



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Centro de Ciências Sociais, da Saúde e Tecnologia – CCSST
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Materiais – PPGCM



Sacha Dupin Gade

PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA BIOATIVIDADE DE
COMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA – VIDRO BORATO BIOATIVO

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

Coorientador: Prof. Dr. Alysson Steimacher

Imperatriz – MA

2021

Sacha Dupin Gade

**PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA BIOATIVIDADE DE
COMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA – VIDRO BORATO BIOATIVO**

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

Área de concentração: Materiais

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

Coorientador: Prof. Dr. Alysson Steimacher

Imperatriz

2021

Sacha Dupin Gade

**PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA BIOATIVIDADE DE
COMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA – VIDRO BORATO BIOATIVO**

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

Área de concentração: Materiais

Apresentado em: 30/07/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Franciana Pedrochi (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

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

Prof. Dr. Marcio José Barboza
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Walter e Alda, pelo esforço, referência, conduta, dedicação e apoio desde sempre. Aos meus irmãos Alexandre e Luciana e aos meus queridos e amados filhos João, Davi e Ana Júlia pela motivação.

Ao Instituto Federal do Maranhão (IFMA) pela estrutura, organização, incentivo a capacitação e qualificação dos servidores.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais (PPGCM) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), campus Imperatriz, pela oportunidade de cursar a pós-graduação. A todos os professores do programa, pela disponibilidade, propósito, dedicação, cobrança, compartilhamento de experiências, que resulta na capacitação e formação na região.

Aos meus colegas de turma, do LEOF e demais laboratórios pela cumplicidade, companheirismo e total disponibilidade em colaborar. Se for tentar citar todos os nomes que contribuíram nesta jornada, vão faltar alguns. De pronto, neste momento em que escrevo, tenho que citar alguns: o amigo Gleison, estudioso e namorador, Floriano, Otávio, Sara, Ingrid, Brenda, Maxwell, Glauco, Ian, João, Alexandre, Jéssica, Leonardo, Raychimam, Shelton, Jhonatan, Jorge dentre outros que são parte desta boa jornada e de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

À professora doutora Franciana Pedrochi pelo profissionalismo, paciência, exemplo e disponibilidade na orientação. Ao professor doutor Alysson Steimacher pela disponibilidade e orientação e ao professor doutor Marcio José Barboza pela disponibilidade e colaboração. Professores presentes, exigentes e disponíveis às nossas orientações, compartilhando conhecimento, experiências de vida e profissionalismo. O LEOF é acadêmico e criativo. Muito obrigado por toda a aprendizagem.

Ao Laboratório de Difração de raios-X pelas medidas de DRX, em particular ao Jailton Romão Viana e ao professor doutor Adenilson Oliveira dos Santos pelas aulas, conhecimento, discussões e convivência neste período.

À querida Escola de Minas da Universidade Federal de Ouro Preto pela base e experiência de vida que certamente contribuíram com o retorno aos estudos após quase 15 anos de trabalho no chão de fábrica.

RESUMO

Foram estudados compósitos de hidroxiapatita (HA) e vidro bioativo borato dopado com prata, de composição $59,5\text{B}_2\text{O}_3-2\text{P}_2\text{O}_5-9,5\text{CaO}-19,5\text{Na}_2\text{O}-9\text{CaF}-0,5\text{Ag}_2\text{O}$ (% em mol), com o objetivo de explorar a ação combinada da compatibilidade e estabilidade da HA como reforço estrutural inicial, aliada à cinética de dissolução e rápida conversão do vidro borato em apatita com o objetivo de avaliar se estes compósitos possam servir como substrato indutor da autorregeneração óssea e/ou permitir a substituição de partes danificadas. Os compósitos foram elaborados a partir dos pós dos materiais precursores nas proporções de 25% e 50%, em massa de vidro, tratados a 530 °C e 1000 °C e tiveram sua bioatividade, *in vitro*, avaliada em períodos de 14 e 28 dias de imersão em simulador de fluido corporal. A 530 °C a natureza amorfa do vidro é preservada e a análise dos difratogramas e espectros FTIR indica a predominância da estrutura apatítica sem formação de fases adicionais. A 1000°C surge NaCaPO_4 como fase adicional decorrente do tratamento térmico, e, em todos os compósitos, a estrutura característica da HA é confirmada por difração de raios-X, antes e após ensaio de bioatividade em simulador de fluido corporal. Nesta temperatura, de 1000 °C, ocorrem substituições iônicas na estrutura da HA com alteração na sua hidroxilação, a partir da incorporação de grupos borato em locais de OH^- e PO_4^{3-} , que são confirmadas pelos espectros de FTIR e permitem indicar a formação de boroapatita. Os difratogramas dos compósitos contendo 50% de vidro e tratados a 530 °C, mostraram a fase cloreto de prata mesmo após 28 dias de imersão em simulador de fluido corporal, indicando maior potencial, dentre os compósitos e condições estudadas, de ação antibacteriana. A análise dos difratogramas, espectros de FTIR, medidas de pH e do índice de cristalinidade calculado pela técnica de FTIR para a HA mostraram comportamento bioativo dos compósitos tratados a 530 °C e da boroapatita obtida a partir dos compósitos tratados a 1000 °C. Os compósitos estudados, mostraram comportamento bioativo, *in vitro*, e portanto, possuem potencial para serem utilizados como biomateriais em tratamentos ósseos; e o compósito contendo 25% de vidro e tratado a 1000 °C, maior tempo em dias de imersão para estabilizar valor medido de pH, indicando uma interação ou reabsorção mais controlada da fase reabsorvível após imersão em simulador de fluido corporal.

Palavras Chaves: compósitos, tratamento térmico, substituição iônica, boroapatita, bioatividade.

ABSTRACT

Composites of hydroxyapatite (HA) and bioactive borate glass doped with silver, of composition $59.5\text{B}_2\text{O}_3-2\text{P}_2\text{O}_5-9.5\text{CaO}-19.5\text{Na}_2\text{O}-9\text{CaF}-0.5\text{Ag}_2\text{O}$ (% in mol) were studied, with the aim of exploring the combined action of compatibility and stability of HA as an initial structural reinforcement, combined with the dissolution kinetics and quick conversion of borate glass to apatite in order to assess whether these composites can serve as an inducing substrate for bone self-regeneration and/or allow the replacement of damaged. The composites were prepared from powders of precursor materials in proportions of 25% and 50%, in mass, of glass, thermally treated at 530 °C and 1000 °C and had their bioactivity, *in vitro*, evaluated in periods of 14 and 28 days of immersion in simulator body fluid. At 530 °C the amorphous nature of the glass is preserved and the analysis of diffractograms and FTIR spectra indicates the predominance of the apatite structure without the formation of additional phases. At 1000°C, NaCaPO_4 appears as an additional phase resulting from the heat treatment, and, in all composites, the characteristic structure of HA is confirmed by X-ray diffraction, before and after bioactivity testing in a simulator body fluid. At this temperature of 1000 °C, ionic substitutions occur in the HA structure with changes in its hydroxylation, from the incorporation of borate groups in OH^- and PO_4^{3-} sites, which were confirmed by the FTIR spectra and allow to indicate boroapatite formation. The diffractograms of composites containing 50% glass and thermally treated at 530 °C showed the silver chloride phase even after 28 days of immersion in a simulator body fluid, indicating greater potential, among the composites and conditions studied, of antibacterial action. The analysis of diffractograms, FTIR spectra, pH measurements and the crystallinity index calculated by the FTIR technique for HA showed the bioactive behavior of composites thermally treated at 530 °C and of boroapatite obtained from composites thermally treated at 1000 °C. The studied composites showed bioactive behavior, *in vitro*, and therefore, have the potential to be used as biomaterials in bone treatment; and the composite containing 25% of glass and thermally treated at 1000 °C, longer in days of immersion to stabilize the measured pH value, indicating a more controlled interaction or resorption of the resorbable phase after immersion in a simulator body fluid.

Keywords: composites, thermal treatment, ionic substitution, boroapatite, bioactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Projeção no plano a, b para a HA [43].....	17
Figura 2: Ilustração de conversão de vidro de borato em HA em uma solução diluída de fosfato. Adaptado de [12].	21
Figura 3: Esquema de classificação para vários tipos de compósitos, segundo o mecanismo de reforço. O termo grande é utilizado para indicar que as interações partícula-matriz não podem ser tratadas ao nível atômico ou molecular. Adaptado de [59].....	23
Figura 4: Esquema de classificação dos compósitos baseado na escala, tipos de reforços e matriz e em biocompósitos. Adaptado de [55].	23
Figura 5: a) tecido ósseo (tíbia) sem processamento, b) processado por desmineralização e c) processado por calcinação. Adaptado de [61].	24
Figura 6: Foto da pastilha de compósito em tubo de Falcon.	29
Figura 7: Imagens das pastilhas dos compósitos 25VB_530, 25VB_1000, 50VB_530 e 50VB_1000, após a imersão em SBF, em períodos de 14 e 28 dias.	30
Figura 8: Figura esquemática para as medidas das intensidades das bandas de absorção (ν_4) de PO_4^{3-} entre 450 e 750 cm^{-1} , para o cálculo do índice de cristalinidade por FTIR.	32
Figura 9: Difratomogramas dos materiais precursores utilizados na elaboração de compósitos e ficha padrão de referência: a) 100VB_530, b) 100HA_25, c) ficha padrão ICSD 087670 para HA.....	34
Figura 10: Espectros de FTIR dos materiais precursores, a) 100HA_1000_C e b) 100VB_530_C com indicação do número de onda nos máximos das bandas e picos.	35
Figura 11: Difratomogramas das amostras 25VB_530_C, 50VB_530_C, 100HA_25 e ficha padrão ICSD 87670 para HA.....	36
Figura 12: Sobreposição das curvas 25VB_530_C, 50VB_530_C e 100HA_25	37
Figura 13: Difratomogramas das amostras 25VB_1000_C e 50VB_1000_C, antes da imersão em SBF, e fichas padrões correspondentes às fases identificadas.....	38
Figura 14: Difratomogramas de: 100HA_1000, 100HA_25 e ficha padrão correspondente HA_ICSD_087670, ficha padrão ICSD_15893 para H_3PO_3	39
Figura 15: Espectros de FTIR das amostras dos compósitos 25VB_530_C e 50VB_530_C, antes da imersão em SBF, com destaque dos picos e bandas observados no material e identificados como características da HA.....	40
Figura 16: Espectros de FTIR das amostras dos compósitos 25VB_530_C e 50VB_530_C, antes da imersão em SBF, com destaque das atribuições a picos e bandas observados.....	42

Figura 17: Evolução do pH para tratamento em SBF durante período de 28 dias. O pH inicial é referente a leitura no momento da imersão e o primeiro resultado após 24 horas de imersão.....	45
Figura 18: Difrátogramas das amostras 25VB_530_C, antes da imersão; 25VB_530_14d e 25VB_530_28d e ficha padrão ICSD 087670 para HA.	46
Figura 19: Difrátogramas das amostras 50VB_530 antes e após a imersão em SBF e as fichas padrão para HA (ICSD 87670) e AgCl (ICSD 64734).	47
Figura 20: Ampliação da região 2 θ de picos associados a HA para os grupos de compósitos tratados a 530°C com 25% e 50% de substituição em vidro, antes e após a imersão em SBF.	48
Figura 21: Difrátograma das amostras 25VB_1000 antes e após imersão em SBF e fichas padrão para HA de código ICSD 87670 e NaCaPO ₄ de código ICSD 35629.....	49
Figura 22: Difrátograma das amostras 50VB_1000 antes e após imersão em SBF e fichas padrão para HA de código ICSD 87670 e NaCaPO ₄ de código ICSD 35629.....	50
Figura 23: Espectros de absorção para amostra 25VB_530_C, antes e após imersão em SBF, em períodos de 14 e 28 dias.....	51
Figura 24: Espectros de absorção para amostra 50VB_530_C, antes e após imersão em SBF, em períodos de 14 e 28 dias, com destaque dos grupos químicos em suas respectivas regiões.....	52
Figura 25: Espectros de absorção para amostra 25VB_1000_C, antes e após imersão em SBF, em períodos de 14 e 28 dias, com destaque dos grupos químicos em suas respectivas regiões.....	54
Figura 26: Espectros de absorção para amostra 50VB_1000_C, antes e após imersão em SBF, em períodos de 14 e 28 dias, com destaque dos grupos químicos em suas respectivas regiões.....	55
Figura 27: Efeito da imersão em SBF, nos períodos de 14 e 28 dias, sobre a cristalinidade da HA nos compósitos 25VB e 50VB tratados a 530 °C e 1000 °C.	56
Figura 28: Resultados de densidade em 530 °C para os compósitos nas diferentes proporções de vidro e hidroxiapatita; da pastilha de 100% HA (indicada por 0%VB) e da pastilha 100% vidro (0%HA).	58
Figura 29: Imagens após a sinterização a 530 °C, para: a) 100VB_530_C, b) 25VB_530_C e c) 50VB_530_C.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de fosfatos de cálcio e sua classificação mineralógica. Adaptado de [24,37,40].	16
Tabela 2: Concentração iônica nominal do SBF em comparação com a existente no plasma sanguíneo [40].	21
Tabela 3: Teor percentual dos componentes na amostra em massa e mol.	26
Tabela 4: Identificação das amostras estudadas com sua codificação associada à proporção de vidro e HA e temperatura de sinterização.	27
Tabela 5: Ângulos 2θ (graus) para amostra 100HA_25 e suas posições correspondentes, na ficha padrão ICSD 087670 de HA.	35
Tabela 6: Tamanho de cristalito para o pico em torno de $31,8^\circ 2\theta$, correspondente ao plano $(hkl) = (211)$ e pico de maior intensidade relacionado à HA.	37
Tabela 7: Picos de maior intensidade relativos às fases HA e NaCaPO ₄ , dentre os listados nas suas respectivas fichas padrões, ICSD 87670 e ICSD 35629, e as respectivas ocorrências identificadas nos difratogramas dos compósitos 25VB_1000_C e 50VB_1000_C.	38
Tabela 8: Atribuições dos modos vibracionais destacados na Figura 15 e número de onda de suas ocorrências para os compósitos 25VB_530_C e 50VB_530_C.	41
Tabela 9: Atribuições dos modos vibracionais destacados na Figura 16 e número de onda de suas ocorrências para os compósitos 25VB_1000_C e 50VB_1000_C.	43
Tabela 10: Atribuições das principais bandas de absorção do compósito 25VB_530, antes e após a imersão em SBF.	51
Tabela 11: Atribuições das principais bandas de absorção do compósito 50VB_530, antes e após a imersão em SBF.	53
Tabela 12: Variação linear na maior dimensão.	59

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
2.1 APATITAS.....	15
2.1.1 Fosfatos de cálcio	15
2.1.2 Substituições iônicas.....	17
2.2 PRINCIPAIS PRODUTOS DA DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA DA HIDROXIAPATITA	19
2.3 CONVERSÃO DE VIDRO BORATO EM HIDROXIAPATITA.....	20
2.4 COMPÓSITO.....	22
2.4.1 Compósitos hidroxiapatita/vidros.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	26
3.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	28
3.2.1 Ensaio de bioatividade e medida do pH do SBF.....	28
3.2.2 Difração de raios – X.....	30
3.2.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	31
3.2.4 Densidade (ρ).....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1 ESTUDO DOS MATERIAIS PRECURSORES E DOS COMPÓSITOS PRÉ-IMERSÃO EM SBF	33
4.1.1 Difração de raios-X dos materiais precursores.....	33
4.1.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos materiais precursores. 35	
4.1.3 Análise por difração de raios-X (DRX) dos compósitos pré-imersão em SBF.....	36
4.1.4 Análise por FTIR para os compósitos pré-imersão em SBF.....	39
4.2 ESTUDO DOS COMPÓSITOS PÓS-IMERSÃO EM SBF	44
4.2.1 Medidas de pH no SBF	44
4.2.2 Análise por difração de raios-X (DRX) dos compósitos pós-imersão em SBF.....	45
4.2.3 Análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier para os compósitos pós-imersão em SBF	50

4.3 ÍNDICE DE CRISTALINIDADE POR FTIR	56
4.4 DENSIDADE	57
4.5 ANÁLISE DE VARIAÇÃO DIMENSIONAL	58
5. CONCLUSÃO	60
6. REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento progressivo da população mundial, associado a uma crescente incidência de doenças esqueléticas, à mudança em hábitos de vida e acidentes veiculares, acidentes esportivos etc., é uma das principais motivações aos crescentes esforços de pesquisa para o desenvolvimento de novos materiais implantáveis [1–3]. Além da reparação e reconstrução de defeitos ósseos, busca-se materiais que sejam capazes de servir como substrato indutor da autorregeneração, em vez de promover unicamente a substituição de partes danificadas [4–8].

O primeiro material artificial implantado a formar uma interface ligada quimicamente ao osso surgiu no final da década de 1960, como resultado das pesquisas de Larry Hench e colaboradores. Esse material, um vidro silicato (Sodalime), cuja composição consistia em 45% de SiO_2 , 24,5% de Na_2O , 24,5% de CaO e 6% de P_2O_5 , porcentagens em massa, foi patenteado e recebeu o nome de Bioglass® 45S5 [9]. Essa interface quimicamente ligada ao osso é uma hidroxiapatita (HA), produto da degradação do vidro em meio biológico e que tem estrutura e composição química semelhante à fase mineral do tecido ósseo. Os resultados iniciais mostraram total integração do vidro com o tecido hospedeiro, de forma que este não pôde ser removido do local implantado sem fratura [4,10,11].

O desenvolvimento do Bioglass® levou à criação de uma nova classe de materiais denominada biomateriais; e o termo bioatividade foi utilizado para descrever a habilidade do vidro de se interligar ao tecido ósseo por meio da formação da HA. Estudos têm indicado que a substituição parcial ou completa de SiO_2 pelo B_2O_3 , no Bioglass® 45S5, leva a uma completa e mais rápida conversão do vidro borato bioativo em HA [12–14].

A estrutura óssea, como uma dispersão de partículas minerais incorporadas em uma matriz orgânica, classifica-se como um compósito, o que lhe confere propriedades mecânicas particulares a partir da “ação combinada” entre fase proteica e mineral. Muito tem-se buscado entender sob quais condições células são induzidas a mineralizar na tentativa de se poder construir estruturas funcionais bioinspiradas e conduzir, por meio de implantes, essa diferenciação celular de forma aprimorada [15–18]. Sabe-se que a apatita biológica é estruturalmente semelhante a HA, mas existem grandes diferenças entre o mineral biológico, o geológico e os sintéticos. Apesar da semelhança, ainda é um desafio imitar essas estruturas com suas singularidades que venham responder com funcionalidade [19].

A hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e o fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) nas formas polimórficas (α e β – TCP), estão entre fosfatos de cálcio mais difundidos em aplicações

biomédicas. A HA é relatada na literatura por apresentar, dentre outras propriedades, excelente biocompatibilidade, ausência de toxicidade e alta estabilidade/lenta biodegradação [20–24].

A proposta do presente trabalho é buscar uma melhor combinação de resultados positivos, já conhecidos, de um vidro bioativo borato dopado com prata [25] e uma HA natural [24], como formador de interface entre tecido e implante. Ambos biocompatíveis e frágeis mecanicamente quando tratados individualmente, mas que combinados possam gerar um novo material capaz de se assemelhar ainda mais ao tecido ósseo e/ou atuar como estimulador/indutor de uma mineralização que seria o melhor substituto ósseo.

O vidro borato utilizado, foi desenvolvido no Laboratório de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (LEOF), da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e teve demonstrada sua bioatividade, citocompatibilidade e atividade antibacteriana contra *E.coli* e bacteriostática contra a *S. aureus* no trabalho de Silva e colaboradores [26]. A mesma composição tratada termicamente, e parcialmente cristalizada por Lopes e colaboradores [27], apresentou as mesmas propriedades de bioatividade e atividade antibacteriana contra *E. coli*. A hidroxiapatita utilizada apresenta alta pureza e alta cristalinidade. Sua obtenção e processamento foram patenteados por Weinand [28] (PI 0506242-0 A2) e as amostras utilizadas neste trabalho cedidas pelo Grupo de Estudos de Fenômenos Fototérmicos da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Apatitas

Classicamente, um mineral é definido como “substância química natural, sólida, homogênea, geralmente resultante de processos inorgânicos, apresentando estrutura interna ordenada, composição química e propriedades físicas próprias e constantes dentro de certos limites que permitem a sua identificação como espécie mineral” [29]. A denominação apatita engloba um grande número de minerais e pode ser representada pela fórmula geral $M_{10}(YO_4)_6X_2$ em que M representa uma série de cátions como Ca^{2+} , Na^+ , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sc^{2+} . O conteúdo aniônico pode incluir no sítio YO_4 , o PO_4^{2-} , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , CrO_4^{2-} , VO_4^{3-} e o sítio X íons como F^- , OH^- , Cl^- entre outros. A composição da apatita depende das condições de formação como temperatura e pressão por exemplo, mas é também influenciada pela necessidade de compensação de cargas quando ocorrem substituições entre íons de cargas diferentes em sítios de uma apatita estequiométrica [30–33].

