preto), 75VB25HAp (em laranja), 50VB50HAp (em verde), 25VB75HAp (em rosa) e HAp (em preto). Em vermelho, o difratograma do porta amostra e em azul, a área amorfa refratada calculada. (b) Índice de cristalinidade obtido para as amostras, a linha é apenas um guia visual.

4.4 Espectroscopia Raman

As técnicas espectroscópicas têm como princípio fundamental a interação entre a radiação eletromagnética e a matéria que resultam em diferentes mecanismos físicos, os quais permitem variados métodos de detecção, desta forma estas técnicas são amplamente utilizadas na

caracterização de materiais [112-115]. Dentre elas, a espectroscopia Raman tem destaque, pois fornece informações referentes aos modos vibracionais das ligações químicas e grupos funcionais pertencentes ao material, permitindo a sua caracterização molecular [116]. Diante de sua aplicabilidade, a espectroscopia Raman foi empregada para caracterizar os materiais precursores (HAp e VB_t) e os compósitos 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25VB75HAp, todos submetidos ao tratamento térmico em 810°C.

A Figura 4.9 apresenta o espectro Raman obtido para a HAp na região de 400 a 3600cm⁻¹, na qual podem ser observados os modos vibracionais característicos do grupo químico PO₄³⁻, sendo estiramentos simétricos ν_1 em 962cm⁻¹, ν_2 na região entre 550 e 400cm⁻¹, ν_3 entre 1100 e 1000cm⁻¹ e o ν_4 de 750 e 650cm⁻¹, já o estiramento simétrico da ligação O-H ocorre em 3572cm⁻¹ [117].

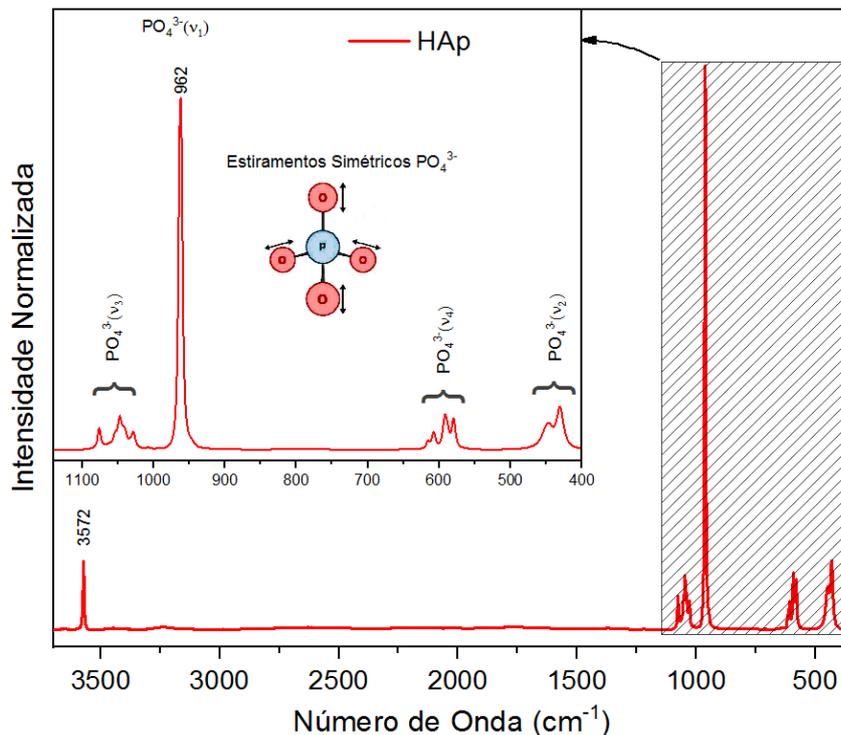


Figura 4. 9: Espectro Raman da hidroxiapatita (HAp) à 810°C. No detalhe a região espectral referente aos modos vibracionais do grupo químico fosfato (PO₄³⁻).

A Figura 4.10 apresenta o espectro Raman do VB_t tratado termicamente em 810°C. Os espectros foram obtidos no intervalo de 400 a 4000cm⁻¹, entretanto a região apresentada é a que possui características espectrais significativas, entre 400 e 1600cm⁻¹. Devido ao tratamento térmico, o VB_t passou por cristalização, formando as fases cristalinas: CaNaB₅O₉, CaNa₃B₅O₁₀ e FAp, conforme discutido nas análises de DRX, o que resulta em um espectro Raman com

picos bem definidos. No caso de um espectro de vidro, as bandas são largas, características de um material amorfo.

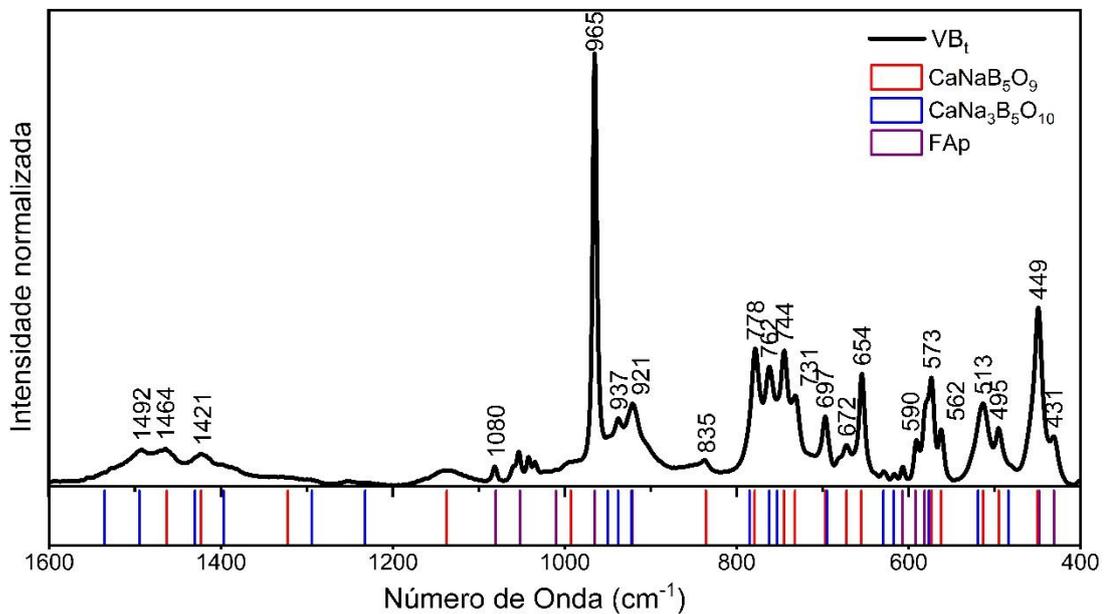


Figura 4. 10: Espectro Raman do vidro bioativo após tratamento térmico à 810°C (VB₁) com indexação fases CaNaB₅O₉ (em vermelho) [93], CaNa₃B₅O₁₀ (em azul) [118] e FAp (RRUFF R040098-3) (em roxo)[119].

O CaNaB₅O₉ apresenta blocos unitários de (B₅O₉)³⁻ compondo uma estrutura de folhas de átomos de B e O, formando dois anéis compostos de unidades triangulares (BO₃) e tetraédricas (BO₄). Já a fase CaNa₃B₅O₁₀ é formada por pentaboratos, constituídos de unidades (B₅O₁₀)⁵⁻ estruturando um par de anéis contendo duas unidades de BO₃ conectadas por uma unidade de BO₄ [89,120,121].

Estudos sobre vidros bioativos boratos, apontam que a rede formadora composta por unidades trigonais (BO₃) e tetraédricas (BO₄) podem formar as superestruturas do Boro com os anéis de boroxol e os grupos diborato, triborato, tetraborato, pentaborato, orto e metaborato. Quando o vidro passa por cristalização, as fases cristalinas formadas continuam a conter as estruturas formadas por BO₃ e BO₄⁻, entretanto em outras formações [32].

Com relação ao espectro Raman do VB₁, observa-se bandas de superestruturas e estruturas mais simples formadas pelas unidades BO₃ e BO₄. Na região entre 1550 e 1300cm⁻¹ e a banda em 630cm⁻¹ que podem ser associadas a estiramentos da estrutura B-O das cadeias e anéis de metaborato, tais cadeias podem ser simples ou até mesmo estruturas mais elaboradas com grupos de BO₃ e BO₄ interligados [122,123]. Já o ortoborato (BO₃)³⁻ apresenta quatro regiões principais de vibração das ligações B-O: (i) 1285 a 1020cm⁻¹ referente ao estiramento assimétrico [124], (ii) 945 a 840cm⁻¹ estiramento assimétrico, (iii) 810 a 676cm⁻¹ e (iv) 672 a

570cm^{-1} que pode ser associado à deformação fora do plano e no plano, respectivamente [124, 125]. Cabe ressaltar, que as fases $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e CaNaB_5O_9 são formadas por unidades tetraédricas e trigonais de BO, o que pode acarretar sobreposição de bandas no espectro do VB_t . A fase CaNaB_5O_9 foi obtida por meio de comparação, conforme descrito por Gibin (2021) [93].

A banda mais intensa do espectro Raman do VB_t , centrada em 965cm^{-1} , é referente ao estiramento simétrico ν_1 de PO_4^{3-} da FAp.

Apesar de algumas sobreposições de bandas das fases identificadas na técnica de DRX, foi possível observar bandas dos modos vibracionais das mesmas três fases por meio da espectroscopia Raman na amostra VB_t .

A Figura 4.11 apresenta os espectros dos compósitos 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25VB75HAp com a indexação das fases observadas. Em todas as concentrações dos compósitos foi possível observar a presença da HAp pela presença das bandas em 3572cm^{-1} . As demais bandas HAp, modos de vibração do PO_4^{3-} , tem superposição com as outras fases indexadas, principalmente com a FAp, pois as composições químicas de ambas são semelhantes. A FAp está presente nos compósitos decorrente da presença do VB na composição. Entretanto, com o aumento da concentração de HAp, nota-se deslocamentos de bandas da FAp em direção às bandas da HAp.

Nas Figuras 4.11.a, b e c há um destaque para região entre 3600 e 3550cm^{-1} atribuído ao estiramento de OH da estrutura da HAp (multiplicado por um fator na figura, para uma melhor visualização). Foi observado um aumento da contribuição desta banda com a adição de HAp aos compósitos, sendo na amostra 25VB75HAp a banda com melhor definição. Veja que quando presente, o F pode substituir o OH, de maneira que a HAp pode sofrer substituições que originaria mais FAp na amostra, fato observado uma vez que a semi quantificação RIR indicam nas amostras com menor quantidade de VB a fase FAp se mantém constante, mesmo quando a parcela de VB no compósito é menor. A banda em 3537cm^{-1} pode ser relacionada ao OH livre, reforçando a ideia de que o mesmo pode estar sofrendo substituições [101, 110, 128].

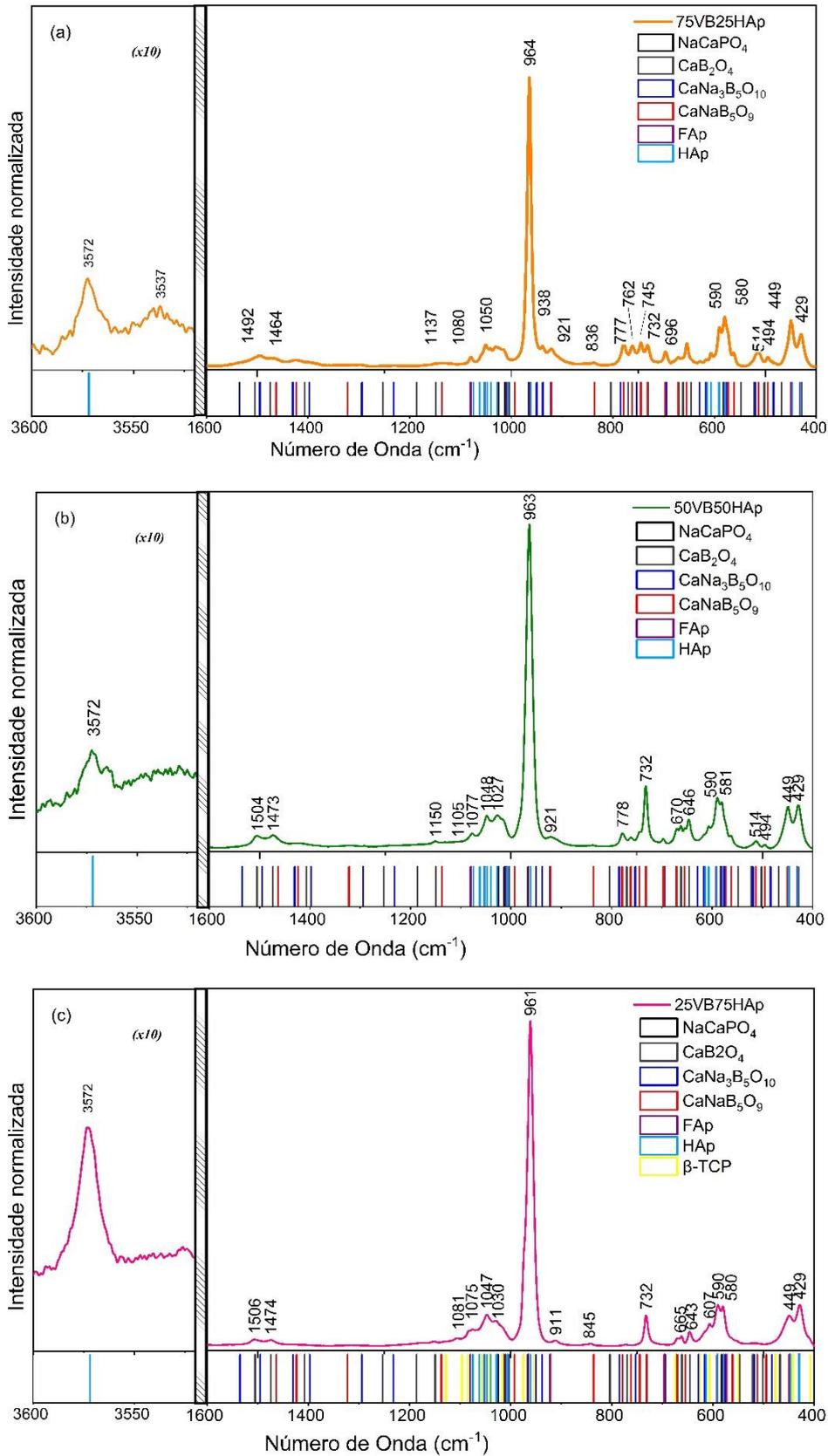


Figura 4. 11: Espectros Raman dos compósitos (a) 75VB25HAp, (b)50VB50HAp e (c) 25VB75HAp com indexação das fases CaNaB_5O_9 (em vermelho), $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ [118] (em azul), FAp RUUFF R040098-3 [119] (em roxo), NaCaPO_4 [126] (em preto) e CaB_2O_4 [121] (em cinza). A HAp (em azul claro) está como indexação para melhor visualização.

A exemplo, a Figura 4.12 mostra o deslocamento da banda centrada em 965cm^{-1} , $\nu_{\text{S1}}\text{PO}_4^{3-}$, (FAp) deslocando-se para 962cm^{-1} (HAp) com o aumento da concentração de HAp. Estes deslocamentos são mais evidentes a partir de 50% de HAp. Ademais, nesta região é notada a presença de um ombro em $\sim 975\text{cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{S1}}\text{PO}_4^{3-}$) [127] na amostra 25VB75HAp indicando a presença de β -TCP no compósito. Os compósitos 50VB50HAp e 75VB25HAp apresentam alargamento da banda na região entre $980 - 940\text{cm}^{-1}$, entretanto não foi possível observar a mesma formação do ombro em 975cm^{-1} . A fase β -TCP é um dos prováveis produtos da reação entre o VB e HAp nos compósitos, nas análises de DRX não foi possível evidenciar nos difratogramas, entretanto na espectroscopia Raman é notória sua presença. O modo de vibração assimétrico é altamente Raman ativo, sendo assim, mesmo que em proporções minoritárias é possível sua detecção.

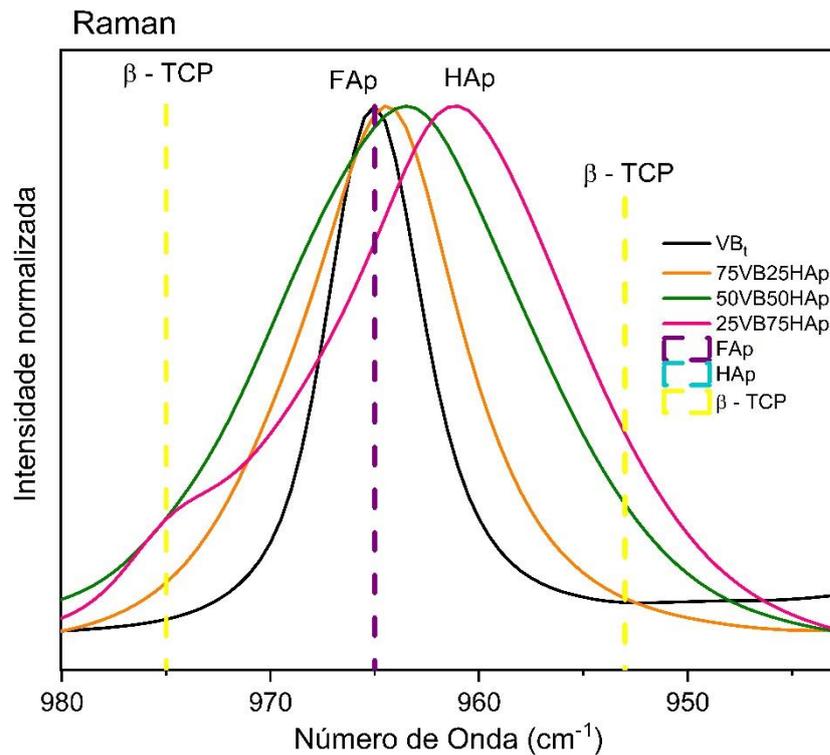


Figura 4. 12: Espectros Raman dos materiais tratados termicamente à 810°C : vidro bioativo (VB_t) e dos compósitos 75VB25HAp, 50VB50HAp, 25VB75HAp na região espectral entre 980 e 940cm^{-1} , banda do modo vibracional $\nu_{\text{S1}}\text{PO}_4^{3-}$. As linhas tracejadas indicam as posições das bandas referentes à fluorapatita (FAp) RUUFF R040098-3 [119], hidroxiapatita (HAp) e β -tricálcio fosfato (β -TCP) [127].

Na Figura 4.13 são apresentados os espectros para o VB_t e compósitos na região entre 1570 e 1270cm^{-1} , referentes às vibrações do tipo estiramento das unidades BO_3 e BO_4 que compõe as fases CaNaB_5O_9 e $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$. Nesta mesma região foram identificados também

os modos de estiramento para a fase CaB_2O_4 [121] presente nos compósitos 50VB50HAp e 25VB75HAp. Nesta figura a presença das fases pode ser visualizada por meio das gaussianas que compõem o espectro da região estudada. A utilização do ajuste matemático com funções gaussianas permite obter, de forma mais precisa, a contribuição de diferentes componentes, quando eles se apresentam sobrepostos em espectros. O ajuste foi realizado de forma que a soma das funções gaussianas melhor representasse o espectro experimental, utilizando os espectros das fases já identificadas na técnica de DRX, e tomando os centros de suas bandas Raman na região como referência para quantificar o número de gaussianas. Nas Figuras 4.13 a) e b), VB_t e compósito 75VB25HAp, respectivamente, se observa a predominância das fases CaNaB_5O_9 e $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ (gaussianas hachuradas em vermelho e azul), entretanto as áreas e larguras das gaussianas ajustadas variam com a adição de HAp. A fase CaB_2O_4 (gaussianas hachuradas em cinza) ocorre para os compósitos 50VB50HAp e 25VB75HAp, nestes também é possível notar que há menos gaussianas das fases CaNaB_5O_9 e $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$. Observa-se gaussianas que foram atribuídas à presença das fases CaNaB_5O_9 e/ou $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ (gaussianas sem hachurado), pois os centros estão localizados em posições intermediárias entre as bandas das duas fases.

As fases CaNaB_5O_9 e $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ foram identificadas ao longo dos espectros de todos os compósitos, entretanto, a exemplo da Figura 4.13, foram diminuindo as suas presenças com a adição de HAp, vista de modo mais expressivo a partir da concentração de 50VB50HAp. Este comportamento foi avaliado levando em consideração a quantidade de bandas Raman presentes nos espectros.

Na Figura 4.14 é apresentada uma comparação para avaliação da presença da fase NaCaPO_4 nos compósitos entre o cálculo de RIR, obtido nas análises de DRX, com a área da região entre 1035 e 1000cm^{-1} , em função da concentração de VB nos compósitos. No detalhe da figura, nota-se o aparecimento de duas bandas, ausentes do espectro do VB_t, centradas em ~ 1025 e 1013cm^{-1} , estiramento ν_3 do PO_4^{3-} [129], com o aumento da concentração de HAp nos compósitos. O comportamento para ambas as análises se apresenta de forma semelhante, com uma tendência de máximo em 50% de VB, ou seja, para a concentração 50VB50HAp. Este fato pode estar correlacionado a maior disponibilidade de íons Na fornecidos pelas fases CaNaB_5O_9 e $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e de íons Ca pela HAp, porém não foi possível quantificá-los pelas técnicas aqui empregadas. A região utilizada para avaliação da fase NaCaPO_4 não apresentou sobreposição com bandas Raman de outras fases em nenhum dos compósitos, sendo esta a única região de não sobreposição de bandas.

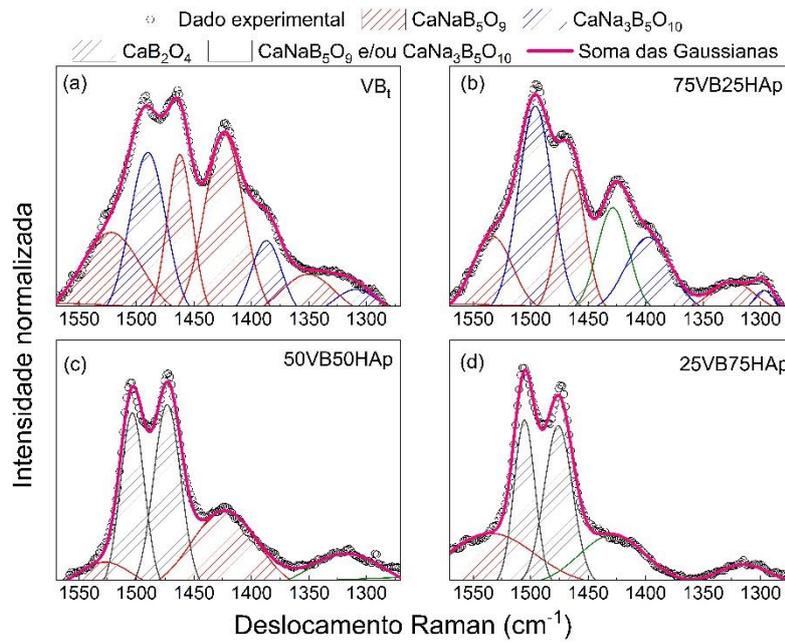


Figura 4. 13: Espectros Raman do a) vidro bioativo tratado (VB_1) à 810°C e compósitos: b)75VB25HAp, c)50VB50HAp e d)25VB75HAp na região entre 1570 e 1270cm^{-1} ajustados com funções gaussianas. Sendo as gaussianas hachuradas as fases identificadas em cada material: CaNaB_5O_9 (vermelho), $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ (azul) e CaB_2O_4 (cinza). As gaussianas sem hachurar foram identificadas como sendo da CaNaB_5O_9 e/ou $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$. Os círculos abertos são os espectros Raman experimentais e a linha contínua em rosa a soma das funções gaussianas.

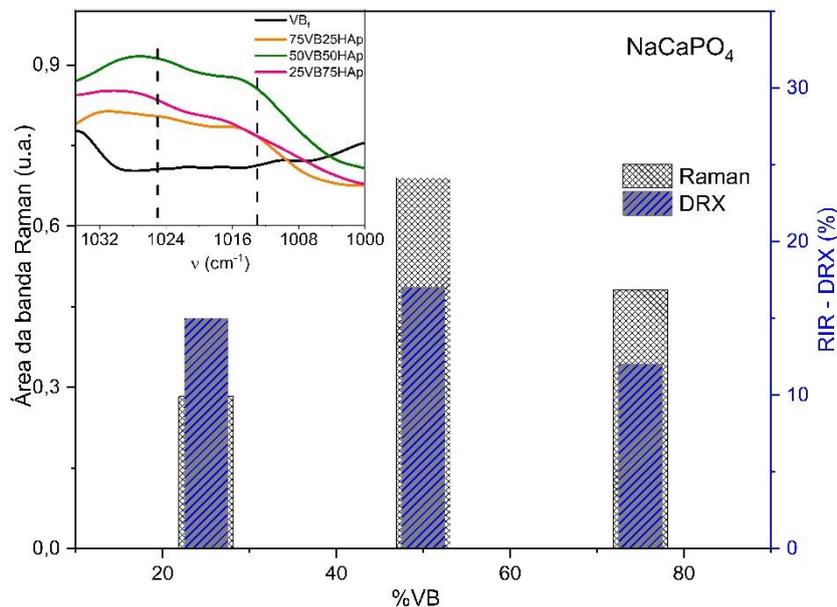


Figura 4. 14: Comparação entre a área da região dos espectros Raman entre 1035 e 1000cm^{-1} e o cálculo de RIR obtido pela técnica de DRX em função da concentração de vidro bioativo tratado termicamente (VB_1), referentes à presença da fase NaCaPO_4 . No detalhe, a região espectral dos espectros Raman utilizada para o cálculo da área nos compósitos. A linha tracejada indica a posição da banda de NaCaPO_4 .

A fase NaCaPO_4 também foi observada nos espectros Raman de todos os compósitos, porém seus modos vibracionais têm energias próximas às dos modos de vibração da FAp e HAp, ocasionando sobreposição de bandas. A região espectral na qual não há sobreposição com outras bandas Raman está localizada entre 1035 e 1000cm^{-1} .

As fases encontradas por meio da técnica de DRX, também foram observadas na espectroscopia Raman, além disso, o mecanismo de reação proposto por meio da decomposição das fases Cálcio, Sódio, Boro e Oxigênio reagindo com a HAp para formação de novas fases, não presente nos materiais precursores, também foi evidenciada pela espectroscopia Raman.

De forma a complementar a análise de espectroscopia Raman foi empregada também a análise de espectroscopia FTIR, visto que estas são técnicas consideradas complementares, cujos resultados podem fornecer novas informações. Ainda que no geral ambas permitem a avaliação dos modos vibracionais das moléculas, há algumas restrições de casos em que as amostras possam ser ativas em apenas uma das técnicas [116]. Dessa forma, na sequência, serão apresentados os resultados obtidos por espectroscopia FTIR.

4.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR)

O espectro da HAp observado na Figura 4.15 possui uma contribuição em 3571cm^{-1} do estiramento da ligação O-H. Na região de 1250 a 1600cm^{-1} (região hachurada em rosa) aparecem duas bandas em 1456 e 1411cm^{-1} atribuídas ao modo de estiramento assimétrico ν_3 (P-O) e possível sobreposição de CO_3^{2-} [33]. Na região compreendida entre 1200 e 400cm^{-1} (região hachurada em preto) temos bandas de absorção dos grupos funcionais PO_4^{3-} e OH^- presentes na HAp, sendo as bandas em 1087cm^{-1} e 1026cm^{-1} atribuídas ao modo de estiramento assimétrico ν_3 (P-O). A banda em 962cm^{-1} atribuída ao modo de estiramento simétrico de ν_1 (P-O). As vibrações em 565cm^{-1} e 600cm^{-1} são atribuídas ao modo de deformação de ν_4 (P-O), a absorção $\sim 472\text{cm}^{-1}$ é atribuída ao modo de deformação do ν_2 (P-O). Já em 630 e 875cm^{-1} as bandas presentes correspondem aos modos de deformação do grupo OH^- [130, 131].

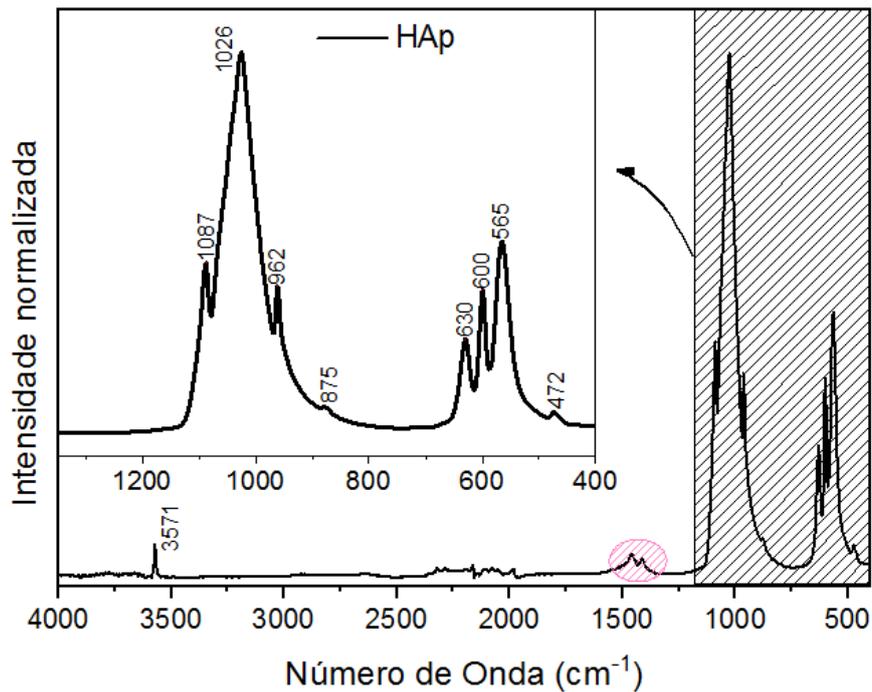


Figura 4. 15: Espectros de FTIR-ATR da HAp à 810°C.

A Figura 4.16 apresenta o espectro de FTIR-ATR obtido para o VB_t na região de 400 a 1600cm⁻¹, é possível observar picos bem definidos devido à cristalização do vidro bioativo borato, tal como no espectro Raman do VB_t. Este comportamento já foi observado em trabalhos anteriores [80, 93], evidenciando a formação de fases cristalinas, diferente de espectros característico de materiais vítreos que apresentam bandas largas, sem picos estreitos. Ainda nesta mesma figura, as fases identificadas na técnica de DRX foram indexadas baseadas em espectros de FTIR obtidos da literatura. Sabendo da existência de unidades trigonais BO₃ e tetraédricas BO₄ nas fases identificadas no VB_t tratado termicamente, foram atribuídas três regiões ao espectro de FTIR-ATR do VB_t: em 1500-1200cm⁻¹ de estiramentos de B-O de unidades trigonais BO₃, em 1200-850cm⁻¹ de estiramentos B-O de unidades tetraédricas BO₄ e 800-600cm⁻¹ decorrente de vibrações de flexão de vários segmentos de borato [18].

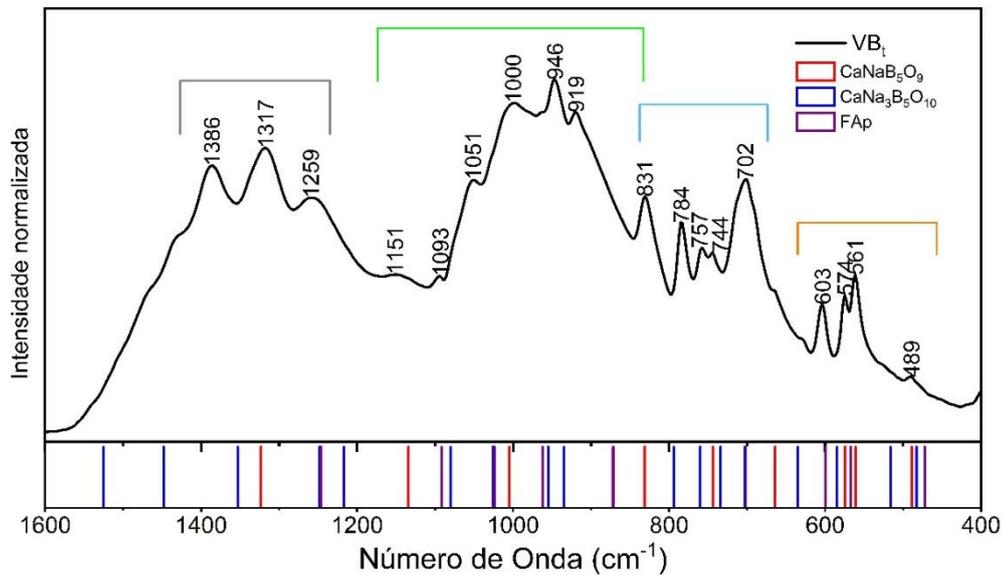


Figura 4. 16: Espectros de FTIR-ATR do VB_t à 810°C com indexação das fases CaNaB₅O₉ (em vermelho) [93], CaNa₃B₅O₁₀ (em azul) [118] e FAp (em roxo) (RRUFF ID: R040098.1) [119].

Para a região demarcada em cinza na Figura 4.16 em cinza, as bandas de 1550 a 1200cm⁻¹ podem ser relacionadas à absorção de unidades triangulares BO₃ [18, 93, 132, 133], sendo entre 1750 e 1200cm⁻¹ dos estiramentos assimétricos de B-O [133], compondo as vibrações de grupos de piroborato e ortoborato em ~1340cm⁻¹, de 1300 a 1200cm⁻¹ atribuída às vibrações de estiramento de B-O e pontes de B-O entre B₃O₆ e BO₃, de modo que a banda observada em 1259cm⁻¹ pode ser associada a grupos de ortoboratos [133]. A região marcada em verde claro, entre 1170 e 830cm⁻¹, pode ser associada às vibrações de unidades tetraédricas BO₄, com predominância dos estiramentos de B-O [132], sendo as bandas na região ~1200 -760 cm⁻¹ atribuídas a grupos pentaborato, triborato e diborato [130]. Vale lembrar que nesta região pode haver sobreposição de bandas dos grupos borato com fosfato da FAp, indexada por meio base de dados RRUF [119], observa-se as bandas em 1093 e 1024cm⁻¹ atribuídos ao estiramento do ν₃(P-O) [135], além de bandas em 962cm⁻¹ do estiramento do ν₁(P-O) [136]. A região em azul de 840 a 670cm⁻¹ é dita de predominância de modos de flexão das unidades de borato [18]. E por fim, a região em laranja, de 620 a 430cm⁻¹, é predominante os modos de flexão de várias unidades de borato [18]. Youssif e colaboradores [134] também indicam bandas em 550cm⁻¹ e 630cm⁻¹ atribuídas a vibrações do tipo estiramento ν₄(P-O) das unidades PO₄.

