MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

ODIVAL SEABRA

# Biovidros ativos multifuncionais dopados com prata e európio para aplicações biomédicas: caracterização, atividade antibacteriana, citocompatibilidade e potencial regenerativo

Uberaba, MG
2026

ODIVAL SEABRA

# Biovidros ativos multifuncionais dopados com prata e európio para aplicações biomédicas: caracterização, atividade antibacteriana, citocompatibilidade e potencial regenerativo

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração II Parasitologia, Imunologia e Microbiologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo César Rosa

Co-orientador: Prof. Dr. Anderson Assunção Andrade

Uberaba, MG

2026

**Catalogação na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

Seabra, Odival
S445b Biovidros ativos multifuncionais dopados com prata e európio para aplicações biomédicas: caracterização, atividade antibacteriana, citocompatibilidade e potencial regenerativo / Odival Seabra. -- 2026.
76 f.: il., fig., graf.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2026
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo César Rosa
Coorientador: Prof. Dr. Anderson Assunção Andrade

1. Nanotecnologia. 2. Biofilmes. 3. Prata. 4. Materiais biocompatíveis 5. Regeneração óssea. I. Rosa, Rodrigo César Rosa. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 620.3

Sônia Maria Rezende Paolinelli – Bibliotecária CRB-6/1191

**ODIVAL SEABRA**

**BIOVIDROS ATIVOS MULTIFUNCIONAIS DOPADOS COM PRATA E EURÓPIO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS: CARACTERIZAÇÃO, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, CITOCOMPATIBILIDADE E POTENCIAL REGENERATIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em **BIOCIÊNCIAS (ANTIGO CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS)**, área de concentração **"II: PARASITOLOGIA, IMUNOLOGIA E MICROBIOLOGIA"** (Linha de Pesquisa: **MODELAGEM MOLECULAR, BIOSSENSORES E MATERIAIS NANOESTRUTURADOS APLICADOS EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

Uberaba, 01 de setembro de 2026.

**Banca Examinadora:**

Dr. Rodrigo César Rosa – Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Drª. Aline Dias Paiva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Dr. Carlo José Freire de Oliveira
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL

Drª. Ralciane de Paula Menezes
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

---

Documento assinado eletronicamente por **RODRIGO CESAR ROSA**, **Professor do Magistério Superior**, em 16/09/2026, às 08:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024.

---

Documento assinado eletronicamente por **CARLO JOSE FREIRE DE OLIVEIRA**, **Professor do Magistério Superior**, em

17/09/2026, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024.

Documento assinado eletronicamente por **ALINE DIAS PAIVA**, **Professor do Magistério Superior**, em 18/09/2026, às 10:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024.

Documento assinado eletronicamente por **Ralciane de Paula Menezes**, **Usuário Externo**, em 18/09/2026, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024.

Documento assinado eletronicamente por **Luiz Cosme Cotta Malaquias**, **Usuário Externo**, em 29/09/2026, às 15:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 e no art. 34 da Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1868999** e o código CRC **4740758D**.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Sandoval (*in memorian*) e Maria, a minha esposa, Beatriz, ao meu irmão Sander. Obrigado por acreditarem em mim e pelo amor que nos une. E a meus filhos, Bernardo e Benício, que chegaram e mudaram minha vida!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo. Por toda a coragem, luz, determinação e força na escolha da direção correta a tomar e por dar-me a oportunidade de conhecer tantas pessoas boas que têm cruzado o meu caminho ultimamente. Ao meu Pai Sandoval Seabra (*in memorian*), minha Mãe Maria Lopes Seabra e ao meu irmão Sander, pelo amor, carinho e atenção que sempre me deram.

À minha esposa Beatriz e aos meus filhos, Bernardo e Benício, pois são minha fortaleza.

Ao Prof. Dr. Rodrigo César Rosa, meu orientador e amigo, pela confiança em mim depositada. Agradeço por ter acreditado no meu potencial e por todas as oportunidades que me deu. Sabe que é muito mais que um orientador, que além de sabedoria e competência, possui uma grande determinação, dinamismo, que o tornam uma pessoa muito especial. Muito obrigado Rodrigo, por tudo, este trabalho tem muito de você.