2.1.1 Fosfatos de cálcio

O principal constituinte dos ossos é um mineral fosfato de cálcio (hidroxiapatita carbonatada deficiente em cálcio) que possui semelhanças composicionais e estruturais com o mineral hidroxiapatita $Ca_5(PO_4)_3(OH)$, em que a versatilidade de substituições em sua estrutura permite que venham a desempenhar papel na atividade metabólica e atuem como reservatório capaz de absorver e liberar íons de Ca, P e outros como de Na, K, Mg, F, CO_3 , OH. A composição mineralógica óssea, ou apatita biológica, irá variar estruturalmente e composicionalmente em relação à hidroxiapatita estequiométrica e também entre indivíduos conforme a função dos ossos, o metabolismo celular, idade, dieta e doenças [34–36].

É comum classificar os diversos fosfatos de cálcio pela sua razão molar cálcio/fósforo (Ca/P). Com exceção do pirofosfato de cálcio ($Ca_2P_2O_7$), a maioria dos fosfatos de cálcio está presente *in vivo* na forma de ortofosfatos de cálcio, que por definição consistem em três elementos químicos principais: Ca^{2+} , P^{5+} e O^{2-} . O grupo ortofosfato (PO_4^{3-}) é estruturalmente diferente de meta (PO_3^-) e pirofosfato ($P_2O_7^{4-}$). A composição química de muitos ortofosfatos de cálcio inclui hidrogênio, como um ânion de ortofosfato ácido, como o HPO_4^{2-} ou $H_2PO_4^-$

e/ou água incorporada como no fosfato dicálcico di-hidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [37–39]. A Tabela 1, reúne a denominação de alguns fosfatos de cálcio e sua classificação mineralógica.

Tabela 1: Exemplos de fosfatos de cálcio e sua classificação mineralógica. Adaptado de [24,37,40].

Nome químico	Fórmula química	Nome mineral	Estrutura	Relação Ca / P
fosfato de cálcio tribásico	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	hidroxiapatita	apatítico	1,67
	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	fluorapatita	apatítico	1,67
hidroxi-fluorapatita mista	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH}, \text{F})_2$, por exemplo, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{0,4}\text{F}_{1,6}$	-	apatítico	-
clorapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$	-	apatítico	-
clorofluorapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{Cl}, \text{F})_2$	-	apatítico	-
apatita carbonatada do tipo A	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$	-	apatítico	-
hidroxiapatita carbonatada do tipo B	$\text{Ca}_{10-x}[(\text{PO}_4)_{6-2x}(\text{CO}_3)_{2x}](\text{OH})_2$	-	apatítico	-
apatita carbonatada mista de tipo A e tipo B	$\text{Ca}_{10-x}[(\text{PO}_4)_{6-2x}(\text{CO}_3)_{2x}]\text{CO}_3$	-	apatítico	-
Fosfato tricálcico	$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$	"Whitlockite"	não apatítico	1,50
fosfato tricálcico substituído com magnésio	$(\text{Ca}, \text{Mg})_9(\text{PO}_4)_6$	"Whitlockite"	não apatítico	$\leq 1,50$
fosfato dicálcico di-hidratado	$\text{Ca}(\text{HPO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	"brushite"	não apatítico	1

2.1.2 Substituições iônicas

As apatitas de fosfato possuem estrutura flexível tornando-se muito adaptável às substituições químicas. Sua fórmula geral pode ser escrita como $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{F}, \text{Cl})$ e as substituições iônicas levam a alterações estruturais, como tamanho do cristalito, e que podem afetar propriedades como solubilidade, dureza, fragilidade, tensão e estabilidade térmica. Em relação a uma classificação mineralógica, outros minerais que não possuem o componente fosfato também pertencem ao grupo da apatita pelo fato de terem a mesma estrutura das apatitas de fosfato [23].

A hidroxiapatita pura contém em sua célula unitária duas unidades da fórmula $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, tendo sua composição geralmente escrita como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e historicamente comparada aos componentes inorgânicos dos ossos e esmalte dos dentes. Simplificadamente pode-se dizer que existem quatro posições cristalográficas para substituições iônicas na célula unitária apatítica: seis sítios tetraédricos dos íons P^{5+} , sítios de Ca para quatro íons Ca^{2+} , sítios de Ca para os outros seis íons Ca^{2+} que formam ao longo do eixo *c* o chamado canal aniônico e por último o sítio do canal que é ocupado normalmente por dois ânions monovalentes (geralmente OH^- , F^- e ou Cl^-) por célula unitária [22,24,41,42]. A Figura 1 traz uma projeção de locais na estrutura da hidroxiapatita.

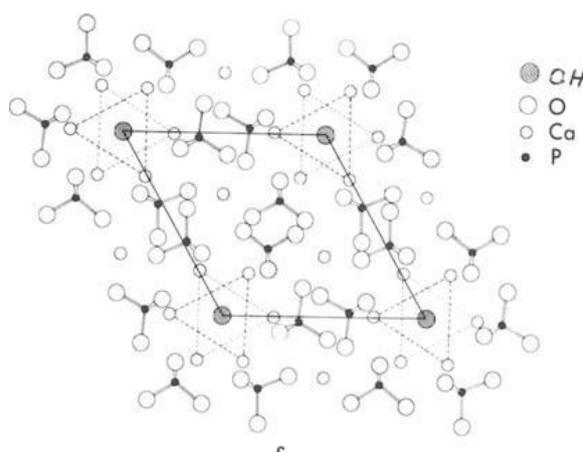


Figura 1: Projeção no plano a, b para a HA [43].

O raio iônico menor para o flúor leva à sua alocação de forma mais simétrica no canal e como consequência a fluorapatita (FA) é a apatita com maior simetria. A hidroxila não é esférica e acarreta em uma menor simetria da HA em relação à FA o que justifica a “fácil” substituição de OH^- por F^- na apatita biológica ou geológica, a exemplo da fluoretação dos

dentes. Mesmo sendo abundante no corpo humano, Cl^- não substitui facilmente OH^- na apatita dos ossos e dentes devido ao tamanho iônico e dificuldade de alocação no canal [31].

Substituições iônicas, por exemplo CO_3^{2-} ou HPO_4^{2-} por PO_4^{3-} , demandam uma segunda substituição em outros locais da rede para manutenção de neutralidade de carga. Por exemplo um íon Ca^{2+} substituído por Na^+ ou uma vacância no local de OH^- . As substituições por carbonato são classificadas como substituições “Tipo A” quando há substituição direta de OH^- por CO_3^{2-} no canal de OH^- [$(\text{CO}_3)^{2-} \rightleftharpoons 2\text{OH}^-$] e “Tipo B” a substituição de grupos PO_4^{3-} tetraédricos por CO_3^{2-} [33,44]. Acredita-se que essas substituições sejam inibidoras do crescimento da estrutura apatítica atuando como moduladora dos processos de mineralização óssea [45]. A substituição do tipo A produz uma expansão no eixo “a” e uma contração no eixo “c”, enquanto que a substituição do tipo B causa uma contração no eixo “a” e uma expansão no eixo “c”. Se as substituições do tipo B estiverem associadas a substituições de Ca^{2+} por Na^+ haverá mudanças morfológicas nos cristais da apatita [42,46].

Apatitas contendo HPO_4^{2-} são chamados de “apatitas deficientes em Ca” e as demandas de equilíbrio de carga com estas substituições podem limitar a concentração de íons hidroxila em sua rede [47]. Outra consequência, além da alteração estrutural é, por exemplo, a suscetibilidade à dissolução ácida da apatita carbonatada em relação à não carbonatada, que é relacionada em parte ao fato de que as ligações $\text{Ca}-\text{CO}_3^{2-}$ são mais fracas que as ligações $\text{Ca}-\text{PO}_4^{3-}$ [35].

Estritamente falando, a “hidroxiapatita” deveria conter os íons hidroxila descritos para sua estrutura. Por meio de técnicas analíticas observa-se, normalmente em apatitas biológicas, baixa intensidade ou ausência da banda OH^- para ossos, fraca para a dentina e de maior intensidade no esmalte dos dentes, que estão correlacionadas a funcionalidades. A apatita óssea tem cerca de duas vezes a concentração de carbonato que a apatita do esmalte e suas características físico-químicas diferem em termos de estequiometria, tamanho do cristal, desordem do cristal, parâmetros das células unitárias, características da superfície e estado de hidratação [33]. Ainda que com baixa detecção da hidroxila ou sua ausência verificada por técnicas Raman, FTIR ou NMR, difratogramas de raios-X confirmam que o arranjo estrutural é consistente com padrões da hidroxiapatita. Além da necessidade de neutralidade de carga como mecanismo de compensação de substituições iônicas e consequente vacância nos locais de OH^- observa-se que a incorporação de OH^- na rede de apatita é reduzida para amostras nanocristalinas. Pesquisadores têm se dedicado ao entendimento dos mecanismos que governam a hidroxilação associada à ordem atômica e cristalinidade de apatitas biológicas.

Uma suposição é de que a nanocristalidade bioquimicamente imposta ao osso, que provavelmente é controlada em parte pela incorporação de CO_3^{2-} ao mineral, limita a hidroxilação [37,38,45,48].

2.2 Principais produtos da decomposição térmica da hidroxiapatita

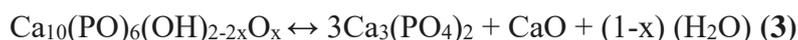
A cinética da decomposição da HA é afetada pelo tamanho das partículas, pela razão Ca/P, pela origem e pureza dos pós de partida, rotas de processamento e suas condições como pressão parcial do vapor de água durante aquecimento. Desta forma é difícil estabelecer patamares de estabilidade ou faixas precisas de temperatura para fases decorrentes da decomposição térmica da hidroxiapatita fazendo com que a análise não seja direta. Uma evolução do processo de aquecimento da hidroxiapatita e seus produtos resultantes poderia ser ordenada nas etapas resumidas nas equações (1) e (2) seguintes:



Na equação (1) temos o resultado de uma desidratação parcial de HA em oxi-hidroxiapatita, em que no limite, quando $x=1$, Oxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$) seria formada [49,50]. Uma elevação da temperatura após a desidroxilação parcial levaria à decomposição da oxi-hidroxiapatita em TCP (fosfato tricálcico) e fosfato tetracálcico conforme a reação (2) abaixo [38]:



Alguns autores consideram que a HA não desidrata completamente antes da decomposição e propõe as seguintes etapas conforme as equações (3) e (4) [51].



A formação de cal livre (CaO) é indesejável devido ao aumento de volume a partir de uma possível formação de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e assim como outros produtos da decomposição por influenciar no processo de densificação e diminuição de resistência mecânica. O TCP possui

três polimorfos: β - TCP, α - TCP e α' - TCP ordenados aqui em escala crescente de temperatura em relação à estabilidade da fase. Também possuem diferentes taxas de dissolução em meio biológico [52].

2.3 Conversão de vidro borato em hidroxiapatita

A capacidade de alguns vidros de formar uma ligação direta com tecidos vivos após a implantação é denominada bioatividade e decorre da formação de uma fase de hidroxiapatita na superfície do implante (vidro) a partir da interação com fluidos biológicos. A partir deste conceito, quanto maior for a bioatividade do material, menor será o tempo de adesão do implante ao organismo [26].

Balasubramanian e colaboradores. [12], descrevem, em relação à dissolução e bioatividade que, um vidro borato equivalente ao Bioglass® (com toda o SiO_2 substituído por B_2O_3) em solução diluída (0,02M) de K_2HPO_4 a 37 °C apresenta perda de peso bem mais alta, associada à taxa de reação com uma evolução mais rápida do pH alcançando um valor constante, quando comparado ao vidro silicato. O aumento do pH se deve ao fato de que o NaOH fortemente básico domina a fraca natureza ácida de $\text{B}(\text{OH})_3$ e $\text{Si}(\text{OH})_4$. Ainda, o valor final do pH, com o vidro silicato superior ao do vidro borato, deve-se à natureza ácida mais forte de $\text{B}(\text{OH})_3$ do que de $\text{Si}(\text{OH})_4$. As características de degradação são reguladas pela degradação da rede de borato. Com a imersão em solução fisiológica, componentes como Na_2O e B_2O_3 são liberados para formar Na^+ , BO_3^{3-} , assim como Ca^{2+} do vidro reage com o PO_4^{3-} da solução para precipitar a HA, levando a uma rápida perda de massa por parte do vidro. A rápida conversão do vidro borato em HA decorre da dissolução simultânea do Na_2O (Na^+) e o ataque da estrutura da rede B-O pela solução de fosfato, levando à nucleação “imediate” de HA e de forma contínua até que o vidro borato seja totalmente convertido em HA [12].

A Figura 2 é um diagrama esquemático do mecanismo de conversão do vidro borato em HA em uma solução diluída de fosfato.

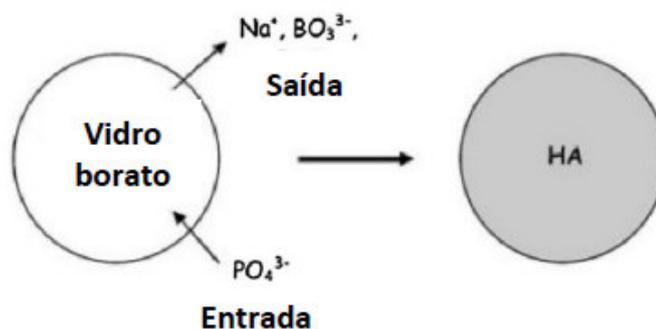


Figura 2: Ilustração de conversão de vidro de borato em HA em uma solução diluída de fosfato. Adaptado de [12].

A demanda por pesquisa das interações dos biomateriais com os organismos vivos, levou ao desenvolvimento de soluções salinas que pudessem simular o fluido corporal e com isto permitir o estudos dessas interações *in vitro*.

Kokubo e seus colaboradores, no início dos anos 90, desenvolveram um simulador de fluido corpóreo, denominado SBF (*Simulated Body Fluid*), de concentrações iônicas e pH próximos aos do plasma sanguíneo, que permitiu a realização de testes *in vitro* com grande similaridade aos testes *in vivo* realizados em cobaias [53]. A tabela 2 relaciona as composições químicas do plasma sanguíneo e a solução SBF de Kokubo e Takadama.

Tabela 2: Concentração iônica nominal do SBF em comparação com a existente no plasma sanguíneo [40].

Íon	Concentração iônica (mM)	
	SBF pH – 7,4	Plasma sanguíneo pH (7,2-7,4)
Na ⁺	142	142
K ⁺	5	5
Mg ⁺	1,5	1,5
Ca ⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	147,8	103
HCO ₃ ⁻	4,2	27
HPO ₄ ²⁻	1	1
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5

2.4 Compósito

Embora materiais multifásicos, tais como madeira, tijolos de argila reforçada com palha, conchas marinhas e mesmo ligas como o aço fossem conhecidas a milênios, o reconhecimento do conceito de combinar materiais diferentes durante a fabricação levou à identificação dos compósitos, em meado do século 20, como uma nova classe distinta dos metais, cerâmicos e polímeros familiares [54].

A microestrutura de um compósito é não uniforme, descontínua e multifásica, no sentido de que ele é uma combinação de dois ou mais materiais distintos, que não se dissolvem ou perdem suas identidades individuais, como em misturas ou soluções sólidas [55]. Ao microscópio, poderão ser identificadas as características que distinguem seus componentes [56]. De maneira geral, um compósito pode ser considerado como qualquer material multifásico que exhibe uma proporção significativa das propriedades das fases constituintes, tal que seja obtida a melhor combinação de propriedades. Uma ilustração é a madeira, composta de cadeias fibrosas de moléculas de celulose (resistentes e flexíveis) em uma matriz de polímero orgânico de lignina (mais rígida). Quando composto de apenas duas fases, uma é denominada matriz, que envolve a segunda fase, denominada frequentemente por fase dispersa. De acordo com esse “princípio da ação combinada”, melhores arranjos de propriedades são criadas por uma combinação acertada de dois ou mais materiais distintos [54,57,58].

Há referência de diferentes formas de classificação e categorização dos compósitos na literatura [54,55]. Inicialmente, muitos compósitos foram projetados para melhorar combinações de características mecânicas, tais como rigidez, tenacidade e resistências às condições do ambiente e de temperaturas elevadas [54]. A Figura 3 apresenta um esquema evidenciando a divisão dos compósitos segundo o mecanismo de reforço.

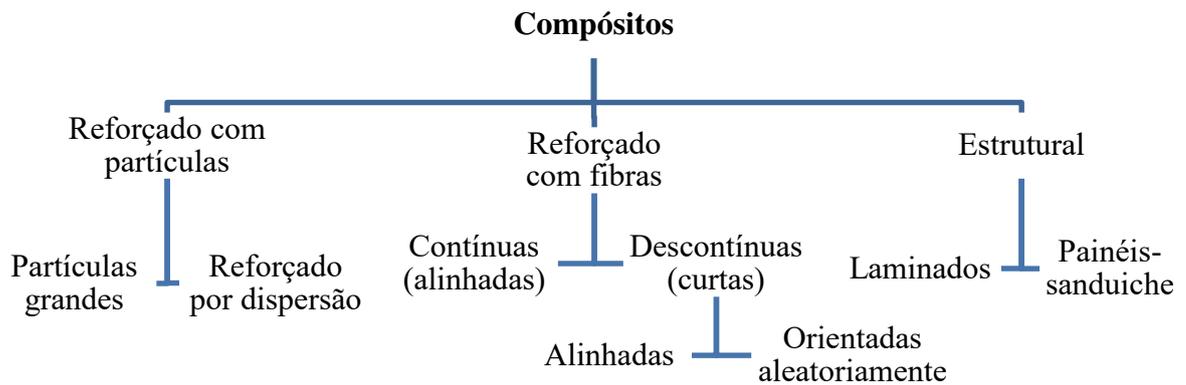


Figura 3: Esquema de classificação para vários tipos de compósitos, segundo o mecanismo de reforço. O termo grande é utilizado para indicar que as interações partícula-matriz não podem ser tratadas ao nível atômico ou molecular. Adaptado de [59].

Dipen Kumar e colaboradores [55] propõem uma classificação mais abrangente, a partir da ampla variedade de materiais compósitos. A figura x apresenta uma classificação baseada na escala, nos tipos de reforços, na fase matriz e aplicação como biocompósitos, que englobam os biodegradáveis, os ecológicos e para aplicações biomédicas.

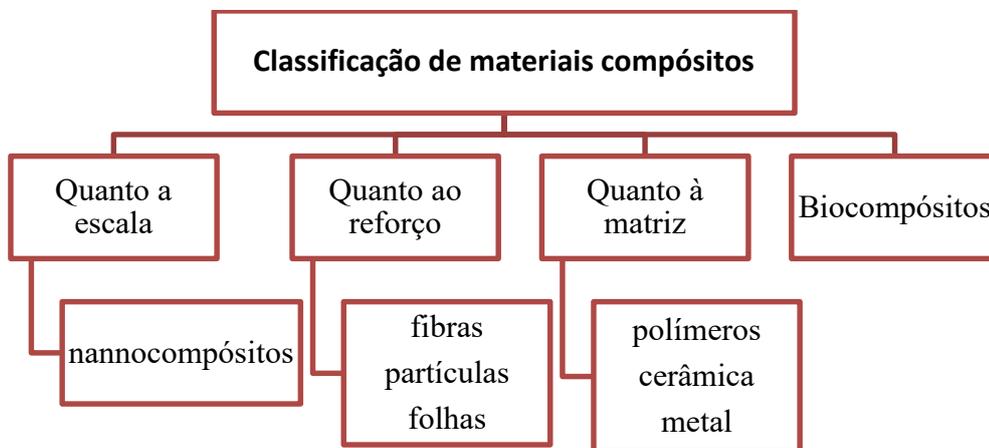


Figura 4: Esquema de classificação dos compósitos baseado na escala, tipos de reforços e matriz e em biocompósitos. Adaptado de [55].