A Figura 4.17 apresenta os espectros de FTIR-ATR obtidos para os compósitos de HAp e VB_t, além da indexação das fases cristalinas verificadas no VB_t, da HAp e das novas fases formadas NaCaPO₄ e CaB₂O₄. Foram observadas bandas na região entre 1600 e 400cm⁻¹, entretanto não foi verificada a presença da banda em 3571cm⁻¹ (região do espectro não mostrada) atribuída ao ν_sOH presente na HAp. A região entre 1140 e 400cm⁻¹ abrange os modos

vibracionais ν_1 , ν_2 e ν_4 do PO_4^{3-} presentes nas fases NaCaPO_4 e FAp e na HAp, resultando assim em uma sobreposição de bandas, o que dificulta a avaliação da contribuição da fase NaCaPO_4 , formada a partir das fases cristalinas do VB_t tratado termicamente e da HAp, bem como de possíveis variações entre a FAp e HAp, tal como observadas nos espectros Raman. Nos espectros dos compósitos 50VB50HAp e 25VB75HAp há uma contribuição da fase NaCaPO_4 , em 1037cm^{-1} (asterisco na cor preta), estiramento de $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ [137] indicando tal como na espectroscopia Raman, a formação desta nova fase. A presença da fase β -TCP foi notada na amostra 25VB75HAp em duas regiões, destacadas na Fig. 5.17 com asteriscos na cor amarelo, em 977 e 548cm^{-1} dos modos de vibrações de estiramento simétrico do $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ e $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$, respectivamente.

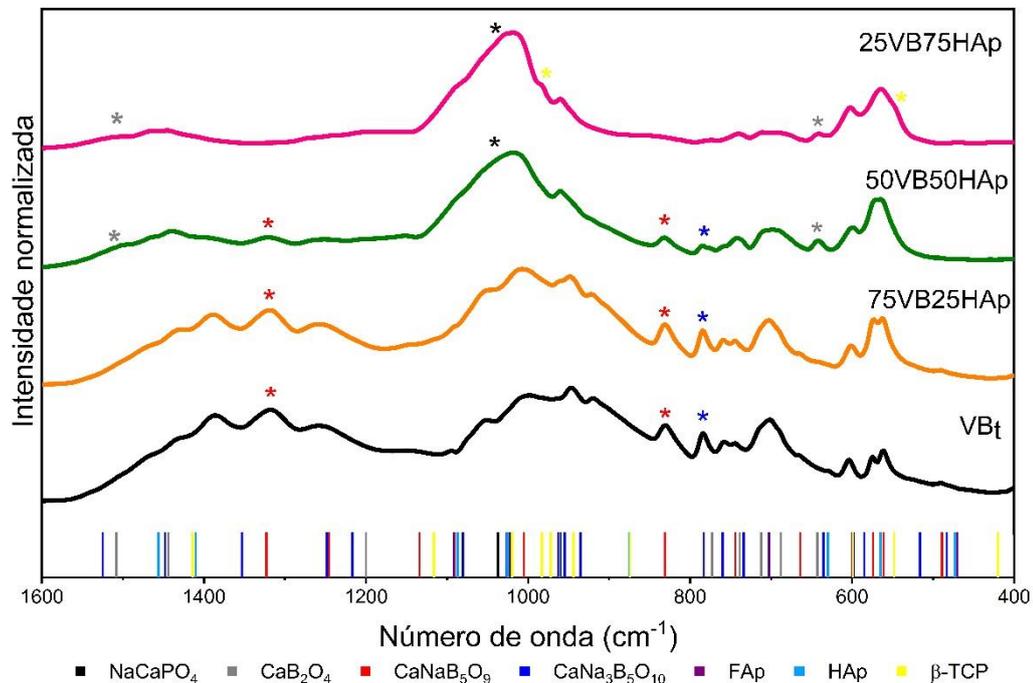


Figura 4. 17: Espectros de FTIR-ATR do VB_t comparado aos compósitos 75VB25HAp, 50VB50HAp, 25VB75HAp. Na parte inferior há a indexação da posição das bandas de absorção das fases identificadas: NaCaPO_4 (na cor preta) [138], CaB_2O_4 (na cor cinza) [139], CaNaB_5O_9 (na cor vermelha) [93], $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ (na cor azul) [118], FAp (na cor roxa) (RRUFF ID: R040098.1) [119], HAp (na cor azul claro) e β -TCP (na cor amarela) [117]. Os asteriscos estão coloridos da mesma cor que as indexações destacando bandas da reação entre o VB e HAp.

A presença dos modos de vibração do carbonato (CO_3^{2-}) é esperada nos espectros de FTIR entre 1600 e 1400cm^{-1} e $\sim 875\text{cm}^{-1}$, atribuídas às vibrações de estiramento antissimétricas do $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ e $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ [140] devido à presença da FAp, HAp e β -TCP nos compósitos, porém nestas regiões também há a sobreposição com os modos de vibração do fosfato e das unidades de BO.

Outra banda da HAp não observada nos espectros FTIR dos compósitos é a $\sim 630\text{cm}^{-1}$, referente ao estiramento de OH [117].

Além das fases que contêm fosfato, os espectros de todos os compósitos apresentam contribuições das fases CaNaB_5O_9 e $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$, similares entre o VB_t e $75\text{VB}25\text{HAp}$, e com alterações espectrais nas amostras $50\text{VB}50\text{HAp}$ e $25\text{VB}75\text{HAp}$. Os espectros destas fases são compostos por vibrações das unidades trigonais e tetraédricas de BO que resultam em diferentes estruturas, cujas atribuições já foram mencionadas anteriormente na descrição do espectro FTIR do VB_t . A decomposição das fases CaNaB_5O_9 e $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ para formação da fase CaB_2O_4 , pode ser vista em algumas regiões dos espectros dos compósitos, quando comparados ao espectro do VB_t , e foram destacadas na Fig. 4.17 por asteriscos nas cores vermelha, azul e cinza. Nota-se uma diminuição nas bandas referente às fases CaNaB_5O_9 e $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ com a adição de HAp, e ausentes no compósito $25\text{VB}75\text{HAp}$, asteriscos na cor vermelha e azul, e o aparecimento de picos atribuídos à fase CaB_2O_4 (asteriscos na cor cinza) nos espectros das amostras $50\text{VB}50\text{HAp}$ e $25\text{VB}75\text{HAp}$. Comportamento similar ao visto na espectroscopia Raman. A fase CaB_2O_4 é formada por unidades trigonais BO_3 que compartilham pares com átomos de Oxigênio formando cadeias de $-\text{O}-\text{B}-\text{O}-\text{B}-\text{O}-$, sendo os modos vibracionais, destacados na Figura 4.17, 1444 e 641cm^{-1} de estiramento e deformação da cadeia de B-O, respectivamente [139].

A presença da fase NaCaPO_4 nos compósitos $50\text{VB}50\text{HAp}$ e $25\text{VB}75\text{HAp}$ também é outro indicativo da decomposição das fases CaNaB_5O_9 e $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$.

De forma resumida, os resultados obtidos pela espectroscopia FTIR-ATR corroboram com os obtidos pelas técnicas DRX e Raman apresentados anteriormente, fortalecendo a proposta da reação entre o VB e HAp na formação dos compósitos à 810°C . Cabe ressaltar que cada uma das técnicas utilizadas até o momento, dependendo do fenômeno físico a ser detectado e da sensibilidade do equipamento, tem diferentes limites de detecção, o que poderia justificar a identificação da fase $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ ainda nos compósitos $75\text{VB}25\text{HAp}$ e $50\text{VB}50\text{HAp}$ para as espectroscopias Raman e FTIR, enquanto para a DRX esta fase foi identificada somente no VB_t .

Na reação proposta, a fase $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ se decompõe na CaNaB_5O_9 liberando também Na_2O , ou seja, há uma diminuição da fase $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ com a adição de HAp ao VB, este decréscimo é observado pelas espectroscopias vibracionais por meio da diminuição de intensidade de bandas não sobrepostas às de outros componentes, referentes a esta fase, mas na técnica de DRX não foi possível indexar esta fase nos compósitos. Pelo método de RIR, a fase $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ abrange 24% da composição do VB_t , enquanto a fase CaNaB_5O_9 53%, mostrando

ser a fase majoritária no VB_t, deste modo a quantidade de CaNa₃B₅O₁₀ pode ser minoritária nos compósitos, entretanto com modos vibracionais Raman e FTIR de alta atividade.

Outra fase não indexada na DRX, foi a TCP, entretanto, por meio da reação proposta, o Na₂O liberado difunde na estrutura da HAp podendo formar a TCP, sendo esta mudança estrutural acompanhada pela da liberação de OH, processo conhecido como desidroxilação, formando TCP [141] e NaCaPO₄ [99]. Para a formação da TCP, além da desidroxilação, deve ocorrer a formação da oxiapatita, então a decomposição desta fase para a formação de TCP (α -TCP ou β -TCP) [84]. A fase β -TCP foi identificada nos espectros Raman e FTIR-ATR no compósito 25VB75HAp, possivelmente, decorrente de ser uma fase minoritária formadas nos compósitos, porém o sinal referente às bandas dos modos vibracionais de estiramento de PO₄³⁻ são intensos nas espectroscopias Raman e FTIR.

Com o decréscimo da CaNa₃B₅O₁₀, a fase CaNaB₅O₉, também apresentou decréscimo devido à decomposição na fase CaB₂O₄ [142], a qual é identificada nas três técnicas nos compósitos 50VB50HAp e 25VB75HAp, e não estava presente no VB_t.

A fase NaCaPO₄ resulta da difusão dos íons Na, liberados na decomposição das fases Cálcio Sódio Borato, na estrutura da HAp, que por sua vez libera íons Ca tornando sua estrutura deficiente deste íon [98, 99]. A presença da fase NaCaPO₄ é esperada em compósitos de HAp com vidros bioativos de sistemas vítreos composto por Sódio [141]. A fase NaCaPO₄ foi identificada na DRX em todos os compósitos, entretanto para as técnicas vibracionais foi observada nos compósitos 50VB50HAp e 25VB75HAp. Os modos vibracionais da NaCaPO₄ são majoritariamente de estiramentos de PO₄³⁻, desta forma foi observada a sobreposição de suas bandas com modos vibracionais da FAp, também presente no VB_t, além da sobreposição com as bandas referentes aos modos de vibração das unidades de BO das fases Cálcio Sódio Borato, em maior quantidade na amostra 75VB25HAp. Possivelmente, com a diminuição das fases Cálcio Sódio Borato a fase NaCaPO₄ ficou mais evidente nos espectros.

A FAp se manteve presente em todos os compósitos nas três técnicas utilizadas até o presente momento. A desidroxilação da HAp poderia ter ocasionado na substituição do OH por F⁻ [88, 143], mantendo assim a FAp, independente da adição de HAp. A técnica com mais sensibilidade para detectar essa substituição é a espectroscopia Raman, pois mesmo que a FAp e HAp tenham os mesmos modos de vibração de PO₄³⁻, o estiramento ν_1 PO₄³⁻ é centrado em 965cm⁻¹, enquanto a HAp está em 961cm⁻¹, porém com a adição de HAp à composição do compósito o deslocamento desta banda é observado, dificultando a análise. Outra região dos espectros para avaliar esta substituição é a região do estiramento de OH⁻, porém há a mesma dificuldade com a adição de HAp. Além disso, a desidroxilação é um processo reversível,

dependendo da temperatura de aquecimento, densidade da substância e pressão parcial do vapor de água [88]. Segundo Qu (2006) e colaboradores [143] a adição de íons de Flúor ao compósito por meio de uma fase vítrea, e não por síntese química, dificulta o controle das substituições iônicas.

Ainda como resultado da interação do VB com a HAp nos compósitos tratados à 810°C espera-se a formação de uma fase amorfa composta por óxido de Cálcio e Boro, em menor quantidade que as fases cristalinas, dificultando sua quantificação e identificação.

4.6 Análise por Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para avaliar a morfologia dos materiais precursores e dos compósitos VB/HAp, tratados termicamente em 810°C, foram realizadas imagens, superfície e fratura, por meio da técnica de MEV.

Na Figura 4.18-a e 4.18-b são apresentadas as micrografias obtidas para HAp em 810°C, superfície e fratura, respectivamente, nas quais observa-se que as partículas estão aglomeradas, com formas irregulares, apresentando formas esferoidais ou bastonetes, tanto em sua superfície quanto na fratura. Esta morfologia sugere que na amostra de HAp não ocorreu de fato uma sinterização, pois o pó se apresenta aglomerado, com a presença de microporosidade entre os grãos, não tendo a formação de pescoço que seria o processo inicial para a formação das partículas. Conforme descrito na seção (2.3), a amostra precisa passar por alguns processos durante o tratamento térmico para garantir que o produto final seja de fato uma sinterização, e não um apenas um aglomerado. A HAp só teria energia de ativação para sinterização em temperaturas superiores à 810°C [33]. Também é possível observar em sua superfície algumas marcas devido ao processo de compactação e que não apresentou laminação.

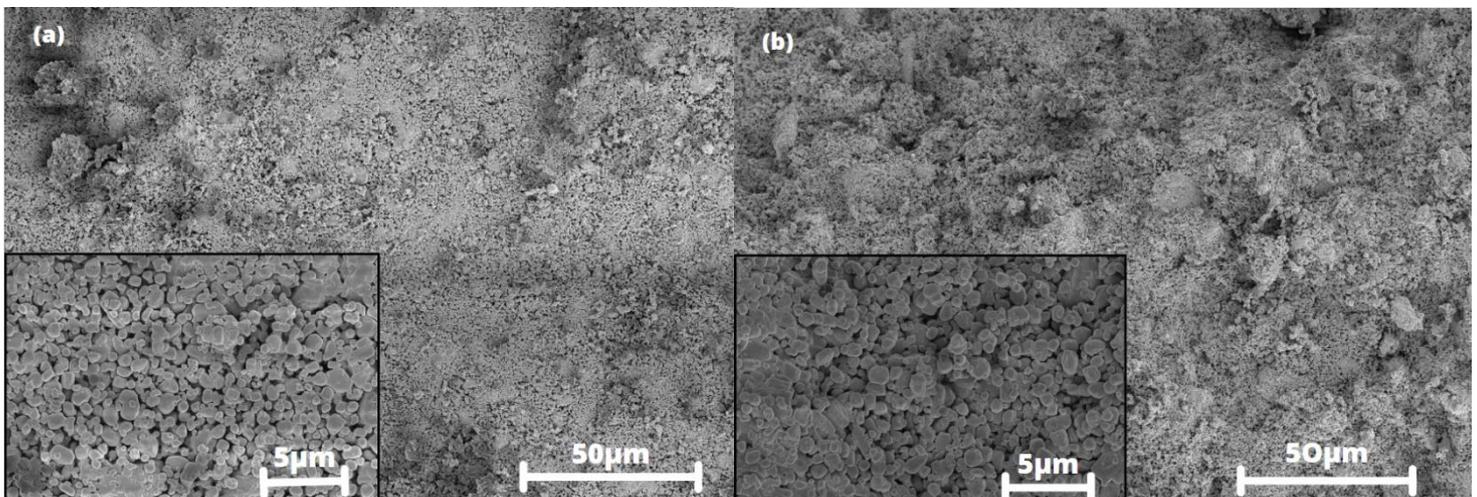


Figura 4. 18: Imagens de MEV obtidas para a amostra de HAp a) Superfície, b) Fratura.

A Figura 4.19 apresenta as imagens de MEV obtidas para a superfície e fratura da amostra de VB_t. O tratamento térmico ao qual os vidros bioativos são submetidos durante sua produção influencia se este permanecerá com estrutura amorfa ou cristalina, o que reflete diretamente em suas propriedades, interferindo assim na sua aplicabilidade.

Para a superfície da amostra, temos estruturas de várias formas, umas lembram bastonetes cilíndricos, enquanto outras têm formato menor e arredondado, que se distribuem por toda a superfície e parecem interconectadas umas às outras, ainda que se observe alguns espaços “vazios” sugerindo a presença de poros. Possivelmente as estruturas diferentes presentes na superfície poderiam ser associadas às diferentes fases observadas para a amostra de VB_t nas técnicas de DRX, Raman e FTIR-ATR.

Essa morfologia observada na superfície pode ser resultado da cristalização do vidro borato, e o fato das partículas estarem conectadas ser devido ao fluido viscoso remanescente. Quando há a cristalização da partícula, o fluido viscoso é interrompido o que pode acarretar em partículas superficiais cristalizadas com poros remanescentes, esses poros também podem ter origem na contração da amostra durante o processo de densificação [144]. As trincas observadas em alguns pontos da amostra (destaque da Fig. 4.19-a) podem ser associadas ao processo de resfriamento, entretanto, o volume parece ser amorfo uma vez que para a fratura observamos um aspecto mais denso, lembrando que o processo de densificação se inicia em temperaturas acima da temperatura de transição vítrea do material.

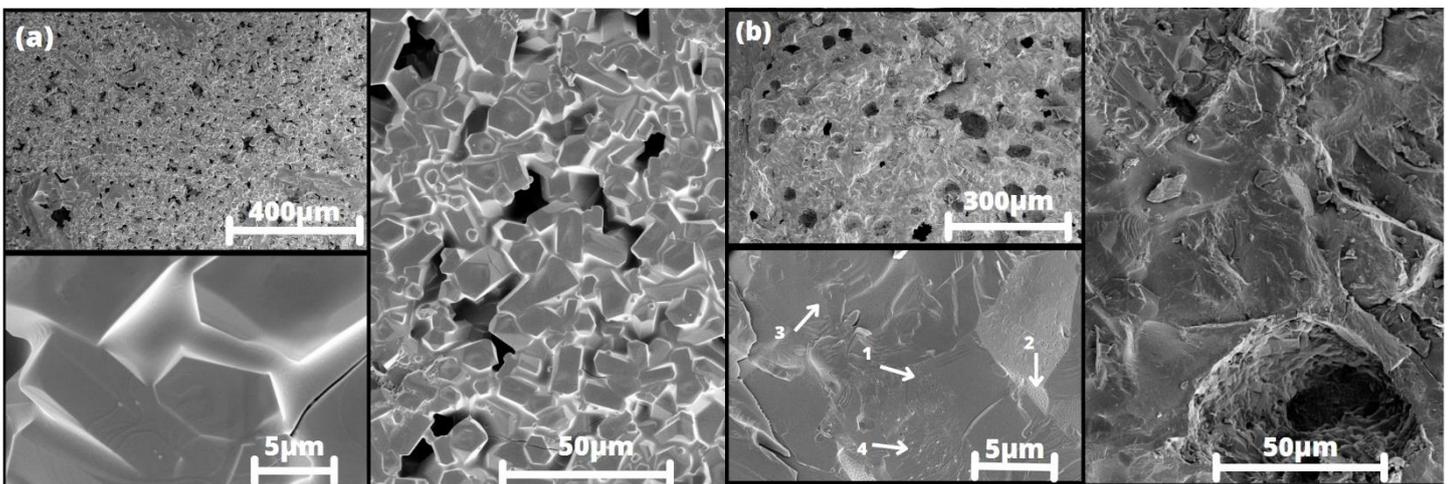


Figura 4. 19: Imagens de MEV obtidas para a amostra de VB_t a) Superfície, b) Fratura.

Segundo Muller e colaboradores (2000) [146], a maioria dos pós de vidro tem uma tendência a cristalizar quando aquecidos, iniciando o processo nas superfícies externas, e qualquer fração delas que cristaliza dificulta a sinterização, pois impede o fluido viscoso [145]. Para partículas pequenas ocorre cristalização dominada pela cristalização da superfície, já que

a área da superfície é maior em relação ao volume total do material. No detalhe da imagem da fratura (Fig. 4.19-b) temos morfologias com aspectos diferentes indicadas por setas, uma região que parece ter sido suavizada que apresenta uma morfologia específica, com criação de domínios (região 1), isso pode ser atribuído à separação de fases vidro em vidro, cada tipo de íon tende a concentrar em uma fase separada [144], e a outra com formação de “buracos/crateras” (região 2) como resultado da cristalização, no canto esquerdo superior (região 3) é possível a visualização de uma segunda fase com uma estrutura e morfologia diferente e proeminente associada a cristais com crescimento heterogêneo, na região ao lado da parte suavizada apresenta algumas estruturas pequenas e arredondadas (região 4) que alguns autores associam a uma fase amorfa de fosfato presente na estrutura do VB_t .

Segundo Scherer (1997) [147], vidros bioativos tratados termicamente são propensos à cristalização, o que elimina o fluido viscoso e leva a poros residuais, essa cristalização é relacionada com a energia de ativação necessária para que o processo se inicie.

A Figura 4.20-a e 4.20-b apresenta as imagens de MEV da amostra 75VB25HAp para a superfície e fratura, respectivamente. A superfície apresenta uma morfologia muito similar à observada no VB_t , possivelmente devido à quantidade de vidro ser maior nesta amostra, entretanto, as bordas das partículas estão mais suavizadas parecendo mais interconectadas, de modo que a quantidade de poros na superfície parece menor, isso pode ser porque o fluido viscoso estava em maior quantidade e envolveu as partículas de HAp. Em relação à amostra de VB_t , há mais partículas em formatos arredondados, que podem ser associados à presença da HAp, deste modo a morfologia de modo geral indica assim como para a amostra de VB_t , que houve a cristalização superficial, mas devido à presença de HAp foi mais homogênea com presença menor de poros remanescentes.

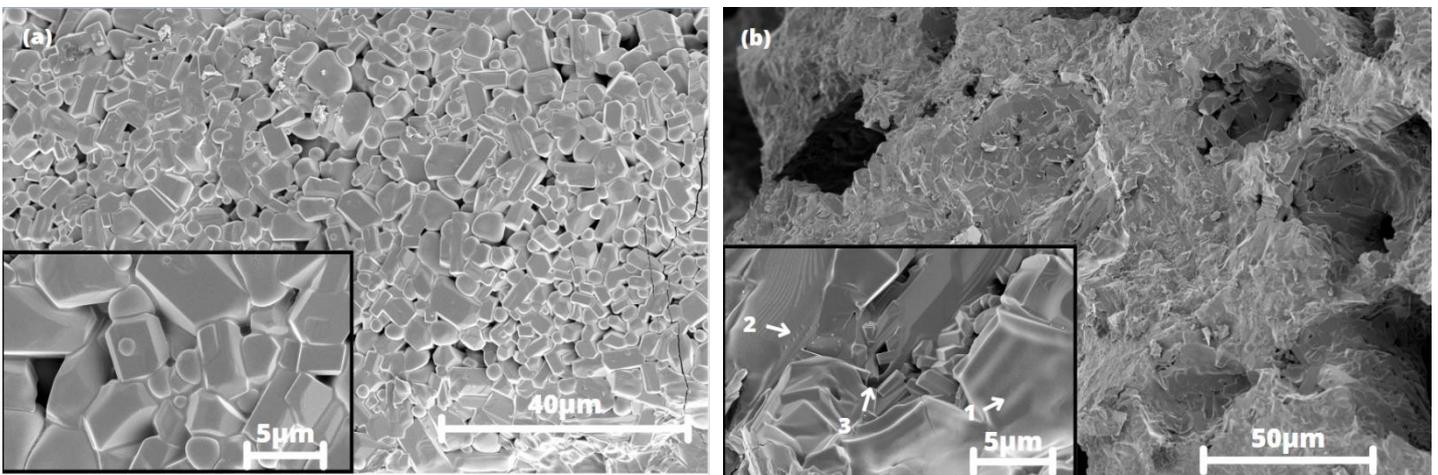


Figura 4. 20: Imagens de MEV obtidas para a amostra de 75VB25HAp a) Superfície, b) Fratura.

Na fratura da amostra 75VB25HAp se visualizam poros com formatos irregulares, profundos e interconectados, possivelmente originados no momento da contração da amostra no processo de densificação. Esta amostra foi a única entre os compósitos que perdeu sua forma original, ou seja, sofreu deformação devido a um dos componentes ter atingido a fase líquida no processo de tratamento térmico conforme visto na sessão (3.3). No detalhe da fratura, observa-se morfologia semelhante ao VB_t, com pontos em que se percebe apenas uma densificação (região 1). Há indícios de início de cristalização e até mesmo pequenas partículas que podem ser associadas a alguma fase relacionada ao fosfato (região 2). Entretanto para essa concentração, há também a presença de cristais bem definidos que não puderam ser observados para a amostra de VB_t (região 3), o que pode indicar que a HAp agiu como indutor de cristalização volumétrica. Dessa forma, a micrografia da fratura indica uma possível cristalização volumétrica heterogênea com poros remanescentes.

Na Figura 4.21, as imagens de MEV para a amostra de 50VB50HAp mostram a presença de mais poros espalhados pela superfície, alguns possivelmente devido à contração da amostra, visto que a fração de VB deve se contrair na densificação, uma vez que a relação entre a ligação das partículas com o crescimento do pescoço e o encolhimento dependem do mecanismo de tratamento adotado [144]. No detalhe da Figura 4.21-a, a superfície apresenta partículas interconectadas sobre uma morfologia densa, indicando que o fluido viscoso possa ter envolvido as partículas de HAp. Zanotto e colaboradores (2001) [148] dizem que se houver cristalização concorrente ou cristais na superfície do vidro, nem todos os contatos partícula-partícula estão disponíveis para fluido viscoso.

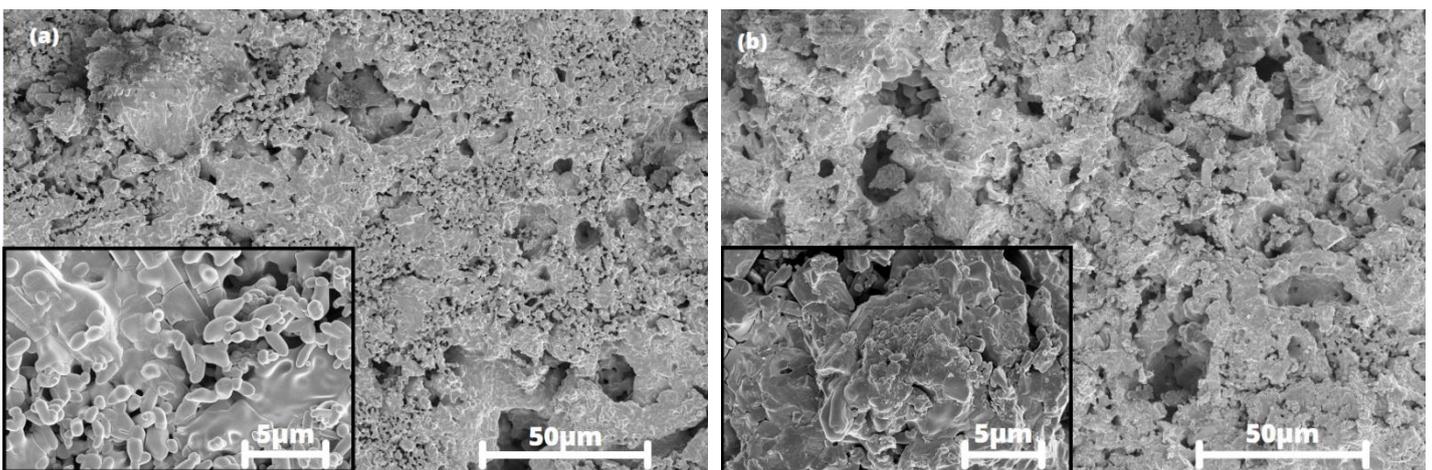


Figura 4. 21: Imagens de MEV obtidas para a amostra de 50HAp50VB a) Superfície, b) Fratura.

Para a imagem obtida da fratura da amostra (Figura 4.21-b), se observa um aspecto amorfo com característica de material denso, assim como a presença de poros. Sabe-se que após

a temperatura de transição vítrea do material temos o processo de densificação com o fluido viscoso, mas que qualquer parcela do material que cristaliza pode cessar esse processo [145], de modo que internamente, a amostra indica que teve início a essa densificação do VB que envolveu as partículas de HAp, possivelmente promovendo sua decomposição, visto que as estruturas do Boro podem ser responsáveis por essa degradação [128]. No entanto, não se observa a formação de cristais em seu volume, permanecendo uma morfologia que indica a densificação. Há relatos na literatura que, para se obter uma boa cristalização volumétrica em vidros, é preciso avaliar a taxa de aquecimento assim como o tempo de tratamento empregado [144, 149]. Aihua Y. e colaboradores (2007) [132] associam a cristalização em uma fase ou outra com a força das ligações dos elementos da matriz, que compara essas energias de ativação com a força de ligação das ligações B-O e P-O, indicando que ocorre a cristalização da fase $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ que é obtida com a quebra das ligações B-O, enquanto a cristalização da fase CaB_2O_4 foi mais provavelmente associada com a quebra das ligações Ca-O e Na-O.

Por fim, as Figuras 4.22-a e 4.22-b apresentam as imagens de MEV obtidas para a amostra de 25VB75HAp para a superfície e fratura, respectivamente. Observa-se na superfície uma morfologia similar a amostra de HAp, talvez por esta ser majoritária na amostra, com partículas distribuídas em aglomerados de formas diversas. Todavia, em alguns pontos é possível identificar algo similar à junção das partículas (indicadas pelas setas no detalhe), que diferente do que foi citado anteriormente não parece ser efeito do processo de prensa. Essa morfologia indica uma possível formação de uma nova fase que poderia ser associada à fase β -TCP, por exemplo, visto que ela não está presente nos precursores separadamente, e como visto nas técnicas anteriores, ela foi identificada nesta concentração [101, 110, 128].

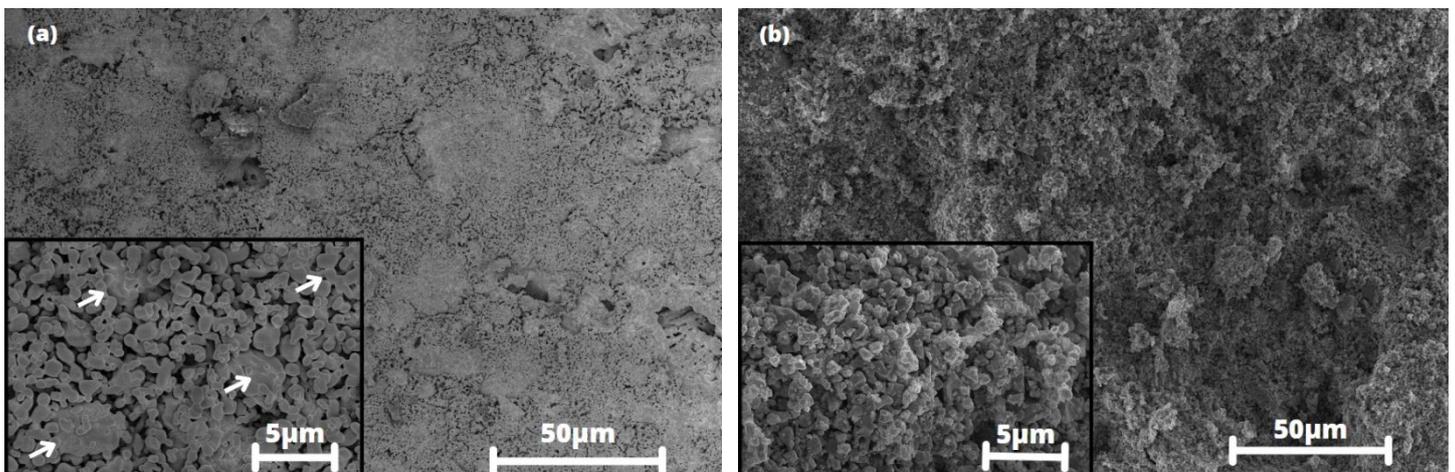


Figura 4. 22: Imagens de MEV obtidas para a amostra de 25VB75HAp a) Superfície, b) Fratura.

Na fratura é possível notar uma morfologia um pouco diferente da observada na HAp, provavelmente decorrente do processo de densificação com o fluido viscoso do VB, de maneira que nos aglomerados da fratura há partículas com formatos diferentes das arredondadas, associadas à HAp, além da formação discreta de poros.

Assim como observado nas demais técnicas para análise, a proporção entre VB e HAp, assim como a metodologia empregada para a obtenção dos compósitos é determinante nas características do material final, afetando desta forma, suas características finais e por conseguinte a sua aplicabilidade. Quando tratado termicamente, o vidro pode cristalizar dando origem a uma vitrocerâmica que terá possivelmente uma melhor resistência mecânica, entretanto quanto mais resistente mecanicamente menor é a sua taxa de degradação em meio biológico [18]. Quando se pensa na produção de compósitos o objetivo é sempre buscar uma solução com o melhor resultado possível. Nas amostras produzidas neste trabalho ocorreu cristalização do vidro, concomitante da reação entre as fases cristalinas formadas e a HAp, resultando em fases diferentes dos precursores, que podem ser vantajosas para aplicação, uma vez que, o VB_t pode ajudar na resistência do material, enquanto que as fases cristalinas existentes podem promover uma melhor solubilidade garantindo uma melhor resposta biológica, com o intuito de avaliar esta resposta foram realizados testes de bioatividade *in vitro* que serão apresentados a seguir.

4.7 Testes de bioatividade

4.7.1 Curvas de pH e perda de massa

De modo geral, as reações *in vitro* de biomateriais, como HAp e vidros bioativos, são estudadas em soluções tamponadas para avaliar a precipitação do Fosfato de Cálcio (CaP) na superfície da amostra, visto que ela é usada como indicador de bioatividade. O grau de bioatividade é classificado de acordo com o tempo necessário para que ocorra o aparecimento da camada [19]. A solução de imersão mais utilizada para este ensaio foi desenvolvida por Kokubo e colaboradores (2006) [45], conhecida como SBF do inglês *Simulated Body Fluid*, de composição química e pH próximos ao plasma sanguíneo. Desta forma, antes de avaliar a formação da camada apatítica é importante analisar os parâmetros: variação de pH da solução de imersão e perda de massa do biomaterial para melhor entendimento das trocas iônicas entre o meio e o biomaterial.

A Figura 4.23 mostra a variação do valor de pH da solução durante todos os períodos de imersão das amostras. As curvas apresentam comportamento de aumento para todas as

amostras, com maior variação dos valores de pH para VB_t e menor para HAp. As curvas para os compósitos até 7 dias permanecem entre os valores dos seus precursores, sendo a maior variação no período de 4 dias e tendendo a uma menor variação nos demais períodos, sendo nas primeiras horas o aumento mais abrupto.

O aumento de pH mais abrupto com o tempo atingiu, eventualmente, um *plateau* que pode ser um indicador da formação de CaP sobre as superfícies da amostra, este comportamento é observado nas amostras VB_t , HAp e 25VB75HAp, sendo a tendência *plateau* a partir de 4, 1 e 7 dias, respectivamente.