Aos amigos da disciplina de Anatomia, que me ajudaram nessa caminhada.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e seus professores pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento profissional. Especialmente aqueles que estiveram presentes em todas as etapas importantes, desde o processo de seleção até hoje.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na execução desse trabalho. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

## RESUMO

Os biovidros nanoestruturados têm emergido como biomateriais promissores para o reparo ósseo, particularmente quando funcionalizados com íons capazes de conferir propriedades antimicrobianas. Este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho biológico de biovidros dopados com prata e európio por meio de caracterização físico-química, ensaios *in vitro* e avaliação *in vivo* em modelo experimental. A caracterização estrutural confirmou a formação de uma rede vítrea típica composta por $SiO_2$–$Na_2O$–CaO–$P_2O_5$, com modificações estruturais associadas à incorporação de prata. Os resultados *in vitro* demonstraram que as formulações contendo prata apresentaram atividade antibacteriana e antibiofilme dependente da concentração contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*, mantendo elevada citocompatibilidade em células Vero. A incorporação de európio não influenciou significativamente os parâmetros biológicos avaliados. Com base nesses resultados, as formulações contendo 0,5% e 1,25% (m/m) de prata foram selecionadas para avaliação *in vivo* em um modelo de defeito ósseo em calvária de ratos. Os resultados demonstraram que a concentração de prata modulou diretamente a resposta tecidual, sendo que a formulação com 0,5% promoveu uma resposta inflamatória inicial mais pronunciada, enquanto a formulação contendo 1,25% esteve associada a maior deposição de colágeno e maturação da matriz extracelular. Conclui-se que a dopagem com prata confere propriedades multifuncionais aos biovidros, destacando seu potencial para aplicações em engenharia tecidual óssea. A concentração do dopante desempenha papel fundamental no equilíbrio entre eficácia antimicrobiana e resposta biológica.



**Palavras-chave:** Biovidro nanoestruturado; Prata; Atividade antibacteriana; Biofilme; Regeneração óssea.

## ABSTRACT

Nanostructured bioactive glasses have emerged as promising biomaterials for bone repair, particularly when functionalized with ions capable of providing antimicrobial properties. This study aimed to evaluate the biological performance of bioactive glasses doped with silver and europium through physicochemical characterization, *in vitro* assays, and *in vivo* evaluation in an experimental model. Structural characterization confirmed the formation of a typical $SiO_2$–$Na_2O$–$CaO$–$P_2O_5$ glass network, with structural modifications associated with silver incorporation. *In vitro* results demonstrated that silver-containing formulations exhibited concentration-dependent antibacterial and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus mutans*, while maintaining high cytocompatibility in Vero cells. Europium incorporation did not significantly influence the evaluated biological parameters. Based on these findings, formulations containing 0.5 wt% and 1.25 wt% silver were selected for *in vivo* evaluation in a rat calvarial defect model. The results showed that silver concentration directly modulated tissue response, with 0.5 wt% promoting a more pronounced initial inflammatory response, whereas 1.25 wt% was associated with increased collagen deposition and extracellular matrix maturation. In conclusion, silver doping confers multifunctional properties to bioactive glasses, highlighting their potential for bone tissue engineering applications. The dopant concentration plays a critical role in balancing antimicrobial efficacy and biological response.



**Keywords:** Nanostructured bioactive glass; Silver; Antibacterial activity; Biofilm; Bone regeneration.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AAS** – Espectrometria de Absorção Atômica (*Atomic Absorption Spectrometry*)

**Ag** – Prata

**$Ag^+$** – Íon prata

**AgNPs** – Nanopartículas de prata (*Silver Nanoparticles*)

**ANOVA** – Análise de Variância (*Analysis of Variance*)

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**BHI** – *Brain Heart Infusion* (Caldo Infusão Cérebro-Coração)

**CaO** – Óxido de cálcio

**CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**CLSM** – Microscopia Confocal de Varredura a Laser (*Confocal Laser Scanning Microscopy*)