A estrutura óssea, como uma dispersão de partículas minerais (duras e frágeis) incorporadas em uma matriz orgânica (resistente, porém macia), classifica-se como um compósito que lhe confere propriedades mecânicas particulares. A fase mineral é uma bioapatita [hidroxiapatita substituída por carbonato e de fórmula aproximada $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-y}(\text{CO}_3^{2-})_{x+y}$] que compõe aproximadamente 60% da massa total do tecido ósseo. Da

massa restante, a fase orgânica, compreendendo lipídios e proteínas (principalmente colágeno tipo I), representa 25%; constituintes celulares variados 2% e água 9,7 %. A composição mineralógica óssea, ou apatita biológica, irá variar entre indivíduos conforme sua função, o metabolismo celular, a idade, dieta e doenças [49,55,60,61].

O componente inorgânico resiste às forças de compressão, enquanto que, o componente orgânico confere ao osso capacidade de resistência às forças de tensão [24]. A Figura 3 mostra um tecido ósseo (tíbia) processado por desmineralização e calcinação em que quando desmineralizado se mostra maleável sem se fraturar e quando a fase orgânica é removida por calcinação, permanecendo a fase mineral, o osso perde a elasticidade tornando-se frágil.

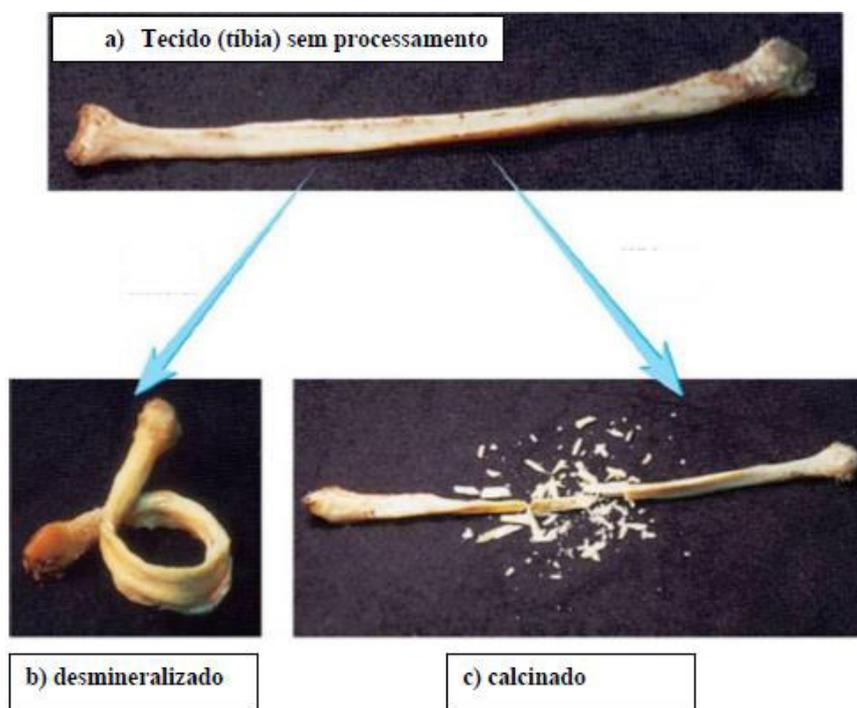


Figura 5: a) tecido ósseo (tíbia) sem processamento, b) processado por desmineralização e c) processado por calcinação. Adaptado de [61].

2.4.1 Compósitos hidroxiapatita/vidros

Entre os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita é considerada a mais estável em contato com os fluidos corporais. O desenvolvimento de compósitos de hidroxiapatita e/ou fosfato de cálcio/vidro bioativo permite a combinação sinérgica de fases; uma fase estável (HA) e uma

fase reabsorvível (vidro bioativo), melhorando a dissolução do sistema final aprimorando sua resposta biológica [58,62].

A atividade antibacteriana dos íons Ag^+ é reconhecida [25,27,63,64] e biocerâmicas e vidros bioativos são estruturas/arca-bouços estudados como uma estratégia promissora de liberação de íons terapêuticos [8,63,65,66], em acordo com a perspectiva de combinação de propriedades na conceituação dos compósitos.

Fatores como a composição do vidro utilizado, sua proporção na mistura com a HA, tamanho de partículas dos precursores e curva de tratamento térmico levam à formação de fases secundárias, seja por difusão atômica a partir da combinação dos componentes, seja como produto da decomposição da hidroxiapatita ou da cristalização do vidro durante o tratamento térmico. A adição de vidro promove níveis mais altos de fases secundárias no compósito. Alterações na porosidade decorrente do tratamento térmico se somam a esses efeitos e afetarão as propriedades mecânicas e biológicas do compósito formado, de maneira que sua análise não é trivial. Como exemplo de substituição iônica, hidroxiapatita dopada com estrôncio e boratos foi obtida por Kolmas e colaboradores [67], a partir de métodos de síntese a úmido e a seco a partir de precursores contendo fosfatos, boratos e estrôncio. Boro-hidroxiapatita também foi obtida por Ternane e colaboradores [68], a partir de reação no estado sólido da mistura prensada de precursores contendo cálcio, fósforo e boro.

Outra perspectiva é a melhora da sinterabilidade e densificação do compósito a partir da adição do vidro, permitindo ganhos de resistência mecânica. A formação de novas fases pode implicar em alterações de propriedades mecânicas e biológicas [58]. É relatado que o vidro atua também como inibidor do crescimento de grão, melhorando as propriedades mecânicas do compósito. Uma retração linear do compósito indica o vidro agindo como auxiliar de sinterização, eliminando ou minimizando a porosidade e contribuindo para a melhora das propriedades mecânicas [69].

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste tópico estão descritos os procedimentos utilizados na preparação das amostras para ensaio da bioatividade *in vitro* e as técnicas de caracterização utilizadas antes, e após o ensaio. Para as caracterizações foram feitos: ensaio de bioatividade com medidas de pH do SBF, análise visual dos compósitos pós imersão em SBF, medidas de difração de raios-X (DRX), cálculo do tamanho de cristalito, espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), cálculo do índice de cristalinidade por FTIR e medidas de densidade.

3.1 Preparação das amostras

As amostras de vidro borato bioativo dopados com prata foram preparadas no Laboratório de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (LEOF) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) - *campus* avançado, Imperatriz. O preparo foi realizado pelo método fusão/resfriamento (melt-quenching), a partir dos componentes e percentuais, apresentados na tabela 3, em massa (% wt) e em mol. Os reagentes são da marca SIGMA-ALDRICH, com grau de pureza $\geq 99,98\%$.

Tabela 3: Teor percentual dos componentes na amostra em massa e mol.

Componentes	B ₂ O ₃	P ₂ O ₅	CaO	Na ₂ O	CaF ₂	Ag ₂ O
% wt	59,29	4,06	7,62	17,3	10,06	1,66
% mol	59,5	2	9,5	19,5	9	0,5

Todos os componentes para produção do vidro e preparação dos compósitos foram pesados em balança analítica, modelo AUW220D da marca SHIMADZU. Para produção do vidro, é realizada a calcinação prévia do carbonato de cálcio (CaCO₃) à 900 °C em forno de atmosfera a ar da marca JUNG (modelo LF0061401), em cadinho de platina, para obtenção do CaO. Após a obtenção do CaO e pesagem dos demais componentes, os mesmos são homogêneos em almofariz de ágata, transferidos para um cadinho de platina e levados ao forno para fusão a 1100 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. Ao atingir o patamar de 1100 °C, o vidro permanece nesta temperatura por 90 minutos, e em seguida o cadinho é agitado para homogeneização da massa fundida e eliminação de possíveis bolhas. Terminada a fusão, a temperatura é elevada até 1200 °C para garantir a homogeneidade total do fundido e melhora da fluidez, facilitando o seu verter em molde de aço inoxidável, previamente

aquecido a 420 °C, temperatura próxima e abaixo da temperatura de transição vítrea. Em seguida, o vidro é desmoldado e permanece em tratamento térmico a 450 °C para redução de tensões residuais do choque térmico (alívio de tensões) por 240 minutos, com subsequente resfriamento interno ao forno até atingir a temperatura ambiente.

As amostras de vidro foram pulverizadas em almofariz de ágata para obtenção do pó, posteriormente classificadas por faixa granulométrica entre 77 e 98 µm a fim de fixar parâmetros quanto à repetibilidade dos ensaios.

A HA em pó, produzida a partir de calcinação, entre 750°C e 950°C, e moagem de ossos de peixe, foi cedida pelo Grupo de Estudos de Fenômenos Fototérmicos, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), e produzida e caracterizada conforme patente de invenção PI 0506242-0 A2 de Weinand [24]. As amostras de HA foram submetidas ao mesmo processo de classificação por tamanho, executado para o vidro, com o objetivo de fixar parâmetros de preparação da pastilha de compósito.

A massa definida para cada pastilha prensada foi de 350 mg. Foi utilizada uma carga de 4 toneladas por um período de 60s para uma conformação que permitisse manipulação sem quebra das peças, e também evitasse a fratura de pastilhas durante a prensagem, mantendo-se referência à classificação inicial. Os compósitos tratados a 1000 °C nas proporções de 25% e 50%, em massa de vidro, foram pastilhados e levados ao forno com uma camada de HA como material de sacrifício, sob e sobre, a pastilha para evitar a adesão do vidro fundido sobre as placas cerâmicas. Após a sinterização, essas amostras foram desbastadas em lixas de gramatura 1600 e 2000 para retirada da camada excedente aderida de HA e tiveram suas dimensões aferidas em micrômetro durante e depois dos desbastes.

Na tabela 4 estão a codificação e as principais características de preparo das amostras utilizadas no estudo.

Tabela 4: Identificação das amostras estudadas com sua codificação associada à proporção de vidro e HA e temperatura de sinterização.

Identificação da amostra	Proporção em massa (%)		Temperatura de sinterização (°C)
	vidro	hidroxiapatita	
100VB_530	100	0	530
50VB_530	50	50	530
50VB_1000	50	50	1000
25VB_530	25	75	530

25VB_1000	25	75	1000
100HA_1000	0	100	1000
100HA_25	0	100	Não sinterizada. Compactada a temperatura ambiente

As rampas de tratamento térmico foram definidas como: grupo I - aquecimento a uma taxa de 10 °C/minuto até atingir a temperatura de 530 °C, a fim de evitar a cristalização de qualquer fração do vidro, e uma permanência nesta temperatura por 10 minutos, com subsequente resfriamento dentro do forno; grupo II – aquecimento a uma taxa de 10 °C/minuto até atingir 1000 °C e permanência nesta por 2 horas e subsequente resfriamento em forno. O vidro borato utilizado neste trabalho, teve sua temperatura de transição vítrea determinada por DTA, igual a 512 °C, no trabalho de Lopes da Silva e colaboradores [27]. Para codificação das amostras, em todos os casos, a extensão adicionada tem o mesmo significado: C (amostra controle, tratadas termicamente na temperatura e composição indicadas, para serem caracterizadas antes da imersão em SBF), 14d (amostras imersas em SBF por 14 dias) e 28d (amostras imersas em SBF por 28 dias).

3.2 Técnicas de caracterização

3.2.1 Ensaio de bioatividade e medida do pH do SBF

A preparação de SBF necessita de uma sequência metódica de procedimentos, e foi preparada seguindo rigorosamente o método de Kokubo e Takadama [53].

As amostras pastilhadas e sinterizadas tiveram suas dimensões medidas para cálculo do volume de solução SBF a ser utilizado durante o período de imersão. O volume da solução foi calculado de acordo com a equação (5) [53].

$$V_s = \frac{V_a}{10} \quad (5)$$

em que,

V_s: volume de SBF a ser utilizado (ml);

V_a: área aparente da superfície da amostra (mm²).

As amostras foram fixadas em suportes e condicionadas em tubos, ambos de polipropileno, de maneira que o máximo da área superficial da pastilha tivesse contato com a solução conforme Figura 4. O tubo foi fechado e colocado em banho térmico (banho-maria) a uma temperatura de 36,5 °C mantida durante todo o período de imersão.

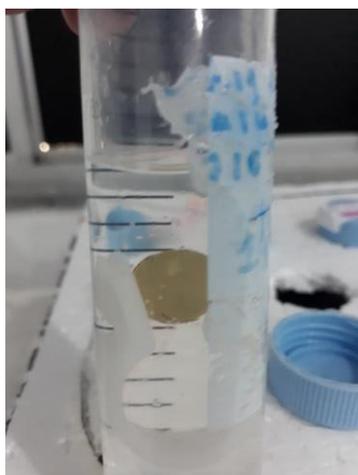


Figura 6: Foto da pastilha de compósito em tubo de Falcon.

Foram analisados 2 períodos de imersão, 14 e de 28 dias, e as amostras foram colocadas em solução SBF em datas específicas, de tal forma que todas fossem retiradas dos tubos de falcon no mesmo dia, ou seja, amostras ensaiadas em intervalo de 14 dias entram em imersão no 14º dia da imersão do grupo a ser ensaiado por 28 dias.

A variação do pH é uma medida das concentrações iônicas decorrentes das interações (trocas iônicas) entre os materiais em teste e o SBF. Foi feita aferição diária do pH da solução em que estavam imersas as pastilhas, e após 14 e 28 dias de imersão, as amostras foram retiradas do SBF, secas ao ar, e armazenadas para caracterizações posteriores. Os valores de pH foram obtidos utilizando um pHmetro microprocessado de bancada – PG1800 da marca Gehaka, com precisão de 0,01.

3.2.1.2 Análise visual dos compósitos pós imersão em SBF

A Figura 7 apresenta as imagens das pastilhas dos compósitos 25VB e 50VB tratados a 530 e 1000 °C, após a imersão em SBF nos períodos de 14 e 28 dias. A coloração branca para os compósitos tratados a 1000 °C é natural das mesmas a partir da sua elaboração/tratamento térmico, ou seja, antes da imersão em SBF, e possivelmente é

decorrente da utilização de pó de sacrifício (HA) em mesma quantidade (150 mg), colocados sob e sobre as amostras antes da sinterização, a fim de evitar sua adesão à placa cerâmica. As pastilhas foram desbastadas após a sinterização e antes da imersão, até a espessura aproximada dos compósitos tratados a 530 °C.

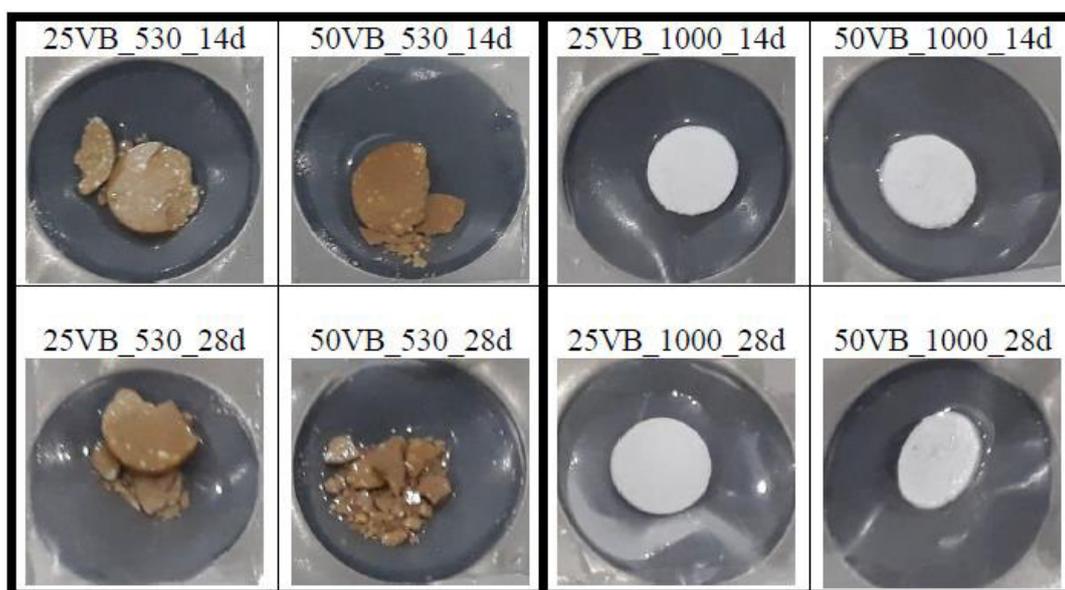


Figura 7: Imagens das pastilhas dos compósitos 25VB_530, 25VB_1000, 50VB_530 e 50VB_1000, após a imersão em SBF, em períodos de 14 e 28 dias.

3.2.2 Difração de raios – X

As radiações de raios-X são ondas eletromagnéticas que apresentam comprimento de onda em torno de Ângstron (Å), da mesma ordem de grandeza das distâncias interatômicas, as quais interagem com esses átomos produzindo o fenômeno de difração permitindo a identificação da composição do material [70]. A técnica de difração de raios-X (DRX) é largamente utilizada no estudo de materiais no estado sólido, pois permite a determinação de ordem a longo alcance na estrutura dos materiais, inerentes à natureza, tamanho e orientação de suas unidades básicas estruturais [71,72].

A caracterização por difração de raios-X foi realizada no Laboratório de Difração de Raios-X (LDRX) da Unidade de Preparação e Caracterização de Materiais (UPCM) da Universidade Federal do Maranhão. As amostras em forma de pastilhas foram medidas com passos de 0,02° durante o intervalo de tempo de 2 segundos, num intervalo angular de 10° a

60° em 2θ em um difratômetro *PANalytical* modelo *Empyrean*, operando com radiação Cu Kα (λ= 0,15418 nm), geometria Bragg-Brentano e monocromador de grafite pirolítico.

3.2.2.1 Tamanho de cristalito

A partir da largura a meia altura (FWHM), obtida utilizando o software gráfico *Origin* 2018 e função Pseudo-Voigt, foi calculado o tamanho de cristalito por meio da equação (6) de Scherrer [73].

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

Na qual, D corresponde ao diâmetro médio das partículas, o valor de k é uma constante que varia em função do formato das partículas (k = 0,94), λ é o comprimento de onda da radiação eletromagnética (radiação emitida pelo cobre, λ_{cu} = 1,5406 Å), θ é o ângulo de difração e β é a largura na metade da altura do pico de difração (FWHM).

3.2.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR se baseia na interação eletromagnética com a matéria, em que a diferença entre radiação incidente e transmitida é a energia absorvida que resultará em movimentos de torção, deformação, rotação e vibração entre átomos nas moléculas. As bandas características geradas a partir da absorção de radiação infravermelha detectadas pelo aparelho, decorrem da formação e/ou variação de momento de dipolo elétrico resultante dos momentos dipolos entre todos os átomos da molécula usadas como “impressão digital” para caracterizar o de material. A técnica exibe alta sensibilidade exigindo pequenas quantidades de material das amostras, podendo ser utilizada também como análise complementar à caracterização por difração de raios-X [33,74,75].

As medidas de FTIR foram realizadas no LEOF II, por meio de um espectrômetro marca Bruker, modelo Vertex 70V. O modo de análise foi o de absorção, usando pastilhas de KBr (brometo de potássio) com massa total de 200 mg em que 1% da massa é do material a ser estudado. Os parâmetros foram de 32 varreduras em uma faixa de 400 – 4000 cm⁻¹, com resolução espectral de 4 cm⁻¹ em temperatura ambiente. As medidas são realizadas em vácuo, minimizando as contribuições atmosféricas e de umidade.

3.2.3.1 Índice de cristalinidade (IC) por FTIR

O índice de cristalinidade é definido como um indicador quantitativo de cristalinidade, e está relacionado ao tamanho do cristal e ao grau de ordem dentro dos cristais [76]. O cálculo do índice de cristalinidade, a partir das medidas de FTIR, foi realizado pelo método semiquantitativo de Weiner e Bar-Yosef [77], que utiliza o grau de resolução das bandas do modo de deformação assimétrico (ν_4) de PO_4^{3-} entre aproximadamente 602 e 569 cm^{-1} . O método fundamenta-se no fato do fosfato de cálcio amorfo (FCA) possuir um largo singlete na frequência de deformação assimétrica (ν_4) para o íon ortofosfato, em torno de 600 cm^{-1} [24].

Para a aplicação do método, procede-se a correção da linha base entre 450 e 750 cm^{-1} no modo de absorbância e mede-se a partir desta, as intensidades I_1 e I_2 das vibrações ν_4 (PO_4^{3-}) em torno de 602 e 569 cm^{-1} [77]. O índice de cristalinidade (IC) é, então, obtido pela equação [77,78] (7):

$$IC = (I_1 + I_2) / I_3 \quad (7)$$

Em que a intensidade I_3 é medida a partir da linha base até o vale que separa essas duas bandas de absorção [77,78]. Os procedimentos para a obtenção destes valores no espectro de absorbância estão ilustrados na Figura 8.