Em geral, três processos ocorrem em vidros bioativos, quando em imersão em soluções aquosas: lixiviação, dissolução e precipitação. Rápida lixiviação resulta em um aumento de pH, entretanto, as mudanças no pH dependem de diferentes fatores, tais como, composição e razão entre a área superficial e volume do SBF e a taxa de agitação do sistema de imersão. Para tempos iniciais ocorre a lixiviação e a dissolução ocasionando um rápido aumento no pH, com o prolongamento do período de imersão o aumento do pH se torna mais lento devido às reações entre as camadas desenvolvidas na superfície do vidro [146]. Nos vidros borato as trocas iônicas do Sódio e Cálcio com o Hidrogênio, no estágio inicial da dissolução, leva ao aumento de pH [142].

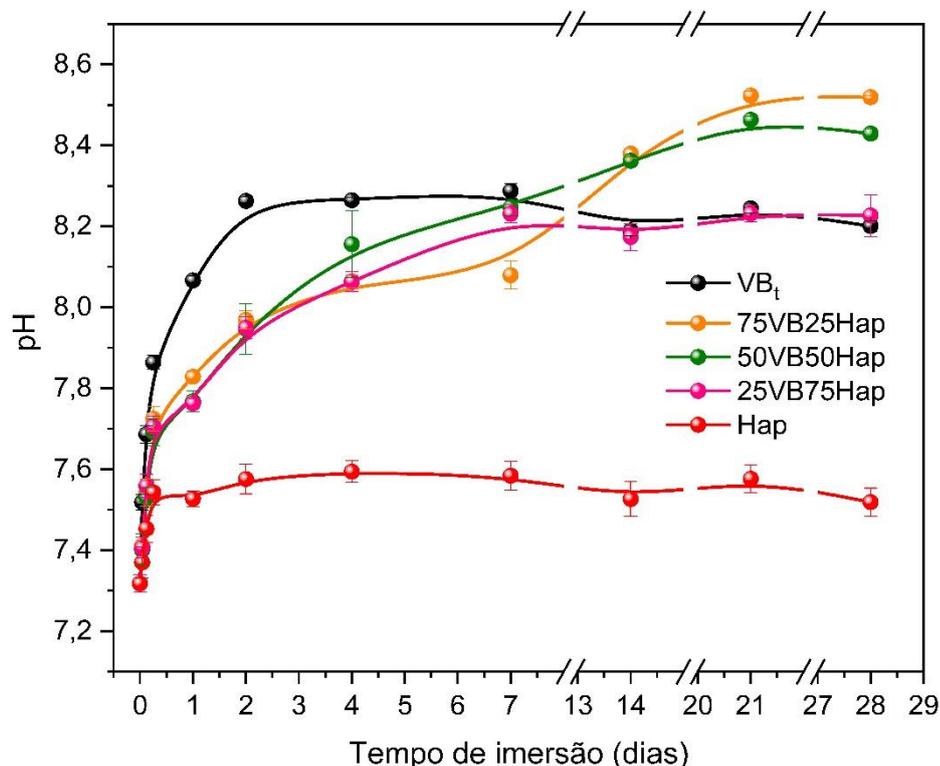


Figura 4. 23: Variação do pH da solução em função do tempo de imersão para as amostras (n=2) VB_t , HAp, 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25VB75HAp. As linhas são guias visuais.

Para vidros silicato, nas fases iniciais da conversão para CaP, há a formação de uma camada rica em SiO_2 que separa a crescente camada do núcleo do vidro, o que dificulta a total conversão do mesmo em CaP [47,49]. Já nos vidros borato pode ocorrer a incorporação de OH em suas estruturas, causando a hidrólise das pontes de B-O-B e formando estruturas B-OH, que poderiam atuar de forma similar à camada de SiO_2 no processo de bioatividade, e neste caso, a camada de CaP seria depositada sobre a camada de B-OH, mas o vidro não seria totalmente convertido em CaP [51].

A formação da camada de CaP é dependente da liberação do Fósforo e Cálcio para a solução de imersão, e posterior absorção pelo biomaterial, no caso dos vidros borato, os processos que envolvem o Cálcio são dependentes da concentração de B_2O_3 . De modo geral, altas concentrações de Boro facilitam a liberação de Ca^{2+} , mas suprimem sua absorção, e consequentemente interferem na formação da camada de CaP [151].

Desta forma, o VB_t que apresentou maior variação de pH, até 4 dias, é a amostra que contém maior concentração de B_2O_3 , promovendo maior liberação de Ca para o meio. Nota-se um limite de concentração de VB nos compósitos, de modo que com 25% de VB é possível controlar a troca iônica da amostra com meio. Para concentrações acima deste percentual não foi observado o regime de *plateau* na análise de pH, sugerindo que não houve saturação na solução de imersão, podendo ocasionar em tempo mais prolongado para a precipitação da camada de CaP ou em uma camada mais amorfa.

As trocas iônicas podem acarretar a degradação da peça, visto que o mecanismo de dissolução e reação é que leva à precipitação da camada de CaP, que é constituída com a migração dos grupos Ca_2^+ e PO_4^{3-} da superfície do vidro bioativo e pela incorporação de íons e Fosfatos de Cálcio solúveis da solução, que com o passar do tempo cristalizam formando a HAp [35].

Desta forma, a perda de massa teria correlação direta com a dissolução da amostra, e aumento do pH, já o ganho de massa pode estar relacionado à precipitação de uma camada de apatita sobre a superfície do biomaterial. A Figura 4.24 mostra o comportamento da perda de massa em função do tempo de imersão em SBF para todas as amostras.

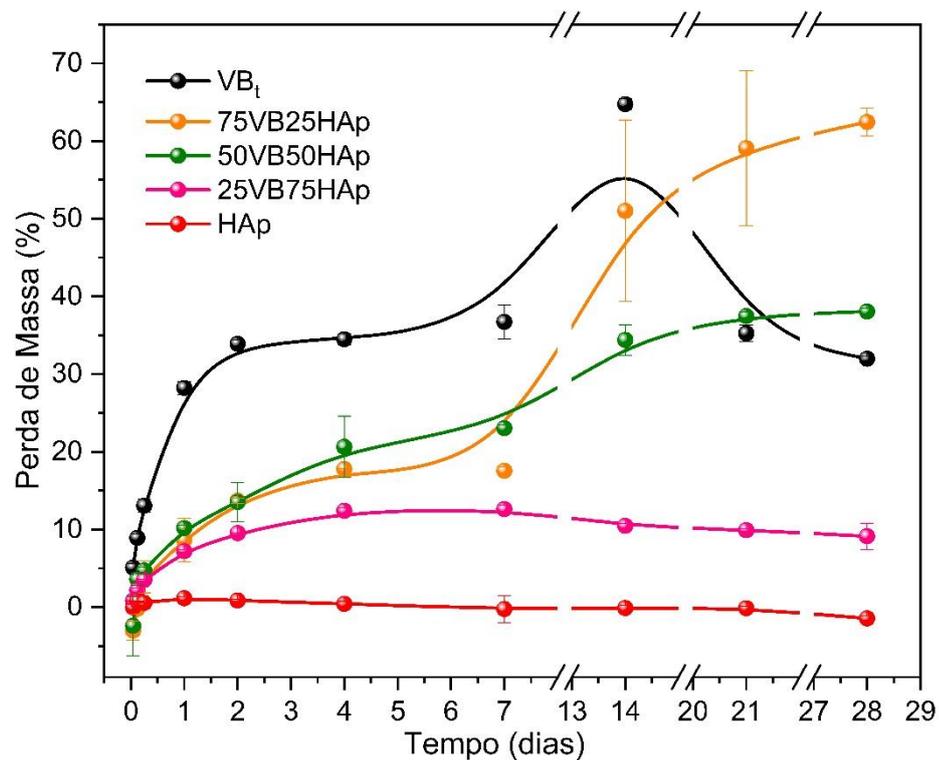


Figura 4.24: Percentual de perda de massa função do tempo de imersão para as amostras (n=2) VB_t, HAp, 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25VB75HAp. As linhas são guias visuais.

Todas as amostras com VB apresentaram maior perda de massa no período de 4 dias, o mesmo período de maior aumento do pH, entretanto, a amostra VB_t obteve uma maior perda de massa em 14 dias, seguido de um ganho de massa nos períodos seguintes, podendo este ser atribuído a uma deposição de camadas de CaP ou B-OH sobre a superfície do vidro. A variação observada em 14 dias na perda de massa não foi similar a variação no pH da solução de imersão, possivelmente pelo fato de sua saturação a partir do 4º dia de imersão.

A amostra 25VB75HAp apresenta maior perda de massa em função do tempo de imersão quando comparada a HAp, entretanto, seus comportamentos são similares, possivelmente pela alta concentração de HAp.

Para a amostra 50VB50HAp e 75VB25HAp temos uma maior perda de massa quando comparadas à amostra de 25VB75HAp, que pode indicar, assim como o pH, uma maior troca iônica com a solução. Foi observado que o compósito 75VB25HAp atingiu maiores valores de pH, o que pode ser associado à composição da amostra, uma vez que a área de contato da amostra com o fluido, assim como o volume adotado pode interferir nesta variação [148]. A perda de massa consequente desta interação promoveu a deterioração da amostra ao fim do período de imersão de 28 dias, possivelmente não só devido às fases presentes, mas também por conta da morfologia geral da amostra.

De modo geral, com o aumento de pH houve maior perda de massa em todas as amostras avaliadas, entretanto a dinâmica de dissolução da amostra em SBF e a precipitação de camadas sobre a superfície dos materiais está associada à concentração de B_2O_3 nas amostras que contém VB em sua composição, sendo possível a formação de camadas de CaP e B-OH sobre superfície dos materiais, podendo ser a camada de B-OH intermediária à formação da camada de CaP, interferindo nas trocas iônicas. Desta forma, pode-se inferir que as proporções diferentes dos compósitos interferiram nas fases identificadas, na morfologia e conseqüentemente na resposta bioativa das amostras.

4.7.2 Análise da superfície das amostras

Após diferentes períodos de imersão em SBF, a superfície das amostras VB_t, HAp, 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25VB75HAp foram avaliadas por meio das técnicas de MEV, FTIR-ATR e DRX.

A Figura 4.25 mostra uma foto das amostras após cada período de imersão. Todas as amostras estudadas apresentaram a formação de uma camada sobre suas superfícies, sendo para as amostras 75VB25HAp e VB_t uma camada mais frágil, com fragmentação total após 28 dias de imersão para o compósito

Diferentemente das análises pré-imersão, nas quais as amostras tratadas termicamente foram avaliadas na forma de pó, no pós-imersão, as análises foram realizadas nas amostras íntegras, tal como mostra a Fig. 4.25, a fim de melhor estudar a camada formada sobre cada amostra. Desta forma, os resultados apresentados nos experimentos a seguir de FTIR-ATR e DRX são referentes às medidas das superfícies das amostras, o que ocasionou diferenças na contribuição das fases cristalinas, uma vez que estas se apresentaram distribuídas de forma não homogênea nas amostras. Ademais, a camada formada sobre algumas amostras mostrou-se frágil, contribuindo de forma negativa para as análises. A amostra 75VB25Hap após 28 dias de imersão perdeu sua integridade, tal como mostra a Figura 4.25, não permitindo sua análise. Em outras amostras a camada se despreendeu da superfície, também não permitindo realizar as medidas em determinados períodos de imersão em SBF.

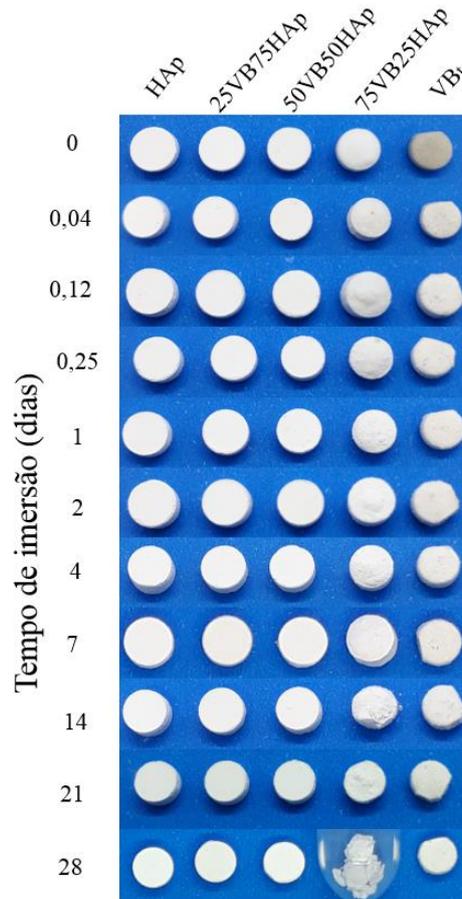


Figura 4. 25: Fotografia das amostras VB_t, HAp, 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25VB75HAp em todos os períodos de imersão.

4.7.2.1 MEV

Considerando os resultados observados para os ensaios de bioatividade, indicando que uma camada de apatita se formou na superfície das amostras, foram realizadas imagens por MEV com o intuito de avaliar sua morfologia. As medidas foram realizadas nos períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias de imersão em SBF.

A Figura 4.26 apresenta as imagens de micrografia para a amostra de VB_t controle e após imersão. Já com 0,04 dias de imersão é possível observar grãos menores crescendo nos poros remanescentes, indicando o início do crescimento da camada com a formação de apatitas imaturas; as setas em vermelho mostram um exemplo desta estrutura. Com 1 dia, observa-se a formação de uma camada dentro dos poros da amostra interligando as estruturas já existentes. Com 4 dias há uma camada que se forma sobre a superfície do material com estruturas globulares e algumas fissuras semelhantes à observada para uma camada amorfa de apatita [153]. Em 14 e 28 dias há um aspecto ainda mais craquelado com alargamento das fissuras superficiais, notando-se uma densificação desta camada. Para vidros contendo Boro a formação da camada de CaP superficial ocorre simultaneamente à dissolução do vidro, o VB após o

tratamento térmico apresenta duas fases majoritárias contendo Boro, sendo assim, conjectura-se que uma camada amorfa cresce sobre a outra antes que esta cristalize. Além disso, uma vez que a camada amorfa recobra a amostra, as trocas iônicas continuam de maneira mais discreta, dificultando a cristalização. A curva de pH mostra uma interação inicial rápida até 4 dias, seguida de uma saturação associada ao crescimento de uma nova camada sobre a anterior e sem grandes mudanças nos últimos períodos, o que corrobora com o observado para as imagens de MEV obtidas.

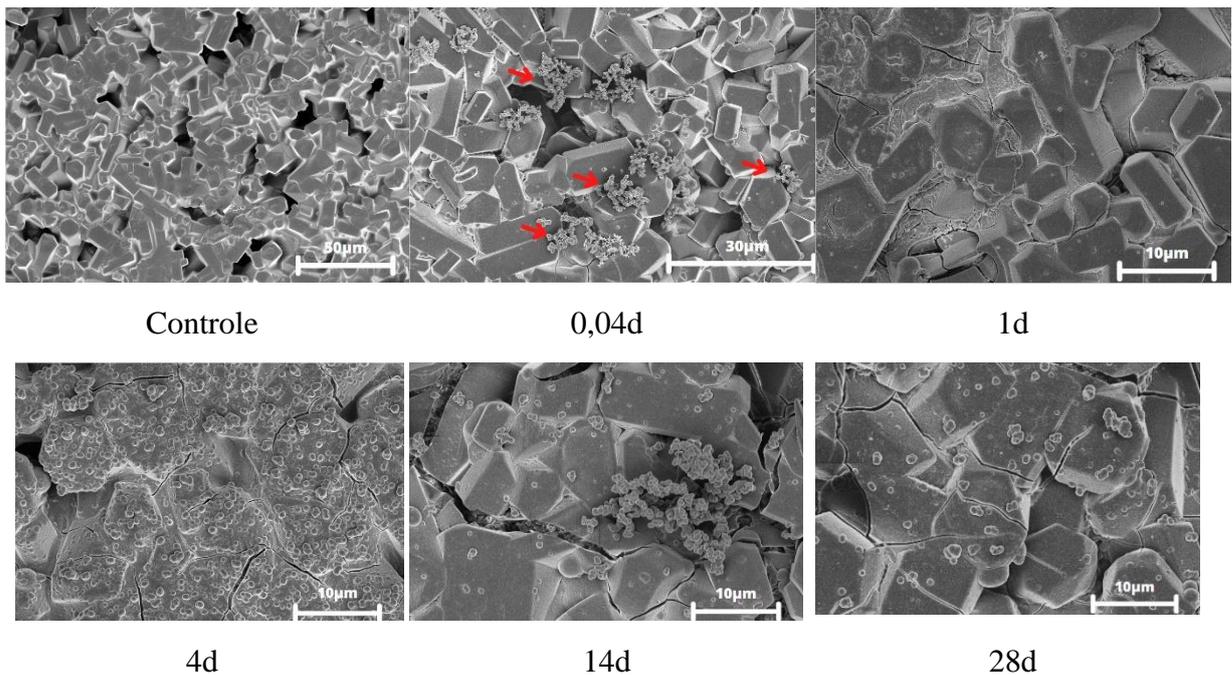


Figura 4. 26: Micrografia de superfície de VB_t após imersão em SBF nos períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias. Controle é amostra sem imersão.

Diferentemente do VB_t, para a HAp em imersão em SBF, Figura 4.27, é possível observar a formação de uma camada de apatita apenas em 28 dias de imersão em SBF, porém com morfologia de nanocristais que formam placas, característica esta que mostra que ocorreu uma cristalização da camada [154]. Em 0,04 dias a morfologia da HAp se assemelha à amostra controle. Com 1 dia há a presença de alguns aglomerados das estruturas já presentes na amostra, e com 4 dias ocorre uma alteração na morfologia da superfície analisada, indicando o início de formação da camada de apatita, recobrando a superfície do material. Em 14 dias a superfície apresenta uma morfologia que pode ser associada à camada de apatita com estruturas arredondadas, mas que ainda exibe vestígios da mesma morfologia observada em 4 dias em diversos pontos da amostra, isso porque, embora a troca iônica ocorra de maneira mais lenta para HAp quando comparada com o VB_t para tempos mais longos, é possível observar comportamento similar à nucleação e formação da camada na superfície das amostras.

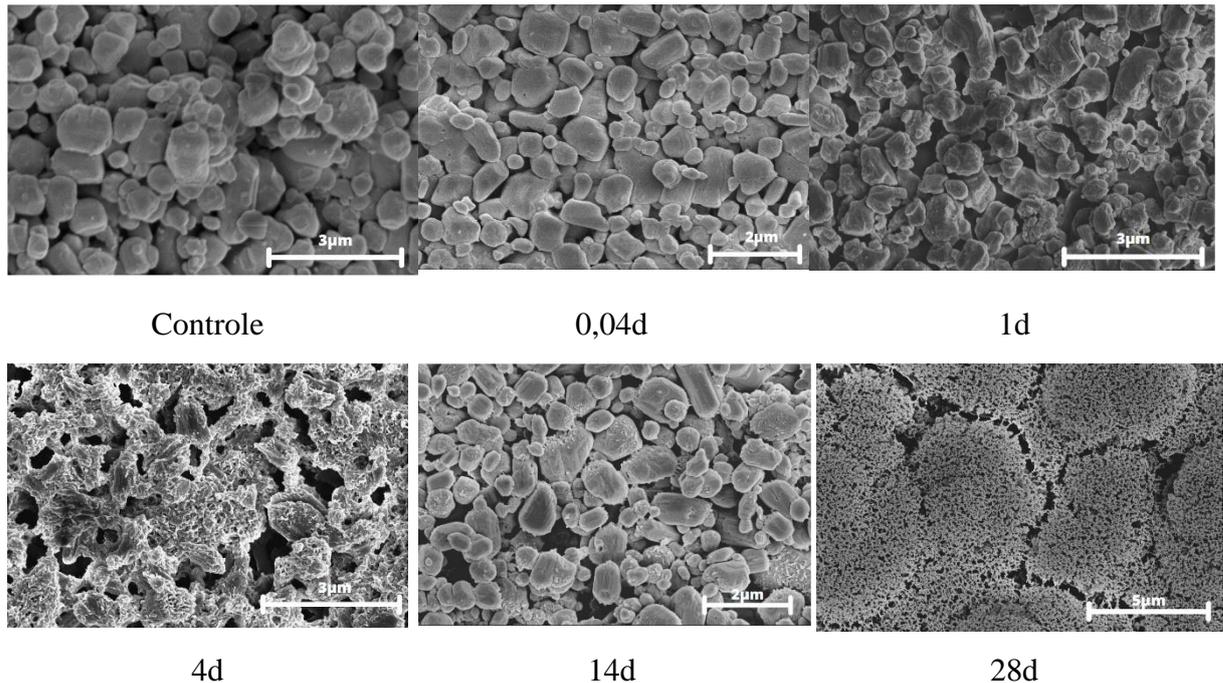


Figura 4. 27: Micrografia de superfície de HAp após imersão em SBF nos períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias. Controle é amostra sem imersão.

A Figura 4.28 apresenta as micrografias para a amostra 75VB25HAp. Na amostra controle é observada a presença de estruturas de formatos retangulares e arredondados, atribuídos às fases cristalinas de borato e HAp, respectivamente, conforme discutido anteriormente. Em 0,04 dias também já é possível visualizar o crescimento de núcleos característicos indicando o início da formação de uma camada de apatita. Após um dia há formação de uma camada cobrindo a superfície da amostra, ainda com a presença de grãos finos e de estruturas maiores e arredondadas, estas últimas podem ser devido à presença da HAp e/ou estruturas iniciais amorfas que constituem a camada. Não foi possível observar as estruturas referentes às fases cristalinas de borato.

A morfologia da HAp pode variar de cristais aciculares a equiaxiais dependendo da concentração do íon carbonato (CO_3^{2-}). Todas as apatitas biológicas apresentam uma percentagem de carbonato, CO_3^{2-} e a morfologia globular tem cerca de 12,5% de CO_3^{2-} [155].

Em 4 dias há a presença de duas morfologias predominantes: núcleos maiores arredondados e núcleos menores, junto com camada que neste período de imersão apresenta algumas trincas indicando uma característica ainda amorfa e não homogênea sobre a superfície da amostra. Com 14 dias a camada tem aspecto mais denso e homogêneo, com estruturas típicas de uma apatita em estágio mais cristalizado [153], diferente do período anterior. Ao fim do período de 28 dias a camada de apatita se apresenta mais espessa e com trincas.

A amostra 75VB25HAp se apresentou bastante frágil, o que pode ser associado ao processo de interdifusão que induziu à formação de apatita internamente. Como discutido anteriormente, o Boro garante ao material alta dissolução em soluções aquosas, sendo assim, no compósito o processo para a formação da camada é contínuo até a sua dissolução, supõe-se que grande parte da amostra foi consumida durante a imersão, o que resultou em sua fragilidade. Para esta amostra os dados de bioatividade indicam uma interação inicial rápida, mas a cinética de crescimento da camada parece mais lenta, embora tenha sido a amostra que mostrou intensa troca iônica com a solução de SBF, quando comparada às demais. A camada indica cristalização apenas em 14 dias, esse comportamento pode estar relacionado à morfologia geral da amostra, uma vez que esta apresentou uma certa cristalização interna após o tratamento térmico além de muita porosidade, o que pode ter facilitado a formação de apatita no interior da amostra.

Rincón-López e colaboradores (2019) [154] relatam resultados similares aos deste trabalho, demonstrando que pode ocorrer a formação de apatita pelo processo de interdifusão, com a permeação da solução pelos poros resultantes do processo de obtenção da amostra. Além disso, para períodos mais longos a apatita observada nos poros passa a ter características morfológicas de apatita cristalina, similar à camada que cobre a superfície da amostra, de modo que este mecanismo pode ter resultado na formação de apatita nos poros da biomaterial.

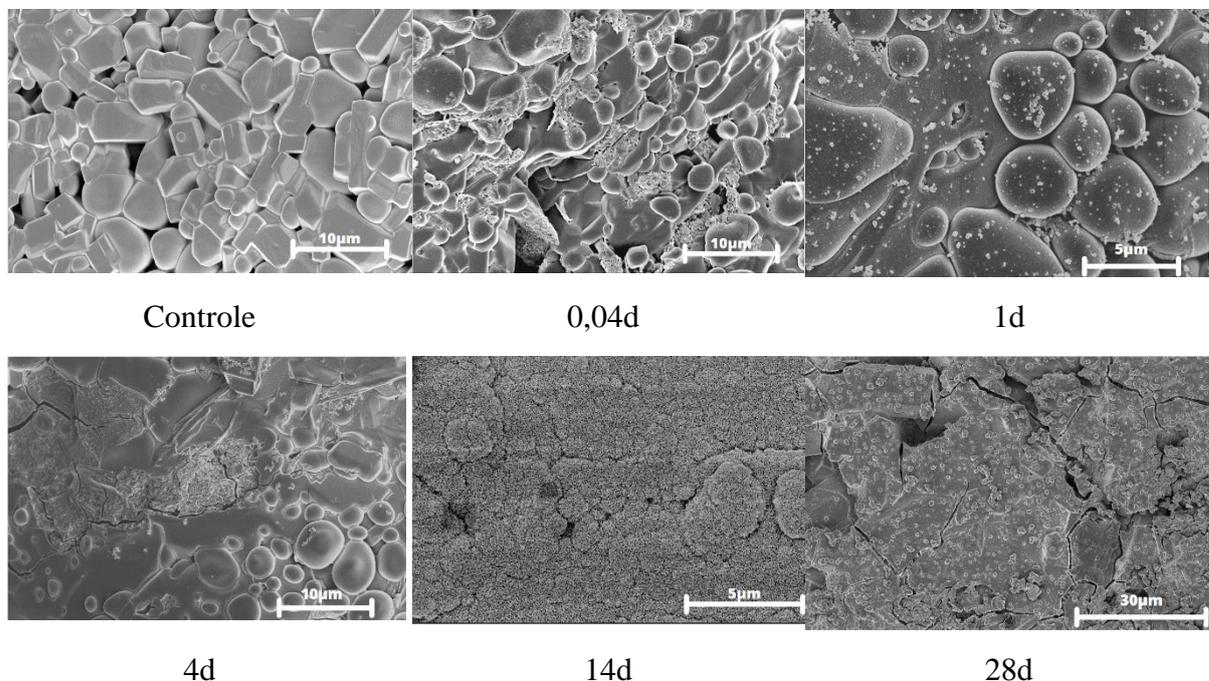


Figura 4. 28: Micrografia de superfície de 75VB25HAp após imersão em SBF nos períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias. Controle é amostra sem imersão.

A Figura 4.29 apresenta as imagens de superfície do compósito 50VB50HAp, sendo possível observar também em 0,04 dia de imersão o surgimento de núcleos entre as estruturas

da amostra, característicos da formação de uma camada amorfa de apatita. Após 1 dia, há o desenvolvimento desta morfologia e a camada se apresenta mais homogênea sobre a superfície da amostra. São observadas, neste período de imersão, duas morfologias, uma referente aos núcleos que formam aglomerados (seta em branco) e a outra sendo microestruturas (setas em vermelho), que possivelmente irá evoluir para o desenvolvimento da camada amorfa.

A camada formada por núcleos após 4 dias apresenta características semelhantes ao período anterior, porém com aspecto mais homogêneo, que após 14 dias em imersão ocorre uma densificação, camada crescida sobre camada, com o aparecimento de trincas. Tal morfologia parece ser formada por milhares de cristais característicos da cristalização [154]. Em 28 dias é possível observar regiões com morfologia similar à camada observada em 14 dias e, adicionalmente, estruturas em forma de bastonetes e outras mais arredondadas, que podem ser relacionadas à apatita formada.

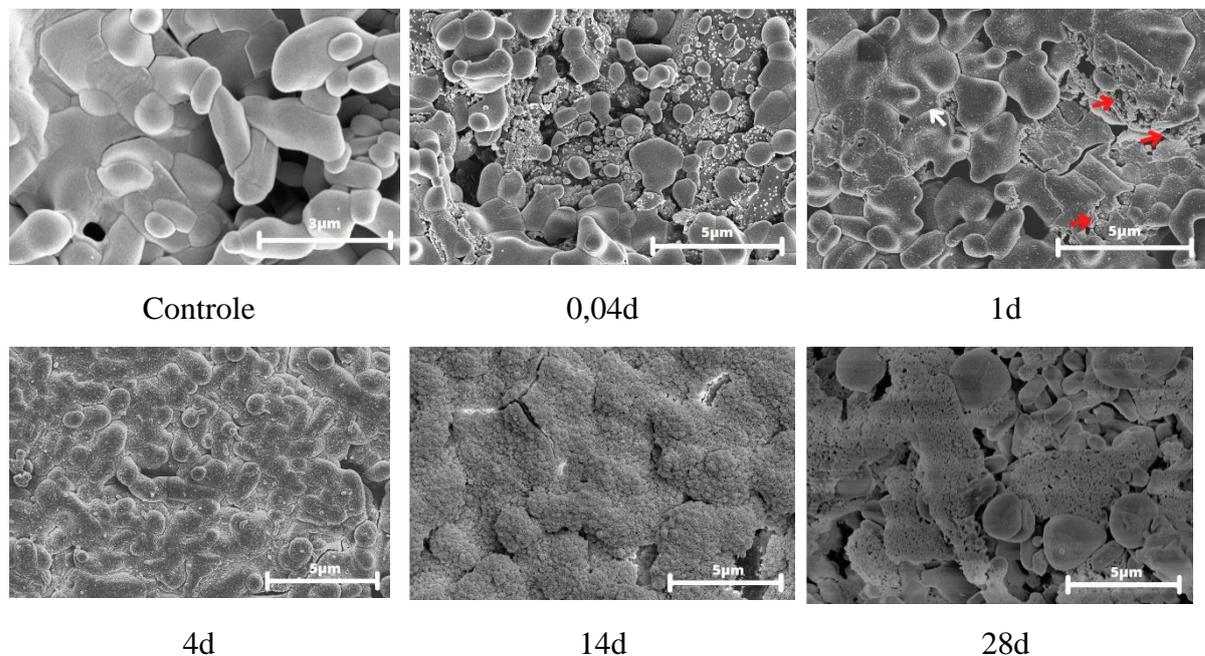


Figura 4. 29: Micrografia de superfície de 50VB50HAp após imersão em SBF nos períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias. Controle é amostra sem imersão.

As micrografias da amostra 25VB75HAp estão mostradas na Figura 4.30. Após o período de 0,04 dia se observa o início de uma interligação entre as estruturas presentes na amostra, de forma que com 1 dia de imersão há a presença estruturas de formas globulares que cobrem sua superfície, tal como uma camada, preenchendo a porosidade resultante do processo para a obtenção da amostra. A morfologia na superfície da amostra se altera evidenciando a presença de estruturas e contornos de grão, e um aumento de trincas superficiais, além da diminuição da porosidade da superfície, caracterizando os estágios iniciais da formação de apatita semelhante

ao osso ou apatita imatura, que é composta de Fosfatos de Cálcio amorfos e podem ser consideradas as unidades básicas da apatita [153].

Em 4 dias a micrografia apresenta uma evolução com relação à morfologia da camada de apatita formada sobre a superfície, com uma densificação das estruturas se apresentando como de milhares de nanocristais em forma de placa, que está associada à apatita madura, indicando a cristalização da camada de apatita [154]. Após 14 dias a camada de apatita parece mais densa que no período de imersão anterior, com trincas maiores e mais largas. O desenvolvimento da camada é um processo contínuo, com o crescimento e junção dos aglomerados ocasionando o espessamento da camada de apatita [153]. Em 28 dias há a morfologia de camada cristalizada sobre a superfície, recobrendo as estruturas globulares.

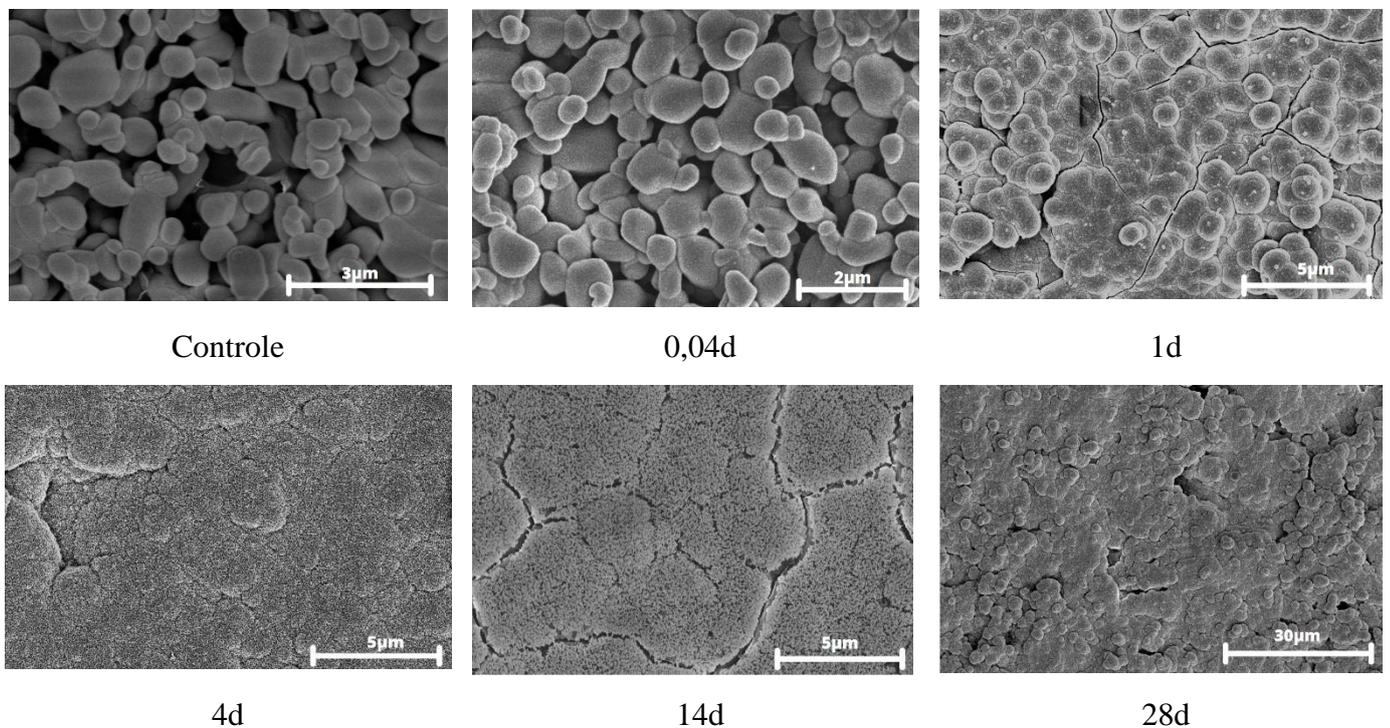


Figura 4. 30: Micrografia de superfície de 25VB75HAp após imersão em SBF nos períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias. Controle é amostra sem imersão.

Embora todas as amostras indiquem crescimento de uma camada de apatita na superfície, a morfologia observada nas imagens indica uma diferença de cinética de crescimento de camadas para as amostras. Para o VB_t, a camada parece não cristalizar, nos compósitos há comportamentos distintos em um mesmo período de imersão, 4 dias, enquanto a amostra de 75VB25HAp ainda tem indicativos de crescimento da camada, a 50HAp50VB já tem essa camada bem definida e a 25VB75HAp já possui morfologia referente a uma camada mais cristalizada. Entretanto, em 14 dias todas possuem características que indicam uma camada cristalina, apontando que essa diferença é mais significativa em períodos curtos.