**CuO** – Óxido de cobre

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

**DRX** – Difração de Raios X

**ELISA** – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

**Eu** – Európio

**$Eu^{3+}$** – Íon európio trivalente

**FAPEMIG** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

**FRX** – Fluorescência de Raios X

**FTIR** – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

**HA** – Hidroxiapatita (*Hydroxyapatite*)

**ICBN** – Instituto de Ciências Biológicas e Naturais

**ICP-MS** – Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

**IFN-γ** – Interferon gama

**IL-4** – Interleucina 4

**IL-6** – Interleucina 6

**IL-10** – Interleucina 10

**ISO** – Organização Internacional para Padronização (*International Organization for Standardization*)

**LB** – *Luria–Bertani* (meio de cultura)

**MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura

**MRSA** – *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (Staphylococcus aureus resistente à meticilina)

**MTT** – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

**$Na_2O$** – Óxido de sódio

**OD600** – Densidade Óptica a 600 nm (*Optical Density at 600 nm*)

**$P_2O_5$** – Pentóxido de fósforo

**PEG** – Polietilenoglicol

**RNA** – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

**ROS** – Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

**RT-qPCR** – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real com Transcrição Reversa (*Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

**SBF** – Fluido Corporal Simulado (*Simulated Body Fluid*)

**$SiO_2$** – Dióxido de silício

**SNCP** – Sistema vítreo composto por $SiO_2$–$Na_2O$–CaO–$P_2O_5$

**TNF-α** – Fator de Necrose Tumoral Alfa (*Tumor Necrosis Factor Alpha*)

**TSB** – *Tryptic Soy Broth* (Caldo de Soja Tríptica)

**UFC** – Unidade Formadora de Colônia

**UFTM** – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**UNIUBE** – Universidade de Uberaba

**Vero** – Linhagem celular derivada de células renais de *Cercopithecus aethiops* (macaco-verde-africano)

**XPS** – Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*)

**XRD** – Difração de Raios X (*X-ray Diffraction*)

**XTT** – Sal tetrazólio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

**ZnO** – Óxido de zinco

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**TOC GRAPHIC (Artigo)**.....**42**

**Figura 1** (A e B) Espectros de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos biovidros nanoestruturados: (A) biovidro base (SNCP) e (B) biovidro dopado com prata (Ag-1,25%).....**50**

**Figura 2** (A e B) Difratogramas de difração de raios X (DRX) dos biovidros nanoestruturados: (A) biovidro base (SNCP) e (B) biovidro dopado com prata (Ag-1,25%).....**52**

**Figura 3** Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos biovidros nanoestruturados em diferentes ampliações.....**53**

**Figura 4** Viabilidade celular (%) avaliada por ensaio MTT em células Vero após exposição a diferentes concentrações de biovidros nanoestruturados contendo variações de prata e európio.....**55**

**Figura 5** Atividade antibacteriana e efeito sobre biofilme de *Staphylococcus aureus* exposto aos biovidros nanoestruturados.....**57**

**Figura 6** Atividade antibacteriana e efeito sobre biofilme de *Escherichia coli* exposto aos biovidros nanoestruturados.....**59**

**Figura 7** Atividade antibacteriana e efeito sobre biofilme de *Streptococcus mutans* exposto aos biovidros nanoestruturados.....**60**

**Figura 8** Cortes histológicos da calvária de ratos e quantificação de cristais residuais grupo (SNCP 0Eu 1.25 Ag).....**61**

**Figura 9** Cortes histológicos e quantificação da infiltração de células inflamatórias no centro da lesão (entre cristais).....**62**

**Figura 10** Cortes histológicos e quantificação da infiltração de células na periferia da lesão (SNCP 0Eu 1.25 Ag).....**64**