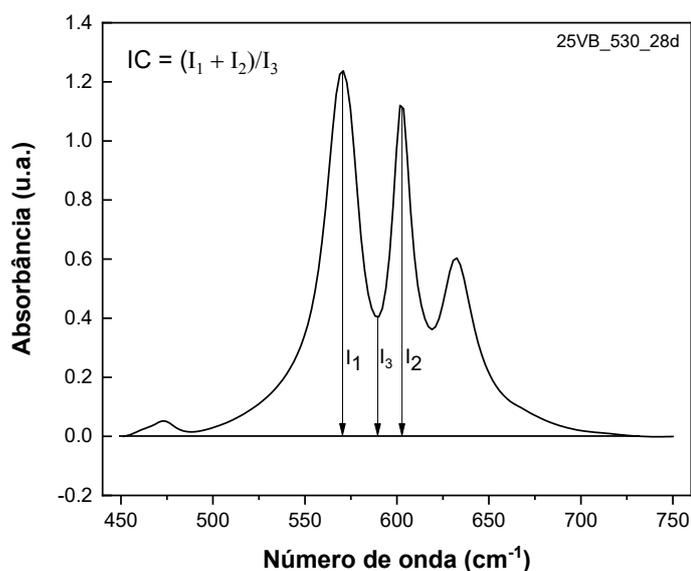


Figura 8: Figura esquemática para as medidas das intensidades das bandas de absorção (ν_4) de PO_4^{3-} entre 450 e 750 cm^{-1} , para o cálculo do índice de cristalinidade por FTIR.

3.2.4 Densidade (ρ)

A densidade é uma propriedade física dos materiais e utilizada com o intuito de compreender a estrutura do material, indicando, por exemplo, o nível de porosidade interna [58]. É representada por meio da relação entre a quantidade de massa e uma unidade de volume ocupada por esta massa, podendo ser expressa em quilograma por metro cúbico (kg/m^3) ou grama por centímetro cúbico (g/cm^3). O princípio de Arquimedes, por meio da equação (8) [79], foi utilizado para calcular a ρ das amostras,

$$\rho_{\text{pastilha}} = \frac{m_{\text{ar}}}{m_{\text{ar}} - m_{\text{líquido}}} * \rho_{\text{líquido}} \quad (8)$$

em que m_{ar} é massa da pastilha em ar e $m_{\text{líquido}}$ é a massa da pastilha imersa em um líquido de densidade e temperatura conhecidas. O líquido usado nesse experimento foi a água destilada, $\rho_{\text{água}} = 0,99757 \text{ g/cm}^3$ a $23 \text{ }^\circ\text{C}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados e a discussão das caracterizações por: difração de raios-X dos materiais precursores (hidroxiapatita e vidro borato) e dos compósitos, antes e após a imersão em SBF; espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier para os compósitos, antes e após imersão em SBF; e medidas de pH durante o período de imersão dos materiais em SBF.

4.1 Estudo dos materiais precursores e dos compósitos pré-imersão em SBF

4.1.1 Difração de raios-X dos materiais precursores

Na Figura 9 são apresentados: o difratograma da amostra de vidro previamente triturado, classificado por tamanho, compactado e tratado termicamente a 530°C (100VB_530), Figura 9a; hidroxiapatita classificada por tamanho e compactada (100HA_25), na Figura 9b; e padrão de difração correspondente à ficha padrão ICSD (Inorganic Crystal Structure Database) n° 087670 [80], na Figura 9c.

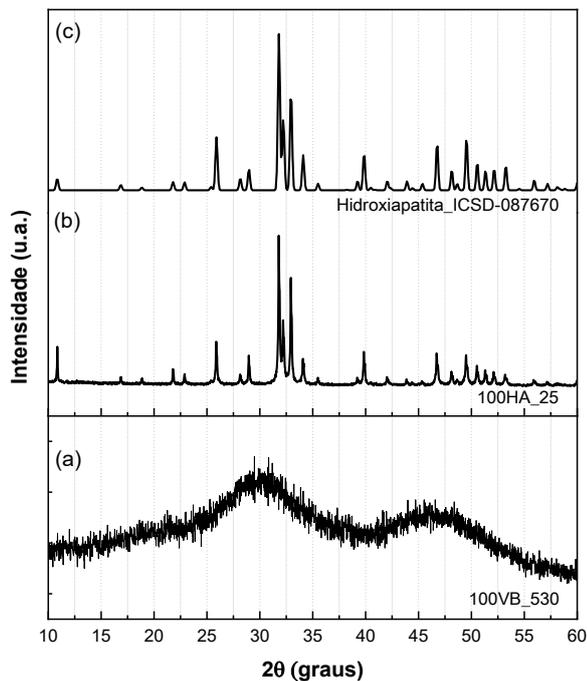


Figura 9: Difratogramas dos materiais precursores utilizados na elaboração de compósitos e ficha padrão de referência: a) 100VB_530, b) 100HA_25, c) ficha padrão ICSD 087670 para HA.

Para a amostra 100VB_530, verifica-se bandas alargadas e de baixa intensidade centralizadas em $\sim 30^\circ$ e $\sim 46^\circ$ 2θ , características de vidros boratos, comprovando o caráter amorfo da mesma [15,25]. A constatação desta estrutura amorfa teve por objetivo a distinção dos grupos de amostras a serem analisadas quanto ao efeito da temperatura, desenvolvimento de fases cristalinas e seu comportamento em ensaio de bioatividade *in vitro*.

O difratograma da amostra 100HA_25, previamente calcinada entre 750°C e 950°C em etapa de seu processo de obtenção, passou pelo mesmo procedimento de classificação dos pós e compactação das outras amostras, concorda com a ficha padrão ICSD 087670, não apresentando fases adicionais. A estequiometria associada à ficha indicada é $\text{Ca}_{10.132}(\text{PO}_4)_{5.958}(\text{OH})_{3.258}$ apresentando relação Ca/P (1,70), próxima a encontrada no estudo do detentor da patente PI0506242-0 A2 [28] e fornecedor da HA utilizada neste estudo.

A Tabela 5 relaciona algumas posições 2θ (graus) de picos característicos de hidroxiapatita, referenciados pela ficha padrão ICSD nº 087670, e as posições observadas no difratograma da amostra 100HA_25, demonstrando concordância.

Tabela 5: Ângulos 2θ (graus) para amostra 100HA_25 e suas posições correspondentes, na ficha padrão ICSD 087670 de HA.

Ângulo 2θ (graus)	
Ficha ICSD-087670	Difratograma 100HA_25
25,88	25,89
31,78	31,81
32,20	32,21
32,92	32,95
34,07	34,09

4.1.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos materiais precursores.

Na Figura 10 são apresentados os espectros de absorção no infravermelho para os materiais precursores: Figura 10a referente a hidroxiapatita 100HA_1000_C e Figura 10b referente ao vidro, 100VB_530_C.

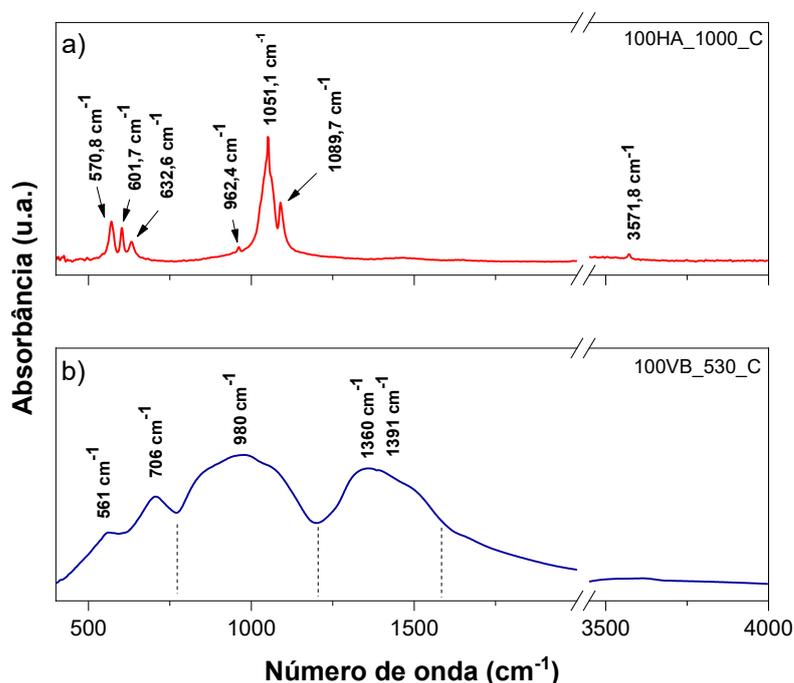


Figura 10: Espectros de FTIR dos materiais precursores, a) 100HA_1000_C e b) 100VB_530_C com indicação do número de onda nos máximos das bandas e picos.

O espectro mostra para 100HA_1000_C, na Figura 10a, os picos característicos da hidroxiapatita em: 570,8 e 601,7 cm^{-1} (deformação angular antissimétrica ν_4 de PO_4^{3-}), 962,4 cm^{-1} (alongamento simétrico ν_1 de PO_4^{3-}), 1051,1 e 1089,7 cm^{-1} (alongamento antissimétrico

ν_3 de PO_4^{3-}). Apresenta também as bandas do grupo OH^- características de hidroxiapatita em $632,6 \text{ cm}^{-1}$ (deformação O-H) e $3571,8 \text{ cm}^{-1}$ (alongamento O-H), além de um ombro centralizado em 1466 cm^{-1} , atribuído ao modo de estiramento assimétrico de CO_3^{2-} [24,45,81]. Os difratogramas apresentados anteriormente, e os espectros de absorção, confirmam uma hidroxiapatita cristalina.

Para a amostra 100VB_530_C, espectro apresentado na Figura 10b, são observadas bandas centradas em: 561 cm^{-1} , atribuída ao modo de flexão O-P-O; 706 cm^{-1} atribuída à flexão B-O de unidades BO_3 ; 980 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} e 1391 cm^{-1} , atribuídas a vibrações dos grupos BO_4 [25,27,82]. O caráter amorfo está caracterizado por difração de raios-X para o mesmo material, e os modos vibracionais identificados, associados aos grupos PO_4^{3-} do componente P_2O_5 em menor concentração (2% em mol), e unidades BO_3 e BO_4 do componente formador de rede, B_2O_3 , em maior concentração (59,5% em mol) no vidro base utilizado na formulação dos compósitos. Hide e colaboradores [83], em estudo sobre estrutura e bioatividade de um sistema com ampla faixa de composição, expressa pela equação $x\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 30\text{Na}_2\text{O} \cdot (70-x)\text{P}_2\text{O}_5$, em que $0 \leq x \leq 70\%$ em mol, concluem que, para faixas de concentrações maiores de B_2O_3 ($70 \leq x \leq 50\%$), as estruturas de boro são preponderantes.

4.1.3 Análise por difração de raios-X (DRX) dos compósitos pré-imersão em SBF

Os resultados de difratometria de raios-X para as amostras 25VB_530_C e 50VB_530_C, antes da imersão em SBF, estão representados na Figura 11, juntamente com a ficha padrão ICSD 87670 e o difratograma da amostra controle 100HA_25.

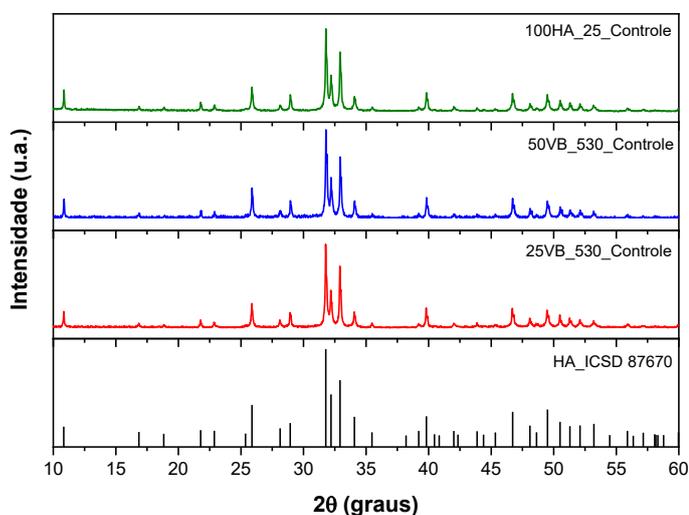


Figura 11: Difratogramas das amostras 25VB_530_C, 50VB_530_C, 100HA_25 e ficha padrão ICSD 87670 para HA.

Os difratogramas apresentados na Figura 11 indicam que não houve formação de novas fases por reação de estado sólido após prensagem e aquecimento das pastilhas a 530°C. Os difratogramas dos compósitos 25VB_530_C e 50VB_530_C indicam a presença da hidroxiapatita e sem grandes alterações com o aumento da proporção de vidro. A Figura 12, que é uma ampliação da região entre 30° e 37° 2θ da sobreposição das mesmas curvas da Figura 11, mostra que não houve grandes alterações na intensidade ou deslocamento dos picos associados à hidroxiapatita, quando comparada a seus compósitos.

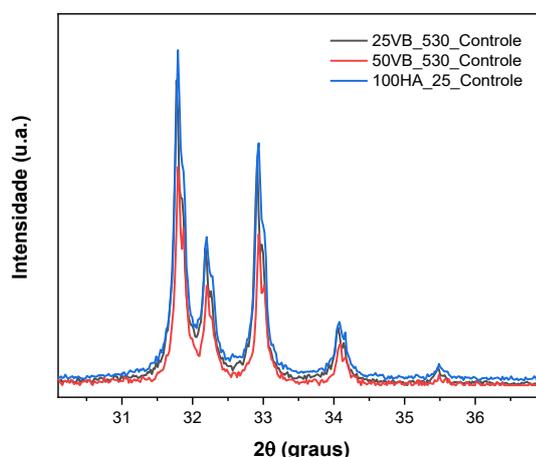


Figura 12: Sobreposição das curvas 25VB_530_C, 50VB_530_C e 100HA_25

A partir da largura a meia altura (FWHM) e da equação de Scherrer [73] foi calculado o tamanho de cristalito para o pico em torno de 31,8° 2θ, correspondente ao plano (hkl) = (211) e pico de maior intensidade para as três amostras. O processo de compactação, aumento do teor de vidro e/ou temperatura de tratamento térmico não indicam alterações significativas no tamanho dos cristalitos. Os valores calculados, estão na tabela 6.

Tabela 6: Tamanho de cristalito para o pico em torno de 31,8° 2θ, correspondente ao plano (hkl) = (211) e pico de maior intensidade relacionado à HA.

Amostra	Posição 2θ (graus)	Tamanho (nm)
100HA_25	31,81	52,40
25VB_530_C	31,79	54,35
50VB_530_C	31,81	53,54

Com o tratamento térmico a 1000 °C, para as composições 25VB_1000_C e 50VB_1000_C, mantém-se a estrutura da hidroxiapatita, confirmada por comparação à ficha

padrão ICSD 87670 e há o surgimento de nova fase, fosfato de cálcio e sódio (NaCaPO_4), que concorda em ambos os compósitos em uma série de ângulos, dentre os quais, foram destacados na tabela 7, os de maior intensidade relativos à fase NaCaPO_4 de ficha padrão ICSD 35629 [84] e também os picos correspondentes à HA, de ficha padrão ICSD 87670. Os difratogramas e respectivas fichas padrão estão representados na Figura 13.

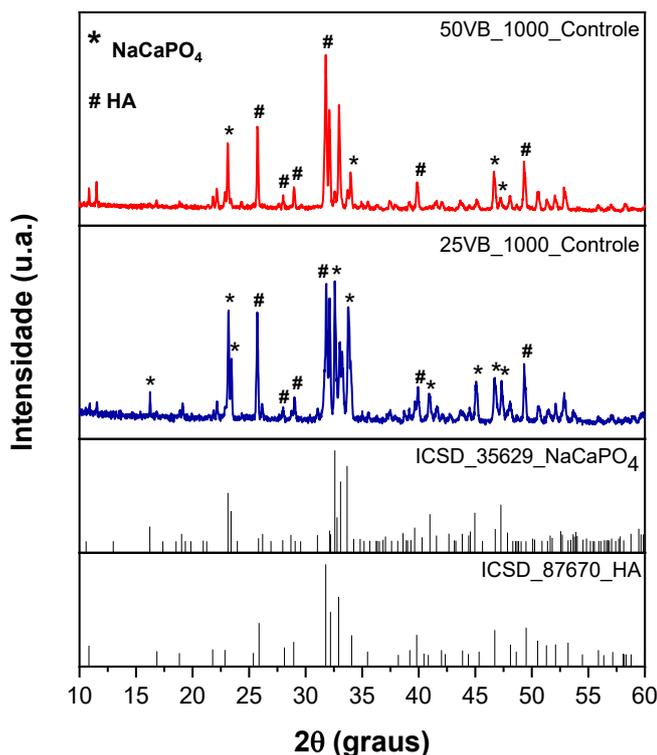


Figura 13: Difratogramas das amostras 25VB_1000_C e 50VB_1000_C, antes da imersão em SBF, e fichas padrões correspondentes às fases identificadas.

Tabela 7: Picos de maior intensidade relativos às fases HA e NaCaPO_4 , dentre os listados nas suas respectivas fichas padrões, ICSD 87670 e ICSD 35629, e as respectivas ocorrências identificadas nos difratogramas dos compósitos 25VB_1000_C e 50VB_1000_C.

2θ (graus)			
HA_ICSD 87670	NaCaPO ₄ _ICSD 35629	25VB_1000_C	25VB_1000_C
31,78	-	31,82	31,78
32,20	-	32,12	32,12
-	32,58	32,60	32,58
32,92	-	33,06	32,97
-	33,08	33,22	-
-	33,67	-	33,66
34,07	-	33,81	33,97

Para 100HA_1000 surge um pico de maior intensidade em 2θ $23,11^\circ$ e de menor intensidade em $26,00^\circ$, $41,47^\circ$ e $47,21^\circ$ quando comparado a 100HA_25, como é mostrado na Figura 14. Este pico mais intenso em 2θ igual $23,11^\circ$ é coincidente com o pico de maior intensidade da ficha padrão ICSD 15893 [85] para H_3PO_3 indicada como candidato, além da fase majoritária HA de código ICSD 87670. Na presença do vidro, que contém sódio (Na), a fase que se origina em decorrência do tratamento térmico a $1000^\circ C$ para os compósitos contendo 25% e 50% de vidro, é $NaCaPO_4$, como citado anteriormente. Neste caso, o evento mais provável é a difusão dos íons sódio presentes na fase vítrea precursora para formação da nova fase, como relatado por Kangasniemi e colaboradores [86]. Os difratogramas não indicam picos adicionais de outras fases que poderiam ser decorrentes da decomposição térmica da hidroxiapatita, como $Ca_3(PO_4)_2$, CaO ou $CaCO_3$.

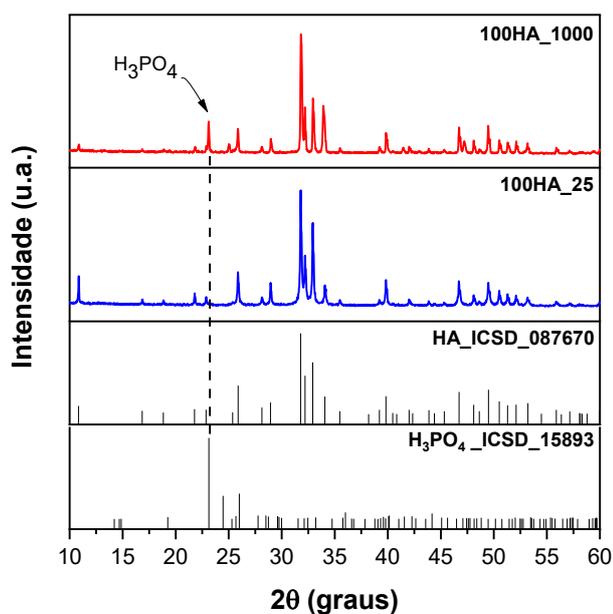


Figura 14: Difratogramas de: 100HA_1000, 100HA_25 e ficha padrão correspondente HA_ICSD_087670, ficha padrão ICSD_15893 para H_3PO_3 .

4.1.4 Análise por FTIR para os compósitos pré-imersão em SBF

As medidas de FTIR foram realizadas a fim de verificar alterações decorrentes do tratamento térmico nas diferentes temperaturas e composições, complementando os resultados apresentados pelas análises de difração de raios-X. As amostras de material para medidas de FTIR foram obtidas raspando-se a superfície dos compósitos.

A Figura 15 apresenta os espectros para os compósitos 25VB_530_C e 50VB_530_C antes da imersão em SBF, em que estão indicadas as vibrações correspondentes aos grupos fosfato, carbonato e hidroxila, característicos da HA utilizada na formulação dos compósitos.