Para os três compósitos estudados o comportamento de 14 para 28 dias foi semelhante, ou seja, houve a formação de uma camada de apatita mais densa e uniforme composta por muitos nanocristais. Nas curvas de variação de pH as amostras 50VB50HAp e 75VB25HAp não atingem uma saturação, tal como o VB_t. Já a amostra 25VB75HAp apresenta uma tendência de saturação, as trocas iônicas estão diretamente correlacionadas com a formação da camada de apatita sobre os materiais, desta forma sem que as trocas iônicas atinjam um regime de saturação bem definido, é possível que novas camadas se sobreponham às já existentes.

Para a amostra HAp há o crescimento de camada, mas esta ocorre de modo mais lento, corroborando com os dados de pH que indicam uma troca iônica lenta e com menor variação, quando comparados a VB_t e os compósitos. Com a intenção de tentar avaliar a camada observada nas imagens da superfície das amostras, foi empregada a técnica de FTIR-ATR cujos resultados serão apresentados a seguir.

4.7.2.2 FTIR-ATR

A dissolução de vidros bioativos contendo Boro ocorre com uma taxa de dissolução superior aos vidros bioativos típicos de silicato [18, 152]. Ocorre a troca de íons do material em imersão e da solução, levando à nucleação e crescimento de uma camada amorfa de CaP na superfície do material, que com o passar do tempo pode cristalizar na forma de hidroxicarbonato apatita (HCA) [35, 90].

A camada de apatita formada na superfície da amostra pode ser avaliada por meio de espectro de FTIR composto de bandas na região do infravermelho médio. É característico na região entre 600 e 570cm⁻¹ a presença de bandas de absorção dos modos relacionados às deformações de PO₄ [33, 110, 156] A camada inicialmente formada é amorfa, de modo que se observa nesta região apenas uma banda larga com centro próximo de 560 cm⁻¹, atribuída ao modo de vibração ν_4 PO₄³⁻, que no decorrer do tempo de imersão pode cristalizar, e ocorrer o surgimento de duas bandas com centros em 570 e 603cm⁻¹ [157,158]. Há também uma banda importante com centro próximo a 1030cm⁻¹, atribuída ao estiramento assimétrico do PO₄ [33, 130, 131]. As bandas na região próxima a 1400 cm⁻¹ e a banda em 875cm⁻¹ podem ser associadas aos modos vibracionais dos grupos de carbonato (CO₃²⁻), sendo característicos de uma camada mais amorfa [135]. Os espectros de FTIR-ATR para as amostras VB_t, HAp, 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25VB50HAp em diferentes tempos de imersão estão mostrados nas Figuras 4.31, 4.32, 4.33, 4.34 e 4.35, respectivamente. Foram realizadas medidas em todos os períodos

de imersão, porém só estão sendo mostradas algumas para melhor visualização. Ademais, em todas as figuras estão indicadas as posições dos centros das bandas de absorção das fases identificadas (linhas coloridas na vertical).

Os espectros de FTIR-ATR do VB_t estão apresentados na Figura 4.31. Foram identificadas bandas de absorção das fases cristalinas $CaNaB_5O_9$ [93], $CaNa_3B_5O_{10}$ [118] e FAp (RRUFF ID: R040098.1) [119]. Estas fases estão em concordância com as indexadas por meio da técnica de DRX realizadas nas amostras em pó pré-imersão, discutidas anteriormente.

A técnica de FTIR-ATR necessita que a amostra esteja em contato direto com o cristal de ATR, desta forma o feixe de infravermelho incide no cristal na condição de ângulo crítico, sofrendo reflexão interna total. A radiação penetra por uma determinada distância no interior da amostra antes de ocorrer a reflexão completa. Esta penetração é chamada de onda evanescente, e a profundidade de penetração depende dos índices de refração da amostra e do cristal, comprimento de onda da radiação incidente e do ângulo de incidência [159]. Sendo assim, cada uma das amostras medidas por FTIR-ATR neste trabalho pode ter diferentes profundidades de penetração ao longo da amostra. Foi possível com a técnica de FTIR-ATR caracterizar os espectros das amostras íntegras com as mesmas fases cristalinas indexadas da técnica de DRX realizada nas amostras em pó (pré-imersão).

No período de 0,04 dias (1 hora) observa-se um espectro para o VB_t similar ao de antes de imersão. Com 1 dia nota-se uma banda centrada em 1010cm^{-1} e uma melhor definição da banda em 560cm^{-1} . As mesmas bandas foram observadas para 0,25 dias (6 horas) (Figura A1 do apêndice). Estas bandas são indicativos da formação da camada de CaP sobre a superfície do material. As mesmas bandas são observadas até o período final de imersão, 28 dias, porém a banda em 1010cm^{-1} sofre um deslocamento para 1020cm^{-1} , podendo esta característica indicar uma camada menos amorfa do que as dos períodos anteriores. Deste modo, é possível inferir que a variação de pH e perda de massa observada no mesmo período podem ser parâmetros que refletem a formação da camada.

As bandas das fases de $CaNaB_5O_9$ e $CaNa_3B_5O_{10}$ aparecem de forma mais evidente até o 1º dia de imersão, e posteriormente apresentam baixa intensidade, podendo estar sobrepostas às bandas de fosfato. Há indícios de que a camada CaP formada sobre VB_t seja de FAp, uma vez que não foi observada a presença de bandas referentes ao estiramento de OH (3572 e 630cm^{-1}), características da HAp e ausente da FAp. Entretanto, por se tratar de uma camada amorfa não há evidências concretas deste fato.

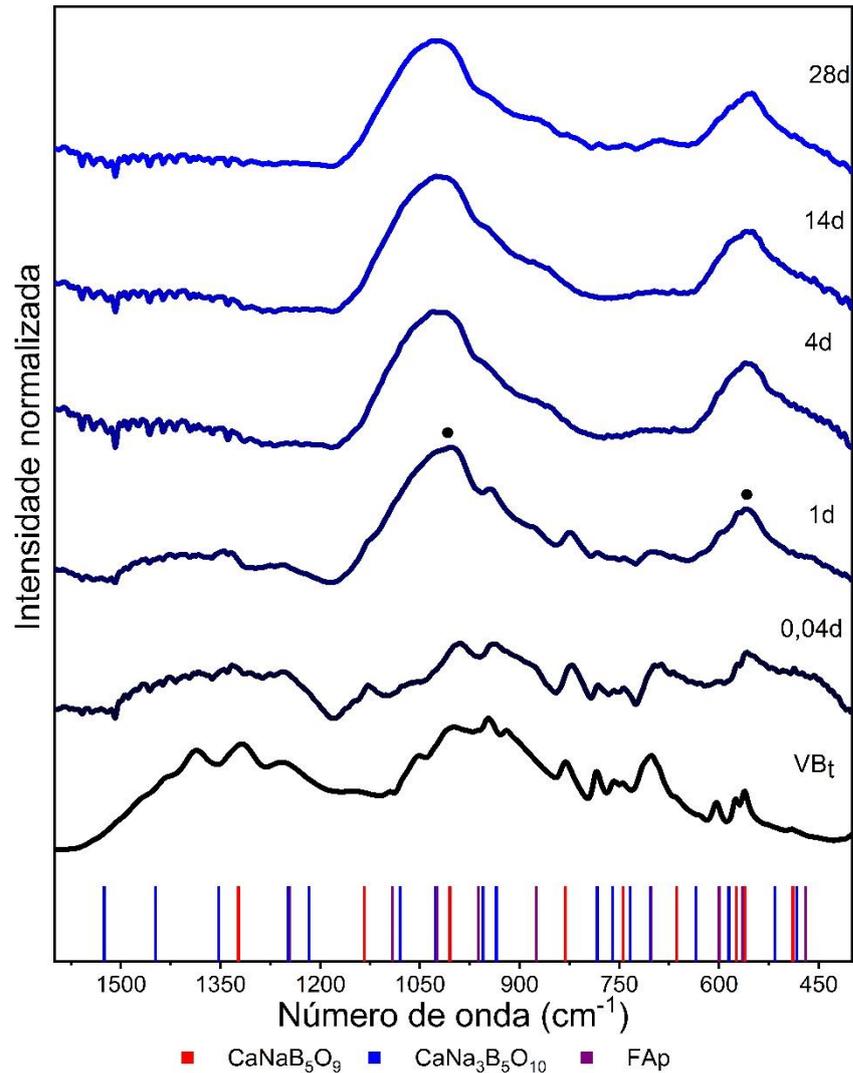


Figura 4. 31: Espectros de FTIR-ATR da amostra VB_t após os períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): $CaNaB_5O_9$ (em vermelho) [89], $CaNa_3B_5O_{10}$ (em azul) [114] e FAp (em roxo) RRUFF ID: R040098.1 [115]. VB_t indica a amostra sem imersão e os pontos em preto destacam a formação da camada CaP.

A Figura 4.32 mostra os espectros de FTIR-ATR da HAp que se apresentaram semelhantes em todos os tempos analisados, mostrando a estabilidade do Fosfato de Cálcio cristalino e baixa solubilidade [108], em concordância com o comportamento observado para as análises de pH da solução de imersão e a solubilidade da amostra. Além disso, se uma camada amorfa de apatita se formar na superfície, a mesma estará sobreposta aos modos vibracionais definidos observados para a HAp.

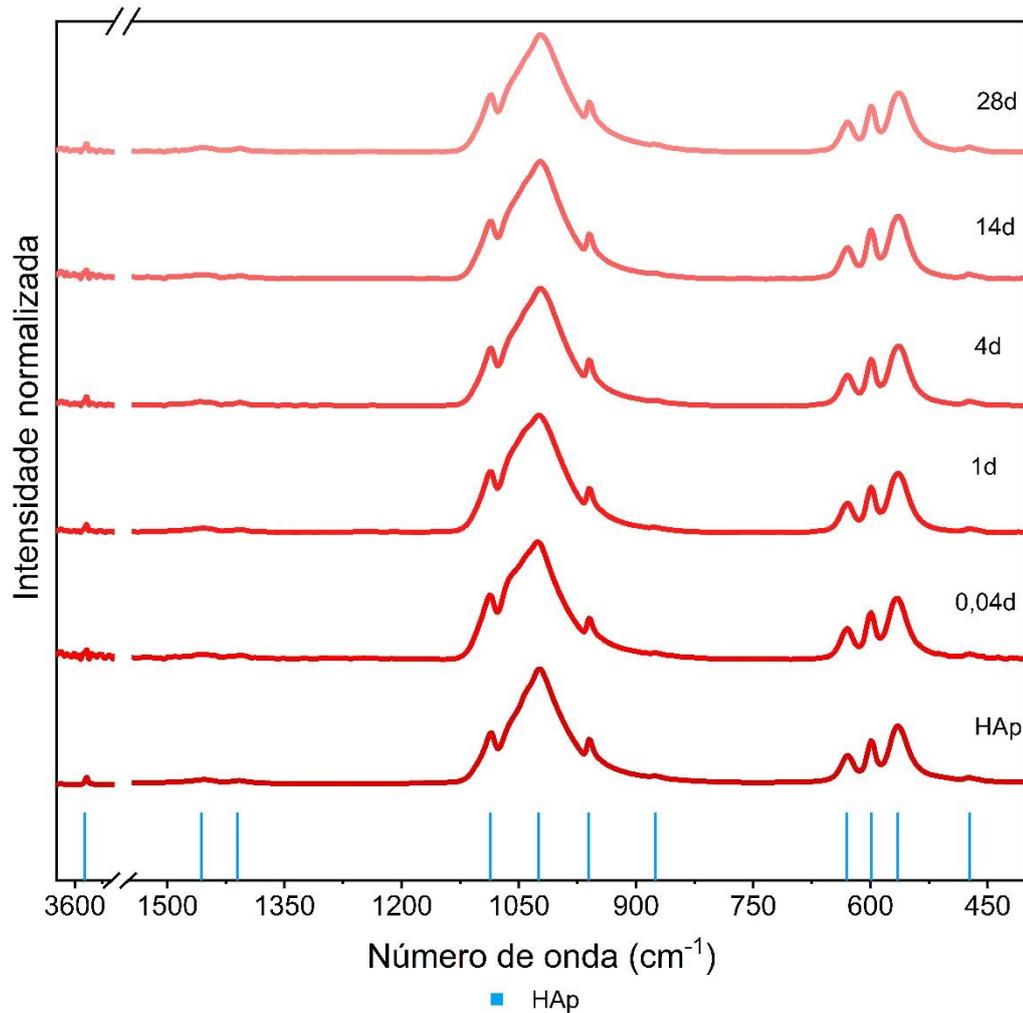


Figura 4. 32: Espectros de FTIR-ATR da amostra HAp após os períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação da fase cristalina (linha na vertical) HAp (em azul claro) [33]. HAp indica a amostra sem imersão.

Para a amostra de 75VB25HAp, apresentada na Figura 4.33, não foi possível identificar o modo vibracional referente ao estiramento de OH em 3572cm^{-1} , desta forma, por questão de visualização, os espectros são exibidos de 1600 a 400cm^{-1} .

Em 0,04 dias (1 hora) o espectro apresenta bandas similares ao espectro de pré-imersão, porém nota-se o desaparecimento de bandas atribuídas à fase $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$, tais como as marcadas com asterisco em azul escuro, enquanto as bandas relacionadas a fase CaNaB_5O_9 (asteriscos em vermelho) permanecem com menor intensidade neste período. Por se tratar de amostras diferentes na pré-imersão e em cada período de imersão, além da não homogeneidade das amostras, com relação à distribuição das fases, foi observada uma banda mais proeminente em 1135cm^{-1} em 0,04 dias do que no espectro 75VB25HAp (pré-imersão). A banda em $\sim 600\text{cm}^{-1}$ desaparece neste período, referente ao estiramento $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ da FAp e/ou HAp,

podendo indicar a deposição de uma camada mais amorfa sobre a superfície da amostra, pois neste período há intensas trocas iônicas como foi visto por meio dos resultados de pH.

Em 1 dia as bandas referentes às fases cristalinas de borato têm suas intensidades bastante reduzidas, apontando para a diluição destas, resultando em um espectro com predominância das bandas dos modos de vibração do fosfato em 1012, 960, 601 e 565 cm^{-1} (pontos em preto), indicando a formação de uma camada CaP de característica amorfa sobre a superfície da amostra. Em 4 dias o espectro é semelhante ao de 1 dia.

Em 14 dias as bandas em 960, 601 e 565 cm^{-1} parecem mais bem definidas, já a banda antes centrada em 1012 cm^{-1} sofre um deslocamento para 1020 cm^{-1} , e uma discreta contribuição é observada próximo de 1090 cm^{-1} . Em 28 dias as bandas se tornaram mais definidas quando comparadas à 14 dias.

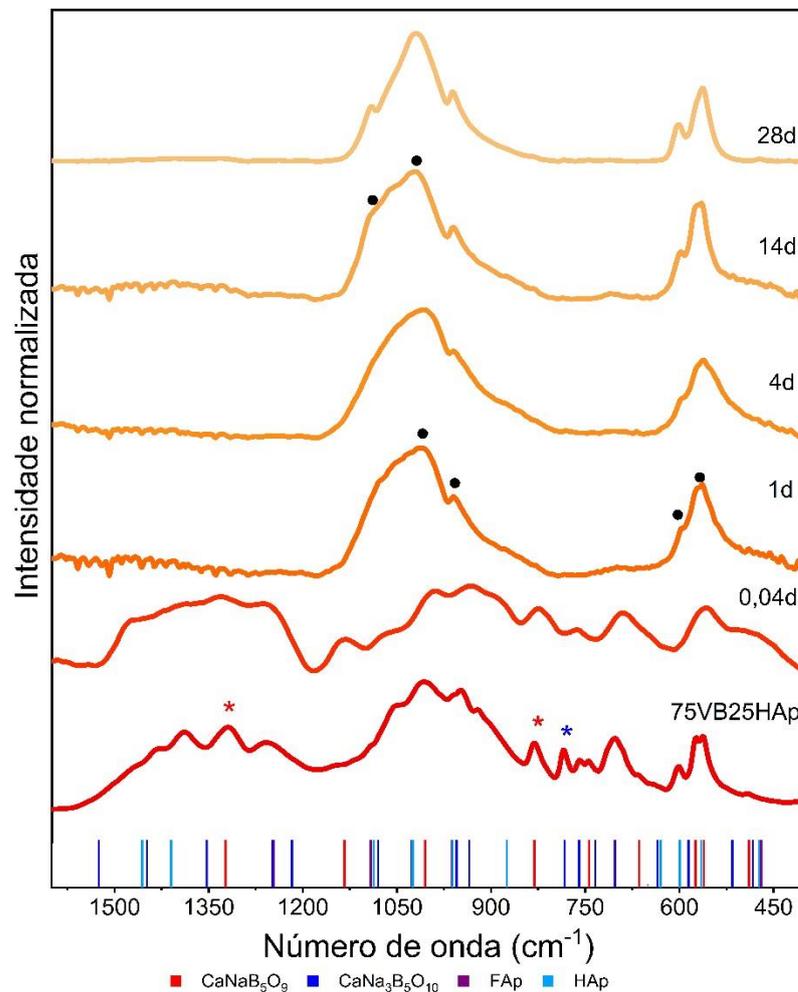


Figura 4. 33: Espectros de FTIR-ATR da amostra 75VB25HAp após os períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): CaNaB_5O_9 (vermelho) [89], $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ (azul escuro) [114], FAp (roxo) RRUFF ID: R040098.1[115] e HAp (azul claro). 75VB25HAp indica a amostra sem imersão. As bandas indicadas por asteriscos destacam as bandas das fases que não apresentam sobreposição com bandas das outras fases. Pontos em preto destacam a formação da camada CaP.

As bandas com centro em 1090 e 1020cm^{-1} estão relacionadas aos modos de estiramento assimétrico ν_3 (P-O) e 960cm^{-1} do estiramento simétrico de ν_1 (P-O). Já em 601 e 565cm^{-1} são provenientes dos modos vibracionais ν_4 (P-O) [73].

O compósito 75Vb25HAp apresentou, ao final do período de imersão, um espectro com bandas mais definidas, indicando a cristalização da camada CaP formada sobre a superfície da amostra, mostrando a precipitação desta camada de forma mais amorfa em um dia de imersão.

Para a amostra de 50VB50HAp, apresentada na Figura 4.34, em 0,04 dias não é possível identificar a contribuição das bandas referentes às fases CaNaB_5O_9 e $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$, asteriscos em vermelho e azul escuro, respectivamente, somente a contribuição da fase CaB_2O_4 , asterisco em cinza. As bandas associadas à fase cristalina NaCaPO_4 se sobrepõem em quase todo o espectro avaliado às fases HAp e FAp, não sendo possível avaliar sua dissolução. Nesta composição o compósito apresenta contribuição maior dos modos vibracionais da HAp dificultando a identificação da camada de apatita de característica amorfa.

Em 1 dia o espectro se mostra com a envoltória mais atenuada, perdendo a resolução das bandas como se observa entre 600 e 800cm^{-1} , que podem ser relacionadas às fases presentes no material. As bandas com centros próximos a 600 e 565cm^{-1} possuem características amorfas que podem ser relacionadas à camada de apatita precipitada. Para períodos menores que 1 dia também foi notado o mesmo comportamento (Figura A4 do apêndice). Além disso, outro indicativo da camada amorfa é o deslocamento da banda centrada em 1015cm^{-1} para 996cm^{-1} .

Com 4 dias as bandas em 960 e 600cm^{-1} ficam mais evidentes. Em 14 dias há um deslocamento da banda antes centrada em 996cm^{-1} para 1020cm^{-1} . E por fim, em 28 dias, há outro deslocamento da banda antes em 1020cm^{-1} para 1035cm^{-1} , além de um espectro com bandas mais resolvidas e aparecimento de um ombro em $\sim 1080\text{cm}^{-1}$ (ponto em preto). A amostra 50VB50HAp apresentou uma camada de CaP com características mais amorfas quando comparada à amostra de 75VB25HAp ao final dos 28 dias de imersão, este comportamento pode tanto se relacionar à evolução da cristalinidade do material, quanto de sucessivas precipitações de camadas sobre a superfície do material, consequência de trocas iônicas entre o meio de imersão e a amostra. Ao avaliar o comportamento do pH da solução em função do tempo de imersão foi observado que para o compósito 50VB50HAp em 28 dias não houve saturação dos valores de pH, podendo indicar a sobreposição de camadas precipitadas de CaP sobre a superfície da amostra.

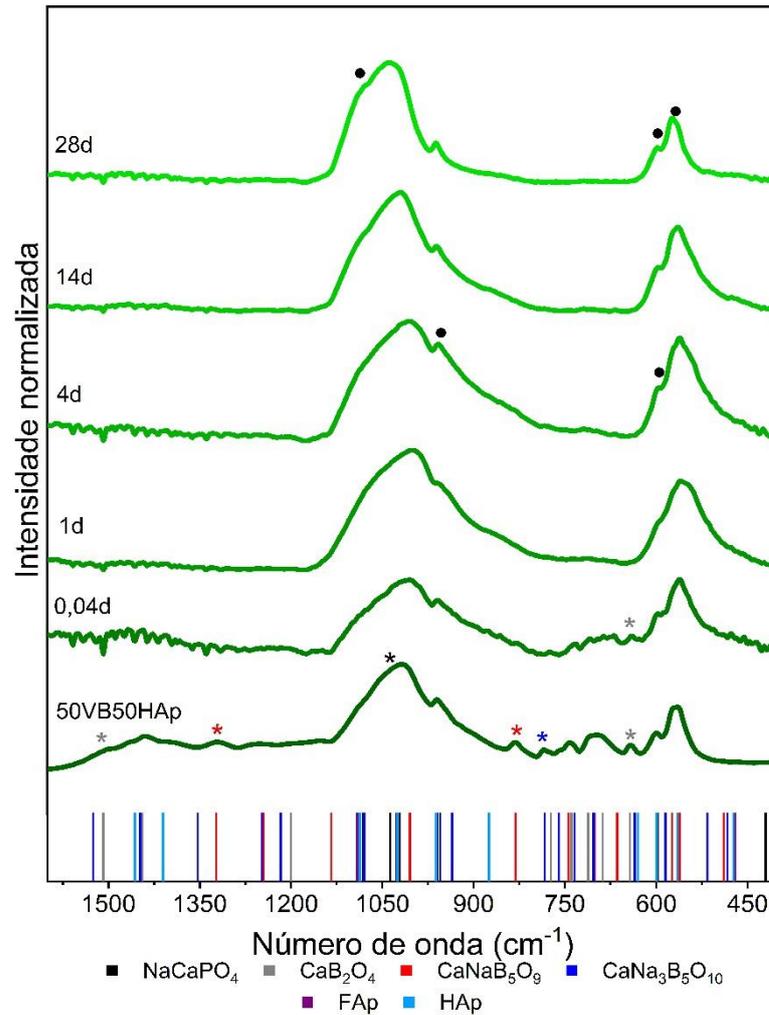


Figura 4. 34: Espectros de FTIR-ATR da amostra 50VB50HAp após os períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): NaCaPO₄ (preto) [138], CaNaB₅O₉ (vermelho) [93], CaNa₃B₅O₁₀ (azul escuro) [118], FAp RRUFF ID: R040098.1[119] e a HAp (azul claro). 75VB25HAp indica a amostra sem imersão. As bandas indicadas por asteriscos destacam as bandas das fases que não apresentam sobreposição com bandas das outras fases. Pontos em preto destacam a formação da camada CaP.

A Figura 4.35 apresenta os espectros da amostra 25VB75HAp em diferentes períodos de imersão em SBF. Em 0,04 dias o espectro é similar ao da amostra sem imersão, com contribuição, ainda que discreta, das fases CaB₂O₄ (asterisco em cinza) e β-TCP (asterisco em amarelo), a fase NaCaPO₄ apresenta sobreposição com as bandas de HAp e FAp, novamente não possibilitando avaliar sua dissolução em função do tempo de imersão. Após um dia de imersão não foi possível identificar a contribuição das fases supracitadas, prevalecendo as bandas dos modos de vibração PO₄³⁻, sugerindo que a camada de CaP esteja depositada sobre a amostra, uma vez que as bandas se mostram menos definidas, principalmente na região entre 630 e 450cm⁻¹ e o deslocamento da banda em 1020cm⁻¹ (sem imersão) para 1010 cm⁻¹. Este comportamento foi semelhante para períodos antes de 1 dia de imersão (Figura A5 do apêndice).

Em 4 dias as bandas próximas de 960 , 600 e 565cm^{-1} aparecem melhor definidas, permanecendo assim até 14 dias. É possível observar também um alargamento da banda na região com centro próximo a 1088cm^{-1} , que pode ser devido ao modo vibracional relacionado à camada de apatita, uma vez que a banda associada à HAp desaparece. É possível identificar também a presença de uma banda larga $\sim 1400\text{cm}^{-1}$, que pode ser associada à presença de carbonato na amostra assim como a banda $\sim 874\text{cm}^{-1}$ (símbolos \blacklozenge), mostrando a formação de uma camada CaP carbonatada na superfície da amostra, sendo característica de uma camada amorfa.

Vale destacar alguns pontos neste ensaio para avaliar a camada de apatita que se formou nas amostras em imersão. As amostras de compósito possuem HAp em sua composição de forma que elas já apresentam por si só bandas relacionadas ao fosfato e carbonato nas regiões de identificação da camada de CaP amorfa acima citadas, e o VB_t após o tratamento térmico apresenta a contribuição da fase de FAp que possui espectro similar o HAp com exceção da ausência das bandas relacionadas ao OH em 3572 e 630cm^{-1} e, portanto, teria contribuições nas mesmas regiões.

Os últimos períodos analisados indicam que a camada formada na superfície das amostras está na forma de Fluofosfato de Cálcio (ou fluorapatita), uma vez que não são observadas as bandas referentes ao OH em 3572cm^{-1} (região não apresentada) ou em 630cm^{-1} . As duas bandas são referência para a camada de apatita carbonatada (HCA) e são utilizadas para diferenciar as duas formas de Fosfato de Cálcio, essa ideia é apoiada pelo fato de o Flúor, Cloro e Hidroxila se substituírem originando as outras formas da apatita [160].

O fato de as amostras conterem Flúor em sua composição pode ter favorecido o surgimento da fase FAp após o tratamento térmico, e esta fase pode ter influenciado na formação de uma camada de Fluofosfato de Cálcio nas amostras em imersão. Como nenhuma das amostras apresentou nos espectros as bandas referentes ao OH, em nenhuma das regiões características, supõe-se que a camada obtida para o VB_t e os compósitos seja de fluorapatita, o que, dependendo da aplicação, é vantajoso uma vez que a Fluorapatita é mais resistente que a Hidroxiapatita [108]. Para complementar os dados encontrados com a técnica de FTIR-ATR para a identificação da camada de apatita formada na superfície das amostras, foi empregada a técnica de DRX, cujos resultados são apresentados na sequência.

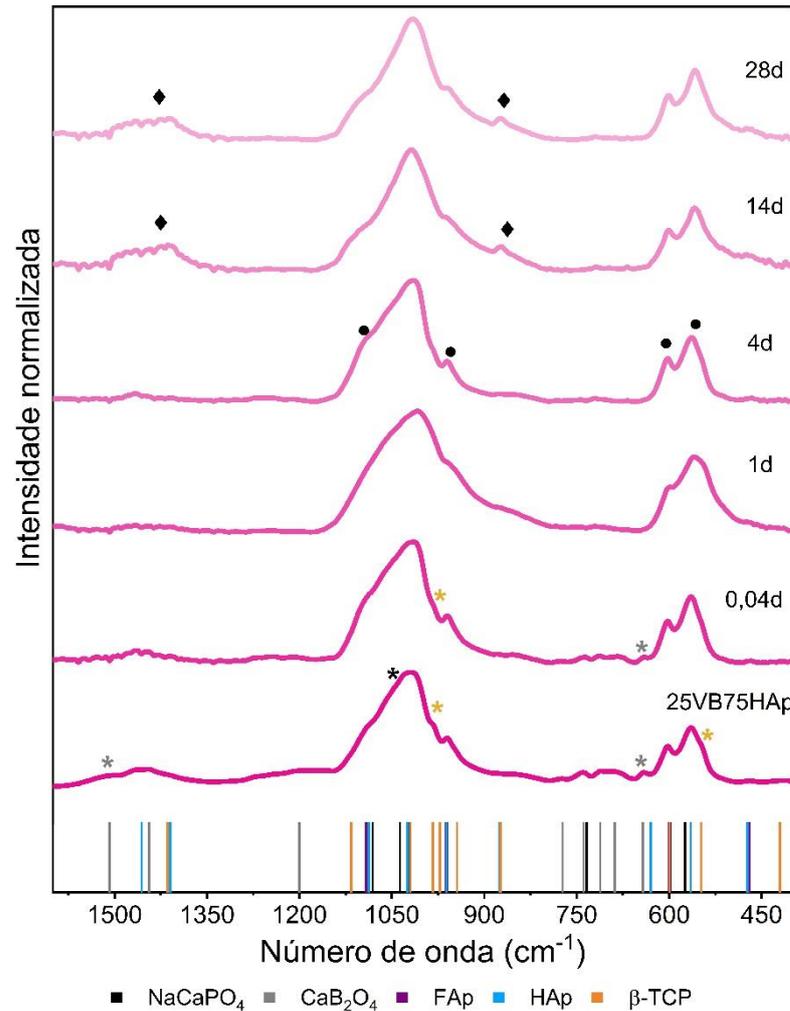


Figura 4. 35: Espectros de FTIR-ATR da amostra 25VB75HAp após os períodos de 0,04, 1, 4, 14 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): NaCaPO₄ (preto) [138], CaB₂O₄ (em cinza) [139], FAp RRUFF ID: R040098.1 [119], HAp (azul claro) e a β-TCP (em amarelo). 25VB75HAp indica a amostra sem imersão. As bandas indicadas por asteriscos destacam as bandas das fases que não apresentam sobreposição com bandas das outras fases. O símbolo \blacklozenge indica bandas relacionadas ao carbonato. Pontos em preto destacam a formação da camada CaP.

4.7.2.3 DRX

A Figura 4.36 mostra os difratogramas da superfície de VB_t em diferentes períodos de imersão em SBF. Em todos os períodos foi possível identificar, majoritariamente, a fase CaNaB₅O₉. A indexação foi realizada por meio de comparação com as mesmas fichas cristalográficas utilizadas para as amostras pré-imersão, observando posição e intensidade dos picos. Na análise de DRX pré-imersão em SBF do VB_t foi observada, além da fase CaNaB₅O₉, a presença da FAp e CaNa₃B₅O₁₀, com menores contribuições quando comparada à CaNaB₅O₉. Esta ausência das demais fases reforça a não homogeneidade de distribuição das fases cristalinas nas amostras estudadas.

Em todos os períodos de imersão foi possível indexar a fase CaNaB_5O_9 , e não foi observada alteração significativa nos difratogramas com relação à intensidade dos picos. Estudos em vidros bioativos de borato e borossilicato [48,49] mostraram que a presença do B_2O_3 na composição é um fator determinante na troca iônica da superfície do vidro com o meio de imersão. Youssif e colaboradores (2021) [51] correlacionam o aumento de unidades tetraédricas (BO_4) com maior número de átomos de Oxigênio ligados, resultando em um aumento da conectividade da rede e decréscimo na taxa de interação da amostra com o meio de imersão. Sendo assim, é razoável associar a maior perda de massa e variação de pH do VB_t , em função do tempo de imersão, Figuras 4.23 e 4.24, respectivamente, quando comparado às demais amostras, com a presença da fase cristalina CaNaB_5O_9 .

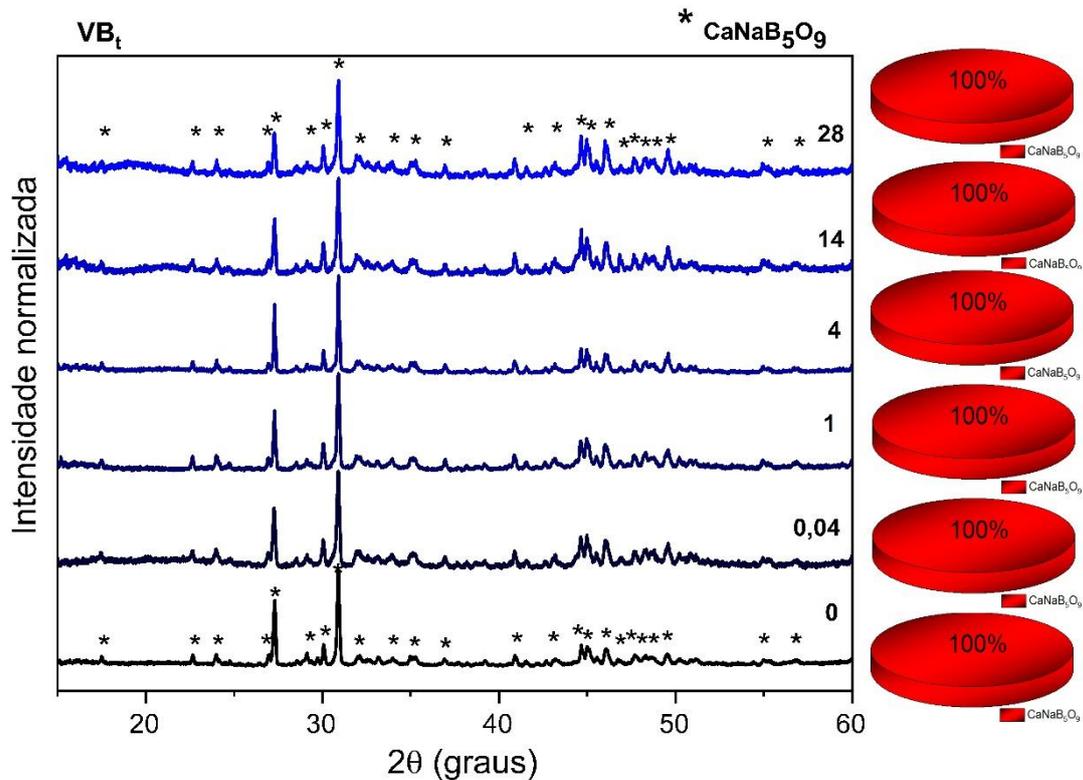


Figura 4. 36: Difratogramas da superfície de VB_t após 0,04; 1; 4; 14 e 28 dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. O símbolo * indica a indexação da fase cristalina CaNaB_5O_9 (JCPDS # 078-0294).

A formação de uma camada superficial de Fosfato de Cálcio é esperada durante testes de bioatividade, *in vitro*, em materiais bioativos, iniciando de forma amorfa e cristalizando ao longo do tempo de imersão em soluções fosfatadas. Estudos de bioatividade em vidros borato apresentaram a formação de camada superficial de Fosfato de Cálcio amorfa em até 24hrs de imersão em SBF [34, 49-51]. No presente estudo, o VB_t submetido ao teste de bioatividade foi tratado termicamente em 810°C , conferindo-lhe características cristalinas, desta forma

dificultando a análise de DRX na verificação da formação de uma camada amorfa de Fosfato de Cálcio no período avaliado.