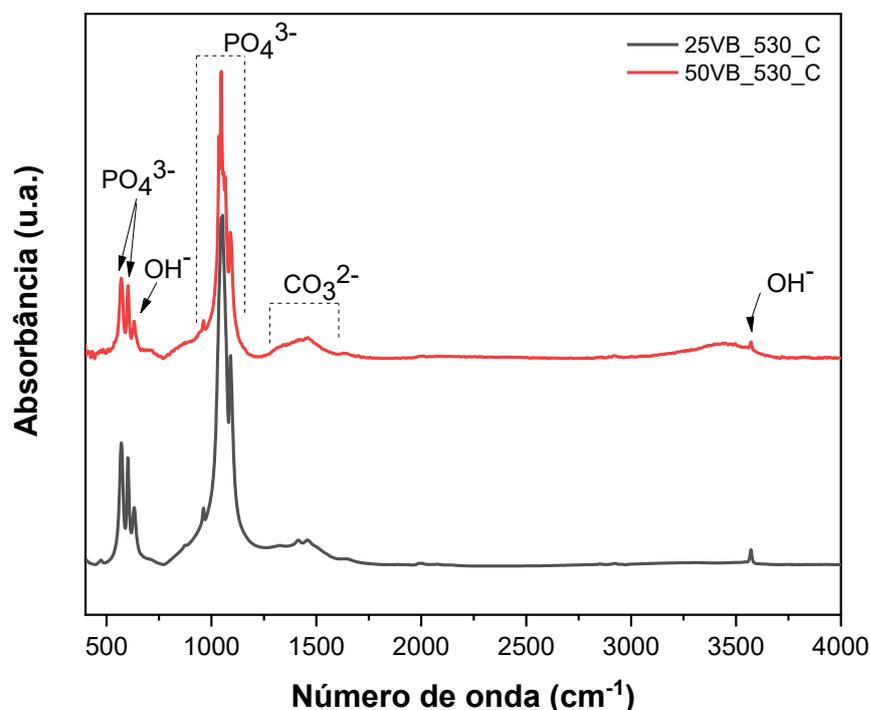


Figura 15: Espectros de FTIR das amostras dos compósitos 25VB_530_C e 50VB_530_C, antes da imersão em SBF, com destaque dos picos e bandas observados no material e identificados como características da HA.

Na temperatura de 530 °C não há cristalização para o vidro precursor e predominam nos espectros os modos vibracionais característicos da HA componente dos compósitos. Para o compósito com menor proporção de vidro, 25VB_530_C, os picos característicos da HA são mais bem definidos e de maior intensidade, quando comparados a 50VB_530_C, que têm uma menor proporção de HA na sua formulação. Esta observação está em acordo com o cálculo do índice de cristalinidade, no tópico 4.3. As atribuições para os picos e regiões destacadas na Figura 15, estão listadas e referenciadas aos compósitos, na Tabela 8.

Tabela 8: Atribuições dos modos vibracionais destacados na Figura 15 e número de onda de suas ocorrências para os compósitos 25VB_530_C e 50VB_530_C.

Atribuições	Centro da banda/pico (cm ⁻¹)		Referências
	25VB_530_C	50VB_530_C	
(ν_2 - PO ₄ ³⁻)	474,45	472,52	[13,24,87]
(ν_4 - PO ₄ ³⁻)	570,88	570,88	
	601,74	603,67	
(ν_1 - PO ₄ ³⁻)	962,40	962,40	
(ν_3 - PO ₄ ³⁻)	1047,26	1037,62	
	1053,05	1047,26	
	1091,62	1089,69	
(ν_L - OH ⁻)	632,60	632,60	
(ν_S - OH ⁻)	3571,89	3571,89	
(ν_3 - CO ₃ ²⁻)	1415,64	1413,71	
	1456,14	1460,00	
<p>(ν_1 - PO₄³⁻) modo de estiramento simétrico, não degenerado; (ν_2 - PO₄³⁻) modo de deformação, duplamente degenerado; (ν_3 - PO₄³⁻) modo de estiramento assimétrico, triplamente degenerado; (ν_4 - PO₄³⁻) modo de deformação, triplamente degenerado; (ν_L - OH⁻) modo de deformação; (ν_S - OH⁻) modo de estiramento; (ν_3 - CO₃²⁻) modo de estiramento assimétrico.</p>			

Os grupos químicos de uma hidroxiapatita estequiométrica (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) são PO₄³⁻ e OH⁻ [19], e a ocorrência de picos de baixa intensidade na região entre 1300 e 1600 cm⁻¹ são atribuídos ao CO₃²⁻. Weinand [24], relata que tais ocorrências podem corresponder a dióxido de carbono adsorvido na superfície durante o manuseio e armazenamento, e/ou provenientes da incorporação de carbonatos na estrutura da HA, durante a calcinação/etapa do processo de obtenção da HA a partir de ossos de peixes, que é precursora nos compósitos estudados.

Para o compósito 50VB_530_C, foi detectada uma banda larga centralizada em 3436 cm⁻¹, atribuída a água (H₂O) adsorvida da atmosfera, possivelmente devido ao

acondicionamento da amostra após sua preparação. Os resultados de FTIR não indicaram a presença de outros grupos funcionais associados a outras fases, que não a hidroxiapatita, e que poderiam ser decorrentes do tratamento térmico ou compactação do compósito, estando em acordo com a difração de raios-X para as mesmas amostras.

Na Figura 16 são apresentados os espectros de FTIR para os compósitos 25VB_1000_C e 50VB_1000_C, amostras antes da imersão em SBF, com destaque para as principais atribuições.

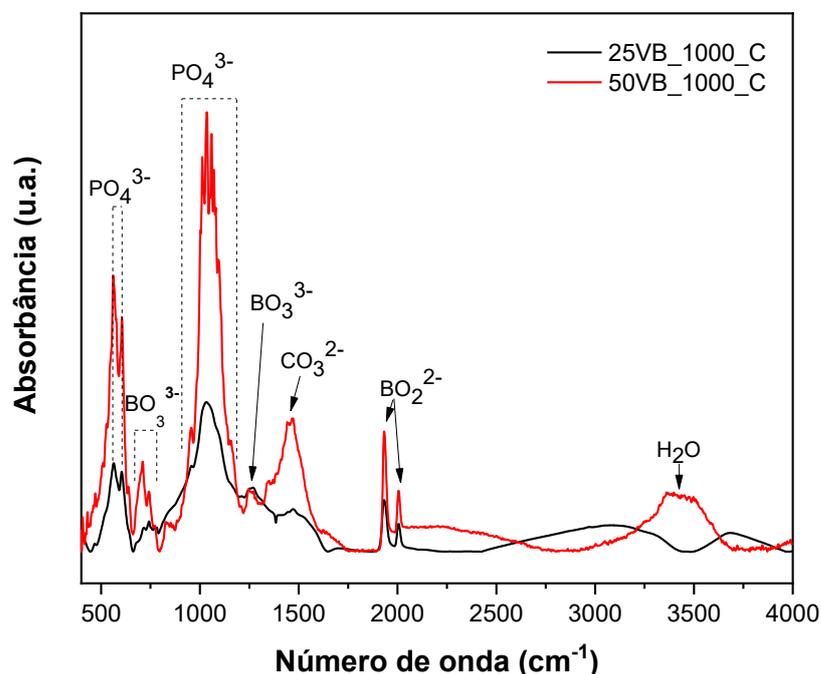


Figura 16: Espectros de FTIR das amostras dos compósitos 25VB_530_C e 50VB_530_C, antes da imersão em SBF, com destaque das atribuições a picos e bandas observados.

Os espectros de FTIR da Figura 16 indicam alterações atribuídas a substituições iônicas, decorrentes do tratamento térmico, em ambos os compósitos. Não estão presentes os modos vibracionais de OH⁻, característicos da HA, em 632 cm⁻¹ e 3571 cm⁻¹ para 25VB_1000_C. Para o compósito 50VB_1000_C foi identificado um ombro em 638 cm⁻¹ e ausência do modo vibracional em 3571 cm⁻¹. Também são identificados modos vibracionais centrados em 1932 cm⁻¹ e 2005 cm⁻¹ em ambos os compósitos, e atribuídos a alongamento antissimétrico em grupos BO₂⁻ ($\nu_2 - \text{BO}_2^-$). As atribuições à flexão simétrica de BO₃³⁻ ($\nu_2 - \text{BO}_3^{3-}$) e alongamento antissimétrico de BO₃³⁻ ($\nu_3 - \text{BO}_3^{3-}$), aparecem respectivamente em 742,5 cm⁻¹ e 1260 cm⁻¹, para ambos os compósitos; apresentando-se mais bem definidas em 50VB_1000_C.

A ausência dos modos vibracionais da hidroxila e a identificação dos grupos borato relacionados, indicam que os mesmos estariam incorporados à estrutura da HA, por meio de substituições iônicas, como resultado da presença do vidro borato e da temperatura de sinterização.

Ternane e colaboradores [68], em estudo com diferentes razões fósforo/boro (P/B), com o objetivo de caracterizar a introdução de boro em HA, argumentam que as substituições ocorrem com grupos BO_2^- em locais de OH^- e grupos BO_3^{3-} em locais de PO_4^{3-} , causando alterações nos parâmetros de rede da hidroxiapatita. Em outro estudo, do sistema $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-B}_2\text{O}_3$, Ternane e colaboradores [88], caracterizam um campo monofásico de uma oxiboroapatita, com suas atribuições nos espectros FTIR e Raman, e indicam os mesmos tipos de substituições $[(\text{BO}_2)^- \rightleftharpoons \text{OH}^-]$ e $[(\text{BO}_3)^{3-} \rightleftharpoons (\text{PO}_4)^{3-}]$. Caracterizações estruturais também foram realizadas por Barheine e colaboradores [89] em estudo sobre fosfatos de cálcio contendo boro.

Um pico bem definido em 710 cm^{-1} para 50VB_1000_C e um ombro centralizado em 716 cm^{-1} para 25VB_1000_C, podem ser atribuídos à flexão B-O de unidades BO_3 do componente vidro precursor, que na amostra 100VB_530, apresenta banda centralizada em 706 cm^{-1} para a mesma atribuição [27,82,90].

Os grupos fosfato e carbonato comumente associados à HA também foram identificados e suas atribuições estão relacionadas na tabela 9, que traz também outras referências da literatura para frequências vibracionais de grupos borato na estrutura da HA.

Conforme apresentado no tópico 4.1.3, os difratogramas confirmam que a estrutura cristalina dos compósitos é apatítica e os espectros de FTIR indicam alterações/substituições iônicas nessa estrutura.

Tabela 9: Atribuições dos modos vibracionais destacados na Figura 16 e número de onda de suas ocorrências para os compósitos 25VB_1000_C e 50VB_1000_C.

Atribuições	Centro da banda/pico (cm^{-1})		Literatura	
	25VB_1000_C	50VB_1000_C	(cm^{-1})	Referência
$(\nu_4 - \text{PO}_4^{3-})$	565,1	561,2	556 - 573	[24,87,91]
	605,6	605,6	596 - 603,7	
$(\nu_L - \text{OH}^-)$	Não detectada	Ombro em 638	627 - 646	
Flexão B-O-B*	716	710	691 - 717	[27,82,90]

$(\nu_2 - \text{BO}_3^{3-})$	742,5	742,5	744 - 787	[7,68,89,92]
$(\nu_1 - \text{PO}_4^{3-})$	954,68	958,54	952 - 984	[24,91,93]
$(\nu_3 - \text{PO}_4^{3-})$	1033,8	1012,54	1015 - 1165	
		1035,69		
		1058,8		
		1070,4		
$(\nu_3 - \text{BO}_3^{3-})$	1260	1260	1204 - 1374	[7,68,88,89,92]
$(\nu_3 - \text{CO}_3^{2-})$	1471,6	1442,6	1383 - 1487	
	-	1471,6		
$(\nu_2 - \text{BO}_2^-)$	1932,5	2005,8	1932 - 2003	[7,68,88,89,92]
$(\nu_S - \text{OH}^-)$	Não detectada	Não detectada	3534 - 3574	[24,87,91]
<p>$(\nu_1 - \text{PO}_4^{3-})$ modo de estiramento simétrico, não degenerado; $(\nu_3 - \text{PO}_4^{3-})$ modo de estiramento assimétrico, triplamente degenerado; $(\nu_4 - \text{PO}_4^{3-})$ modo de deformação, triplamente degenerado; $(\nu_L - \text{OH}^-)$ modo de deformação; $(\nu_S - \text{OH}^-)$ modo de estiramento; $(\nu_3 - \text{CO}_3^{2-})$ modo de estiramento assimétrico; * Flexão B-O-B de unidades BO_3, $(\nu_2 - \text{BO}_3^{3-})$ flexão simétrica de BO_3^{3-}; $(\nu_3 - \text{BO}_3^{3-})$ alongamento antissimétrico de BO_3^{3-}; $(\nu_2 - \text{BO}_2^-)$ alongamento antissimétrico de grupos BO_2^-</p>				

4.2 Estudo dos compósitos pós-imersão em SBF

4.2.1 Medidas de pH no SBF

A Figura 17 mostra o gráfico de pH das amostras durante a imersão na solução de SBF no intervalo de 28 dias, em que tiveram pH e temperatura monitorados em intervalos de 24 horas.

O valor do pH inicial da solução SBF, com todas as amostras imersas, foi de 7,56.

Alterações no pH resultam de trocas iônicas a partir da dissolução de íons presentes no vidro, por exemplo Na^+ , Ca^+ , B^+ e consumo de íons PO_4^{3-} da solução para formação de HA. Para o vidro borato, quando comparado a um vidro silicato, uma conversão ou degradação mais rápida do vidro, leva a um consumo mais rápido de íons PO_4^{3-} da solução e, portanto, a um aumento mais rápido do pH da solução [12,94,95].

A variação do pH na amostra 50VB_530, foi a maior, de 7,56 para 8,63, mostrando maior troca iônica com a solução. Os compósitos tratados a 530°C têm valores de pH médio, no patamar de estabilidade, maiores conforme a proporção de vidro aumenta, 8,83 e 8,43 para 50%VB e 25%VB respectivamente e atingem um patamar de estabilidade mais rapidamente do que a amostra 25VB_1000. O comportamento do pH em relação à proporção de vidro permanece nos compósitos tratados a 1000 °C, mas em ambas as proporções, 50% e 25%, estão em um patamar mais baixo, 8,53 e 8,35, devido ao desenvolvimento de novas fases nestes compósitos. Dentro de uma proposta de degradação “controlada”, a partir da estabilidade da HA e reabsorção/degradação do vidro bioativo, o compósito 25VB_1000 interage mais lentamente, quando comparado aos demais compósitos, atingindo o patamar de estabilidade no décimo sexto dia. Quanto à ação terapêutica relacionada à liberação controlada de íons Ag^+ , foi possível identificar a partir da análise dos difratogramas, a presença do AgCl apenas nos compósitos 50VB_530 após 28 dias de imersão.

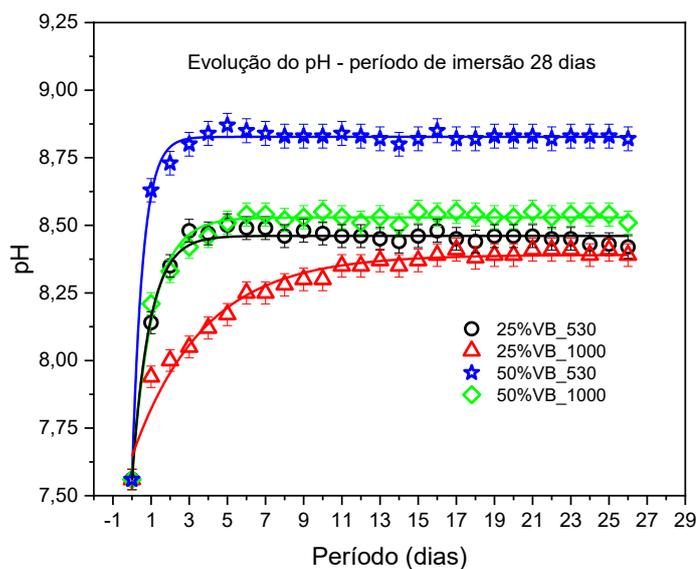


Figura 17: Evolução do pH para tratamento em SBF durante período de 28 dias. O pH inicial é referente a leitura no momento da imersão e o primeiro resultado após 24 horas de imersão.

4.2.2 Análise por difração de raios-X (DRX) dos compósitos pós-imersão em SBF

As medidas de difração foram realizadas sobre a superfície das amostras em todos os casos. Para o compósito 50VB_530_28d, a degradação após imersão em SBF foi mais acentuada e a peça colocada no porta-amostra para realização da medida, de menor dimensão

quando comparada às demais pastilhas em suas medidas. Neste caso específico, foi aumentado o tempo de medida em relação às outras amostras.

Os resultados de difratometria de raios-X, após imersão em SBF, para os compósitos 25VB_530_C são apresentados na Figura 18.

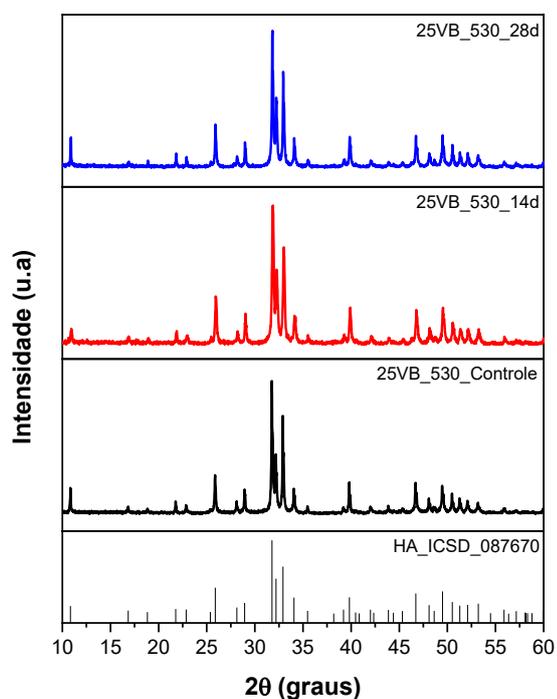


Figura 18: Difratogramas das amostras 25VB_530_C, antes da imersão; 25VB_530_14d e 25VB_530_28d e ficha padrão ICSD 087670 para HA.

Na Figura 18, os difratogramas confirmam a estrutura apatítica dos compósitos 25VB_530, após imersão em SBF, para os períodos de 14 e 28 dias e também que não há surgimento de fase adicional e mudanças no perfil dos difratogramas após a imersão. Como já relatado em 2.2.2 a estrutura apatítica é bastante flexível e segundo Wopenka e colaboradores [19], podem ocorrer substituições iônicas na rede da apatita sem grandes distorções na sua estrutura, como por exemplo apatitas ósseas caracterizadas por difração de raios-X e relatadas na literatura como HA, mas que na verdade são ausentes de hidroxila.

Na Figura 19, são apresentados os difratogramas dos compósitos 50VB_530_C após imersão em SBF por períodos de 14 e 28 dias e fichas padrão ICSD 87670 e ICSD 64734 [96] respectivamente para HA e AgCl.

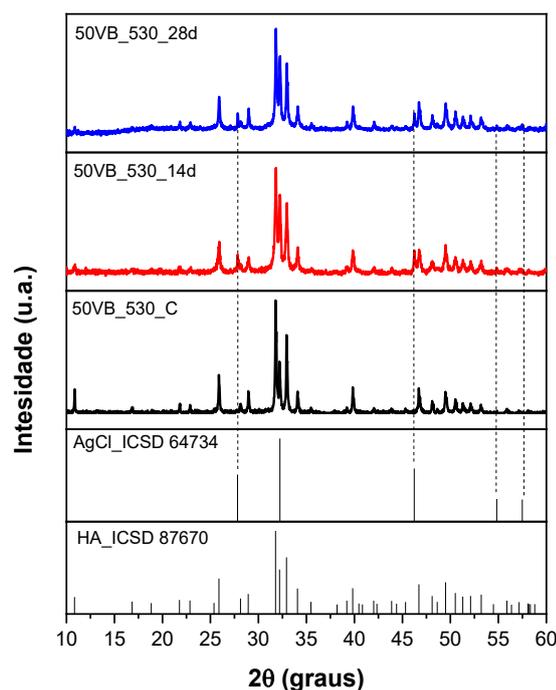


Figura 19: Difratomogramas das amostras 50VB_530 antes e após a imersão em SBF e as fichas padrão para HA (ICSD 87670) e AgCl (ICSD 64734).

Os difratogramas dos compósitos 50VB_530, antes e após a imersão, confirmam a manutenção da estrutura apatítica do material. Identificou-se ainda, após a imersão em SBF, picos associados ao Cloreto de Prata (AgCl), de ficha padrão ICSD nº 64734, localizados em 27,85°, 46,19°, 54,85° e 57,48° 2θ. Em 32,26° 2θ há sobreposição com o pico da hidroxiapatita.

Os dados de variação do pH, discutidos no tópico 4.2.1, são indicativos de trocas iônicas entre amostras e o SBF, e o mecanismo para precipitação do cloreto de prata decorre da interação dos íons de Cl^- da solução SBF com íons Ag^+ provenientes da degradação do vidro [2,67]. Não foram identificados picos associados ao AgCl ou Ag nas outras formulações de compósitos em qualquer temperatura.

Na figura 20, uma ampliação das regiões 2θ que compreendem picos próximo a 25,8° e entre 31 e 35° 2θ, associados à HA, permite melhor visualizar alterações no perfil dos difratogramas conforme o tratamento em SBF evolui em tempo.

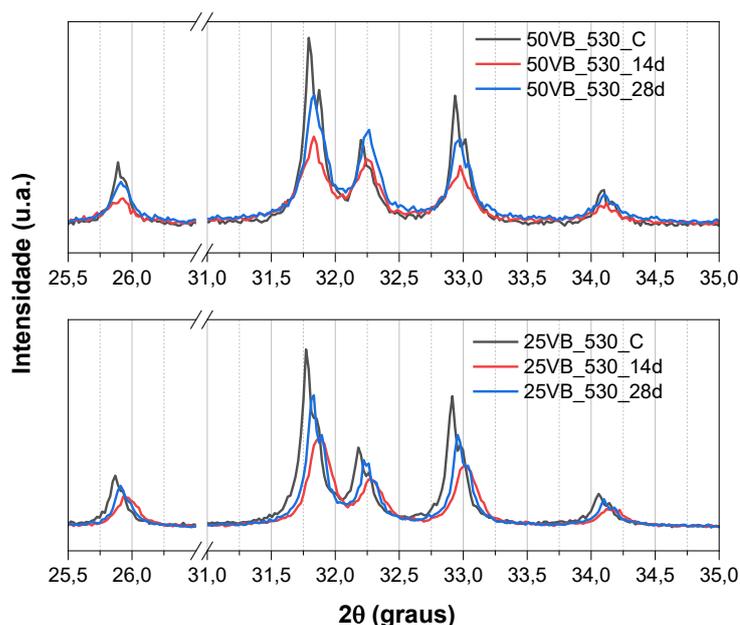


Figura 20: Ampliação da região 2θ de picos associados a HA para os grupos de compósitos tratados a 530°C com 25% e 50% de substituição em vidro, antes e após a imersão em SBF.

Conforme defendido por Londoño-Restrepo e colaboradores [97], o perfil do difratograma, quando tratamos da largura à meia altura, indica o tamanho do cristalito, mas não definitivamente o quanto é cristalino o material. Wopenka e colaboradores [19] argumentam que: essencialmente, quanto mais estreitos os picos no padrão de difração de raios-X, maior é comprimento de continuidade dos planos atômicos e maior é o tamanho do cristalito e desta forma, à medida que o tamanho do grão, ou cristalito, se torna menor, seria refletido em uma ampliação dos picos de difração. A partir dessa perspectiva, não seria correto afirmar, neste caso, que as amostras, após imersão em SBF, são menos cristalinas do que as amostras controle. Novos grãos ou partículas de dimensões nanométricas devem ter se formado a partir da degradação/trocas iônicas do vidro com o meio somando-se à hidroxiapatita precursora.

Como já abordado no tópico 2.3, da conversão dos vidros boratos em HA, íons Ca^{2+} provenientes do vidro reagem com PO_4^{3-} da solução para precipitar fosfato de cálcio amorfo e/ou cristalino. Admite-se a fase amorfa, fosfato de cálcio amorfo, como precursora da fase cristalina em estudos *in vitro* e presente no tecido ósseo com funcionalidade no metabolismo, como fase reversível indo do estado amorfo a cristalino e vice-versa [98–101]. As alterações do pH do meio durante o tratamento em SBF comprovam as trocas iônicas, assim como relatado em trabalhos anteriores, como os de Silva e colaboradores [26] e Alves e

colaboradores [82], que utilizaram a mesma base vítrea ou muito próxima desta e sua conversão em hidroxiapatita.

Os difratogramas para o compósito 25VB_1000, após imersão em SBF por 14 e 28 dias estão apresentados na Figura 21 e indicam a presença apenas de hidroxiapatita associada à ficha padrão ICSD 87670. A fase adicional NaCaPO_4 de ficha padrão ICSD 35629, presente apenas na amostra controle, não é identificada nas amostras, após 14 e 28 dias de imersão.

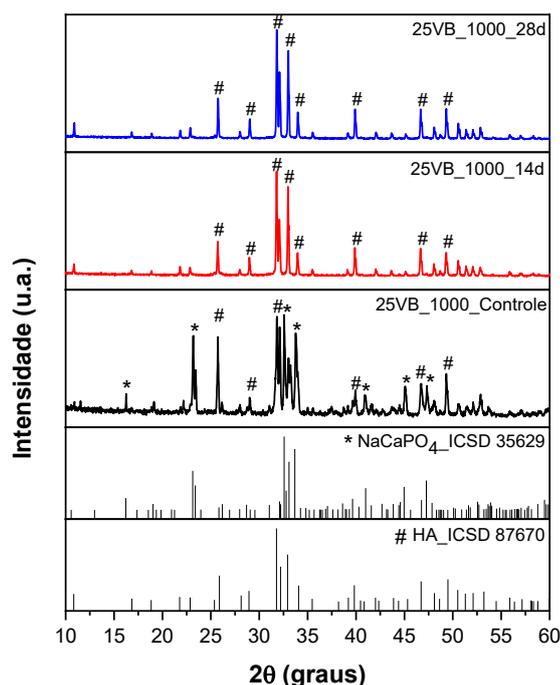


Figura 21: Difratoograma das amostras 25VB_1000 antes e após imersão em SBF e fichas padrão para HA de código ICSD 87670 e NaCaPO_4 de código ICSD 35629.

Na Figura 22, são apresentados os difratogramas para os compósitos 50VB_1000 antes e após imersão em SBF, e as respectivas fichas padrão associadas, ICSD 87670 para HA e ICSD 35629 para NaCaPO_4 .

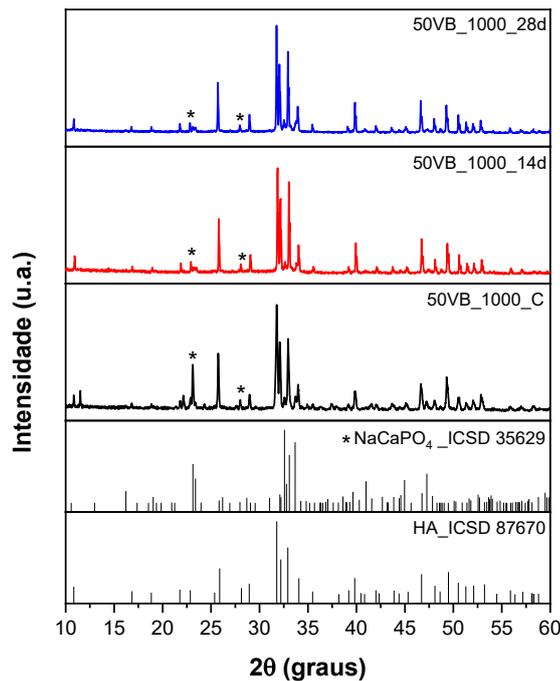


Figura 22: Difratoograma das amostras 50VB_1000 antes e após imersão em SBF e fichas padrão para HA de código ICSD 87670 e NaCaPO₄ de código ICSD 35629.

Os difratogramas indicam fase majoritária de HA antes e após imersão em SBF. Para a amostra 50VB_1000_C, foram destacadas concordâncias para picos de NaCaPO₄ listados anteriormente na tabela 7, e na Figura 22, referenciada na posição 23° 2θ mais marcante. Após a imersão, os picos associados a NaCaPO₄ diminuem de intensidade ou desaparecem, indicando a degradação da fase NaCaPO₄ em SBF.

O ângulo associado a NaCaPO₄ e destacado na Figura 22, têm pequeno deslocamento à esquerda com a evolução do período de imersão, localizando-se antes da imersão em 23,11° 2θ, e em 22,93° e 22,83° 2θ, respectivamente, para 14 e 28 dias de imersão.

A fase NaCaPO₄ aos 28 dias de imersão surgiu como segundo candidato na pesquisa ao banco de dados, já que a fase principal indicada não suprimiu 100% dos picos.

4.2.3 Análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier para os compósitos pós-imersão em SBF

A Figura 23 apresenta os espectros de absorção para os compósitos 25VB_530_C após a imersão em SBF, para os quais estão identificados os grupos característicos da HA utilizada na elaboração dos compósitos.

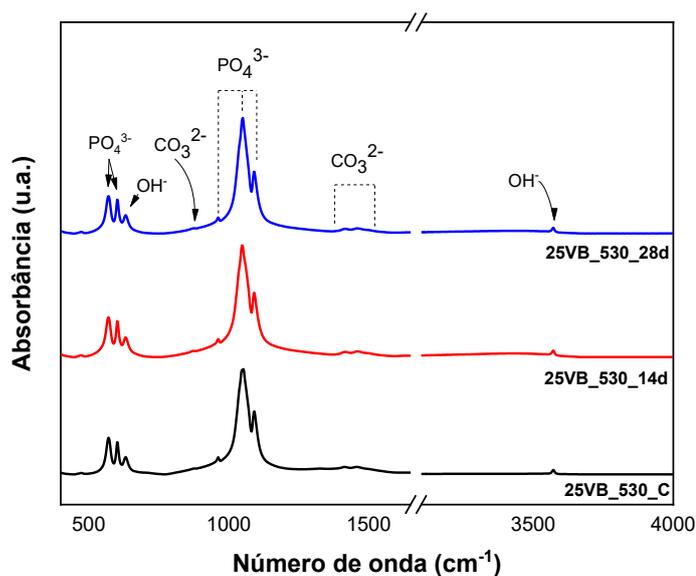


Figura 23: Espectros de absorção para amostra 25VB_530_C, antes e após imersão em SBF, em períodos de 14 e 28 dias.

A partir das análises dos valores de números de onda das atribuições inseridos na tabela 10, é possível verificar que não ocorrem alterações significativas nas posições das bandas ou picos após a imersão.

As posições e atribuições dos modos vibracionais identificadas nos espectros, para os diferentes períodos de imersão, estão na tabela 10.

Tabela 10: Atribuições das principais bandas de absorção do composto 25VB_530, antes e após a imersão em SBF.

Atribuições	Centro da banda/pico (cm ⁻¹)			Referências
	25VB_530_C	25VB_530_14d	25VB_530_14d	
(ν_2 - PO ₄ ³⁻)	474,45	472,52	472,52	[20,24,87]
(ν_4 - PO ₄ ³⁻)	570,88	570,88	570,88	
	601,74	601,74	601,74	
(ν_1 - PO ₄ ³⁻)	962,4	962,4	962,4	
(ν_3 - PO ₄ ³⁻)	1047,26	1047,26	1051,22	
	1053,05		1091,62	
	1091,62	1091,62	1091,62	

$(\nu_L - \text{OH}^-)$	632,6	632,6	632,6
$(\nu_S - \text{OH}^-)$	3571,89	3571,89	3571,89
$(\nu_3 - \text{CO}_3^{2-})$	1415,64	1415,64	1415,64
	1456,14	1458,07	1458,07
<p>$(\nu_1 - \text{PO}_4^{3-})$ modo de estiramento simétrico, não degenerado; $(\nu_2 - \text{PO}_4^{3-})$ modo de deformação, duplamente degenerado; $(\nu_3 - \text{PO}_4^{3-})$ modo de estiramento assimétrico, triplamente degenerado; $(\nu_4 - \text{PO}_4^{3-})$ modo de deformação, triplamente degenerado; $(\nu_L - \text{OH}^-)$ modo de deformação; $(\nu_S - \text{OH}^-)$ modo de estiramento; $(\nu_3 - \text{CO}_3^{2-})$ modo de estiramento assimétrico.</p>			

Independente da temperatura, 530 °C ou 1000 °C, os compósitos com 50% em vidro apresentaram saturação na região entre 1000 e 1100 cm^{-1} (alongamento antissimétrico de PO_4^{3-}) nas medidas pós-imersão em que utilizamos 1% de material em KBr. As medidas foram refeitas, utilizando-se 0,5% de material.

A Figura 24 apresenta os espectros de FTIR para os compósitos 50VB_530_C após a imersão em SBF.

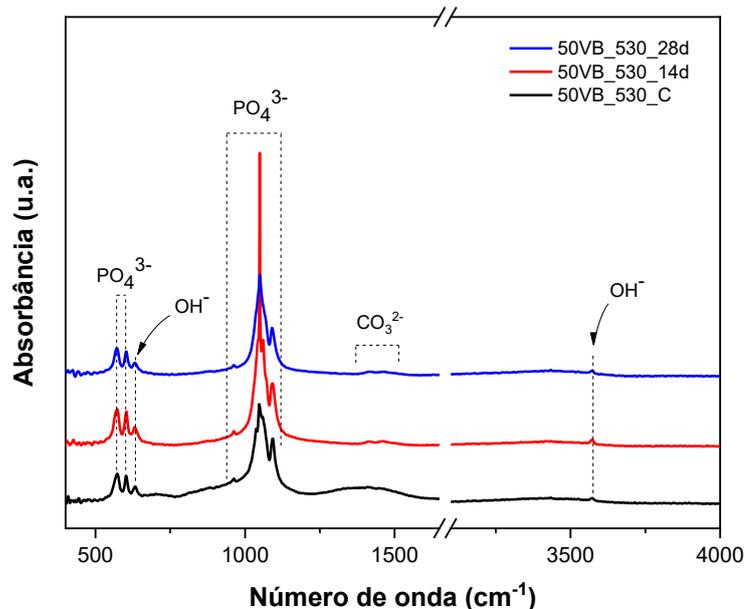


Figura 24: Espectros de absorção para amostra 50VB_530_C, antes e após imersão em SBF, em períodos de 14 e 28 dias, com destaque dos grupos químicos em suas respectivas regiões.

Na Figura 24, as atribuições identificadas, estão associadas a HA, em qualquer período de imersão, mostrando-se mais intensos na amostra 50VB_530_14d, quando comparada à amostra controle e amostra imersa por 28 dias. A razão poderia ser a deposição de camadas alternadas de fosfato de cálcio amorfo, sua cristalização, nova formação de fosfato de cálcio amorfo e sua cristalização ao longo dos períodos de imersão, indicando a bioatividade do material e a alternância no perfil dos espectros, para os diferentes períodos de imersão. Sabe-se que ambos os precursores são bioativos e que a conversão de vidros boratos em HA é mais rápida que do que em vidros silicatos. Os resultados de pH, tópico 4.2.1, indicam uma rápida alteração e estabilidade do pH, já nos 3 primeiros dias de imersão em SBF para 50VB_530 e aos 5 dias de imersão para 50VB_1000.

A tabela 11 reúne os valores de números de onda das atribuições identificadas nos espectros das amostras 50VB_530, para os diferentes períodos de imersão.

Tabela 11: Atribuições das principais bandas de absorção do compósito 50VB_530, antes e após a imersão em SBF.

Atribuições	Centro da banda/pico (cm ⁻¹)			Referências
	50VB_530_C	50VB_530_14d	50VB_530_14d	
(ν ₄ - PO ₄ ³⁻)	572,8	572,8	570,8	[20,24,87]
	601,7	603,6	603,6	
(ν ₁ - PO ₄ ³⁻)	962,4	962,4	962,4	
(ν ₃ - PO ₄ ³⁻)	1049,1	1049,19	1049,19	
	1058,8	1060,7	1089,6	
	1091,6	-	-	
(ν _L - OH ⁻)	632,6	632,6	632,6	
(ν _S - OH ⁻)	3571,8	3571,8	3571,8	
(ν ₃ - CO ₃ ²⁻)	1410	1415	1413	
	1463	1465	1465	
(ν ₁ - PO ₄ ³⁻) modo de estiramento simétrico, não degenerado; (ν ₂ - PO ₄ ³⁻) modo de deformação, duplamente degenerado; (ν ₃ - PO ₄ ³⁻) modo de estiramento assimétrico, triplamente degenerado; (ν ₄ - PO ₄ ³⁻) modo de deformação, triplamente degenerado; (ν _L -				

OH⁻) modo de deformação; (ν_S - OH⁻) modo de estiramento; (ν_3 - CO₃²⁻) modo de estiramento assimétrico.

Para os compósitos 25VB_1000_C após imersão em SBF, apresentados na Figura 25, surge um ombro centralizado em 848 cm⁻¹, adicionalmente aos grupos já identificados para amostra pré-imersão. A vibração em 848 cm⁻¹ é atribuída por Rojas e colaboradores [102], ao alongamento B-O de BO₄⁻ em grupos tri, tetra e pentaborato. Após a imersão em SBF, a região com uma banda centrada em 1033,8 cm⁻¹ deriva-se em picos posicionados em 1018 cm⁻¹, 1035 cm⁻¹ e 1060 cm⁻¹ também atribuídos aos grupos fosfato, modo de estiramento assimétrico (ν_3 - PO₄³⁻).

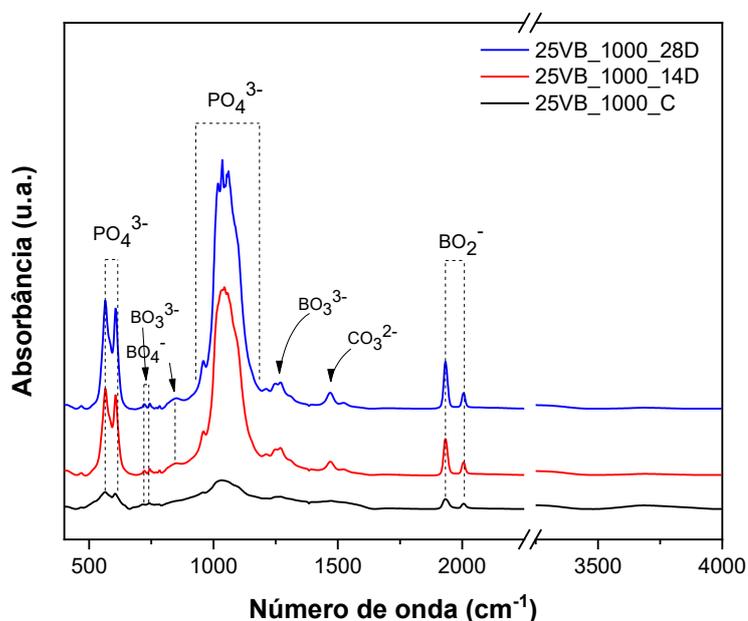


Figura 25: Espectros de absorção para amostra 25VB_1000_C, antes e após imersão em SBF, em períodos de 14 e 28 dias, com destaque dos grupos químicos em suas respectivas regiões.

Para as amostras com 14 e 28 dias de imersão, distinguem-se nitidamente vibrações em 721 cm⁻¹, 744 cm⁻¹ e 783 cm⁻¹ atribuídas à flexão simétrica em BO₃³⁻, anteriormente identificada em 716 cm⁻¹. Para os mesmos períodos de imersão, os picos 1932 cm⁻¹ e 2005 cm⁻¹ atribuídos a BO₂⁻ ficam mais nítidos e intensos. Como relatado anteriormente, as vibrações identificadas para os grupos borato estão relacionadas à incorporação dos mesmo na estrutura da apatita, resultado numa boroapatita com substituições iônicas nos locais de PO₄³⁻ e OH⁻ da hidroxiapatita precursora [7,68,89,92].

Na Figura 26 são apresentados os espectros FTIR para o compósito 50VB_1000_C antes e após a imersão em SBF.