É de consenso na literatura sobre a cristalização melhorar propriedades mecânicas dos vidros, levando a maior resistência à fratura. Entretanto, ainda há diferentes entendimentos no que se pode acarretar sobre a bioatividade, dependendo da composição da vitrocerâmica estudada [42, 106]. Peitl Filho e colaboradores (1996) [158] e Li e colaboradores (1992) [161] estudaram os efeitos da cristalização de vidros bioativos contendo SiO_2 , P_2O_5 , Na_2O e CaO , obtendo como resultado que a cristalização causou maior tempo para a formação da camada de apatita, em comparação com o vidro sem tratamento térmico, sendo a fase vítrea residual contida nas vitrocerâmicas a maior responsável pela formação da camada, por meio de interação eletrostática entre a superfície da fase amorfa carregada negativamente e os cátions dissolvidos no meio de imersão. Já Youssif e colaboradores (2021) [51] estudaram a bioatividade em vitrocerâmicas de borato microporosas, compostas por B_2O_3 , CaO , Na_2O e P_2O_5 , os resultados mostraram que a rede de borato de natureza vítrea atrasa a formação da camada de apatita. Com a hidrólise das ligações B-O-B do sistema vítreo, há a formação de grupos B-OH, que constituem uma camada hidratada de B-OH sobre matriz residual amorfa. Sendo assim, o Ca liberado da superfície da amostra para o meio de imersão forma uma fase amorfa de Fosfato de Cálcio sobre a camada de B-OH, assim retardando a formação da camada de Fosfato de Cálcio sobre a superfície da amostra.

A Figura 4.37 apresenta os difratogramas do compósito 75VB25HAp até 14 dias de imersão em SBF, não foi possível realizar as medidas de DRX para amostras com 21 e 28 dias de imersão devido à fragmentação de ambas. Tal como a amostra VB_t, o compósito, antes de imersão ($t=0$), apresentou a presença majoritária da fase CaNaB_5O_9 , cerca de 67%, além da fase NaCaPO_4 com percentual de 33%. Os percentuais das fases foram calculados pelo método semiquantativo RIR.

Não foi possível identificar as fases HAp e FAp, antes da imersão na amostra íntegra, por meio do método de indexação comparando as fichas cristalográficas da base de dados, posições e intensidades de picos de difração, com o difratograma da amostra. Entretanto, há importantes fatos que mostram a presença destas fases neste compósito, mesmo sem ser possível a indexação: i) para todos os períodos de imersão se observa a presença de picos em $31,92^\circ$ e $49,58^\circ$ que podem ser atribuídos à FAp; ii) a presença destas nas amostras medidas na forma de pó, cujos resultados de DRX foram apresentados anteriormente e iii) a contribuição da não homogeneidade da distribuição das fases na amostra.

Após a imersão, a fase CaNaB_5O_9 diminui, desaparecendo após 4 dias, que pode ser observado mais facilmente pela diminuição do pico em $2\theta = 30,86^\circ$ (Figura 4.37). Com a diminuição da fase CaNaB_5O_9 , a fase NaCaPO_4 se torna dominante a partir de 1 dia de imersão. No 14º dia há o surgimento da fase FAp, sendo esta majoritária, ~59%, neste período. Com a diminuição da fase CaNaB_5O_9 é provável que as outras fases indexadas se tornem mais evidentes, uma vez que podem estar presentes na amostra pré-imersão. Considerando a diminuição da fase CaNaB_5O_9 , o aumento de pH e diminuição da massa da amostra 75VB25Hap, Figuras 4.23 e 4.24, respectivamente, podem ter sido regidos pela liberação de íons oriundos desta fase, já que as demais fases não apresentaram diminuição durante o período avaliado.

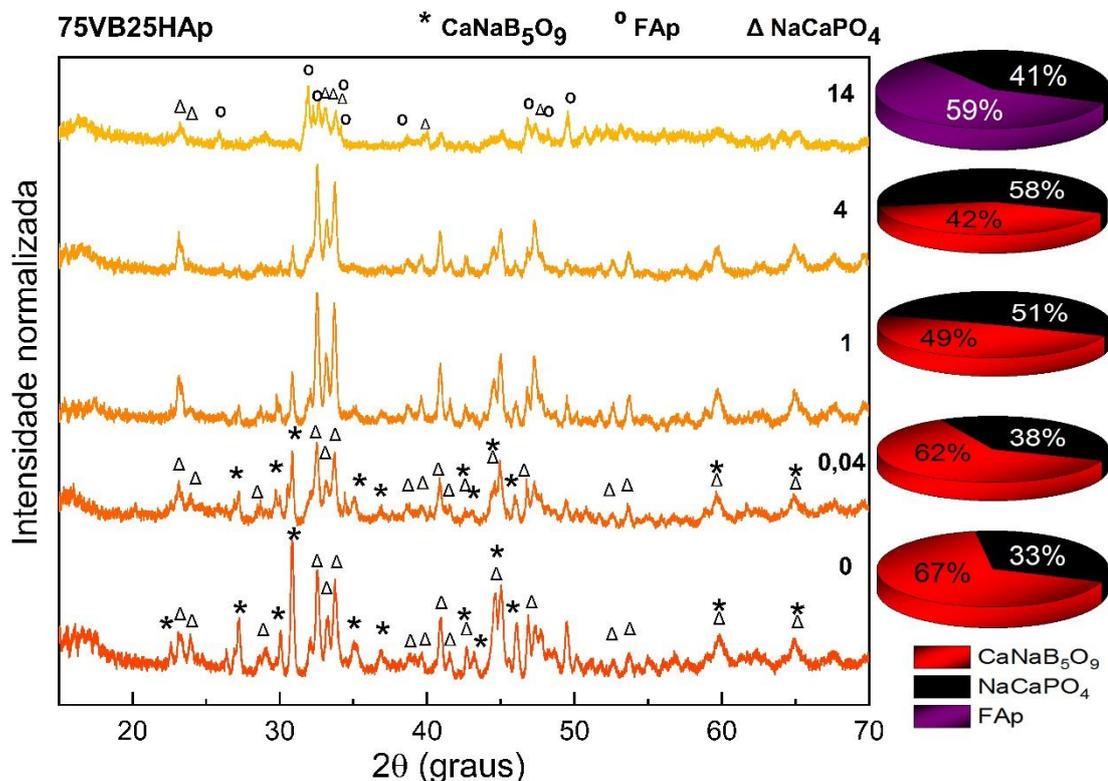


Figura 4. 37: Difratogramas da superfície da amostra 75VB25H após 0,04, 1, 4 e 14 dias de imersão em SBF.

O tempo zero indica a amostra antes da imersão. Os símbolos *, Δ e \circ indicam a indexação das fases cristalinas CaNaB_5O_9 (JCPDS # 078-0294), NaCaPO_4 (JCPDS # 076-1456) e FAp (JCPDS # 071-0881), respectivamente.

Os difratogramas para a amostra 50VB50Hap em diferentes períodos de imersão estão apresentados na Figura 4.38. Nota-se a presença das fases Hap, NaCaPO_4 , CaNaB_5O_9 e CaB_2O_4 , as quais apresentaram percentuais de 24, 25, 24 e 28%, por meio do método RIR, para amostra sem imersão em SBF. Novamente, diferente dos resultados apresentados anteriormente para amostra em pó, não foi possível indexar a fase FAp em nenhum dos períodos avaliados, reforçando a hipótese da distribuição não homogênea das fases cristalinas.

Após 1 dia de imersão não há a presença da fase CaB_2O_4 e também há ausência da fase CaNaB_5O_9 , mostrando mais uma vez que as fases que contém Boro são as mais solúveis em SBF, quando comparadas as fases que contém Fósforo. Com a dissolução das fases de borato, as fases Hap e NaCaPO_4 ficam constantes, ~50% cada uma, até completar 28 dias de imersão. Desta forma pode-se inferir que as fases com Boro são, majoritariamente, as responsáveis pelo aumento mais rápido do pH da solução de imersão e a perda de massa da amostra, visto até 2 dias de imersão, e mais lento do 4º dia em diante por conta da presença, predominante das fases de fosfato. É possível acompanhar o comportamento da fase CaNaB_5O_9 e CaB_2O_4 pelos picos de difração localizados em $30,86$ e $29,74^\circ$, respectivamente. A dissolução da fase CaB_2O_4 e da matriz vítrea residual na solução de SBF causa uma supersaturação de íons Ca para formação da camada superficial de Fosfato de Cálcio [106]. Entretanto, em nosso estudo não foi possível identificar esta camada por meio da técnica de DRX.

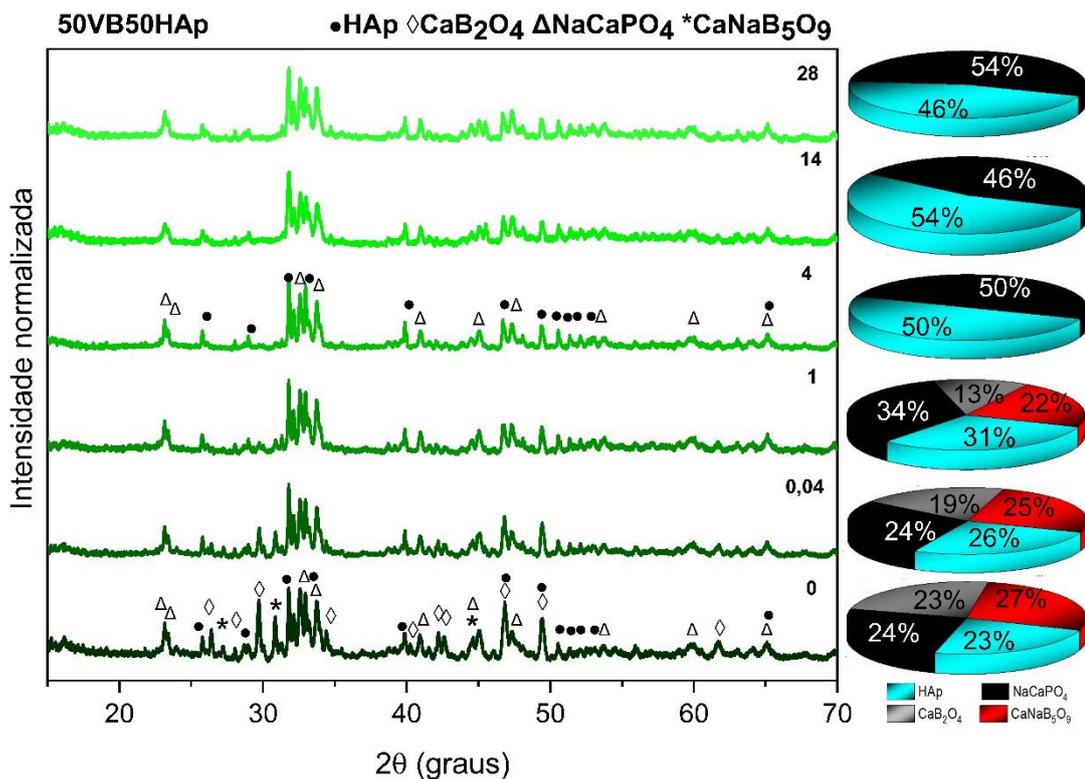


Figura 4. 38: Difratogramas da superfície da amostra 50VB50Hap após 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7 e 14, dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. Os símbolos *, Δ , \bullet e \diamond indicam a indexação das fases cristalinas CaNaB_5O_9 (JCPDS # 078-0294), NaCaPO_4 (JCPDS # 076-1456), Hap (JCPDS # 074-0565) e CaB_2O_4 (JCPDS # 076-0747), respectivamente.

A Figura 4.39 mostra os difratogramas do compósito 25VB75Hap em diferentes períodos de imersão em SBF, na qual se observa para $t = 0$, ou seja, sem a imersão em SBF, a presença das fases cristalinas Hap, NaCaPO_4 e CaB_2O_4 , sendo os percentuais estimados para cada uma delas 63, 17 e 20%, respectivamente. As fases com fosfato são maiores que a fase com borato,

sendo a Hap majoritária. A fase CaB_2O_4 se dissolve em 1h (0,04 dias) e a fase NaCaPO_4 em 4 dias. Diferentemente dos demais compósitos, a fase NaCaPO_4 não se mantém até o final do período de imersão. Suchanek e colaboradores [98] mencionam em seu trabalho que a taxa de degradação da NaCaPO_4 é maior do que a Hap em testes, *in vivo*, porém menor que a β -TCP. Além disso, exibe alta biocompatibilidade e bioatividade. Este compósito por predominar a Hap em sua composição apresentou esta fase durante todo o período de imersão em SBF avaliado.

Com a rápida dissolução da fase CaB_2O_4 , a fase NaCaPO_4 atuou cedendo íons para o meio de imersão, foi possível observar que o maior aumento de pH e a maior perda de massa para o compósito ocorreu no período de 4 dias, seguido por um comportamento mais constante nos demais períodos, desta forma podemos inferir que a fase NaCaPO_4 atuou de forma mais efetiva para as trocas iônicas na solução de imersão.

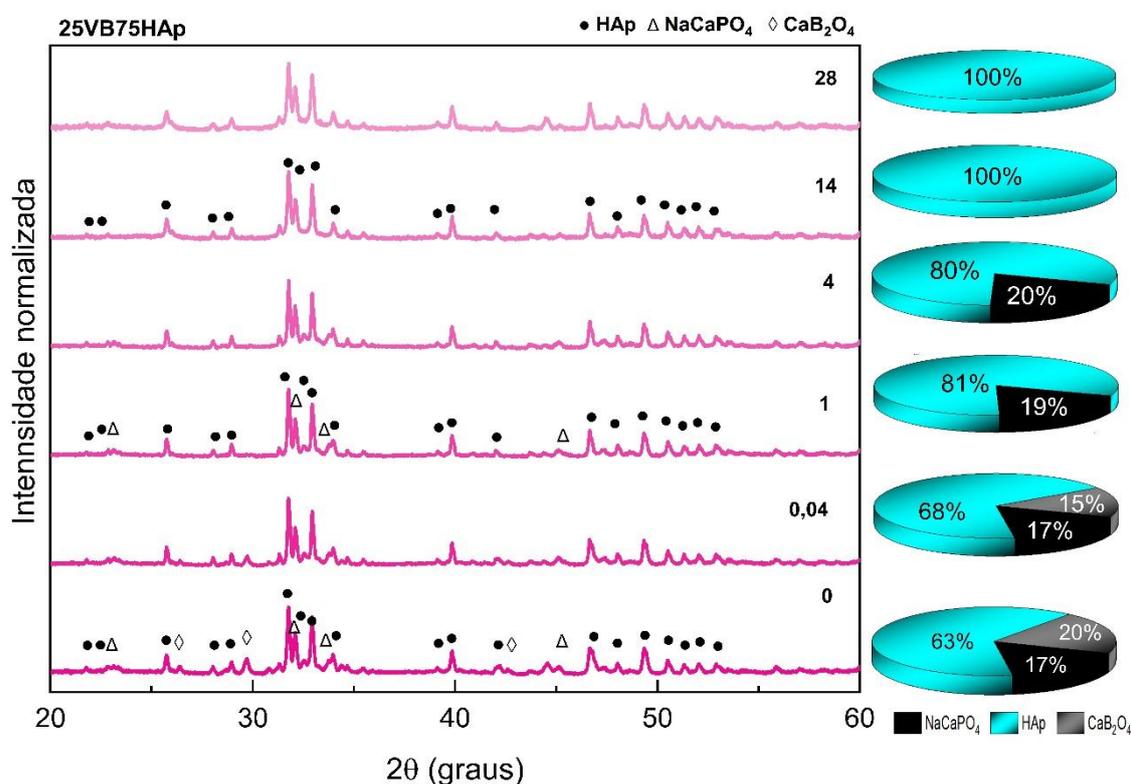


Figura 4. 39: Difratogramas da superfície da amostra 25VB75HAp após 0,04, 1, 4, 14 e 28, dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. Os símbolos Δ , \bullet e \diamond indicam a indexação das fases cristalinas NaCaPO_4 (JCPDS 076-1456), HAp (JCPDS 074-0565) e CaB_2O_4 (JCPDS 076-0747), respectivamente.

A HAp também foi submetida ao teste de bioatividade nos mesmos períodos que as demais amostras, não mostrando fases adicionais ou alterações significativas nos difratogramas, como mostra a Figura 4.40.

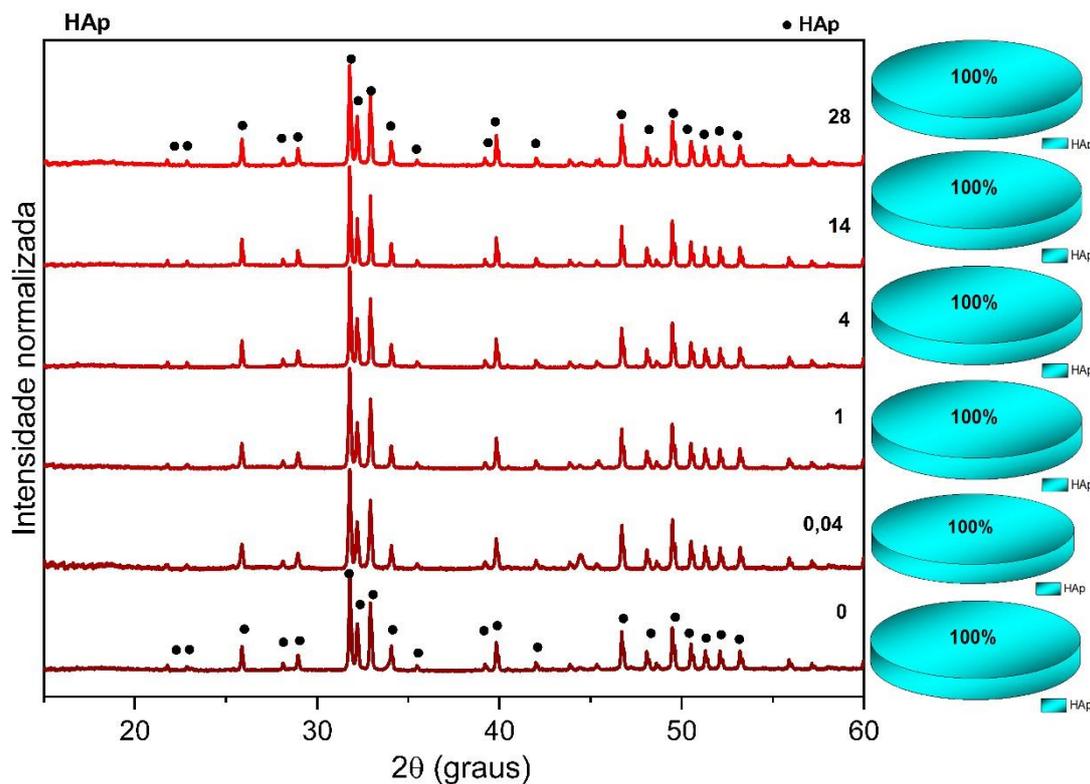


Figura 4. 40: Difratogramas da superfície da amostra HAp após 0,04, 1, 4, 14 e 28, dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. O símbolo • indicam a indexação da fase HAp (JCPDS 074-0565)

Os resultados obtidos por meio da técnica de DRX mostraram as fases presentes durante os diferentes períodos de imersão em SBF. O percentual de cada fase identificada se mostrou dependente da proporção entre VB e HAp, sendo as fases com borato mais solúveis em SBF. Porém no compósito com maior proporção de HAp, 25VB75HAp, na ausência das fases de borato, a fase NaCaPO_4 se mostrou mais solúvel que a HAp, sendo a maior responsável pelas trocas iônicas do compósito com o SBF.

Com a dissolução das fases cristalinas no meio de imersão com fosfato espera-se que as trocas iônicas realizadas entre a amostra e o meio, estabeleçam o crescimento de uma camada de Fosfato de Cálcio sobre a superfície do biomaterial, iniciando amorfa e adquirindo características mais cristalinas com maiores tempos de imersão. Em nosso estudo não foi possível identificar a formação desta camada sobre a superfície das amostras no período de 28 dias de imersão em SBF por meio da técnica de DRX. Acredita-se que por se tratar do crescimento de uma camada amorfa sobre material cristalino há dificuldades na sua detecção. Ademais, devido à fragilidade da camada formada sobre a amostra é possível que ela tenha se fragmentado e se deslocado da superfície das amostras durante a realização das medidas impossibilitando determinar sua presença. Outro fato importante obtido das análises com a técnica de DRX é sobre a não homogeneidade das amostras com relação à distribuição das fases

crystalinas, as quais mostraram ausência nas medidas das amostras íntegras, principalmente da FAp, identificada nas medidas realizadas nas amostras em forma de pó.

Considerando que todos os ensaios de bioatividade mostraram resultados promissores, indicando que as amostras poderiam interagir com o meio promovendo o crescimento de apatita em sua superfície, foram realizados ensaios *in vitro* para avaliação de citotoxicidade e de cicatrização que avaliam a resposta do material quando na presença de células, que é exibido a seguir.

4.7.3 Teste de citotoxicidade e de cicatrização

A avaliação da atividade citotóxica das amostras foi realizada em células de pré-osteoblastos, da linhagem MC3T3-E1. Os ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular são baseados em várias funções celulares, quando em cultura, as células constantemente se dividem de maneira a se multiplicar. Entretanto, ao serem expostas a diferentes materiais podem apresentar diferentes comportamentos ocasionando em um aumento de células viáveis ou redução, com a morte celular, quando comparadas com o controle, sendo este o máximo que a célula poderia crescer e estar viável sem nenhum tipo de tratamento [162].

Diferentes tipos de ensaios de citotoxicidade são empregados nas áreas de toxicologia e farmacologia, visto que a citotoxicidade é um importante parâmetro na avaliação biológica em estudos *in vitro* [162]. No presente trabalho as amostras foram testadas em quatro concentrações (1000, 700, 400 e 100 µg/mL), após o período de incubação a viabilidade celular foi avaliada conforme apresentado na Figura 4.41.

Os resultados obtidos para viabilidade celular foram satisfatórios, pois nenhuma das amostras atingiu nível de viabilidade celular menor que 50%. Abaixo deste nível a concentração dos biomateriais poderia induzir morte celular [163]. A concentração inibitória de 50% é convencionalmente utilizada para determinar a potência de uma droga em testes de citotoxicidade *in vitro* [164]. Por meio de análise estatística as concentrações de 100 µg/mL de VB_t, 100 e 400 µg/mL de 50VB50HAp e todas as concentrações testadas de 25VB75HAp e HAp não apresentaram diferença quando comparadas ao controle (0 µg/mL).

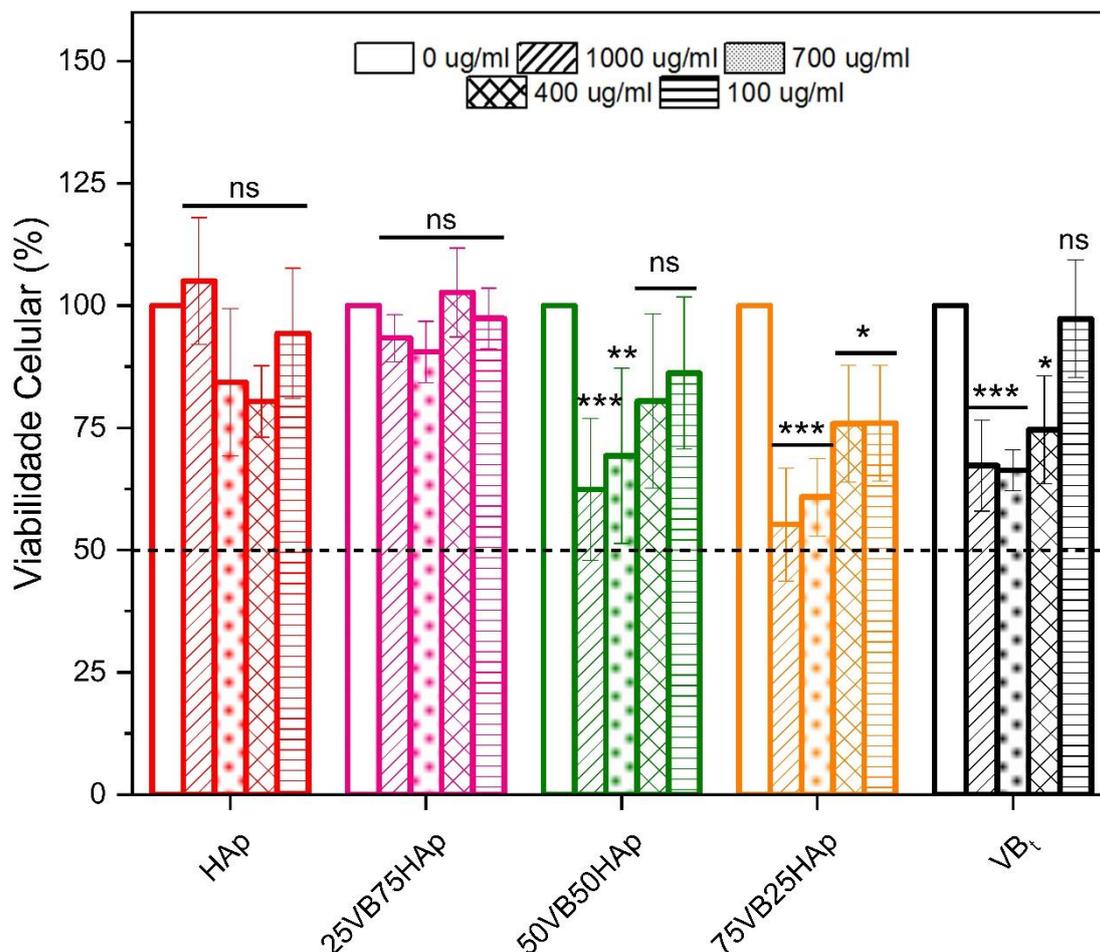


Figura 4. 41: Viabilidade celular realizada em diferentes concentrações 100, 400, 700 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ das amostras VB_t, 75VB25HAp, 50VB50HAp, 25VB75HAp e HAp durante 24 horas de incubação. A concentração 0 $\mu\text{g/mL}$ é o controle. Os símbolos *, ** e *** indicam que há diferença estatística entre as amostras e ns que não houve diferença ($p < 0,05$). As barras de erro são referentes a $n = 3$.

A Tabela 4.2 mostra uma comparação entre as concentrações de VB_t e compósitos com HAp utilizadas no ensaio de citotoxicidade. A HAp é um biomaterial que não exibe citotoxicidade [165, 166], por isso foi comparado seu percentual de viabilidade com os demais materiais. Para 100 $\mu\text{g/mL}$ VB_t e os compósitos têm efeito igual a HAp, com a HAp atingindo ~95% de viabilidade celular enquanto o menor percentual foi de ~75% do VB_t. Já com 1000 $\mu\text{g/mL}$ somente o compósito 25VB75HAp não apresenta diferença estatística com a HAp, possivelmente por ser a amostra com maior concentração de HAp em sua composição. Para 400 e 700 $\mu\text{g/mL}$ somente dois compósitos não se equiparam estatisticamente a viabilidade celular da HAp 25VB75HAp e 75VB25HAp.

Tabela 4. 2: Comparação de VB_t e compósitos com HAp para as concentrações testadas no teste de citotoxicidade *in vitro*.

	Valor de p	Significância
1000 µg/mL		
HAp vs. VB _t	<0,0001	****
HAp vs. 75VB25HAp	<0,0001	****
HAp vs. 50VB50HAp	<0,0001	****
HAp vs. 25VB75HAp	0,4461	ns
700 µg/mL		
HAp vs. VB _t	0,0875	ns
HAp vs. 75VB25HAp	0,0162	*
HAp vs. 50VB50HAp	0,2359	ns
HAp vs. 25VB75HAp	0,8678	ns
400 µg/mL		
HAp vs. VB _t	0,8720	ns
HAp vs. 75VB25HAp	0,9393	ns
HAp vs. 50VB50HAp	>0,9999	ns
HAp vs. 25VB75HAp	0,0377	*
100 µg/mL		
HAp vs. VB _t	0,9900	ns
HAp vs. 75VB25HAp	0,1116	ns
HAp vs. 50VB50HAp	0,7443	ns
HAp vs. 25VB75HAp	0,9888	ns

ns: sem diferença estatística; *, ** e ****: com diferença estatística ($p < 0,05$).

O ensaio *in vitro* de viabilidade celular mostrou que os compósitos, bem como os precursores HAp e VB_t não induziram morte celular, sendo a HAp e o compósito 25VB75HAp com maior potencial para induzir o crescimento celular com algumas concentrações atingindo mais que 100%. Nos compósitos 50VB50HAp e 75VB25HAp e no VB_t foram identificadas as fases cristalinas de borato e fosfato, considerando os resultados obtidos por meio da técnica de

DRX antes de imersão em SBF, medidas realizadas nas amostras em pó, estas contêm a fase CaNaB_5O_9 como predominante quando comparadas às outras fases cristalinas, indicando que esta fase pode estar contribuindo de forma a diminuir a viabilidade celular. No compósito 25VB75HAp a fase CaNaB_5O_9 não foi mais identificada, e sua viabilidade celular foi a melhor entre os compósitos se equiparando a HAp, que também não contém a fase CaNaB_5O_9 .

Avaliando os resultados das análises estatísticas, a amostra 25VB75HAp, exceto na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, foi amostra que com melhores resultados quando comparada ao controle, bem como, quando comparada à HAp.

As características físicas e químicas das amostras interferem diretamente em sua resposta biológica, de modo que, embora os testes de citotoxicidade possam indicar se o material é citotóxico, não descreve totalmente o comportamento da amostra em meio biológico, uma vez que este é bem mais complexo, entretanto é um bom indicativo para materiais com potencial de aplicação na área clínica médica para implantes e enxertos [167].

Outro ensaio biológico *in vitro* realizado foi o de cicatrização de feridas, no qual células MC3T3-E1 foram cultivadas em placas, formando uma monocamada, que foi ferida em linha reta com uma ponteira de 200 μL e lavadas três vezes com tampão PBS. Em seguida, o meio de cultura com as amostras diluídas nas concentrações de 100 e 400 $\mu\text{g/mL}$ foram adicionados aos poços e incubados a 37°C e 5% CO_2 .

Após 24 horas de incubação, a área da ferida foi analisada usando um modelo de microscópio de contraste de fase e a taxa de cicatrização da ferida, chamado de percentual de migração celular, foi calculada como a porcentagem da ferida inicial até o fechamento completo da ferida em diferentes momentos com o software Image J, os resultados deste ensaio estão mostrados nas Figuras 4.42 e 4.43. Sendo a Figura 4.42 referente às imagens da ferida em linha, região analisada nos tempos 0 e 24hrs, para obtenção dos valores aos percentuais obtidos para a migração celular nas duas concentrações analisadas que são apresentados na Figura 4.43.

As amostras VB_i, 75VB25HAp e 50VB50HAp apresentaram excelentes respostas em relação à migração celular, em ambas as concentrações testadas, atingindo níveis mais altos que o controle, indicando que podem promover a cicatrização de feridas. Já a amostra 25VB75HAp com 400 $\mu\text{g/mL}$ induziu migração celular semelhante ao controle, mas com a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ a migração celular foi semelhante às amostras supracitadas. Por fim, para a amostra de HAp os resultados observados mostram os níveis mais baixos de migração celular comparados a todas as amostras e ao controle.

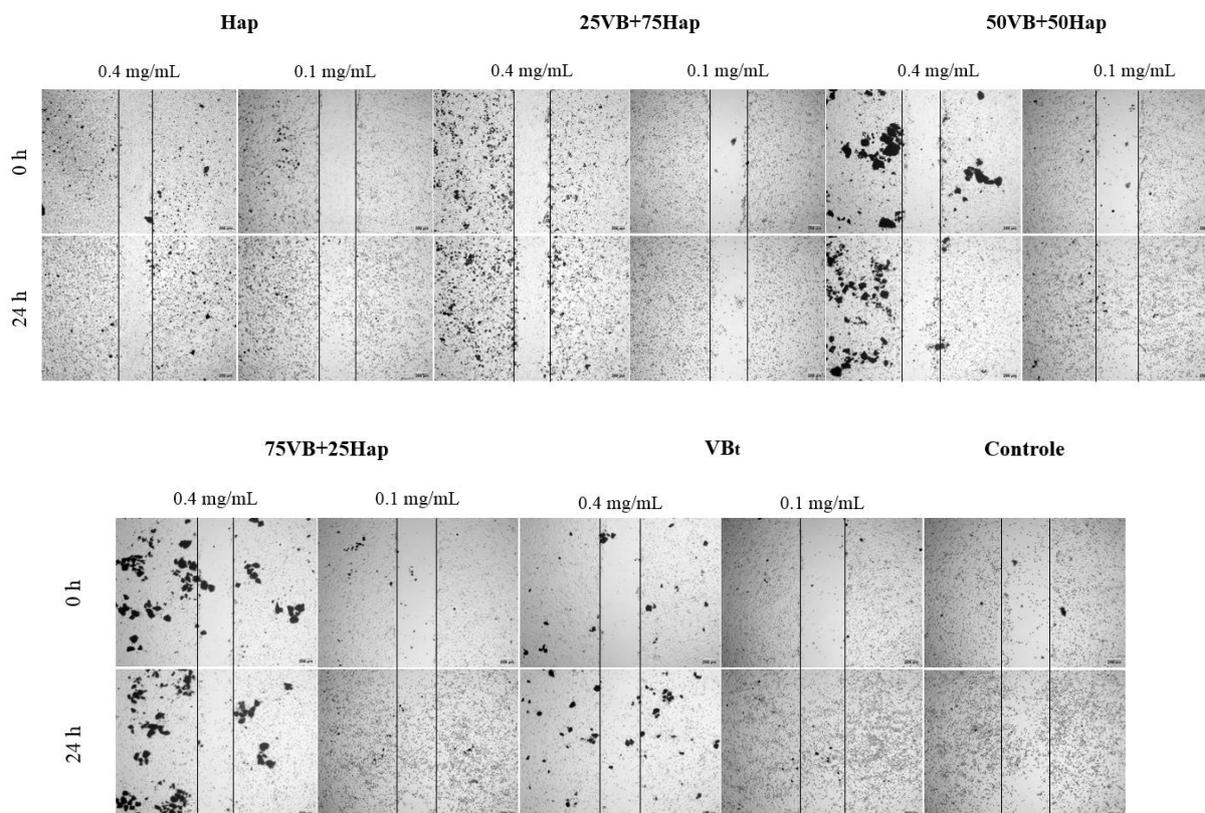


Figura 4. 42: Imagens da prancha do ensaio de migração celular para avaliação da cicatrização.

Além de contribuir para aliviar sintomas de osteoporoses, doenças coronárias e artrite, o Boro tem propriedades cicatrizantes que estão relacionadas com a sua capacidade de regular a liberação de colágeno, proteoglicanos e proteínas. A migração de queratinócitos também ocorre na presença de Boro, que pode desempenhar um papel fundamental na cicatrização de feridas [142]. Desta forma, a presença de fases com borato nas amostras VB_t, 75VB25HAp e 50VB50HAp amplificou o poder de migração celular nas duas concentrações testadas neste ensaio. A 25VB75HAp apresentou menor percentual de fase cristalina com Boro, podendo ter ocasionado na menor migração celular para a amostra com 400 µg/mL. Enquanto a HAp, sem a presença de Boro em sua composição, propiciou a menor migração celular.

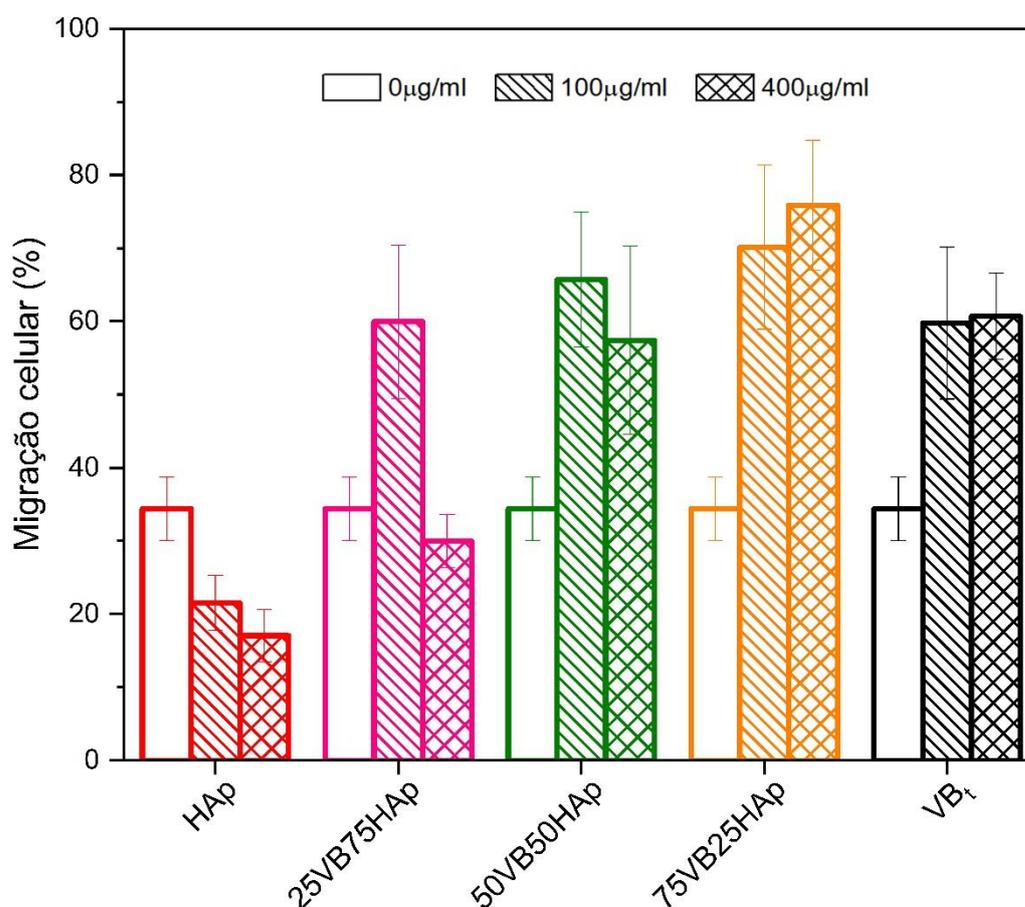


Figura 4. 43: Porcentagem da capacidade de migração das células incubadas para as amostras HAp, 25VB75HAp, 50VB50HAp, 75VB25HAp e VB_t por 24 h de incubação. 0 µg/mL é o controle. As barras de erro são referentes a n = 3.

Desta forma, os resultados dos ensaios biológicos mostraram também uma dependência com a composição da amostra, principalmente com relação à presença de Boro. Para a viabilidade celular, as amostras com menor percentual de fases cristalinas com borato exibiram melhores níveis, já para a migração celular ocorreu o oposto, maior quantidade de Boro, maior a migração celular. Algumas das concentrações dos biomateriais testadas apresentaram comportamento diferenciados, podendo ser efeito do próprio método aplicado, pois todas as amostras foram submetidas à diluição em diferentes soluções, que podem ter acarretado em diferentes íons liberados e consequentemente interferindo na resposta biológica. Nos ensaios biológicos realizados *in vitro*, o compósito 50VB50HAp mostrou bons níveis de viabilidade e migração celular, além de conter diferentes fases cristalinas de borato e fosfato, propiciou a formação de camada de Fosfato de Cálcio em poucas horas, sem a degradação da amostra de forma a não fragmentá-la, o que torna a amostra uma excelente candidata para diferentes aplicações biomédicas.

5. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível avaliar os compósitos produzidos da mistura dos pós de hidroxiapatita e vidro bioativo borato tratados termicamente à 810°C, em diferentes proporções. Tanto com relação à caracterização das amostras, estrutural e molecular, quanto à bioatividade e efeitos biológicos em ensaios *in vitro*. A temperatura de 810°C está acima da temperatura de cristalização do VB, resultando em um material com características cristalinas.

Após os testes de bioatividade *in vitro*, todas as amostras foram analisadas pelas técnicas de MEV, FTIR e DRX, além da análise da variação de pH do meio de imersão e perda de massa das amostras. Para os compósitos e VB_t ocorreram a maior variação de pH e perda de massa nas primeiras horas, sendo o VB_t com a maior taxa de variação, já para HAp as variações foram menores e mais lentas. As micrografias mostraram a formação de uma camada superficial nas amostras com menos de um dia de imersão em SBF, exceto para a HAp que apareceu após 14 dias, corroborando com os resultados de variação de pH e perda de massa. A técnica de FTIR-ATR forneceu espectros da superfície dos compósitos com bandas associadas aos modos de vibração do fosfato, inicialmente com características mais amorfas, indicando que a camada superficial é de Fosfato de Cálcio (apatita). Com o aumento do tempo de imersão foi observada a cristalização desta camada. O VB_t não apresentou cristalização na camada. Já a HAp a camada se mostrou cristalina desde o primeiro tempo de imersão. Por fim, com a técnica de DRX foram indexadas as fases presentes nos compósitos após imersão, mostrando a ausência das fases com borato, quanto menor a proporção de VB no compósito mais rápido as fases não se faziam presentes, já a HAp se manteve presente em todos os períodos de imersão, enquanto a NaCaPO₄ diminuiu na ausência das fases de borato. Cabe ressaltar, que comparando as análises das técnicas de DRX e FTIR-ATR, medidas nos compósitos e VB_t na forma de pó e na peça íntegra é plausível inferir que as amostras têm distribuição das fases cristalinas de forma não homogênea tanto na superfície quanto ao longo de suas espessuras.

Compósitos, VB_t e HAp apresentaram potencial para viabilidade celular, entretanto a característica cicatrizante foi observada somente nas amostras com Boro em sua composição.

Conclui-se que os compósitos 75VB25HAp, 50VB50HAp e 25VB75HAp formados por fases cristalinas de borato e fosfato se apresentaram bioativos, não citotóxicos e alguns potencialmente promissores como agentes cicatrizantes. Em todas as análises realizadas o compósito 50VB50HAp foi o qual apresentou melhores resultados quando comparado somente a HAp ou ao VB_t.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Alguns pontos deste trabalho ainda precisam ser explorados, como a influência das características dos materiais precursores nos compósitos, por exemplo, tamanho de partícula dos precursores; metodologia para obtenção das misturas; temperaturas de tratamento térmico próximos do valor de T_m do vidro, uma vez que o vidro bioativo possui temperatura de cristalização abaixo da temperatura de energia de ativação da HAp, e a influência do tempo de tratamento térmico nas fases observadas para os compósitos.

Ainda, seria interessante um estudo da cinética de cristalização durante o processo para obtenção dos compósitos, para a determinação da variação dos parâmetros de cristalização do VB_t devido à presença da HAp, que são importantes para uma melhor compreensão da dinâmica de formação das fases cristalinas observadas nos compósitos; além de avaliar a influência das fases obtidas na resposta bioativa, uma vez que o presente estudo aponta para uma não homogeneidade nas fases presentes. Outro ponto importante a ser investigado é a resistência mecânica dos compósitos, pois esta propriedade pode variar com a composição, devido à formação de poros, o que pode fragilizar o material.

Por fim, é necessária a análise da presença dos elementos químicos presentes nas fases cristalinas identificadas nas soluções pós-imersão, importantes para o melhor entendimento da bioatividade dos compósitos.

7. APÊNDICE

A - Informações adicionais resultados

A - 1 FTIR-ATR - Após imersão

Conforme mencionado na seção Resultados e Discussão, seguem os resultados de todos os tempos de imersão em SBF para a técnica de FTIR-ATR. A Figura A1 apresenta os espectros obtidos para a amostra VB_t em todos os 10 períodos analisados. Conforme discutido anteriormente, no período de 0,25d (6 horas) já há indicativos nos espectros de formação de camada, todavia os espectros não sofrem o *split* da banda na região $\sim 600\text{cm}^{-1}$, que indicaria a cristalização da camada de apatita sobre a amostra, de maneira que ao fim do período de 28 dias a camada apresenta espectros característicos de uma camada amorfa.

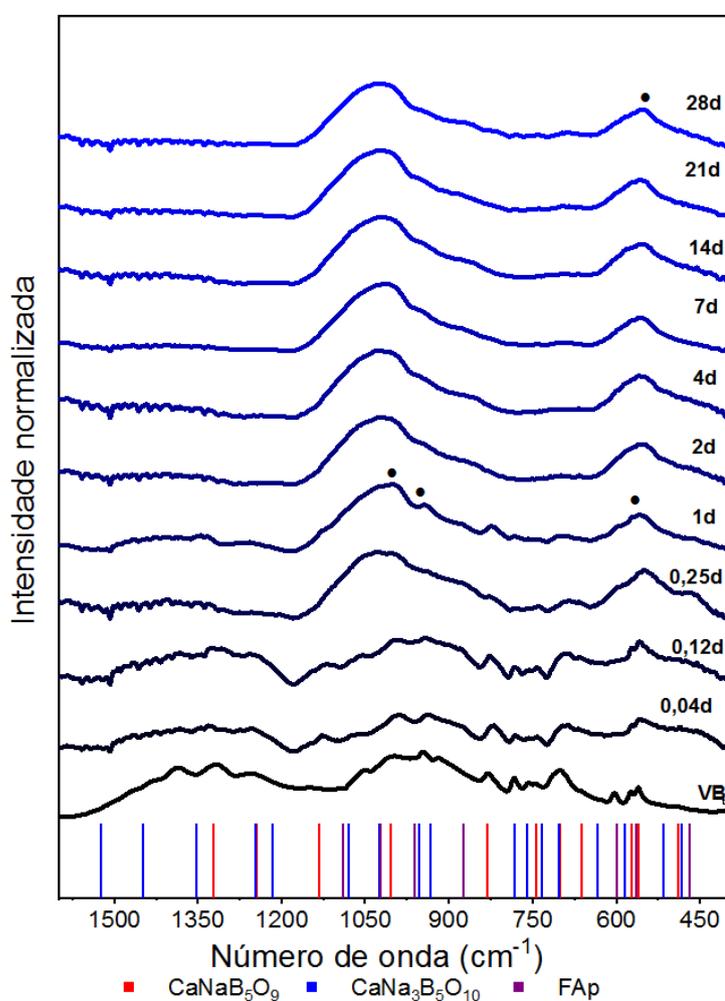


Figura A 1: Espectros de FTIR-ATR da amostra VB_t após os períodos de 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): CaNaB₅O₉ (em vermelho) [90], CaNa₃B₅O₁₀ (em azul) [118] e FAp (em roxo) RRUFF ID: R040098.1 [119]. VB_t indica a amostra sem imersão e os pontos em preto destacam a formação da camada CaP.

A Figura A2, apresenta todos os períodos de imersão para a amostra de HAp, conforme discutido, embora haja a formação de camada na amostra, e que ela desenvolva para a forma cristalina (conforme visto nas imagens de MEV), não observa-se alterações significativas nos espectros da mesma, visto que ela é uma amostra que tem contribuições na mesma região em que se identifica a camada.

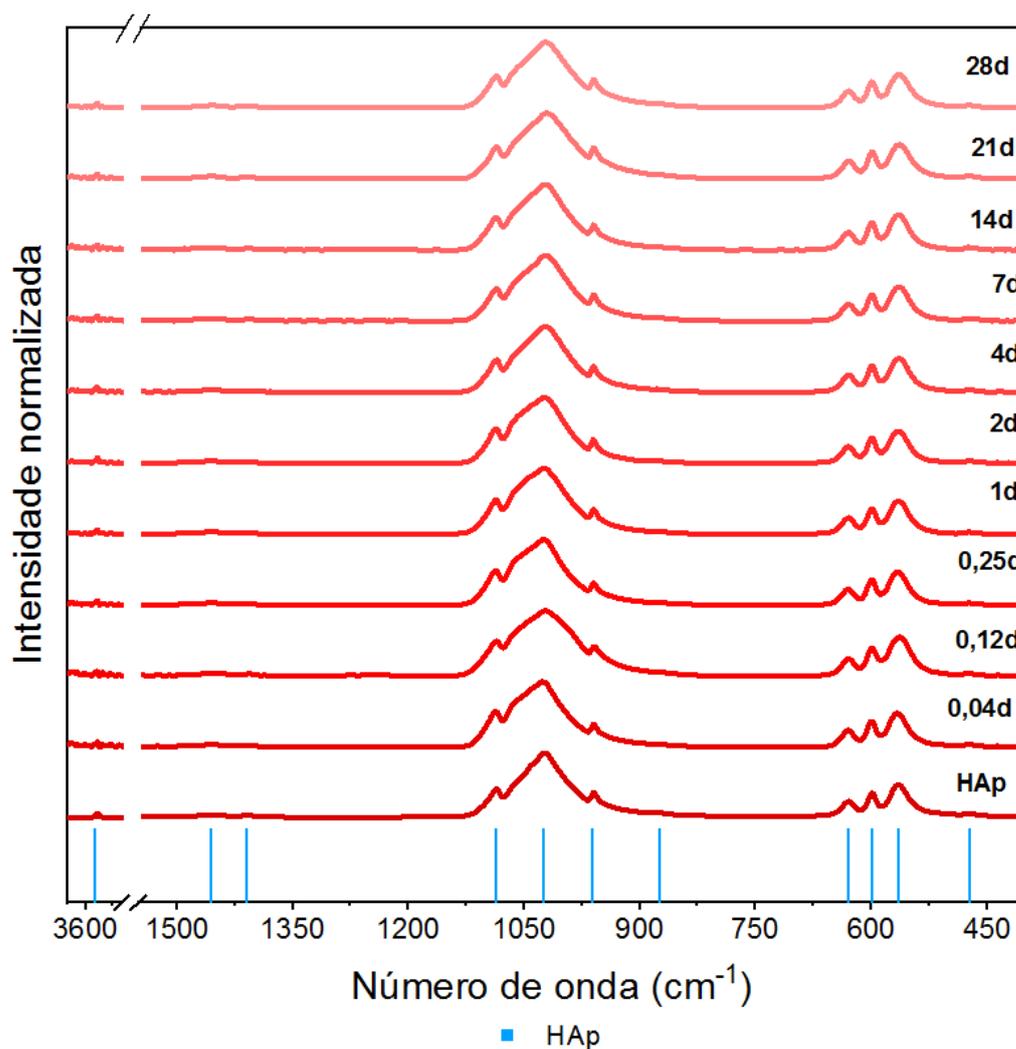


Figura A 2: Espectros de FTIR-ATR da amostra HAp após os períodos de 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação da fase cristalina (linha na vertical) HAp (em azul claro) [33]. HAp indica a amostra sem imersão.

A Figura A3 apresenta os espectros de FTIR-ATR para as amostra de 75VB25HAp para todos os períodos de imersão, conforme já discutido, com 1 dia de imersão os espectros já indicam a formação da camada que nos períodos finais apresenta características de que a mesma cristalizou. Em períodos mais curtos, como 0,25d observa-se a diminuição da contribuição dos modos referentes às fases presentes no material, que pode ser indicativo de que estas estão sendo consumidas no processo de formação da camada, conforme descrito na cinética para a

formação da camada, que sugere que amostras com Boro sejam consumidas durante a precipitação da camada.

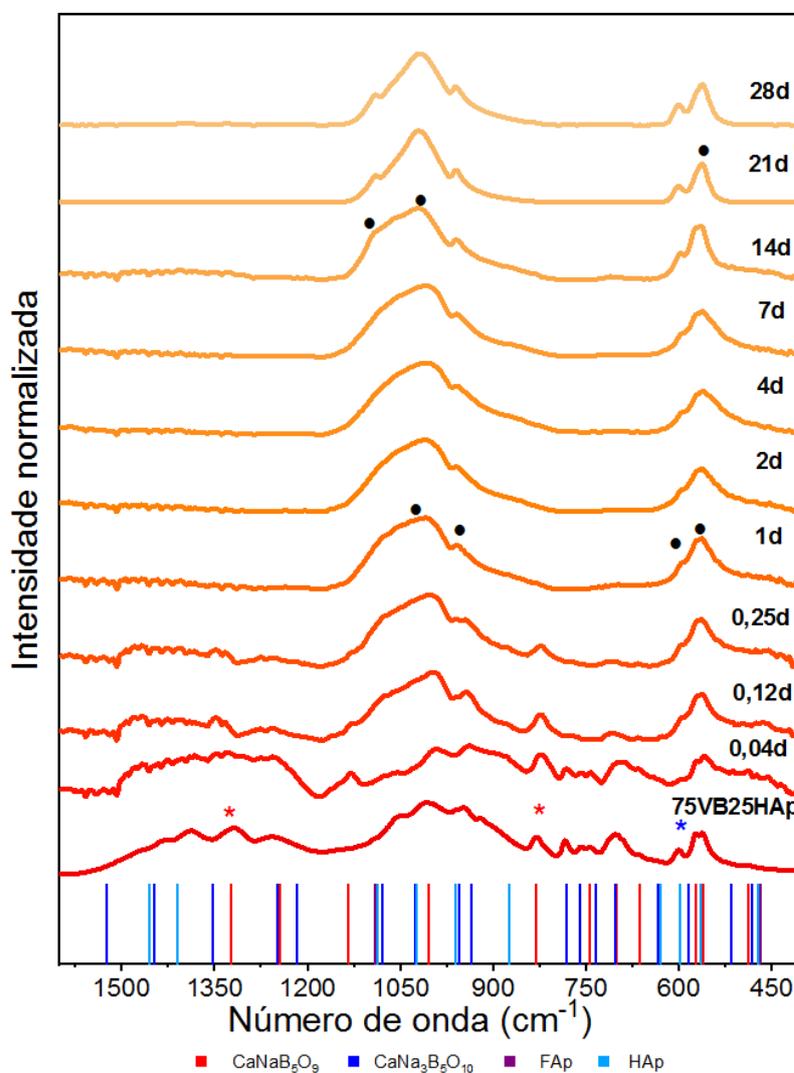


Figura A 3: Espectros de FTIR-ATR da amostra 75VB25HAp após os períodos de 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): CaNaB_5O_9 (vermelho) [93], $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ (azul escuro) [118], FAp (roxo) RRUFF ID: R040098.1 [119] e a HAp (azul claro). 75VB25HAp indica a amostra sem imersão. As bandas indicadas por asteriscos destacam as bandas das fases que não apresentam sobreposição com bandas das outras fases. Pontos em preto destacam a formação da camada CaP.

A Figura A4 apresenta os espectros da amostra 50VB50HAp nos períodos em imersão. Conforme discutido, para essa amostra, devido à maior contribuição de HAp, assim como a não identificação das fases $\text{CaNaB}_5\text{O}_9/\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e sobreposição da NaCaPO_4 com as fases de HAp e FAp presentes no material, dificultaram a identificação da camada amorfa de apatita na superfície. Entretanto, as bandas entre 600 e 800cm^{-1} alteram a resolução no decorrer dos períodos, indicando que há o crescimento de camada, assim como alterações nas bandas entre 900 e 1100cm^{-1} .

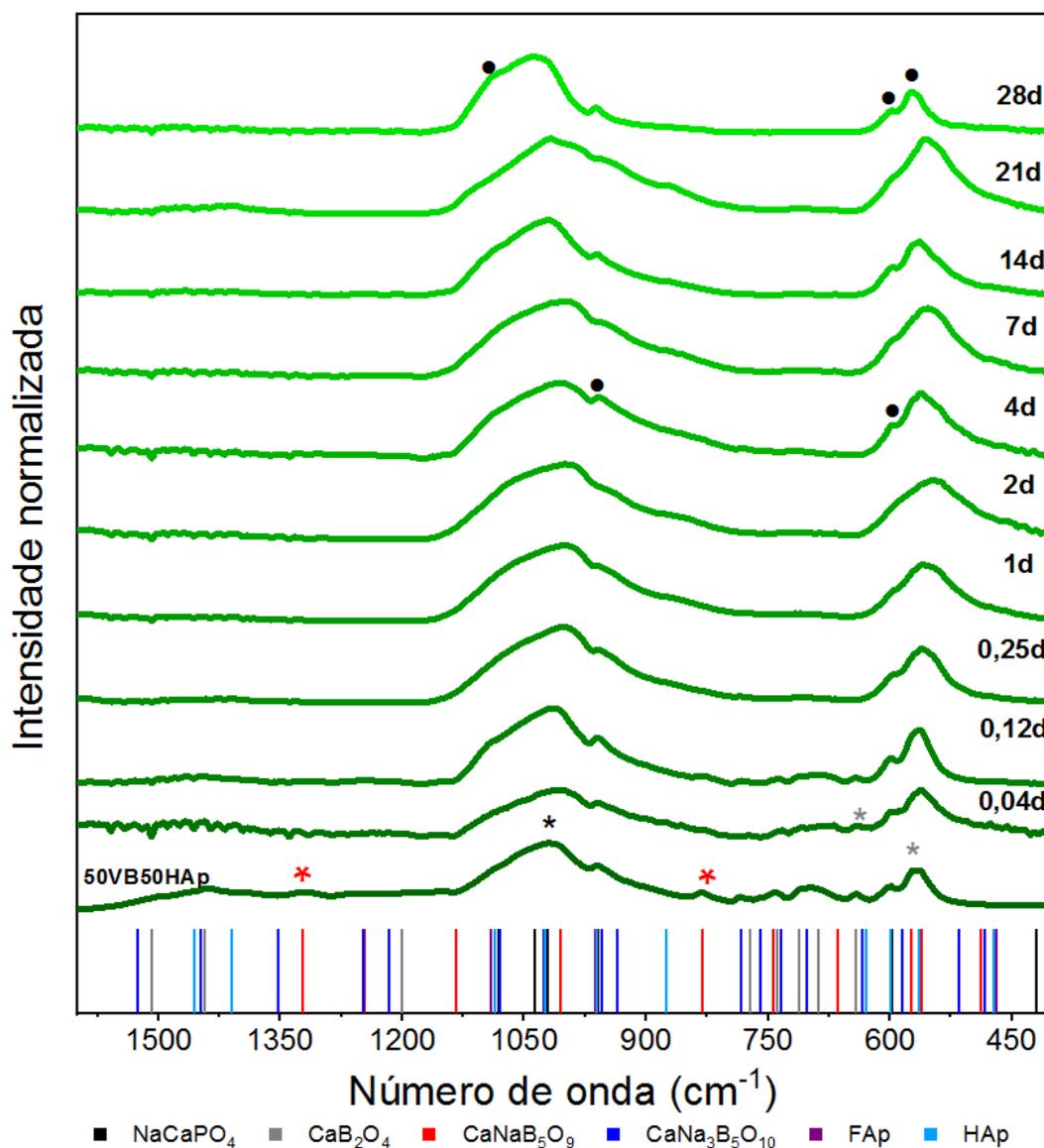


Figura A 4: Espectros de FTIR-ATR da amostra 50VB50HAp após os períodos de 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): NaCaPO_4 (preto) [138], CaNaB_5O_9 (vermelho) [93], $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ (azul escuro) [118], FAp RRUFF ID: R040098.1 [119] e a HAp (azul claro). 50VB50HAp indica a amostra sem imersão. As bandas indicadas por asteriscos destacam as bandas das fases que não apresentam sobreposição com bandas das outras fases. Pontos em preto destacam a formação da camada CaP.

As alterações observadas podem ser relacionados tanto com a evolução da cristalinidade do material, quanto de sucessivas precipitações de camadas sobre a superfície do material. Mas no geral, foi possível observar nos espectros que há a formação de camada na superfície das amostras, e as imagens de MEV apresentam que ao fim do período de 28 dias a camada sobre a superfície é cristalina, ainda que a cinética de crescimento não seja exatamente o mesmo para as diferentes concentrações dos compósitos.

A Figura A5 apresenta os espectros de amostra 25VB75HAp em todos os períodos de imersão. Após 0,04d (1hr) não se observa alterações significativas nos espectros, embora as

imagens de MEV indicam que já há a formação inicial da camada. As bandas próximas de 600cm^{-1} sofrem uma atenuação em 1d que pode ser relacionadas ao crescimento de camada. Com 2d essas bandas ficam melhor definidas, mantendo-se assim nos demais períodos. Em 14 dias, é possível observar um alargamento da banda na região com centro próximo a 1088cm^{-1} que pode ser devido ao modo vibracional relacionado à camada de apatita, uma vez que a banda associada a HAp desaparece.

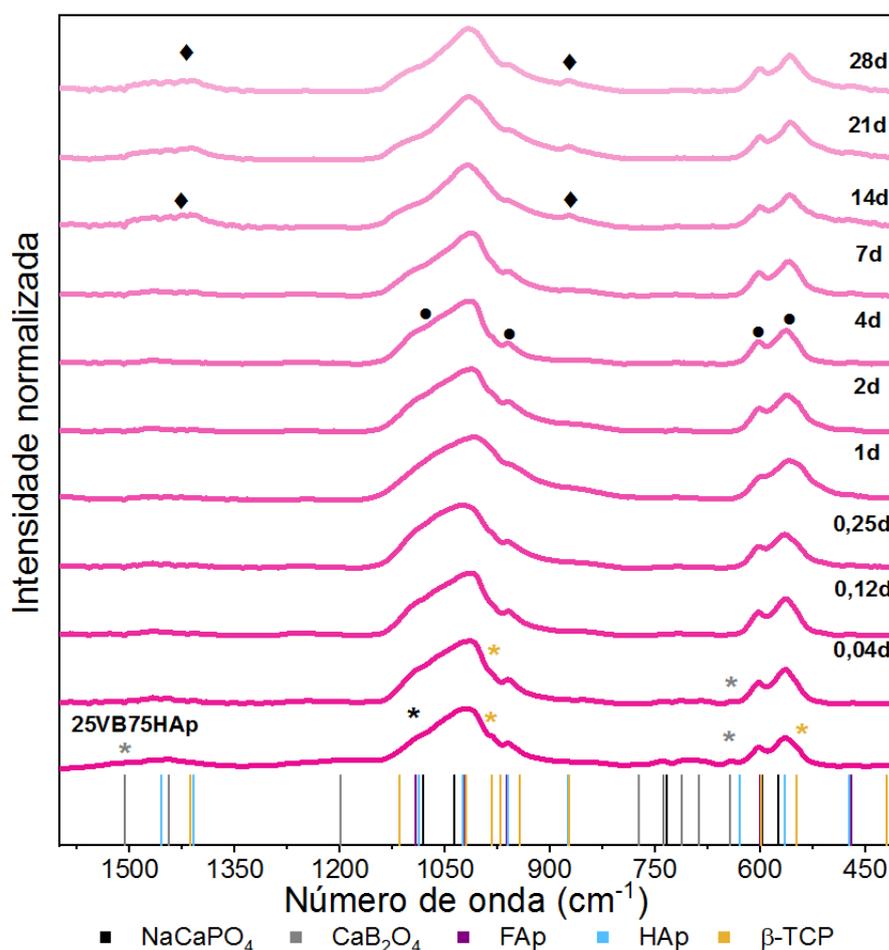


Figura A 5: Espectros de FTIR-ATR da amostra 25VB75HAp após os períodos de 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF com a identificação das fases cristalinas (linhas na vertical): NaCaPO_4 (preto) [138], CaB_2O_4 (em cinza) [139], FAp RRUFF ID: R040098.1 [119], HAp (azul claro) e β -TCP (em amarelo). 25VB75HAp indica a amostra sem imersão. As bandas indicadas por asteriscos destacam as bandas das fases que não apresentam sobreposição com bandas das outras fases. O símbolo ◆ indica bandas relacionadas ao carbonato. Pontos em preto destacam a formação da camada CaP.

Há também a presença de uma banda larga $\sim 1400\text{cm}^{-1}$, que pode ser associada à presença de carbonato na amostra assim como a banda $\sim 874\text{cm}^{-1}$ (símbolos ◆). De maneira geral, os espectros indicam que há a formação de camada nas amostras analisadas.

A - 2 DRX - Após imersão

A Figura A6 mostra os difratogramas da superfície de VB_t em diferentes períodos após imersão em SBF. Em todos os períodos foi possível identificar, majoritariamente, a fase $CaNaB_5O_9$. Não foi possível identificar para a amostra controle em peça as fases $CaNa_3B_5O_{10}$ e FAp presentes nas amostras analisadas em pó no pré imersão, devido à não homogeneidade de distribuição das fases cristalinas nas amostras estudadas. Para o VB_t não observa-se alterações significativas nos difratogramas, uma vez que a amostra é cristalina, o que dificulta a identificação da camada amorfa.

Outro ponto a se considerar para essa amostra é que os espectros de FTIR-ATR e imagens de MEV indicam que embora haja o crescimento de uma camada, essa apresenta características amorfas mesmo no fim do período de 28d.

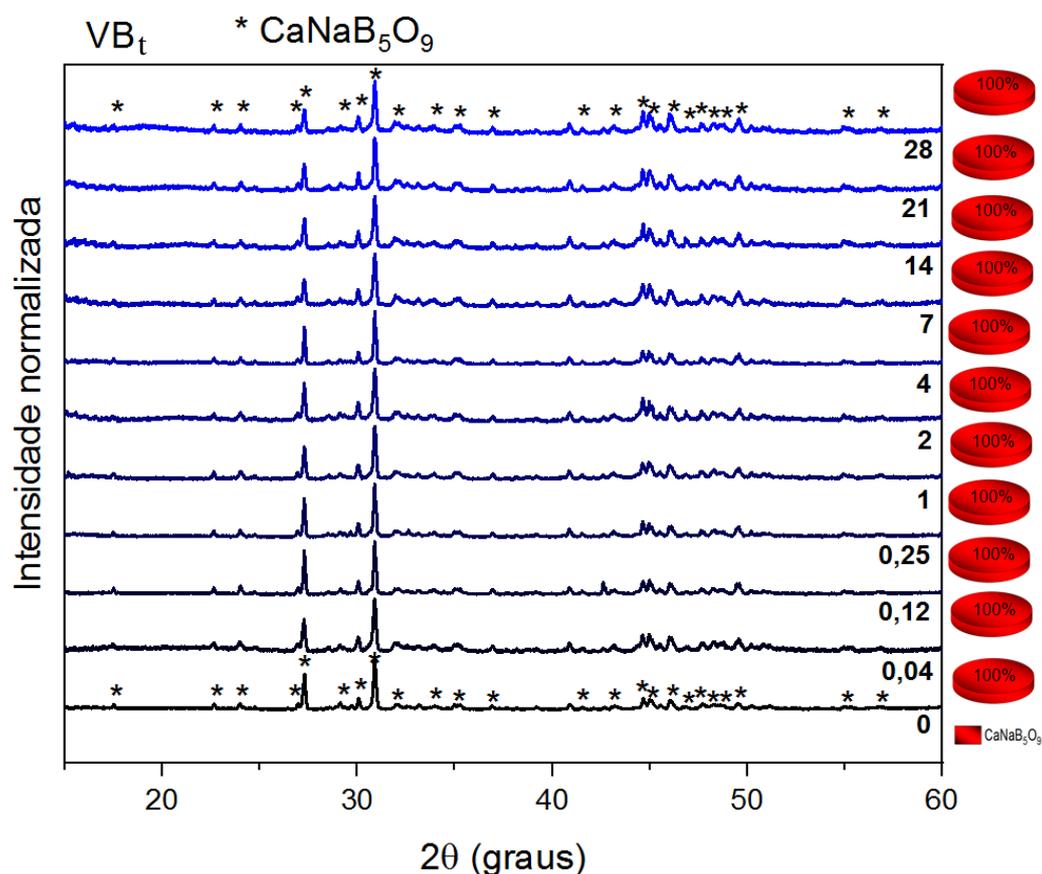


Figura A 6: Difratogramas da superfície de VB_t após 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. O símbolo * indica a indexação da fase cristalina $CaNaB_5O_9$ (JCPDS # 078-0294).

A Figura A7 apresenta os difratogramas para a amostra de HAp em todos os períodos de imersão em SBF, não mostrando fases adicionais ou alterações significativas.