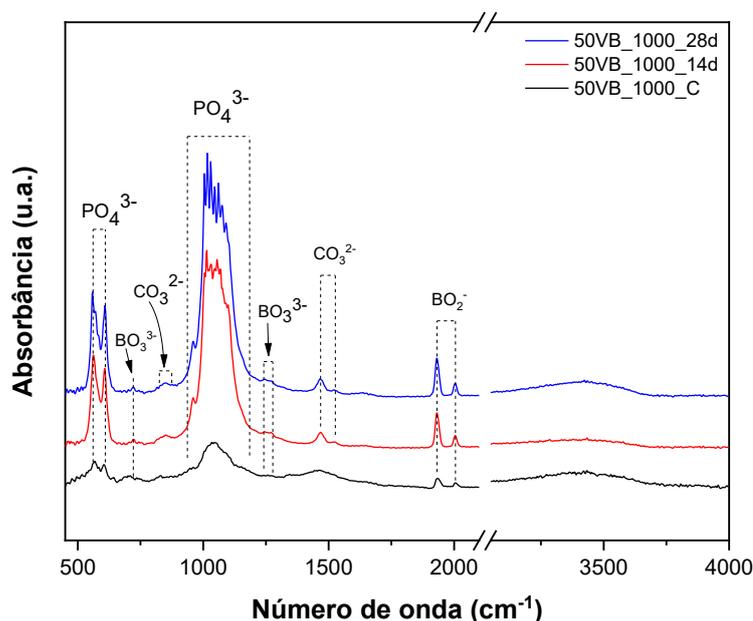


Figura 26: Espectros de absorção para amostra 50VB_1000_C, antes e após imersão em SBF, em períodos de 14 e 28 dias, com destaque dos grupos químicos em suas respectivas regiões.

Os espectros de absorção apresentados na Figura 26, para os compósitos 50VB_1000_C, indicam que após a imersão em SBF, o perfil fica mais bem definido, assim como ocorreu em todos os compósitos pós imersão em SBF. O estreitamento dos picos em qualquer caso, indica um aumento da cristalinidade do material.

Para as amostras com 14 e 28 dias de imersão, as vibrações identificadas respectivamente em 710 cm^{-1} e $742,5\text{ cm}^{-1}$ na amostra controle, deslocam-se para 721 cm^{-1} e 744 cm^{-1} , ainda na mesma região atribuída à flexão simétrica em BO_3^{3-} . Para os mesmos períodos de imersão, os picos 1932 cm^{-1} e 2005 cm^{-1} atribuídos a BO_2^- ficam mais nítidos e intensos. O ombro em 638 cm^{-1} para a amostra controle e atribuído à hidroxila da HA, desaparece após a imersão em SBF, para ambos os períodos de 14 e 28 dias.

A região atribuída ao modo de estiramento assimétrico triplamente degenerado (1000 cm^{-1} a 1100 cm^{-1}), antes com uma banda centralizada em 1043 cm^{-1} para a amostra controle (50VB_1000_C), apresenta picos distintos em ambos os períodos de imersão (14 e 28 dias). Para 50VB_1000_14d são identificados máximos em 1014 cm^{-1} e 1054 cm^{-1} e para 50VB_1000_28d, máximos em $1004, 1016, 1029, 1045, 1060, 1074$ e 1091 cm^{-1} .

Da mesma forma que para os compósitos 25VB_1000_C, os espectros dos compósitos 50VB_1000_C imersos em SBF, demonstram a ausência dos modos vibracionais da hidroxila

característica da HA, e a presença dos modos vibracionais de grupos boratos que podem caracterizar uma boroapatita.

Os modos vibracionais identificados neste estudo para os grupos boratos, também estão presentes para uma oxiboroapatita caracterizada por Ternane e colaboradores [88]. Jillavenkatesa e colaboradores [103], identificaram nos espectros de FTIR para fosfato tetracálcico ($C_4P_2O_9$), banda forte em 1015 cm^{-1} e bandas fracas em 1035 cm^{-1} e 1049 cm^{-1} que poderiam estar correlacionadas com divisão do modo fundamental $\nu_3 - PO_4^{3-}$. Como apresentado no tópico 2.2.2, fosfato tetracálcico é relatado como um possível produto da decomposição da HA em tratamento térmico, mas no caso deste estudo, não foram identificadas por difração de raios-X, fases adicionais ao $NaCaPO_4$ e HA.

A estrutura apatítica dos compósitos foi caracterizada por difração de raios-X e as ausências de vibrações OH^- , presença dos grupos fosfatos característicos da HA, além dos grupos borato (em todos os casos identificadas por FTIR) indicam uma boropatita para os compósitos tratados a $1000\text{ }^\circ\text{C}$ [7,68,89,92]. Demonstrem também que somente a análise por difração de raios-X, não é suficiente para caracterizar uma hidroxiapatita.

4.3 Índice de cristalinidade por FTIR

O índice de cristalinidade (IC) foi calculado pelo método semiquantitativo de Weiner e Bar-Yosef [77], conforme descrito no tópico 3.2.3.1. A Figura 27 apresenta os valores calculados para o índice de cristalinidade.

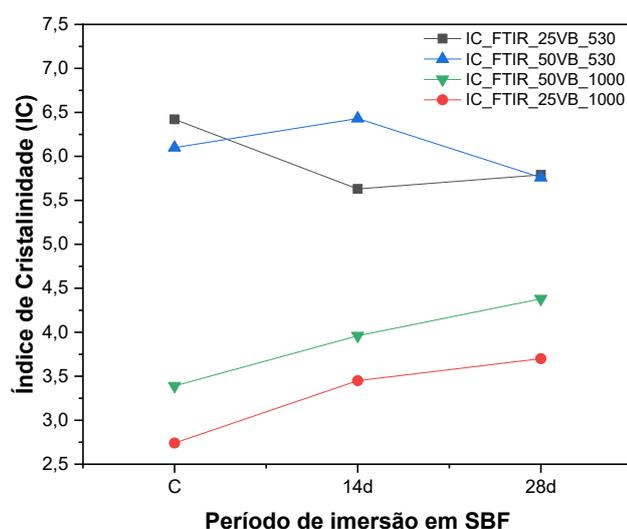


Figura 27: Efeito da imersão em SBF, nos períodos de 14 e 28 dias, sobre a cristalinidade da HA nos compósitos 25VB e 50VB tratados a $530\text{ }^\circ\text{C}$ e $1000\text{ }^\circ\text{C}$.

Observa-se que o IC para os compósitos tratados a 530 °C, onde não houve desenvolvimento de fases adicionais à HA, são maiores que os índices calculados para os compósitos tratados a 1000 °C, onde estão presentes as fases cristalinas HA e NaCaPO₄. O cálculo do IC utiliza o grau de resolução das bandas do modo de deformação assimétrico (ν_4) de PO₄³⁻ entre aproximadamente 602 e 569 cm⁻¹, características da HA nesta região.

Em ambas as temperaturas, 530 °C e 1000 °C, os compósitos com maior proporção de HA na composição, têm IC maiores para as amostras controle (antes da imersão). Em SBF, os compósitos tratados a 1000 °C, mostram uma tendência de aumento da cristalinidade nos dois períodos de imersão analisados, em acordo com o relatado na literatura para uma conversão do vidro bioativo em HA, no ensaio de bioatividade *in vitro* [25]. Os espectros de FTIR de 25VB_1000 e 50VB_1000 como um todo, após a imersão em SBF, também mostram alterações para uma melhor definição de picos e bandas. Os compósitos tratados a 530 °C mostram também variações no IC, oscilando entre um aumento e diminuição na sua magnitude nos diferentes períodos de imersão, que também mostram concordância com os seus respectivos espectros de FTIR como um todo. Também é relatada essa possível alteração da cristalinidade ao longo de diferentes períodos de imersão a partir de formação de camadas sobrepostas de HA e de diferentes graus de cristalinidade, a partir da degradação do vidro no ensaio de bioatividade *in vitro* [27,82,90].

4.4 Densidade

A difusão atômica, formação de fase líquida preenchendo vazios pré-existentes na conformação das pastilhas e/ou formação de novas fases, a partir de diferentes temperaturas de tratamento térmico, são fatores que podem interferir na relação massa/volume de um material, resultando em mudanças nos valores de densidade [69,104,105].

A figura 28 apresenta os resultados de densidade dos compósitos, do vidro e da HA tratados a 530 °C.

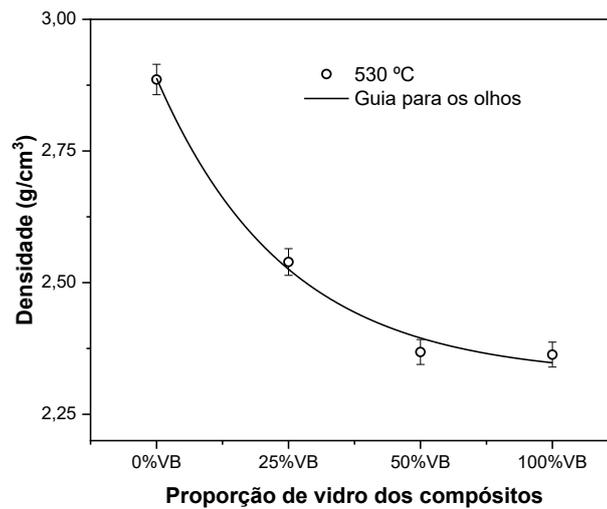


Figura 28: Resultados de densidade em 530 °C para os compósitos nas diferentes proporções de vidro e hidroxiapatita; da pastilha de 100% HA (indicada por 0%VB) e da pastilha 100% vidro (0%HA).

À medida que a proporção de vidro aumenta nos compósitos tratados a 530 °C, a densidade diminui, o que está de acordo com uma densidade menor para o vidro puro (aproximadamente 18%) quando comparada a HA pura. Esta redução não é inversamente proporcional. Os valores de densidade encontrados para 25% e 50% em vidro são menores do que os valores para uma média ponderada em relação proporção/densidade de seus componentes, e neste caso poderia estar ocorrendo uma retenção de vazios/porosidade no interior das pastilhas [106]. Como já apresentado no tópico 4.1.1 para difração de raios-X dos materiais precursores, a única fase cristalina identificada é de HA, não ocorrendo fases adicionais decorrentes do tratamento térmico a 530 °C, que poderiam estar acompanhadas de expansão volumétrica.

4.5 Análise de variação dimensional

Segundo Knowles e colaboradores [69], o vidro também atua como inibidor do crescimento de grão, melhorando as propriedades mecânicas do compósito. Uma retração linear do compósito indica o vidro agindo como auxiliar de sinterização, contribuindo para a melhora das propriedades mecânicas [58].

O diâmetro inicial de 13 mm, considerado para todas as amostras, foi o diâmetro interno do pastilhador. A tabela 13 reúne a média das variações no diâmetro das pastilhas após a sinterização para as diferentes amostras.

A variação linear foi calculada em relação ao diâmetro antes (l_0) e após a sinterização (l) pela expressão

$$\% L = \left[\frac{l-l_0}{l_0} \right] \times 100\%$$

Tabela 12: Variação linear na maior dimensão.

Amostra	Diâmetro após a sinterização (mm) ($\pm 0,001$)	Variação linear
100VB_530_C	11,967	7,9%
50VB_530_C	12,896	0,8%
25VB_530_C	12,939	0,5%
50VB_1000_C	12,207	6,1%
25VB_1000_C	12,261	5,7%
100HA_1000_C	12,676	2,5%

É possível verificar uma maior variação na retração com a elevação da temperatura de tratamento térmico. Amostras 100% vidro tiveram a maior retração linear, em média 7,9% para o grupo tratado a 530 °C. Para os compósitos com 25 e 50%, em massa de vidro, e tratados a 530 °C, a retração linear é em média 0,5% e 0,8% respectivamente. Para a temperatura de 1000°C a variação é mais significativa e maior para uma maior proporção de vidro: os compósitos 50VB_1000 com retração média de 6,1% e os compósitos 25VB_1000 com retração média de 5,7%. A HA pura tratada a 1000 °C apresentou retração média de 2,5%.

A figura 29 apresenta a imagem do vidro precursor (100VB_530) e dos compósitos 25VB_530_C e 50VB_530_C, na qual é possível notar uma variação nos diâmetros conforme o percentual de vidro diminui. As amostras foram aproximadas após a sinterização, para registro da fotografia.

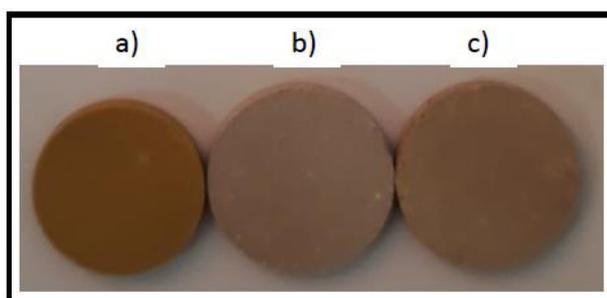


Figura 29: Imagens após a sinterização a 530 °C, para: a) 100VB_530_C, b) 25VB_530_C e c) 50VB_530_C.

5. CONCLUSÃO

Ficou demonstrada flexibilidade da rede estrutural da apatita, por meio de substituições iônicas em sua estrutura, em consequência do tratamento térmico e da presença do vidro. As caracterizações não indicam formação de fases relatadas na literatura como indesejáveis estruturalmente, devido à problemas de expansibilidade como CaO, que se converte em Ca(OH)₂ e também β-TCP, α-TCP ou α'-TCP que têm propriedades interessantes de solubilidade, mas não necessárias ou desejáveis nesta elaboração. A presença do cloreto de prata após 28 dias de imersão nos compósitos contendo 50% de vidro e tratados a 530 °C é positiva quanto a uma retenção e liberação controlada no meio, dos íons prata. Os compósitos tratados a 1000 °C indicam a presença de grupos PO₄³⁻ característicos da apatita, bem como CO₃²⁻ e grupos boratos indicando uma estrutura mais suscetível a substituições iônicas e mais semelhantes estruturalmente ao mineral ósseo, que se apresenta como uma hidroxiapatita não estequiométrica, deficiente em cálcio, e suscetível a substituições. Os compósitos tratados a 1000 °C produziram um novo material, com estrutura que se assemelha a uma boroapatita. A estabilidade da HA precursora combinada com a degradação/interação do vidro demonstrada pelas variações de pH, é também um dos objetivos do material como substrato reabsorvível, que possa induzir a mineralização *in vivo*. A utilização de hidroxiapatita em proporções mássicas elevadas na composição, possivelmente sobrepõe as características que a identificam, sobre resultados de uma nova camada formada, mas as trocas iônicas indicadas pelas variações em resultados de pH, alterações dos perfis dos espectros de absorção e variações na cristalinidade da fase HA após a imersão em SBF, indicam a formação de HA nos compósitos pós-imersão em SBF; além do fato de que ambos os materiais precursores são bioativos.

6. REFERÊNCIAS

- [1] A. Jacobs, G. Renaudin, C. Forestier, J.M. Nedelec, S. Descamps, Biological properties of copper-doped biomaterials for orthopedic applications: A review of antibacterial, angiogenic and osteogenic aspects, *Acta Biomater.* 117 (2020) 21–39. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.044>.
- [2] R. Torrecillas, M. Díaz, F. Barba, M. Miranda, F. Guitián, J.S. Moya, Synthesis and antimicrobial activity of a silver-hydroxyapatite nanocomposite, *J. Nanomater.* 2009 (2009) 1–7. <https://doi.org/10.1155/2009/498505>.
- [3] S. Jacquart, A. Belime, C. Pigasse, R. Siadous, M. Fatnassi, S. Tadier, R. Auzély-Velty, S. Girod-Fullana, R. Bareille, C. Roques, N. El Kissi, F. Anagnostou, A. Bignon, D. Cordier, C. Rey, F. Brouillet, J. Amédée, H. Galliard, C. Combes, Development of an injectable composite for bone regeneration, *Irbm.* 34 (2013) 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.irbm.2013.01.008>.
- [4] X. Gao, M. Fraulob, G. Haïat, Biomechanical behaviours of the bone-implant interface: A review, *J. R. Soc. Interface.* 16 (2019). <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0259>.
- [5] M.S.M. da S. Moreno, Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo, *Clim. Chang.* 2013 - *Phys. Sci. Basis.* (2014) 1–30. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [6] Ö. Kesmez, Preparation of Anti-bacterial Biocomposite Nanofibers Fabricated by Electrospinning Method, 7 (2020) 125–142.
- [7] A.E. Pazarçeviren, D. Keskin, S. Topsoy, S. Sürdem, Boron-doped Biphasic Hydroxyapatite / β -Tricalcium Phosphate for Bone Tissue Engineering, (2021) 968–980. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02230-8>.
- [8] T. Mehrabi, A.S. Mesgar, Z. Mohammadi, Bioactive glasses: a promising therapeutic ion release strategy for enhancing wound healing, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6 (2020) 5399–5430. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00528>.
- [9] L.L. Hench, The story of Bioglass®, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 967–978. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>.
- [10] H.R. Fernandes, A. Gaddam, A. Rebelo, D. Brazete, G.E. Stan, J.M.F. Ferreira, Bioactive glasses and glass-ceramics for healthcare applications in bone regeneration and tissue engineering, *Materials (Basel).* 11 (2018) 1–54. <https://doi.org/10.3390/ma11122530>.
- [11] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castaño, J.A. Planell, Biomaterials in orthopaedics, *J. R.*

- Soc. Interface. 5 (2008) 1137–1158. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0151>.
- [12] P. Balasubramanian, T. Büttner, V. Miguez Pacheco, A.R. Boccaccini, Boron-containing bioactive glasses in bone and soft tissue engineering, *J. Eur. Ceram. Soc.* 38 (2018) 855–869. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2017.11.001>.
- [13] R.F. Brown, M.N. Rahaman, A.B. Dwilewicz, W. Huang, D.E. Day, Y. Li, B.S. Bal, Effect of borate glass composition on its conversion to hydroxyapatite and on the proliferation of MC3T3-E1 cells, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 88 (2009) 392–400. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31679>.
- [14] W. Huang, D.E. Day, K. Kittiratanapiboon, M.N. Rahaman, Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 583–596. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-9220-z>.
- [15] K. Zheng, M. Kapp, A.R. Boccaccini, Protein interactions with bioactive glass surfaces: A review, *Appl. Mater. Today.* 15 (2019) 350–371. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.02.003>.
- [16] Y. Chen, Y. Feng, J.G. Deveaux, M.A. Masoud, F.S. Chandra, H. Chen, D. Zhang, L. Feng, Biomineralization forming process and bio-inspired nanomaterials for biomedical application: A review, *Minerals.* 9 (2019) 1–21. <https://doi.org/10.3390/min9020068>.
- [17] A. Roschger, W. Wagermaier, S. Gamsjaeger, N. Hassler, I. Schmidt, S. Blouin, A. Berzlanovich, G.M. Gruber, R. Weinkamer, P. Roschger, E.P. Paschalis, K. Klaushofer, P. Fratzl, Newly formed and remodeled human bone exhibits differences in the mineralization process, *Acta Biomater.* 104 (2020) 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.004>.
- [18] E. Hamed, I. Jasiuk, Elastic modeling of bone at nanostructural level, *Mater. Sci. Eng. R Reports.* 73 (2012) 27–49. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2012.04.001>.
- [19] B. Wopenka, J.D. Pasteris, A mineralogical perspective on the apatite in bone, in: *Mater. Sci. Eng. C*, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.01.008>.
- [20] J.A. Cruz, Low-Cost Hydroxyapatite Powders from Tilapia Fish, 72 (2020) 1435–1443.
- [21] S. Sakai, T. Anada, K. Tsuchiya, H. Yamazaki, H.C. Margolis, O. Suzuki, Comparative study on the resorbability and dissolution behavior of octacalcium phosphate, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite under physiological conditions, *Dent. Mater.*

- J. 35 (2016) 216–224. <https://doi.org/10.4012/dmj.2015-255>.
- [22] G. Fernandez de Grado, L. Keller, Y. Idoux-Gillet, Q. Wagner, A.M. Musset, N. Benkirane-Jessel, F. Bornert, D. Offner, Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management, *J. Tissue Eng.* 9 (2018). <https://doi.org/10.1177/2041731418776819>.
- [23] A. Carlos, A. Herrera, Fosfatos de cálcio de interesse biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos, *Quim. Nova.* 33 (2010) 1352–1358. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600025>.
- [24] W.R. Weinand, Hidroxiapatita natural obtida por calcinação de osso de peixe e a sua aplicação na produção de materiais compósitos cerâmicos biocompatíveis., Universidade Estadual de Maringá (UEM), 2009. <http://www.pfi.uem.br/producoes/teses/>.
- [25] C. Pimentel, L. Costa, F. Guimar, F. Sato, K. Miyuki, N. Souza, S. Pal, C. Vataru, F. Pedrochi, A. Steimacher, The role of Ag₂O on antibacterial and bioactive properties of borate glasses, 554 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2020.120611>.
- [26] L.C.A. da Silva, Dissertação_LAÍS-SILVA.pdf, (2019) 71. <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/tede/2917>.
- [27] G. Lopes da Silva, Estudo da bioatividade e ação antibacteriana de vitrocerâmicas obtidas por cristalização controlada, 2020. <https://tedebc.ufma.br/jspui/>.
- [28] W.R. Weinand, W.M. Lima, Processo de obtenção de hidroxiapatita via calcinação do osso de peixe, (2007).
- [29] P. de M. Branco, Mineral, Rocha ou Pedra?, (2016) CPRM-Seviço Geológico do Brasil. <http://www.cprm.gov.br/publique/Redes-Institucionais/Rede-de-Bibliotecas---Rede-Ametista/Mineral%2C-Rocha-ou-Pedra%3F-1047.html>.
- [30] G. Ulian, G. Valdrè, M. Corno, P. Ugliengo, DFT investigation of structural and vibrational properties of type B and mixed A-B carbonated hydroxylapatite, *Am. Mineral.* 99 (2014) 117–127. <https://doi.org/10.2138/am.2014.4542>.
- [31] B. Wopenka, J.D. Pasteris, A mineralogical perspective on the apatite in bone, *Mater. Sci. Eng. C.* 25 (2005) 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.01.008>.
- [32] G. Piga, G. Solinas, T.J.U. Thompson, A. Brunetti, A. Malgosa, S. Enzo, Is X-ray diffraction able to distinguish between animal and human bones?, *J. Archaeol. Sci.* 40 (2013) 778–785. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2012.07.004>.