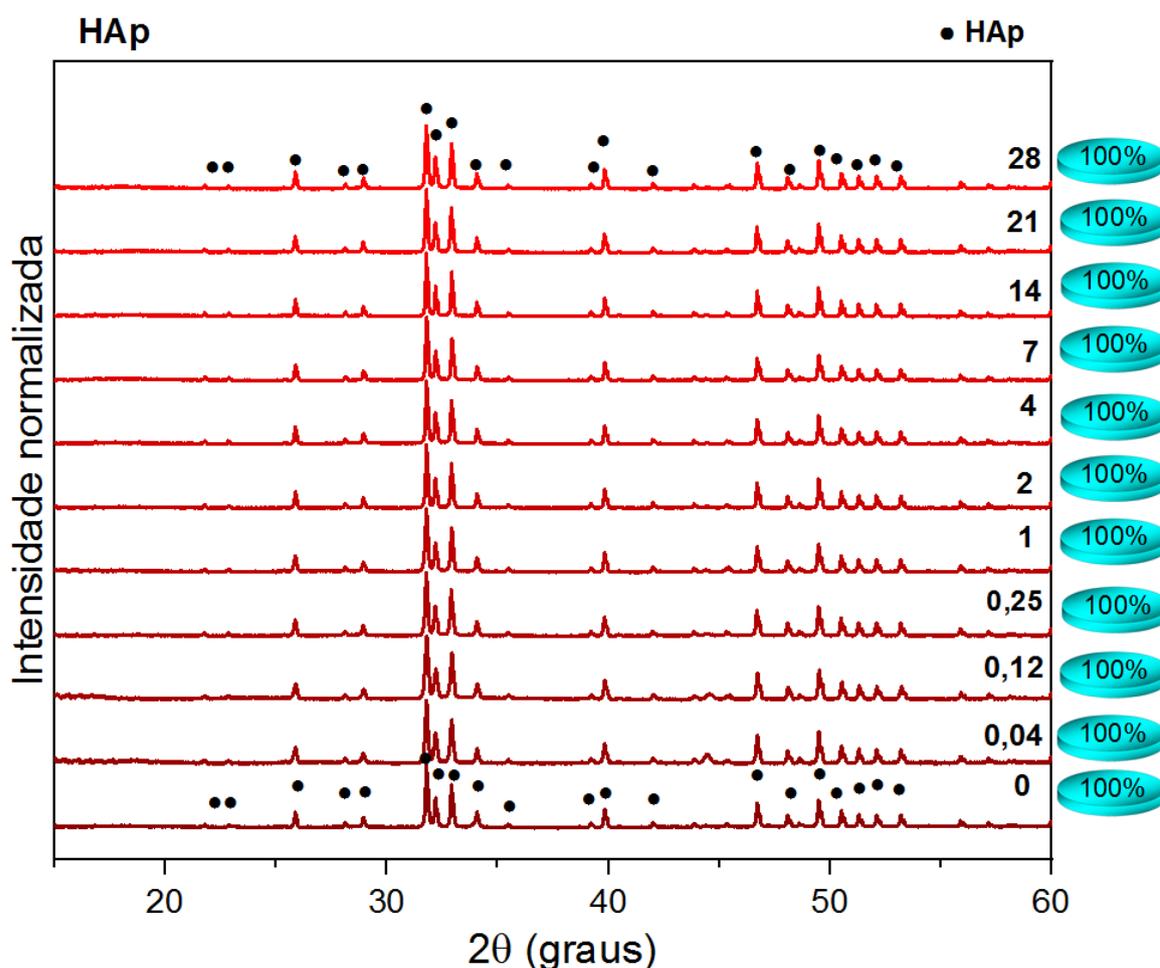


Figura A 7: Difratogramas da superfície da amostra HAp após 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28, dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. O símbolo • indicam a indexação da fase HAp (JCPDS # 074-0565)

A Figura A8 apresenta os difratogramas para a amostra de 75VB25HAp, até 14 dias de imersão em SBF. Não foi possível realizar as medidas de DRX para amostras com 21 e 28 dias. Essa amostra antes de imersão ($t=0$), apresentou a presença majoritária da fase CaNaB_5O_9 , cerca de 67%, além da fase NaCaPO_4 com percentual de 33%.

Não foi possível identificar as fases HAp e FAp antes da imersão na amostra íntegra. No decorrer dos períodos de imersão, a fase CaNaB_5O_9 diminuiu. Com essa diminuição, a fase NaCaPO_4 passa a dominar de modo que com 0,25d já aparece com 50%, lembrando que as porcentagens das fases foram obtidas pelo método semiquantitativo RIR. Em 14 dias há o surgimento da fase FAp, sendo esta majoritária.

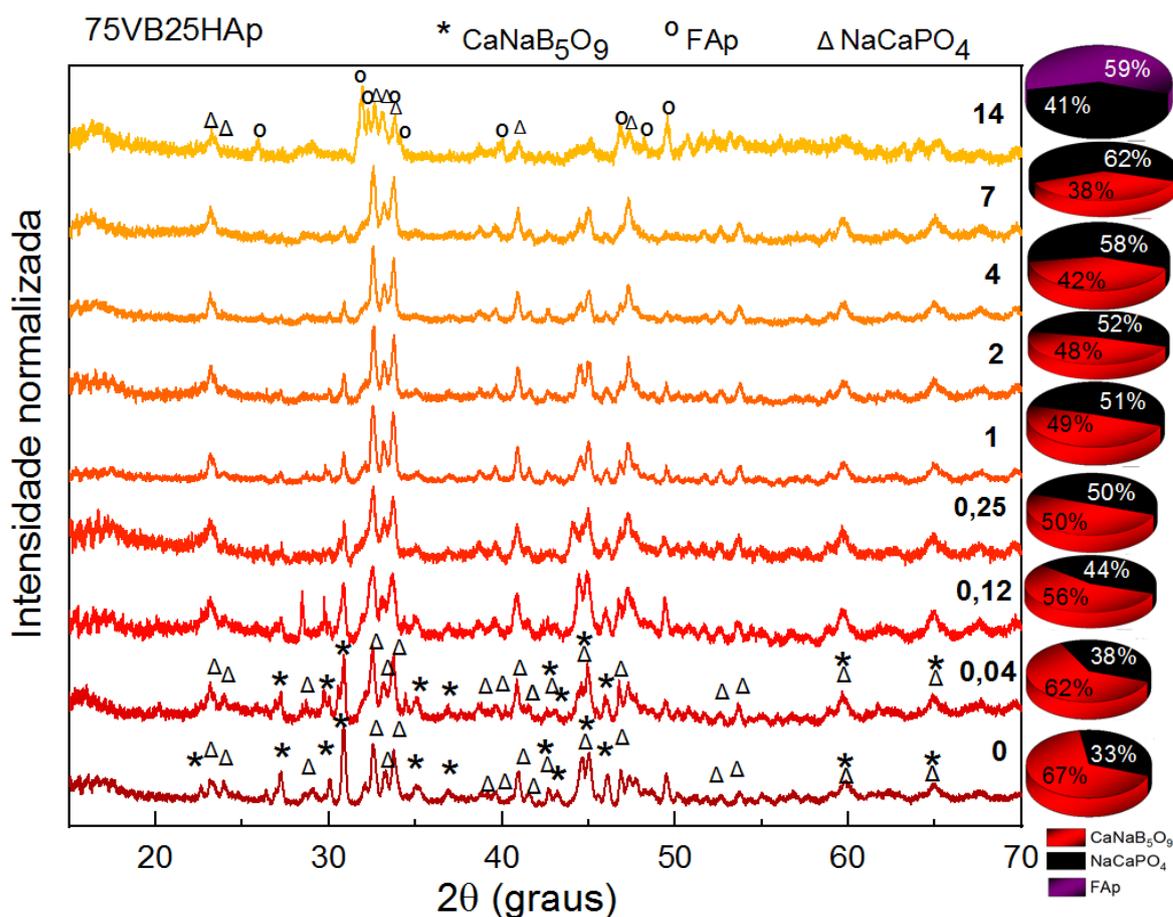


Figura A 8: Difratogramas da superfície da amostra 75VB25H após 0,04,0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7 e 14 dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. Os símbolos *, Δ e ° indicam a indexação das fases cristalinas CaNaB₅O₉ (JCPDS # 078-0294), NaCaPO₄ (JCPDS # 076-1456) e FAp (JCPDS # 071-0881), respectivamente.

A Figura A9 apresenta os difratogramas para a amostra 50VB50HAp nos períodos de imersão em SBF. A identificação das fases na amostra antes de imersão na peça diferem das amostras em pó, conforme já discutido, possivelmente devido à não homogeneidade da distribuição das fases na amostra. Após 1 dia de imersão não há a presença da fase CaB₂O₄ e após 2d há ausência da fase CaNaB₅O₉, predominando então as fases HAp e NaCaPO₄ que ficam constantes até o período de 28d. Os resultados observados indicam que as fases com Boro são as mais solúveis quando comparadas às fases que contém o Fósforo. Embora se observe que as fases contendo Boro tenham se dissolvido e que com isso ocorreria a formação da camada de apatita, não foi possível identificar a camada por meio da técnica de DRX.

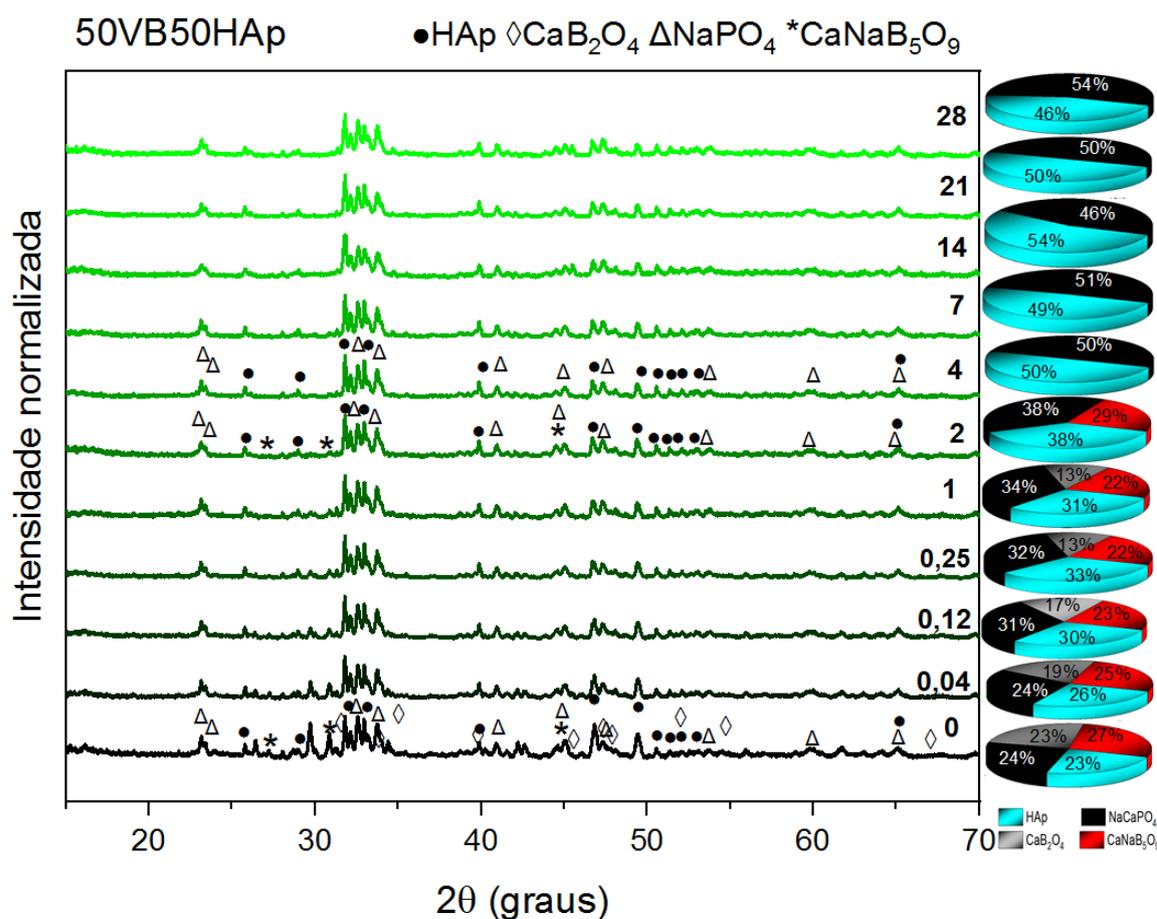


Figura A 9: Difratogramas da superfície da amostra 50VB50HAp após 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. Os símbolos *, Δ, ● e ◇ indicam a indexação das fases cristalinas CaNaB₅O₉ (JCPDS # 078-0294), NaCaPO₄ (JCPDS # 076-1456), HAp (JCPDS # 074-0565) e CaB₂O₄ (JCPDS # 076-0747), respectivamente.

A Figura A10 apresenta os difratogramas da amostra 25VB75HAp em todos os períodos de imersão em SBF. Para essa amostra temos mais fases com fosfato, visto que a HAp é majoritária. Das fases contendo Boro identificadas na amostra antes de imersão, a fase CaB₂O₄ se dissolve em 0,04 dias e a fase NaCaPO₄ após 4 dias. Com essas dissoluções da fase, foi possível observar que o maior aumento de pH e a maior perda de massa para essa amostra ocorreu no período de 4 dias, seguido por um comportamento mais constante nos demais períodos.

Em 7 dias há um pico em 45° (símbolo em verde) que não aparece na amostra controle e que não pode ser relacionada a nenhuma das fases presentes neste estudo. Ela tem uma discreta contribuição em 28 dias também. Esse pico pode ser decorrente de algum cristalito não identificado que se formou na superfície durante o crescimento da camada que foi dissolvido e/ou coberto pela camada de apatita, ou mesmo referente a alguma fase residual que não foi

identificada [101, 110]. Visto que conforme discutido no decorrer do trabalho, as fases presentes não são homogêneas, ademais as amostras para cada tempo são peças diferentes.

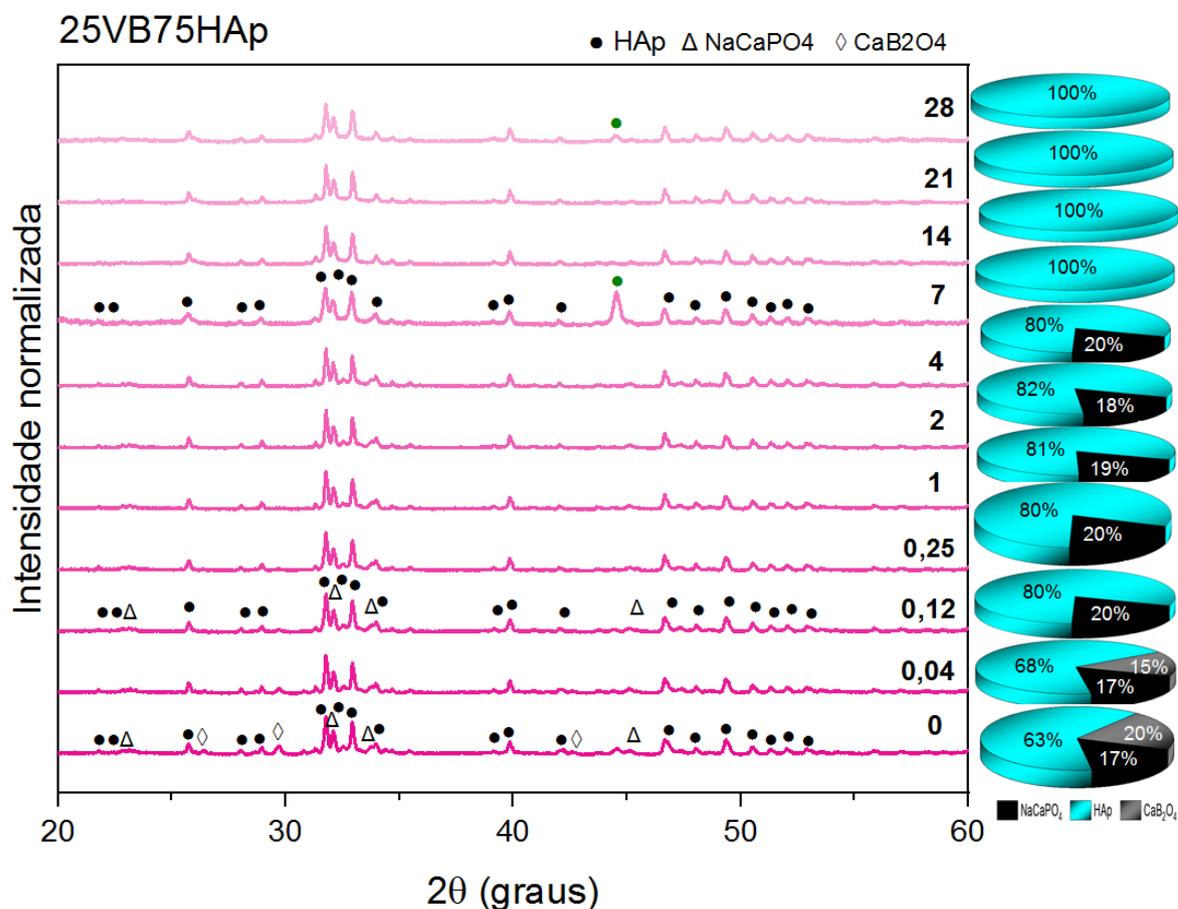


Figura A 10: Difratogramas da superfície da amostra 25VB75HAp após 0,04, 0,12, 0,25, 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28, dias de imersão em SBF. O tempo zero indica a amostra antes da imersão. Os símbolos Δ, ● e ◇ indicam a indexação das fases cristalinas NaCaPO₄ (JCPDS # 076-1456), HAp (JCPDS # 074-0565) e CaB₂O₄ (JCPDS # 076-0747), respectivamente

B - Técnicas experimentais

B - 1 - Calorimetria Exploratória Diferencial

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é um método de análise térmica que analisa como a capacidade térmica de um material (C_p) é alterada pela temperatura. Em um DSC por fluxo de calor, uma amostra de massa conhecida é aquecida ou resfriada. A temperatura da amostra T_{amo} e da referência T_{ref} são registradas e as mudanças em sua capacidade de calor são rastreadas como mudanças no fluxo de calor, esquematizadas na Figura B1.

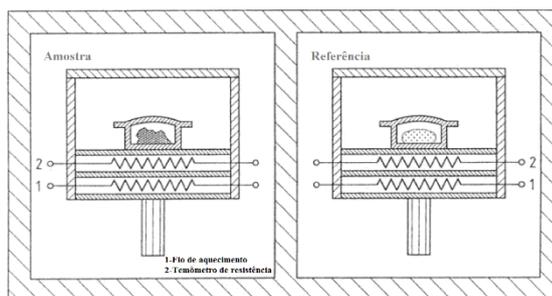


Figura B 1: DSC com fluxo de calor. Adaptado de [168].

As informações geradas por esses instrumentos são usadas para entender o comportamento amorfo e cristalino, transições polimórficas e eutéticas, cura e grau de cura, e outras propriedades térmicas usadas para projetar, fabricar e testar materiais e produtos. Essas informações fornecem curvas conhecidas como termogramas. No DSC é possível determinar valores como a variação de entalpia, resistência térmica total ao fluxo calórico e capacidade calorífica, que podem ser observadas na Figura B2 que apresentam curvas obtidas no DSC, nos quais valores das temperaturas características são determinados [168].

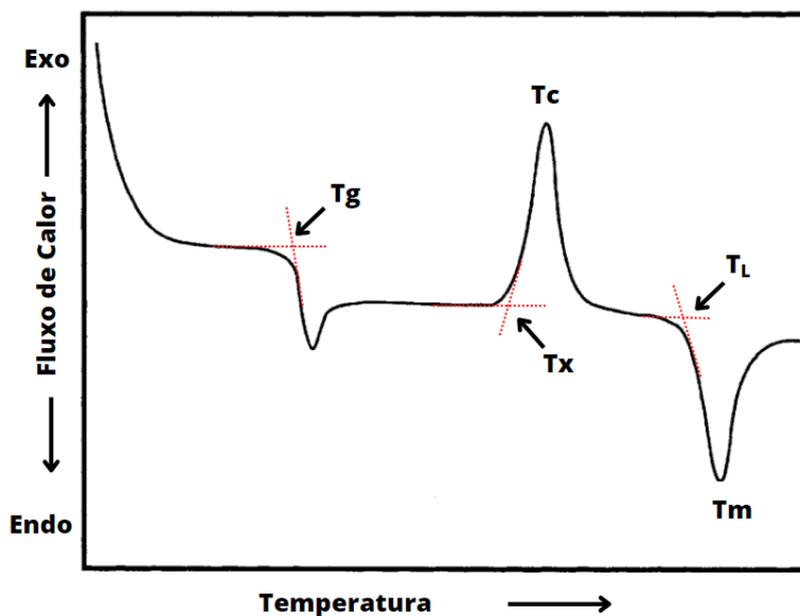


Figura B 2: Um exemplo de curva de DSC apresentando a mudança no calor específico na transformação do vidro, um pico exotérmico devido a cristalização do vidro (Tx) e um endotérmico devido a fusão (Tm). No detalhe um exemplo de como determinar a temperatura de transição vítrea (Tg). Adaptado de [27].

Vidros no geral apresentam curvas de DSC características, de modo que ao aumentar a temperatura do material ocorre uma transição de fase denominada transição vítrea (Tg), no qual o material deixa a forma sólida e se torna um líquido viscoso ainda amorfo. Quando o processo

de cristalização inicia temos o ponto denominado T_x em seguida o pico de cristalização (T_c) o ponto inicial do processo de fusão é chamado de T_L seguido então do pico de fusão T_m no qual o material se torna líquido [27].

B - 2 - Difratomia de raios X

Materiais sólidos podem ser classificados de acordo com a regularidade do arranjo de seus átomos. Nos metais a regularidade, ou ordenação, é de longo alcance, em vidros ocorre em curto alcance, e em polímeros, de maneira geral, não ocorre ordenamento, podemos separar os materiais em dois grandes grupos: cristalinos e não cristalinos, também conhecidos como amorfos [169].

Os arranjos tridimensionais são chamados de rede cristalina. As redes cristalinas mais estáveis são aquelas que minimizam a energia por unidade de volume, são formadas por unidades repetitivas chamadas de célula unitária. Os parâmetros de rede são eixos da rede cristalina representados por a , b e c , enquanto que os ângulos por α , β e γ . As redes cristalinas podem constituir diferentes tipos de células unitárias, chamadas de redes de Bravais. São 7 sistemas cristalinos e 14 redes de Bravais que podem representar a estrutura cristalina de qualquer sólido. A Figura B3 apresenta as 14 redes de Bravais [170].

A técnica de DRX mede diretamente a distância entre planos paralelos de pontos da rede cristalina, a partir dessas distâncias determina-se os parâmetros de rede (a , b e c) do sólido cristalino, bem como os ângulos interaxiais (α , β e γ) do cristal [171].

Os raios X são ondas eletromagnéticas, cujos comprimentos de onda são da mesma ordem de grandeza que as distâncias entre os planos atômicos dos sólidos cristalinos. Foram descobertos em novembro de 1895, pelo físico alemão Wilhelm Conrad Roentgen. No geral o instrumento utilizado para determinação dos parâmetros cristalográficos de um material é chamado de difratômetro de raios X que podem apresentar diversos arranjos geométricos, sendo o do tipo Bragg-Brentano o mais comum.

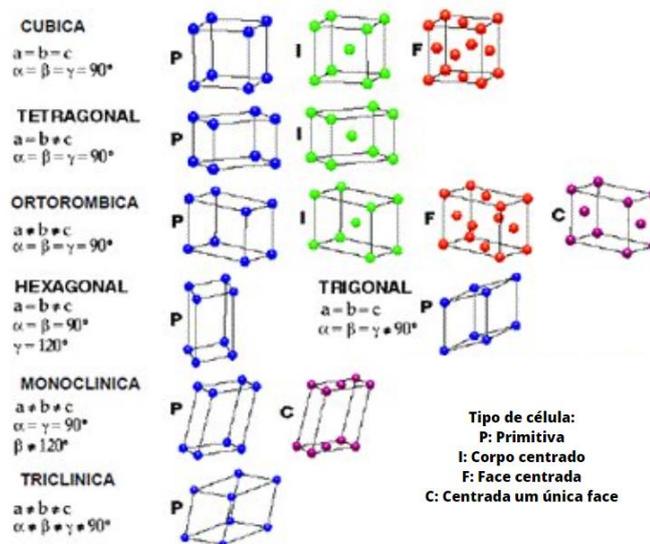


Figura B 3: As 14 possíveis configurações espaciais das células unitárias. Sendo P a célula unitária primitiva ou simples; I a célula de corpo centrado; F de face centrada e C de célula centrada uma única face. Adaptado de [182].

Considerando-se o fato de que os feixes percorrem diferentes distâncias, dependendo do plano de átomos dos quais foram difratados, a interferência será construtiva quando a diferença percorrida for um múltiplo inteiro de comprimento de onda (λ), como expresso pela lei de Bragg [172]:

$$n \lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad (1)$$

A lei de Bragg determina a relação entre as posições angulares dos feixes difratados reforçados, em termos do comprimento de onda λ do feixe incidente de raios X dado em Angstrom (\AA), da distância interplanar d_{hkl} entre os planos cristalográficos, sendo θ o ângulo de Bragg e n a ordem de difração ($n = 1, 2, 3, \dots$) [171].

A Figura B4 apresenta o esquema da difração, segundo a Lei de Bragg, no qual os planos cristalinos são formados por átomos ordenados.

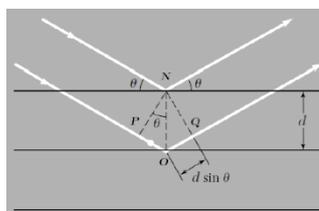


Figura B 4: Esquema da difração de Bragg entre os planos cristalinos. Adaptado de [34].

Dependendo do tipo de interferência sofrida, a superposição das ondas pode dobrar a intensidade ao interferir construtivamente e se anular completamente no caso de interferir

destrutivamente. Os resultados dessas interferências é o que define a forma do difratograma dos raios X na análise de determinada estrutura cristalina.

Nos difratogramas, cada pico pode ser relacionado com a difração do feixe incidente em planos cristalográficos do material analisado, sendo característico para composição. Ao comparar os difratogramas obtidos com os materiais do banco de dados de amostras cristalinas é possível a identificação do material. Como exemplos de banco de dados desses materiais, temos: JCPDS (*Joint Committee of Powder Diffraction Standards*), ICDD (*International Center for Diffraction Data*), ICSD (*Inorganic Crystal Structure Database*) e COD (*Crystallography Open Database*) [173]. Para materiais não cristalinos como vidros e alguns polímeros, não se observa picos no difratograma, a Figura B5 apresenta exemplos dos difratogramas observados para um material cristalino, com picos referentes aos planos cristalográficos, enquanto para materiais amorfos não há presença de picos.

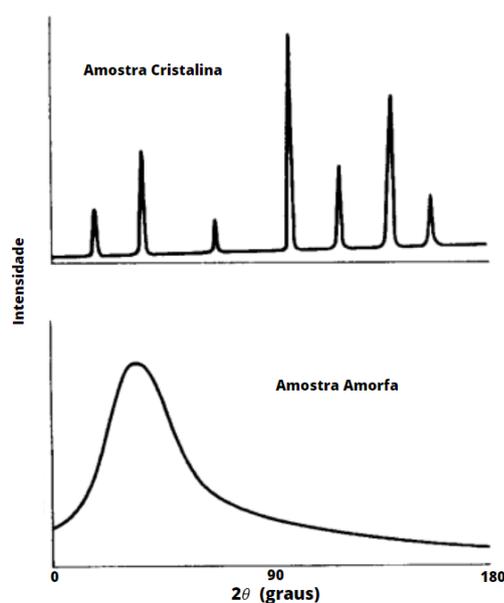


Figura B 5: Exemplos de difratogramas característicos para amostra cristalina e amostra amorfa. Adaptado de [172]

B - 3 - Espectroscopia Raman

Um conjunto de técnicas bastante utilizado para caracterização de materiais são as técnicas espectroscópicas, que analisam a interação entre a energia eletromagnética e a matéria. Quando um fóton é absorvido pelo material, podem ocorrer processos de decaimento, estes processos podem ocorrer de forma isolada ou simultânea, como o decaimento não radiativo, e radiativo, que podem emitir fótons possuindo energia igual ou diferente do fóton incidente.

As espectroscopias no infravermelho, Raman e a de luminescência são exemplos de técnicas utilizadas para caracterização de materiais, e ainda que as três sejam baseadas na interação da radiação com a matéria, cada uma é definida por um fenômeno físico distinto.

A espectroscopia Raman é baseada no efeito de espalhamento inelástico que ocorre com a interação do fóton com o material. Esta técnica possibilita a avaliação das alterações entre os níveis vibracionais das moléculas. Para que o efeito seja observado é necessário que as regras de seleção sejam satisfeitas, no caso da espectroscopia Raman, é a variação da polarizabilidade da molécula. Quando essa regra é satisfeita pelo material dizemos que este é Raman ativo, de modo que é possível avaliar as vibrações na forma de espectros, nos quais podemos identificar grupos funcionais de acordo com os modos vibracionais [175].

Quando a radiação interage com a matéria por processo de espalhamento, este pode ser elástico e inelástico, quando ocorre o espalhamento elástico de fótons é o chamado espalhamento Rayleigh, no qual o fóton espalhado e o fóton incidente têm a mesma energia. No espalhamento inelástico de radiação, temos que a componente de campo elétrico do fóton espalhado perturba a nuvem eletrônica da molécula, levando o sistema a um processo de excitação chamado de estado “virtual” de energia da molécula. Ao decair deste estado o fóton espalhado pode ter energia diferente do incidente, podendo ser maior ou menor. Quando a energia do fóton espalhado é menor, o espalhamento é chamado de Stokes. Já quando a energia é maior, o espalhamento é chamado de anti-Stokes [112, 116].

A Figura B6 apresenta um esquema dos espalhamentos Rayleigh (elástico) e Raman (inelástico), na qual o espalhamento Stokes que tem um fóton com energia $h\nu_0$ interage com uma molécula no estado fundamental, o que leva o sistema para um estado excitado (virtual) com energia $h\nu_0$, quando o sistema decai para o nível vibracional excitado $h\nu_{\text{vib}}$, a energia do fóton espalhado será menor que o incidente, logo temos $h\nu_0 - h\nu_{\text{vib}}$. No espalhamento Rayleigh o sistema volta para o estado fundamental, assim o fóton é espalhado com a mesma energia. Já para o espalhamento anti-Stokes, o fóton espalhado tem energia maior inicial, logo $h\nu_0 + h\nu_{\text{vib}}$, para esse caso o fóton incidente encontra a molécula já em um estado excitado, a variação de energia dos picos é a mesma para o espalhamento Stokes e anti-Stokes, mas a intensidade do anti-Stokes é menor pois a energia que decresce de acordo com a lei de distribuição de Boltzmann.

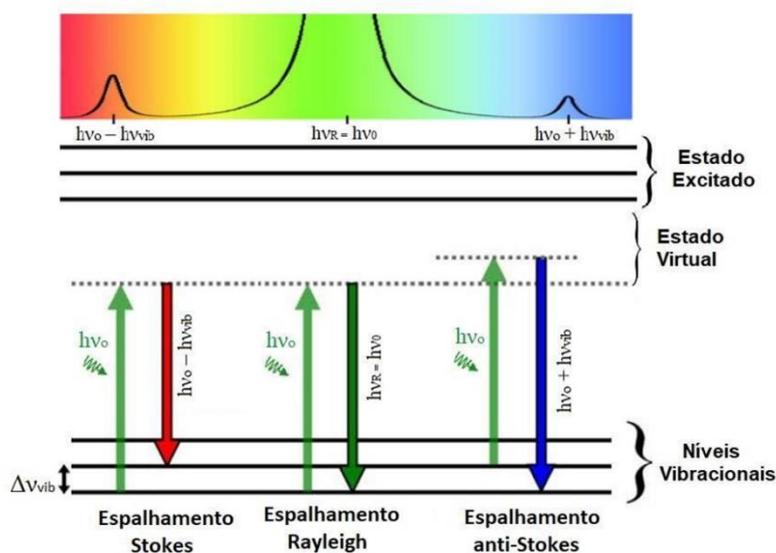


Figura B 6: Esquema dos tipos de espalhamento: inelástico Raman Stokes, elástico Rayleigh e inelástico Raman anti-Stokes. Adaptado de [108].

Por ser uma técnica não-destrutiva e não requer a preparação das amostras, a espectroscopia Raman é muito utilizada para caracterizar materiais biológicos, e também em aplicações que exigem que a amostra não seja alterada. A técnica tem recebido atenção por se mostrar uma provável ferramenta de diagnóstico, e vem sendo utilizada na classificação de bactérias [112, 174].

B - 4 - Espectroscopia FTIR-ATR

Como visto, a interação entre a radiação eletromagnética e matéria é estudada por espectroscopia, cuja a intenção é a de estudar os níveis de energia das moléculas ou átomos. As transições vibracionais estão na região do infravermelho, e as técnicas que analisam os modos vibracionais são infravermelho e Raman, os modos vibracionais das moléculas podem ser previstos com base em sua simetria. Embora ambas as espectroscopias se relacionam às vibrações moleculares, os princípios de análise destas vibrações diferem para cada uma, e usualmente podemos dizer que as espectroscopias Raman e infravermelho são técnicas complementares [116].

Por serem fundamentalmente diferentes, os espectros obtidos são distintos mesmo ambos observando modos vibracionais, por vezes ocorre de um certo pico aparecer em um espectro e não aparecer no outro, pois as regras de seleção para que o efeito ocorra são diferentes para as duas espectroscopias. Para que ocorra absorção da radiação infravermelha é necessário que

ocorra uma variação do momento de dipolo elétrico da molécula como consequência de seu movimento vibracional [176, 177].

Os espectros obtidos na técnica de infravermelho podem ser gerados por emissão, reflexão e absorção/transmissão, neste trabalho a configuração utilizada foi a de absorção com um Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) com o acessório de Refletância Total Atenuada (ATR), caracterizado por ser uma espectroscopia de reflexão interna, Figura B7.

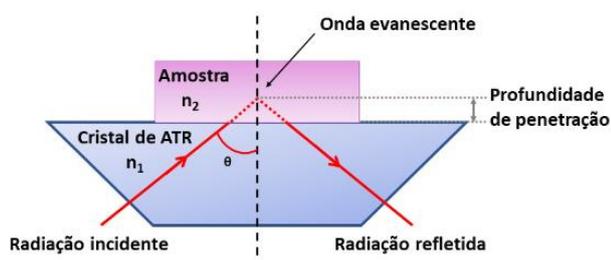


Figura B 7: Diagrama esquemático do acessório de ATR para espectrômetro de FTIR. n_1 e n_2 são os índices de refração do cristal de ATR e da amostra, respectivamente ($n_1 > n_2$), e θ é o ângulo de incidência da radiação incidente. Adaptado de [178].

Nesta configuração, a amostra é colocada em contato com um cristal com um alto índice de refração interno, no caso do presente trabalho, o diamante. A radiação atravessa o diamante e é totalmente refletida em sua superfície interna, essa reflexão interna cria uma onda evanescente, desta maneira a radiação penetra de maneira superficial na amostra, que perde energia nos comprimentos de onda nos quais absorve. A intensidade da radiação será atenuada devido às reflexões mútuas que ocorrem ao longo da amostra. O feixe que chega ao detector pode ser usado então para gerar um espectro de absorção [178]. A técnica ATR tem grande utilidade para analisar os mais variados tipos de materiais, desde soluções químicas até materiais biológicos, pois viabiliza uma maneira direta e não destrutiva de obter espectros de absorção no infravermelho.

B - 5 - Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Um microscópio de luz tem uma ampliação máxima de aproximadamente 1000x, a resolução dos microscópios convencionais foi limitada não só pelas lentes, como também pelo comprimento de onda de luz utilizado para a iluminação (luz branca de 400 a 700nm). Em consequência dessa limitação da luz branca, o microscópio eletrônico foi desenvolvido, pois os elétrons têm comprimentos de onda muito menores, permitindo uma melhor resolução [179].

O microscópio eletrônico de varredura usa um feixe de elétrons no lugar dos fótons utilizados nos microscópios convencionais, que quando submetidos a uma alta voltagem, podem produzir elétrons de comprimento de onda extremamente curtos e, portanto, com uma alta resolução. Devido às cargas dos elétrons é possível focalizar o feixe com campos eletrostáticos ou eletromagnéticos formando então imagens [180].