- [33] C. de C.A. Lopes, P.H.J.O. Limirio, V.R. Novais, P. Dechichi, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone, *Appl. Spectrosc. Rev.* 53 (2018) 747–769. <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1431923>.
- [34] K. de Groot, *Bioceramics of calcium phosphate*, 2018. <https://doi.org/10.1201/9781351070133>.
- [35] J.C. Elliott, Calcium phosphate biominerals, *Phosphates Geochemical, Geobiol. Mater. Importance.* 48 (2019) 427–454. <https://doi.org/10.2138/rmg.2002.48.11>.
- [36] G. Piga, G. Solinas, T.J.U. Thompson, A. Brunetti, A. Malgosa, S. Enzo, Is X-ray diffraction able to distinguish between animal and human bones?, *J. Archaeol. Sci.* (2013). <https://doi.org/10.1016/j.jas.2012.07.004>.
- [37] A.C.F.M. Costa, M.G. Lima, L.H.M.A. Lima, V. V Cordeiro, K.M.S. Viana, *Hidroxiapatita : Obtenção , caracterização e aplicações*, 3 (2009) 29–38.
- [38] C.J. Liao, F.H. Lin, K.S. Chen, J.S. Sun, Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere, *Biomaterials.* 20 (1999) 1807–1813. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00076-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00076-9).
- [39] S. V Oliveira, K.M. Medeiros, E.P. Araújo, C.R.C. Braga, E.M. Araújo, Caracterização química e morfológica do pirofosfato de cálcio obtido por via úmida, *Rev. Eletrônica Mater. e Process.* 3 (2009) 11–20.
- [40] L. Soares, A.F. Oliveira, S. Oliveira, A. Paula, L. Machado, F.P. Rosa, *Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras*, 9 (2010) 37–44.
- [41] C.S. Hsu, S.L. Haag, M.T. Bernards, Q. Li, Effects of chloride substitution on physical, mechanical, and biological properties of hydroxyapatite, *Ceram. Int.* 47 (2021) 13207–13215. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.01.186>.
- [42] L. Müller, E. Conforto, D. Caillard, F.A. Müller, Biomimetic apatite coatings- Carbonate substitution and preferred growth orientation, *Biomol. Eng.* (2007). <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.07.011>.
- [43] E. G. H. Nancollas, *Biological Mineralization and Demineralization*, 1982nd ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1982. [https://doi.org/DOI: 10.1007/978-3-642-68574-3](https://doi.org/DOI:10.1007/978-3-642-68574-3); e-ISBN-13: 978-3-642-68574-3.
- [44] A.P. Mamede, D. Gonçalves, M.P.M. Marques, L.A.E. Batista de Carvalho, Burned bones tell their own stories: A review of methodological approaches to assess heat-

- induced diagenesis, *Appl. Spectrosc. Rev.* 53 (2018) 603–635. <https://doi.org/10.1080/05704928.2017.1400442>.
- [45] A. Grunenwald, C. Keyser, A.M. Sautereau, E. Crubézy, B. Ludes, C. Drouet, Revisiting carbonate quantification in apatite (bio)minerals: A validated FTIR methodology, *J. Archaeol. Sci.* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.05.004>.
- [46] J.M. Hughes, J. Rakovan, The crystal structure of apatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F},\text{OH},\text{Cl})$, *Phosphates Geochemical, Geobiol. Mater. Importance.* 48 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.2138/rmg.2002.48.1>.
- [47] Y. Pan, M.E. Fleet, Compositions of the apatite-group minerals: Substitution mechanisms and controlling factors, *Phosphates Geochemical, Geobiol. Mater. Importance.* 48 (2019) 13–50. <https://doi.org/10.2138/rmg.2002.48.2>.
- [48] A.F. Khan, M. Awais, A.S. Khan, S. Tabassum, A.A. Chaudhry, I.U. Rehman, Raman spectroscopy of natural bone and synthetic apatites, *Appl. Spectrosc. Rev.* 48 (2013) 329–355. <https://doi.org/10.1080/05704928.2012.721107>.
- [49] A.J. Ruys, M. Wei, C.C. Sorrell, M.R. Dickson, A. Brandwood, B.K. Milthorpe, Sintering effects on the strength of hydroxyapatite, *Biomaterials.* 16 (1995) 10 pages. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)98859-C](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)98859-C).
- [50] S. Laasri, M. Taha, A. Laghzizil, E.K. Hlil, J. Chevalier, The affect of densification and dehydroxylation on the mechanical properties of stoichiometric hydroxyapatite bioceramics, *Mater. Res. Bull.* 45 (2010) 1433–1437. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2010.06.040>.
- [51] J. Cihlář, A. Buchal, M. Trunec, Kinetics of thermal decomposition of hydroxyapatite bioceramics, *J. Mater. Sci.* 34 (1999) 6121–6131. <https://doi.org/10.1023/A:1004769820545>.
- [52] A. Sobczak-Kupiec, Z. Wzorek, The influence of calcination parameters on free calcium oxide content in natural hydroxyapatite, *Ceram. Int.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.06.065>.
- [53] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials.* 27 (2006) 2907–2915. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.
- [54] W.D. Callister Jr, D.G. Rethwisch, *Ciência e engenharia de materiais: uma introdução*, 8ª edição, Rio de Janeiro, 2012. isbn: 978-0-470-41997-7, <https://www.grupogen.com.br/editora-ltc>.

- [55] D. Kumar, D.D. Pagar, R. Kumar, C.I. Pruncu, Recent progress of reinforcement materials : a comprehensive overview of composite materials, *Integr. Med. Res.* 8 (2019) 6354–6374. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2019.09.068>.
- [56] F.A. Khalid, O. Beffort, U.E. Klotz, B.A. Keller, P. Gasser, S. Vaucher, Study of microstructure and interfaces in an aluminium – C 60 composite material, 51 (2003) 4575–4582. [https://doi.org/10.1016/S1359-6454\(03\)00294-5](https://doi.org/10.1016/S1359-6454(03)00294-5).
- [57] G. Kaur, V. Kumar, F. Baino, J.C. Mauro, G. Pickrell, I. Evans, O. Bretcanu, Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: state-of-the-art review and future challenges, *Mater. Sci. Eng. C.* 104 (2019) 109895. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109895>.
- [58] D. Bellucci, A. Sola, V. Cannillo, Hydroxyapatite and tricalcium phosphate composites with bioactive glass as second phase: State of the art and current applications, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 104 (2016) 1030–1056. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35619>.
- [59] D.G. Callister Jr, William D.; Rethwisch, *Ciência e engenharia de materiais: uma introdução*, Oitava edi, Rio de Janeiro, 2012. <https://www.grupogen.com.br/editora-ltc>.
- [60] Christophe Drouet, Apatite formation: why it may not work as planned, and how to conclusively identify apatite compounds., *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 12 pages. 10.1155/2013/490946.
- [61] F. Judas, P. Palma, H. Figueiredo, *Estrutura e dinâmica do tecido ósseo*; Coimbra: Clínica Universitária de Ortopedia, HUC, in: 2012: pp. 1–51. <http://hdl.handle.net/10400.4/1346>.
- [62] A. Behnamghader, N. Bagheri, B. Raissi, F. Moztafzadeh, Phase development and sintering behaviour of biphasic HA-TCP calcium phosphate materials prepared from hydroxyapatite and bioactive glass, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008) 197–201. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3120-8>.
- [63] A. Kumar, C.R. Mariappan, B.S. Sarahan, Antibacterial and structural properties of mesoporous Ag doped calcium borosilicate glass-ceramics synthesized via a sol-gel route, *J. Non. Cryst. Solids.* 505 (2019) 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2018.11.024>.
- [64] A.M. El-Kady, A.F. Ali, R.A. Rizk, M.M. Ahmed, Synthesis, characterization and microbiological response of silver doped bioactive glass nanoparticles, *Ceram. Int.* 38 (2012) 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.05.158>.

- [65] O. Lysenko, O. Dubok, A. Borysenko, O. Shinkaruk, The biological properties of the silver- and copper-doped ceramic biomaterial, *J. Nanoparticle Res.* 17 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11051-015-2971-z>.
- [66] F.H. El-Batal, A.A. El-Kheshen, G.T. El-Bassyouni, A.A. Abd El Aty, In vitro bioactivity behavior of some borate glasses and their glass-ceramic derivatives containing Zn²⁺, Ag⁺ or Cu²⁺ by immersion in phosphate solution and their anti-microbial activity, *Silicon.* 10 (2018) 943–957. <https://doi.org/10.1007/s12633-017-9552-y>.
- [67] J. Kolmas, F. Velard, A. Jaguszewska, F. Lemaire, H. Kerdjoudj, S.C. Gangloff, A. Kaflak, Substitution of strontium and boron into hydroxyapatite crystals: Effect on physicochemical properties and biocompatibility with human Wharton-Jelly stem cells, *Mater. Sci. Eng. C.* 79 (2017) 638–646. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.066>.
- [68] R. Ternane, M.T. Cohen-Adad, G. Panczer, C. Goutaudier, N. Kbir-Arighuib, M. Trabelsi-Ayedi, P. Florian, D. Massiot, Introduction of boron in hydroxyapatite: Synthesis and structural characterization, *J. Alloys Compd.* 333 (2002) 62–71. [https://doi.org/10.1016/S0925-8388\(01\)01558-4](https://doi.org/10.1016/S0925-8388(01)01558-4).
- [69] J.C. Knowles, S. Talal, J.D. Santos, Sintering effects in a glass reinforced hydroxyapatite, *Biomaterials.* 17 (1996) 1437–1442. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)87287-5](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)87287-5).
- [70] S.A. Speakman, Basics of X-Ray Powder Diffraction; <http://prism.mit.edu/xray>, Basics X-Ray Powder Diffr. (n.d.) <http://prism.mit.edu/xray>. <http://prism.mit.edu/xray>.
- [71] K.D. Rogers, P. Daniels, An X-ray diffraction study of the effects of heat treatment on bone mineral microstructure, *Biomaterials.* 23 (2002) 2577–2585. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00395-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00395-7).
- [72] C. Meneghini, M.C. Dalconi, S. Nuzzo, S. Mobilio, R.H. Wenk, Rietveld refinement on x-ray diffraction patterns of bioapatite in human fetal bones, *Biophys. J.* (2003). [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75010-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75010-3).
- [73] R.M. Wilson, J.C. Elliott, S.E.P. Dowker, L.M. Rodriguez-Lorenzo, Rietveld refinements and spectroscopic studies of the structure of Ca-deficient apatite, *Biomaterials.* 26 (2005) 1317–1327. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.038>.
- [74] A.S. Khan, H. Khalid, Z. Sarfraz, M. Khan, J. Iqbal, N. Muhammad, M.A. Fareed, I.U.

- Rehman, Vibrational spectroscopy of selective dental restorative materials, *Appl. Spectrosc. Rev.* 52 (2017) 507–540. <https://doi.org/10.1080/05704928.2016.1244069>.
- [75] A. Rapacz-Kmita, C. Paluszkiwicz, A. Ślósarczyk, Z. Paszkiewicz, FTIR and XRD investigations on the thermal stability of hydroxyapatite during hot pressing and pressureless sintering processes, *J. Mol. Struct.* 744–747 (2005) 653–656. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.11.070>.
- [76] Y. Sa, Y. Guo, X. Feng, M. Wang, P. Li, Y. Gao, methods of hydroxyapatite efficient and, (2017) 14–19. <https://doi.org/10.1039/c7nj00803a>.
- [77] S. Weiner, O. Bar-yosefa, States of Preservation of Bones from Prehistoric Sites in the Near East : A Survey, (1990) 187–196.
- [78] T. Monterey, M. Formation, T.H.E. Most, C. Muvfx, ALDOSHEMESE-I Isotope Department, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76 100, Israel, (1990) 2433–2438.
- [79] V.C. Barbosa, Um aparato experimental para o estudo do princípio de Arquimedes, *Rev. Bras. Ensino Física*, v. 28,. (2006) 115–122. <https://www.scielo.br/j/rbef/a/P4tRK3vSC6kBCgR9WrkrJTx/?format=pdf&lang=pt>.
- [80] R.M.W. Ilson, J.C.E. Lliott, S.E.P.D. Owker, Rietveld refinement of the crystallographic structure of human dental enamel apatites, *Am. Mineral.* 84 (1999) 1406–1414. [https://doi.org/0003-004X/99/0009-1406\\$05.00](https://doi.org/0003-004X/99/0009-1406$05.00).
- [81] A. Pal, S. Paul, A. Roy, V. Krishna, M. Das, A. Sinha, Synthesis of hydroxyapatite from Lates calcarifer fish bone for biomedical applications, *Mater. Lett.* 203 (2017) 89–92. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.05.103>.
- [82] L.C.F. Alves, Estudo da influência do fluoreto de cálcio na bioatividade de vidros borato, UFMA, 2017. <https://tedebc.ufma.br/jspui/handle/tede/tede/1939>.
- [83] I.J. Hidi, G. Melinte, R. Stefan, M. Bindea, L. Baia, The study of the structure and bioactivity of the $B_2O_3 \cdot Na_2O \cdot P_2O_5$ system, *J. Raman Spectrosc.* 44 (2013) 1187–1194. <https://doi.org/10.1002/jrs.4330>.
- [84] B.Y.M.B.E.N. Amara, M. Vlasse, G.L.E. Flem, P. Hagenmuller, Structure of the low - temperature variety of calcium sodium orthophosphate, *NaCaPO₄*, 38679 (1983) 1483–1485. <https://doi.org/10.1107/S0108270183008963>.
- [85] F. S., P. Landmark, The crystal structure of phosphorous acid, *Acta Chemica Scandinavica II*, 1957. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.11-1505>.
- [86] I. Kangasniemi, K. De Groot, J. Wolke, O. Andersson, Z. Luklinska, J.G.M. Becht, M.

- Lakkisto, A. Yli-Urpo, The stability of hydroxyapatite in an optimized bioactive glass matrix at sintering temperatures, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2 (1991) 133–137. <https://doi.org/10.1007/BF00692970>.
- [87] P. Shi, M. Liu, F. Fan, C. Yu, W. Lu, M. Du, Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its biocompatibility with osteoblasts, *Mater. Sci. Eng. C.* 90 (2018) 706–712. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.026>.
- [88] R. Ternane, M.T. Cohen-adad, G. Boulon, P. Florian, D. Massiot, M. Trabelsi-ayedi, N. Kbir-ariguib, C.B.L. I, Synthesis and characterization of new oxyborapatite . Investigation of the ternary system $\text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{B}_2\text{O}_3$, 160 (2003) 183–195. [https://doi.org/10.1016/S0167-2738\(03\)00161-9](https://doi.org/10.1016/S0167-2738(03)00161-9).
- [89] S. Barheine, S. Hayakawa, C. Ja, Y. Shirosaki, A. Osaka, Effect of Disordered Structure of Boron-Containing Calcium Phosphates on their In Vitro Biodegradability, 2662 (2011) 2656–2662. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2011.04400.x>.
- [90] P. Nabuco Portes, Caracterização e avaliação da bioatividade in vitro do sistema vítreo: $60\text{B}_2\text{O}_3 - 5\text{CaF}_2 - (20-x)\text{Na}_2\text{O} - (15-x)\text{CaO} - 2x\text{P}_2\text{O}_5$ ($x = 0, 1, 2$)., UEM - Universidade Estadual de Maringá, 2018. http://www.pfi.uem.br/wp-content/uploads/2021/02/tese_pablo_nabuco_portes_2018.pdf.
- [91] S. Paul, A. Pal, A. Roy, S. Bodhak, Effect of trace elements on the sintering effect of fish scale derived hydroxyapatite and its bioactivity, 43 (2017) 15678–15684. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.08.127>.
- [92] O. Albayrak, Materials characterization structural and mechanical characterization of boron doped biphasic calcium phosphate produced by wet chemical method and subsequent thermal treatment, *Mater. Charact.* 113 (2016) 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2016.01.006>.
- [93] P. Shi, M. Liu, F. Fan, C. Yu, W. Lu, M. Du, Materials Science & Engineering C Characterization of natural hydroxyapatite originated from fish bone and its biocompatibility with osteoblasts, *Mater. Sci. Eng. C.* 90 (2018) 706–712. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.026>.
- [94] A. Yao, D. Wang, W. Huang, Q. Fu, M.N. Rahaman, D.E. Day, In vitro bioactive characteristics of borate-based glasses with controllable degradation behavior, *J. Am. Ceram. Soc.* 90 (2007) 303–306. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2006.01358.x>.
- [95] X. Liu, M.N. Rahaman, D.E. Day, Conversion of melt-derived microfibrillar borate ($13\text{-}93\text{B}_3$) and silicate (45S_5) bioactive glass in a simulated body fluid, *J. Mater. Sci.*

- Mater. Med. 24 (2013) 583–595. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4831-z>.
- [96] S. H.E., F. R.K., U. G.M., Standard X-ray diffraction powder patterns, National Bureau of Standards Circular (U. S.) (1955) 539, (4) Article ID * (p. 1-75), 1955.
- [97] S.M. Londoño-Restrepo, R. Jeronimo-Cruz, B.M. Millán-Malo, E.M. Rivera-Muñoz, M.E. Rodríguez-García, Effect of the Nano Crystal Size on the X-ray Diffraction Patterns of Biogenic Hydroxyapatite from Human, Bovine, and Porcine Bones, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42269-9>.
- [98] C.J.S. Ibsen, D. Chernyshov, H. Birkedal, Apatite formation from amorphous calcium phosphate and mixed amorphous calcium phosphate/amorphous calcium carbonate, *Chem. - A Eur. J.* 22 (2016) 12347–12357. <https://doi.org/10.1002/chem.201601280>.
- [99] R. Gelli, F. Ridi, P. Baglioni, The importance of being amorphous: calcium and magnesium phosphates in the human body, *Adv. Colloid Interface Sci.* 269 (2019) 219–235. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.04.011>.
- [100] S. Von Euw, Y. Wang, G. Laurent, C. Drouet, F. Babonneau, N. Nassif, T. Azaïs, Bone mineral: new insights into its chemical composition, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44620-6>.
- [101] W. Querido, N. Shanas, S. Bookbinder, M.C. Oliveira-nunes, B. Krynska, N. Pleshko, Mineral: From Amorphous Precursor to Mature Crystal, 145 (2021) 764–776. <https://doi.org/10.1039/c9an01588d>.Fourier.
- [102] S.S. Rojas, J.E. De Souza, K. Yukimitu, A.C. Hernandez, Structural, thermal and optical properties of CaBO and CaLiBO glasses doped with Eu³⁺, *J. Non. Cryst. Solids.* 398–399 (2014) 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2014.04.026>.
- [103] A. Jilavenkatesa, R.A. Condrate, The infrared and raman spectra of tetracalcium phosphate (Ca₄P₂O₉), *Spectrosc. Lett.* 30 (1997) 1561–1570. <https://doi.org/10.1080/00387019708006744>.
- [104] S. Unal, N. Ekren, A.Z. Sengil, F.N. Oktar, S. Irmak, O. Oral, Y.M. Sahin, O. Kilic, S. Agathopoulos, O. Gunduz, Synthesis, characterization, and biological properties of composites of hydroxyapatite and hexagonal boron nitride, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 106 (2018) 2384–2392. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34046>.
- [105] G. Georgiou, J.C. Knowles, Glass reinforced hydroxyapatite for hard tissue surgery - Part 1: Mechanical properties, *Biomaterials.* 22 (2001) 2811–2815. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00025-4).
- [106] D.C. Tancred, A.J. Carr, The sintering and mechanical behavior of hydroxyapatite with

bioglass additions, 2 (2001) 81–93.