Para que a imagem seja formada, um feixe de elétrons de alta energia varre a amostra, conforme ocorre a interação do feixe com a amostra, eles geram os elétrons secundários, elétrons retroespalhados, elétrons Auger, fluorescência de raios X, raios X característicos e contínuo. Estes sinais são coletados por detectores formando então as imagens, que são exibidas na tela do computador. No momento que o feixe interage com a amostra ele atinge apenas alguns microns de profundidade, que pode variar de acordo com a tensão de aceleração e da densidade da amostra, a Figura B8 ilustra o esquema de funcionamento do microscópio eletrônico de varredura [181].

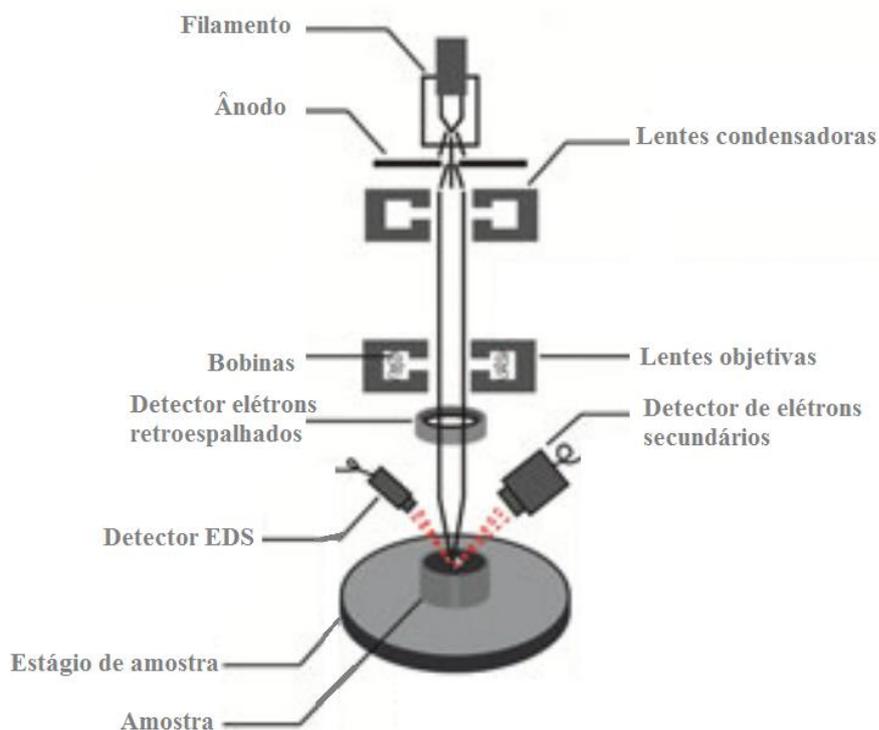


Figura B 8: Esquema de funcionamento do Microscópio Eletrônico de Varredura. Adaptado de [181].

Após ser atingida pelo feixe de elétrons, os raios X característicos gerados são específicos do número atômico da amostra, de forma que seu comprimento de onda ou energia podem ser usados para identificação dos elementos que emitem a radiação. A identificação dos elementos

presentes na amostra pode ser realizada pela análise dos picos, que quando comparados com a energia dos elementos encontrados na tabela periódica, podem ser distinguidos. Em geral os programas utilizados para realizar as medidas, possuem um banco de dados e este relaciona as raias de energia com os elementos da tabela, para identificação, mas cabe ao pesquisador encarregado da análise determinar qual elemento melhor se encaixa nas raias obtidas [180].

Desta forma, MEV é uma ferramenta que tem sido utilizada para análises de composição química, morfologia e estrutura de materiais, e se tornou uma técnica fundamental em muitas áreas, mais especificamente, em análises de novos materiais por fornecer dados detalhados de características microestruturais [179].

8. REFERÊNCIAS

- [1] Sunita P. V.; Shivaram S.; Chandra P. S. **Recent Advances in Biomaterials Science and Engineering Research in India: A Minireview**. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00233>.
- [2] Kumar, A. **Recent Advances In Biomaterials For Medical Applications: A Short Review of our Laboratory's Research**. Biomaterials and Medical Applications, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4172/2577-0268.1000114>.
- [3] Mantripragada, V.; et al. **An overview of recent advances in designing orthopedic and craniofacial implants**. Journal of biomedical materials research. Part A, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34605>.
- [4] Bishop, E. S.; et al. **3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends**. Genes & Diseases, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.10.002>.
- [5] Turnbull, G.; et al. **3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering**. Bioactive Materials, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>
- [6] Hench, L. L. e Polak, J. M. **Third-Generation Biomedical Materials**. Science, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1067404>.
- [7] Ning, C.; Zhou, L. e Tan, G. **Fourth-Generation Biomedical Materials**. Materials Today, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.11.005>.
- [8] Cao, W. e Hench, L.L. **Bioactive materials**, Ceramics International. 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0272-8842\(95\)00126-3](https://doi.org/10.1016/0272-8842(95)00126-3).
- [9] Mariappan, C.R.; et al. **Bioactivity of electro-thermally poled bioactive silicate glass**. Acta Biomaterialia, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.11.005>.
- [10] Hench, L.L.; et al. **Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials**, Journal Biomedical Materials Research, 1971. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.820050611>.
- [11] Hench, L.L. **Bioceramics, a clinical success**, Journal American Ceramic Society Bulletin, 1998.
- [12] Ravaglioli, A.; Hulbert, S. F.; Krajewski, A. **Bioceramics: Materials, properties, applications**, Springer Science Business Media Dordrecht 1992. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-94-011-2336-5>.
- [13] ElBadry, K.M.; et al. **Corrosion behaviour of some selected bioglasses by different aqueous solutions**, Glass Technol Journal of Glass Science and Technology Part , 2002.

- [14] Lanza, R.; Langer, R. e Vacanti, J. **Principles of tissue engineering**, editora Academic Press, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818422-6.00019-8>.
- [15] Boccaccini, A.R e Maquet, V. **Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications**. Composites Science and Technology, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0266-3538\(03\)00275-6](https://doi.org/10.1016/S0266-3538(03)00275-6).
- [16] Willerth, S. e Sakiyama-Elbert, S. **Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery**. Stem Journal, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3233/STJ-180001>
- [17] Richard, M.N.C. Tese doutorado. **Bioactive behavior of a borate glass**, University of Missouri-Rolla, 2000.
- [18] Ouis, M.; Abdelghany, A. M. e Elbatal, H.A. **Corrosion mechanism and bioactivity of borate glasses analogue to Hench's bioglass**. Processing and Application of Ceramics, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2298/PAC1203141O>
- [19] Kim, H.-M.; et al. **The Mechanism of Biomineralization of Bone-like Apatite on Synthetic Hydroxyapatite: An *in Vitro* Assessment**. Journal The Royal Society Publishing, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsif.2004.0003>
- [20] Niu, L. N.; et al. **A Review of the Bioactivity of Hydraulic Calcium Silicate Cements**. Journal of Dentistry, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.015>.
- [21] Barba, A.; et al. **Impact of Biomimicry in the Design of Osteoinductive Bone Substitutes: Nanoscale Matters**. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.8b20749>.
- [22] Beswick, A. e Blom, A.W. **Bone graft substitutes in hip revision surgery: a comprehensive overview**. Injury, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.009>
- [23] Denry, I. e Holloway, J.A. **Ceramics for dental applications: a review**. Materials, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma3010351>
- [24] Vallet-Regí, M. **Ceramics for medical applications**, Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/B007852M>
- [25] Hench, L.L. **Bioceramics: from concept to clinic**. Journal of the American Ceramic Society, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x>
- [26] Medeiros, E. L. G.; et al. **Scaffolds de Vidros Bioativos: Desenvolvimento de Estruturas Bioativas Nanoestruturadas**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, 2018.
- [27] Shelby, J. E. **Introduction to Glass Science and Technology**. Royal Society of Chemistry, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1039/9781847551160>.
- [28] Jones, J. e Clare, A. **Bio-glasses: an introduction**. John Wiley & Sons, 2012.

- [29] Varshneya, A. K. **Fundamentals of inorganic glasses**. Elsevier, 2013.
- [30] Campo E. A. **Selection of Polymeric Materials**. © William Andrew, 2008.
- [31] Zachariasen, W. H. **The atomic arrangement in glass**. Journal of the American Chemical Society, 1932. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja01349a006>.
- [32] Wright, Adrian C. **My Borate Life: An Enigmatic Journey**. International Journal of Applied Glass Science, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijag.12113>
- [33] Weinand, W.R.; Tese doutorado. **Hidroxiapatita natural obtida por calcinação de osso de peixe e sua aplicação na produção de materiais compósitos cerâmicos biocompatíveis**, Universidade Estadual de Maringá, 2009.
- [34] Portes, P. N. Tese doutorado. **Caracterização e avaliação da bioatividade *in vitro* do sistema vítreo: $60\text{B}_2\text{O}_3 - 5\text{CaF}_2 - (20-x)\text{Na}_2\text{O} - (15-x)\text{CaO} - 2x\text{P}_2\text{O}_5$ ($x=0, 1, 2$)**. Universidade Estadual de Maringá, 2018.
- [35] Hench, L. L. **The story of Bioglass®**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>.
- [36] Bansode, P.V. e Sakharkar, D.R. **Bioglass-A Miracle Material**. Bioglass-A Miracle Material, 2015.
- [37] Tirapelli, C.; et al. **The effect of a novel crystallized bioactive glass-ceramic powder on dentine hypersensitivity: a long-term clinical study**. Journal of Oral Rehabilitation, 2010.
- [38] Aparecida, A.H.; et al. **Estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP)**. Química Nova, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400024>.
- [39] Ylänen, H. **Bioactive Glasses: Materials, Properties and Applications**. Elsevier, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2015-0-05462-4>
- [40] Albayrak, O. **Structural and mechanical characterization of boron doped biphasic calcium phosphate produced by wet chemical method and subsequent thermal treatment**. Materials Characterization, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2016.01.006>.
- [41] Bitoh, T. e Watanabe, D. **Effect of Yttrium Addition on Glass-Forming Ability and Magnetic Properties of Fe–Co–B–Si–Nb Bulk Metallic Glass**. Metals, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/met5031127>.
- [42] Pires, A.L.R; Bierhalz, A.C.K e Moraes, A.M. **Biomateriais: tipos, aplicações e mercado**. Química nova, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>.
- [43] Alves, L. C. F. Dissertação mestrado. **Estudo da influência do fluoreto de cálcio na bioatividade de vidros borato**. Universidade Federal do Maranhão, 2017.

- [44] Hench, L. L.; Roki, N e Fenn, M B. **Bioactive glasses: Importance of structure and properties in bone regeneration.** Journal of Molecular Structure, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.066>.
- [45] Kokubo, T. e Takadama, H. **How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?** Biomaterials, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
- [46] Hench, L. L. **An introduction to bioceramics.** World Scientific, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1142/2028>.
- [47] Islam, M. T.; et al. **Bioactive calcium phosphate–based glasses and ceramics and their biomedical applications: A review.** Journal of Tissue Engineering, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1177/2041731417719170>.
- [48] Huang W; et al. **Mechanisms for converting bioactive silicate, borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solution.** Physics and Chemistry of Glasses - European Journal of Glass Science and Technology Part B, 2006.
- [49] Huang W; et al. **Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions.** Journal of materials science. Materials in medicine, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10856-006-9220-z>.
- [50] Liang W; et al. **Bioactive comparison of a borate, phosphate and silicate glass.** Journal of Materials Research, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1557/jmr.2006.0025>.
- [51] Youssif, E.; Doweidar, H. e Ramadan, R. **Bioactivity of microporous borate glass-ceramics prepared from solution and derived glasses.** Journal of Non-Crystalline Solids, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2021.120649>
- [52] Fihri, A.; Len, C.; Varma, R. S. e Solhy, A. **Hydroxyapatite: A review of synthesis, structure and applications in heterogeneous catalysis.** Coordination Chemistry Reviews, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.06.009>.
- [53] Rossomano, N.A.; Trabalho de conclusão de curso. **Estudo das propriedades mecânicas do compósito HAP/Zircônia.** Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.
- [54] Nicomedes, D. N. Dissertação de mestrado. **Deposição e caracterização de revestimentos de hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno.** Universidade Federal de Ouro Preto, 2017.
- [55] Gauglitz, R; **Immobilization of Heavy Metals by Hydroxylapatite.** Radiochemica Acta, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1524/ract.1992.5859.2.253>.
- [56] Batista, T. S A.; Santos-Filho, J. B. **Calcita, Hidroxiapatita e β -Fosfato Tricálcio como absorvedores do ultravioleta.** IFS- Instituto Federal de Sergipe, 2016.

- [57] Materiais Junior. Disponível em <<https://materiaisjr.com.br/materiais-compositos-origem-e-funcionalidades/>> Acesso em 19 nov 2021.
- [58] Feltre, R. **Fundamentos da Química - Compósitos**, editora Moderna, 1990.
- [59] Prieto, J. M. R.; Cambronero, L. G.; Torralba, J. M.; Velasco, F. **Manual de Pulvimetalurgia**. 1ª edição, Höganäs Chair in Powder Metallurgy, 1999.
- [60] Powder Metallurgy Review. Disponível em <<https://www.pm-review.com/>> Acesso em 27 Jun 2021.
- [61] Miraved, J. J. **Práticas de Polvometalotecnia**. Fundação Gómez-Pardo, 1973.
- [62] Silva, A. G. P. e Júnior, C. A. **A sinterização rápida: sua aplicação, análise e relação com as técnicas inovadoras de sinterização**. Cerâmica, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0366-69131998000600004>.
- [63] Jenkins, I. e Wood, J. V. **Powder metallurgy - An overview**. The Institute of Metals, 1991.
- [64] Moro, N. e Auras, A. P.; **Processos de fabricação. Metalurgia do pó e o futuro da indústria**. Disponível em: <<http://norbertocefetsc.pro.br/elm/wp-content/uploads/2014/09/metalurgiadopos.pdf>> Acesso em: 23 Ago 2021.
- [65] Van Nguyen, C.; et al. **A comparative study of different sintering models for Al₂O₃**. Journal of the Ceramic Society of Japan, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2109/jcersj2.15257>.
- [66] Tanaka, H.; et al. **Strongly connected ex situ MgB₂ polycrystalline bulks fabricated by solid-state self-sintering**. Superconductor Science and Technology, 2012. DOI: 10.1088/0953-2048/25/11/115022.
- [67] Kelly, A. **Materials Science and Technology. Fibrous Composite Materials**. University of Surrey. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, 2006.
- [68] Guerrero, F.; et al. **Effects of sinterization process and the influence of the lanthanum content in the Sr_{0.3-3Y/2LaYBa_{0.7}Nb₂O₅}**. Ceramic System. Boletín de la Sociedad Chilena de Química, 2000.
- [69] Brito, F.; Medeiros, K. e Lourenço, J. **Um estudo teórico sobre a sinterização na metalurgia do pó**. Holos, 2008. DOI: <https://doi.org/10.15628/holos.2007.139>.
- [70] Salernitano, E. e Migliaresi, C. **Composite Materials for Biomedical Applications: A Review**. Journal of applied biomaterials & biomechanics, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1177/228080000300100>.
- [71] Dunlop, J. W. C. e Fratzl, P. **Biological Composites**. Annual Review of Materials Research, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-070909-104421>.

- [72] United Kingdom. SIR Ranking of United Kingdom. Materials Science. **Biomaterials Ceramics and Composites Nanoscience and Nanotechnology**. Disponível em <<https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=28200&tip=sid&clean=0>> Acesso em 08 Ago 2022.
- [73] Thian, E. S.; et al. **Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4817-x>2012.
- [74] Güler, H.; et al. **Solid state synthesis of calcium borohydroxyapatite**. Solid State Sciences, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2011.08.016>.
- [75] Soundrapandian, C.; et al. **Studies on novel bioactive glasses and bioactive glass–nano-HAp composites suitable for coating on metallic implants**. Ceramics International, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.10.025>.
- [76] Chatzistavrou, X.; et al. **Sintered Hydroxyapatite / Bioactive Glass Composites: Thermal Analysis and Bioactivity**. Key Engineering Materials, 2006. DOI: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.309-311.167>.
- [77] Greish, Y. E.; Brown, P. W. **Characterization of bioactive glass–reinforced HAP–polymer composites**. Journal of Biomedical Materials Research, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20001215\)52:4<687::AID-JBM13>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4<687::AID-JBM13>3.0.CO;2-K).
- [78] Bellucci, D.; et al. **Bioactive glass/hydroxyapatite composites: Mechanical properties and biological evaluation**. Materials Science and Engineering: C, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.02.041>.
- [79] Barsoum, M. **Fundamentals of ceramics**. Editora CRC press, 2002.
- [80] Nascimento, A. Tese doutorado. **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**. Universidade Estadual de Maringá. 2021.
- [81] Moroz A.; et al. **Finasteride Inhibits Human Prostate Cancer Cell Invasion through MMP2 and MMP9 Downregulation**. Plos One, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084757>.
- [82] Lima, W. M. Tese doutorado. **Materiales compuestos de matriz acero inoxidable austenítico reforzado com intermetálicos: comportamento mecânico, a corrosión y desgaste**. Universidad Carlos III de Madrid, 1999.
- [83] Stetefeld, J.; McKenna, S. A. e Patel, T. R. **Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences**. Biophysical reviews, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.

- [84] Tõnsuaadu, K.; et al. **A review on the thermal stability of calcium apatites**. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10973-011-1877-y>.
- [85] Liao, C.-J.; et al. **Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere**. Biomaterials 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00076-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00076-9).
- [86] Tanaka, H.; et al. **Influence of thermal treatment on the structure of calcium hydroxyapatite**. Physical Chemistry Chemical Physics, 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/B001877P>.
- [87] Wang, T. e Dorner-Reisel, A. **Thermo-analytical investigations of the decomposition of oxyhydroxyapatite**. Materials Letters, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2004.05.033>.
- [88] Bulina, N.V.; et al. **A Study of Thermal Stability of Hydroxyapatite**. Minerals, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/min11121310>.
- [89] Boccaccini, A. R.; et al. **Sintering, crystallization and biodegradation behaviour of Bioglass derived glass-ceramics**. Faraday discussions, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1039/b616539g>.
- [90] Boccaccini, A. R.; Brauer; D.S e Hupa, L. **Bioactive glasses: Fundamentals, technology and applications**. Royal Society of Chemistry, 2016.
- [91] Sebdani, M.M. e Fathi, M.H. **Novel hydroxyapatite-forsterite-bioglass nanocomposite coatings with improved mechanical properties**. Journal of Alloys and Compounds, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2010.10.202>.
- [92] Peitl, O.; Zanutto, E.D. e Hench, L.L. **Highly bioactive P₂O₅-Na₂O-CaO-SiO₂ glass-ceramics**. Journal of Non-Crystalline Solids, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(01\)00822-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(01)00822-5).
- [93] Gibin, M.S. Dissertação mestrado. **Influência da temperatura no sistema vítreo bioativo de Cálcio-Sódio-Borato**. Universidade Estadual de Maringá. 2021.
- [94] Hudon, P. e Baker, D.R. **The nature of phase separation in binary oxide melts and glasses. I. Silicate systems**. Journal of Non-Crystalline Solids, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(02\)01043-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(02)01043-8).
- [95] Hudon, P. e Baker, D.R. **The nature of phase separation in binary oxide melts and glasses. II. Selective solution mechanism**. Journal of Non-Crystalline Solids, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(02\)01043-8](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(02)01043-8).
- [96] Chung, F.H. **Quantitative interpretation of X-ray diffraction patterns, I. Matrix-flushing method of quantitative multicomponent analysis**. Journal of Applied Crystallography, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0021889874010375>.

- [97] Hubbard C. R e Snyder, R. L. **RIR - measurement and use in quantitative XRD**, Powder Diffraction, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0885715600013257>.
- [98] Suchanek, W.; Yashima, M.; Kakihana, M., e Yoshimura, M. **β -Rhenanite (β - NaCaPO₄) as Weak Interphase for Hydroxyapatite Ceramics**. Journal of the European Ceramic Society, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0955-2219\(98\)00131-9](https://doi.org/10.1016/S0955-2219(98)00131-9).
- [99] Kangasniemi, I.; et al. **The stability of hydroxyapatite in an optimized bioactive glass matrix at sintering temperatures**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1991. DOI:<https://doi.org/10.1007/BF00692970>.
- [100] Kurtjak, M.; et al. **Designing Ga(iii)-containing hydroxyapatite with antibacterial activity**. RSC Advances, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1039/C6RA23424K>.
- [101] Ashuri, M.; et al. **Development of a composite based on hydroxyapatite and magnesium and zinc-containing sol-gel-derived bioactive glass for bone substitute applications**. Materials Science and Engineering: C, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.07.004>.
- [102] Garcia-Valles, M.; et al. **Mineralogical and thermal characterization of borate minerals from Rio Grande deposit, Uyuni (Bolivia)**. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10973-015-5161-4>.
- [103] Şener, S.; Özbayoğlu, G. e Demirci, S. **Changes in the structure of ulexite on heating**. Thermochemica Acta, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(00\)00584-0](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(00)00584-0).
- [104] Piskin, M. B. **Investigation of sodium borohydride production process:”ulexite mineral as a boron source”**, International Journal of Hydrogen Energy, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.03.043>.
- [105] Cho J. S. e Kang, Y. C. **Synthesis of spherical shape borate-based bioactive glass powders prepared by ultrasonic spray pyrolysis**, Ceramics International, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2008.11.010>.
- [106] Ryu H. S.; et al. **Novel bioactive and biodegradable glass ceramics with high mechanical strength in the CaOOSiO₂OB₂O₃ system**. Journal of biomedical materials research. Part A, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.20029>.
- [107] Alturki, A.M.; et al. **A Study to Evaluate the Bioactivity Behavior and Electrical Properties of Hydroxyapatite/Ag₂O-Borosilicate Glass Nanocomposites for Biomedical Applications**. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10904-021-02100-3>.
- [108] Costa, A. C. F. M.; et al. **Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, 2009.

- [109] Almeida, J. M. P.; et al. **Architecture of lead oxide microcrystals in glass: a laser and etching based method**. CrystEngComm, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C6CE01255H>.
- [110] Wang C.K.; Ju C.P. e Chem Lin, J.H. **Effect of doped bioactive glass on structure and properties of sintered hydroxyapatite**. Materials Chemistry and Physics, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0254-0584\(97\)02074-9](https://doi.org/10.1016/S0254-0584(97)02074-9).
- [111] Sperling, L. H. **Introduction to physical polymer science**. Editora John Wiley & Sons, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471757128>.
- [112] Shipp, D. W.; Sinjab, F. e Notingher, I. **Raman spectroscopy: techniques and applications in the life sciences**. Advances in Optics and Photonics, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1364/AOP.9.000315>.
- [113] Kong, K.; et al. **Raman spectroscopy for medical diagnostics — From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection**. Advanced Drug Delivery Reviews, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.009>.
- [114] Beier, B. Quivey, R e Berger, A. **Confocal Raman microscopy for identification of bacterial species in biofilms. Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE**, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1117/12.871819>.
- [115] Moreira, L. M.; et al., **Raman spectroscopy: A powerful technique for biochemical analysis and diagnosis**. Journal Spectroscopy, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3233/SPE-2008-0326>.
- [116] Sala, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**. Editora Unesp, 2 ed., 2008.
- [117] Weinand, W.; et al. **Dynamics of the natural genesis of β -TCP/HAp phases in postnatal fishbones towards gold standard biocomposites for bone regeneration**, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121407>.
- [118] Almou, M. e Rulmont, A. **Vibrational spectrum of trisodium calcium pentaborate $\text{Na}_3\text{Ca}(\text{B}_5\text{O}_{10})$ and probable occurrence of the discrete pentaborate ion $(\text{B}_5\text{O}_{10})^{-5}$ in some glassy metaborates**, Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie, 2001.
- [119] Lafuente, B.; et al. **The power of databases: The RRUFF project**, De Gruyter, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1515/9783110417104-003>.
- [120] Mohmoh, H. Ouchetto; et al. **Structural Relationship Between Vitreous P_2O_5 and Its Relevant Crystalline Polymorphs By Raman Spectroscopy**. Phosphorus Research Bulletin, 2002. DOI: https://doi.org/10.3363/PRB1992.13.0_187

- [121] Rulmont, A. e Almou, M. **Vibrational spectra of metaborates with infinite chain structure: LiBO_2 , CaB_2O_4 , SrB_2O_4** . *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(89\)80013-3](https://doi.org/10.1016/0584-8539(89)80013-3).
- [122] Meera B. e Ramakrishna, J. **Raman spectral studies of borate glasses**, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 1993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-3093\(93\)91277-A](https://doi.org/10.1016/0022-3093(93)91277-A).
- [123] Yadav A. K. e Singh, P. **A review of the structures of oxide glasses by raman spectroscopy**, *RSC advances*, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C5RA13043C>.
- [124] Frost, R. L. **Raman spectroscopy of selected borate minerals of the pinakiolite group**, *Journal of Raman Spectroscopy*, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/jrs.2745>.
- [125] Kipcak, S.; et al. **Characterization and physical properties of hydrated zinc borates synthesized from sodium borates**, *Main Group Metal Chemistry*, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1515/mgmc-2016-0002>.
- [126] Bersani, D.; et al. **Multi-technique characterization of glass mosaic tesserae from Villa di Teodorico in Galeata (Italy)**. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/jrs.6180>.
- [127] Aza, P. N.; et al. **Vibrational Properties of Calcium Phosphate Compounds. 1. Raman Spectrum of β -Tricalcium Phosphate**. *Chemistry of Materials* 1997. DOI: <https://doi.org/10.1021/cm960425d>.
- [128] Hayakawa, S.; et al. **Preparation and Characterization of Boron-Containing Hydroxyapatite**. *Key Engineering Materials*, 2007. DOI: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.361-363.191>.
- [129] Silvestri, A.; Nestola, F. e Peruzzo, L. **Multi-methodological characterisation of calcium phosphate in late-antique glass mosaic tesserae**, *Microchemical Journal*, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.10.026>.
- [130] Lu, J.; Yu, H. e Chen, C. **Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review**. *RCS Advances*, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7RA11278E>.
- [131] LeGeros, R.Z. **Calcium phosphates in oral biology and medicine**. *Monographs in Oral Science*, 1991. DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-04021-0>.
- [132] Yao, A.; Rahaman, M. N. e Lin, J.; Huang, W. **Structure and crystallization behavior of borate-based bioactive glass**, *Journal of Materials Science*, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10853-007-1995-x>.
- [133] Gautam, C. **Synthesis, Structural and Optical Investigations of (Pb, Bi)TiO₃ Borosilicate Glasses**. *Physics Research International*, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/606709>.

- [134] Youssif, E.; et al. **Characterization of crystalline borates prepared from solution and derived glasses.** Journal of Non-Crystalline Solids, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.12.027>.
- [135] Veiderma, M. e Knubovets, R. and Kaia, T. **Structural properties of apatites from Finland studied by FTIR spectroscopy.** Bulletin of the Geological Society of Finland, 1998. DOI: <https://doi.org/10.17741/bgsf/70.1-2.005>.
- [136] Balan, E.; et al. **Line-broadening effects in the powder infrared spectrum of apatite.** Physics and Chemistry of Minerals, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00269-010-0388-x>.
- [137] Jalota, S.; Bhaduri, S. B. e Cuneyt Tas, A. **A new rhenanite (β -NaCaPO₄) and hydroxyapatite biphasic biomaterial for skeletal repair.** Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30598>.
- [138] Sitarz, M; Bulat, K. e Olejniczak, Z. **Structure and microstructure of glasses from a NaCaPO₄-SiO₂-BPO₄ system.** Vibrational Spectroscopy, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2012.01.016>.
- [139] Wagner, C. C. e Baran, H. J. **Easy Synthesis of CaB₂O₄ Via Pyrolysis of Calcium Fructoborate.** Materials Research, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-14392008000400020>.
- [140] Gibson, I.R.; Rehman, I. Best, S.M. e Bonfield, W. **Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to β -tricalcium phosphate.** Journal of materials science. Materials in medicine, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1008905613182>.
- [141] Bellucci, D.; Sola, A. e Cannillo, V. **Hydroxyapatite and tricalcium phosphate composites with bioactive glass as second phase: State of the art and current applications.** Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35619>.
- [142] Ege, D.; Zheng, K. e Boccaccini, A. R. **Borate Bioactive Glasses (BBG): Bone Regeneration, Wound Healing Applications, and Future Directions.** ACS Applied Bio Materials, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00384>.
- [143] Qu H, Wei M. **Effect of fluorine content on mechanical Properties of sintered fluoridated hydroxyapatite.** Materials Science and Engineering: C, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.06.005>.
- [144] Lefebvre, L.; et al. **Sintering behaviour of 45S5 bioactive glass.** Acta Biomaterialia, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.05.019>.

- [145] Muller R.; Zanotto E. D. e Fokin V. M. **Surface crystallization of silicate glasses: nucleation sites and kinetics**. Journal of Non-Crystalline Solids, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-3093\(00\)00214-3](https://doi.org/10.1016/S0022-3093(00)00214-3).
- [146] Hmood, F.J.; et al. **Structure and crystallization characterization of chemically developed bioactive glass based on ICIE16**. Open Ceramics, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2020.100027>.
- [147] Scherer GW. **Sintering of sol–gel films**. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02436865>.
- [148] Zanotto E. D. e Prado M. O. **Isothermal sintering with concurrent crystallization of monodispersed and polydispersed glass particles. Part 1**. European Journal of Glass Science and Technology Part B Physics and Chemistry of Glasses, 2001.
- [149] Li, H.; et al. **Spectroscopic and Surface Crystallization Characterizations of Yttrium-Doped Phosphate Glasses**. Crystals, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cryst12010109>.
- [150] Zhang, D.; Hupa, M. e Hupa, L. **In situ pH within particle beds of bioactive glasses**. Acta Biomaterialia, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.04.007>
- [151] Deilmann, L.; et al. **Effect of boron incorporation on the bioactivity, structure, and mechanical properties of ordered mesoporous bioactive glasses**. Journal of Materials Chemistry B, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1039/C9TB01805K>
- [152] Ojha, N. Dissertação mestrado. **Borosilicate glass with enhanced hot forming properties and conversion to hydroxyapatite**. Tampere University of Technology, 2016.
- [153] Rincón-López, J.A.; et al. **Apatite Mineralization Process from Silicocarnotite Bioceramics: Mechanism of Crystal Growth and Maturation**. Crystal Growth & Design, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c00322>.
- [154] Rincón-López, J. A.; et al. **Preferred Growth Orientation of Apatite Crystals on Biological Hydroxyapatite Enriched with Bioactive Glass: A Biomimetic Behavior**. Crystal Growth & Design, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.9b00268>.
- [155] Paiva, A. O.; et al. **In Vitro studies of bioactive glass/polyhydroxybutyrate composites**. Materials Research, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-14392006000400013>.
- [156] Anwar, A.; et al. Synthesis and characterization of pure and nanosized hydroxyapatite bioceramics. Nanotechnology Reviews, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0020>.
- [157] Stoch, A.; et al. **FTIR absorption–reflection study of biomimetic growth of phosphates on titanium implants**, Journal of Molecular Structure, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(00\)00623-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(00)00623-2).

- [158] Filho, O. P.; La Torre G. P. e Hench, L. L. **Effect of crystallization on apatite layer formation of bioactive glass 45S5**. Journal of Biomedical Materials Research, 1996.
- [159] Bieberle-Hütter, A.; et al. **Operando Attenuated Total Reflection Fourier-transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy for water splitting**. Journal of Physics D: Applied Physics, 2020. DOI: 10.1088/1361-6463/abd435.
- [160] Geociências USP. Disponível em: <<https://didatico.igc.usp.br/minerais/fofosfatos/apatita/>> Acesso em: 23 mar 2022.
- [161] Li, P. et al. **The effect of residual glassy phase in a bioactive glass-ceramic on the formation of its surface apatite layer *in vitro***. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00701242>
- [162] Aslantürk, Ö. S. ***In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages**. M. L. Larramendy, & S. Soloneski, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>.
- [163] Rogero, S. O.; et al. **Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias**. Materials Research, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-14392003000300003>.
- [164] Larsson, P. et al. **Optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens**. Scientific Reports, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62848-5>.
- [165] Amaral, M. B. Dissertação mestrado. **Citotoxicidade *in vitro* e biocompatibilidade *in vivo* de compósitos a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana**. Universidade de São Paulo, 2006.
- [166] Pires, Larissa Mariano. Trabalho conclusão de curso. **Biocompatibilidade *in vitro* da hidroxiapatita extraída de resíduo de peixe (*Micropogonias furnieri*)**. Universidade Federal de São Paulo, 2022.
- [167] Deliormanlı, A. M. ***In vitro* assessment of degradation and bioactivity of robocast bioactive glass scaffolds in simulated body fluid**. Ceramics International, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.05.019>.
- [168] Höhne, G. W. H.; Hemminger, W. F.; Flammersheim, H.-J. **Differential Scanning Calorimetry**. Springer Berlin, Heidelberg, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-06710-9>.
- [169] Padilha, A. F. **Materiais de engenharia**. Hemus, 1997.
- [170] Kittel, C. **Introdução à física do estado sólido**. Grupo Gen-LTC, 2000.

- [171] Bunaciu, A. A.; Udristioiu, E. G. e Aboul-Enein, H. Y. **X-ray diffraction: instrumentation and applications**. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.949616>
- [172] Cullity, B. D. **Elements of X-ray Diffraction**. Addison-Wesley Publishing, 1978.
- [173] Jenkins, R. e Snyder, R. L. **Introduction to X-ray powder diffractometry**. John Wiley & Sons, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118520994>.
- [174] Leonardo M. Moreira, L.M. et al. **Raman spectroscopy: A powerful technique for biochemical analysis and diagnosis**. Journal of Spectroscopy, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3233/SPE-2008-0326>
- [175] Smith, E. and Dent, G. **Modern Raman spectroscopy: a practical approach**. John Wiley & Sons, 2019.
- [176] Larkin, P. **Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation**. Elsevier, 2011.
- [177] Smith, B. C. **Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy**. CRC press, 2 ed., 2011. DOI: <https://doi.org/10.1201/b10777>.
- [178] Atitar, M. F. et al. **The Relevance of ATR-FTIR Spectroscopy in Semiconductor Photocatalysis**. Emerging Pollutants in the Environment - Current and Further Implications, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5772/60887>.
- [179] Dedavid, B. A. Gomes, C. I. Machado, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2007.
- [180] Zhou, W., et al. **Scanning Microscopy for Nanotechnology**. Springer, 2006. DOI: https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0_1.
- [181] Ul-Hamid, A. A beginners guide to scanning electron microscopy. Springer, 2018.
- [182] Juarez, J. R. Tese doutorado. **Síntesis y caracterización de galato de zinc dopado con cromo (ZnGa₂O₄:Cr³⁺) recubierto con sílice para su posible aplicación en áreas médicas**. Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño, 2019. DOI: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.11972.58247>.