**Figura 11** Níveis plasmáticos de citocinas (IFN-γ, IL-10 e TNF-α).....**66**

**Figura 12** Análise qualitativa e quantitativa da deposição de colágeno na área do defeito ósseo.....**67**

# SUMÁRIO

**1 INTRODUÇÃO**..... 15

**2 REVISÃO DA LITERATURA**..... 17

2.1 Biovidros: conceito, composição e propriedades bioativas ..... 17

2.2 Biovidros dopados com prata: mecanismos antimicrobianos e aplicações biomédicas..... 18

2.3 Viabilidade celular em sistemas com biovidros e biovidros dopados com prata..... 19

2.4 Formação e dinâmica de biofilmes em contato com biovidros e biovidros dopados com prata ..... 20

2.5 Biovidros dopados com európio: propriedades biológicas e aplicações em biomateriais.. 22

2.6 Considerações sobre métodos in vitro de avaliação da atividade biológica de biovidros.. 23

2.7 Mecanismos de ação antibacteriana dos íons prata em materiais biomédicos..... 24

2.8 Estratégias de dopagem de biovidros com prata: métodos de síntese e controle de liberação iônica ..... 25

2.9 Interações entre células e íons metálicos: efeitos da prata na viabilidade celular *in vitro*. 26

2.10 Resposta inflamatória e imunomodulação induzida por biovidros dopados..... 27

2.11 Matriz extracelular, deposição de colágeno e regeneração óssea ..... 28

2.12 Caracterização físico-química de biovidros dopados: aplicações de FTIR, DRX, FRX e MEV ..... 29

2.13 Modelos de biofilme em testes *in vitro*: desafios e perspectivas para avaliação de biomateriais ..... 30

2.14 Nanotecnologia aplicada a biovidros: vantagens estruturais e funcionais dos anobiovidros ..... 31

2.15 Avaliações comparativas entre biovidros convencionais e nanoestruturados: implicações para aplicação clínica ..... 32

2.16 Técnicas analíticas para avaliação da formação de biofilmes e liberação iônica em biovidros dopados com prata ..... 33

**3 JUSTIFICATIVA** ..... 35

**4 HIPÓTESE** ..... 36

**5 OBJETIVOS** ..... 37

5.1 Objetivo geral ..... 37

5.2 Objetivos específicos ..... 37

**6 REFERÊNCIAS** ..... 38

**APÊNDICE A** – Comprovante de submissão do artigo ..... 41

**APÊNDICE B** – Artigo científico ..... 42

**APÊNDICE C** – Lista de participação dos coautores ..... 75

**ANEXO A** – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa ..... 76

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por materiais bioativos capazes de promover regeneração tecidual, prevenir infecções e manter compatibilidade com o meio biológico tem levado ao desenvolvimento de tecnologias que inovem na área de biomateriais. Entre esses, os biovidros têm se destacado como um dos principais materiais utilizados em aplicações médicas e odontológicas, devido à excelente bioatividade, à capacidade de ligação química com os tecidos e à liberação controlada de íons terapêuticos. (HENCH, 2006; HENCH; POLAK, 2002). Esses materiais são compostos por uma matriz vítrea que pode ser construída com diferentes composições químicas, possibilitando a modulação de suas propriedades físico-químicas e biológicas.

Os biovidros tradicionais, como o 45S5 Bioglass®, são amplamente estudados e demonstraram desempenho superior em aplicações clínicas envolvendo substituição óssea, recobrimento de implantes e na regeneração periodontal. Sua bioatividade está relacionada à formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada, que se assemelha à do osso natural, quando expostos a fluidos corporais (ARAÚJO et al., 2021). No entanto, apesar dessas vantagens, os biovidros ainda enfrentam limitações, principalmente quanto à resistência mecânica em ambientes de carga e, sobretudo, à ausência de propriedades antimicrobianas intrínsecas, o que pode favorecer infecções no pós-operatório e falhas nos implantes (SIQUEIRA et al., 2021; HALL-STOODLEY et al., 2009; COSTERTON et al.,1999).

A formação de biofilmes bacterianos sobre a superfície de biomateriais representa um enorme desafio clínico, uma vez que os microrganismos que formam biofilmes apresentam uma resistência significativamente maior aos antimicrobianos convencionais e às respostas imunes do hospedeiro (DONLAN; COSTERTON , 2002). A colonização bacteriana precoce pode comprometer o sucesso do implante e levar a infecções persistentes, como a osteomielite e a peri-implantite, exigindo a remoção cirúrgica do biomaterial.

Diante desses enormes desafios, a incorporação de agentes antimicrobianos, como a prata (Ag), aos biovidros tem surgido como uma estratégia promissora por apresentar propriedades bactericidas sem comprometer a bioatividade. A prata, conhecida desde a antiguidade por sua ação antimicrobiana, tem seu efeito potencializado quando utilizada em forma de nanopartículas, devido à maior área superficial de contato e portanto, maior liberação de íons $Ag^{+}$ (RAJENDRAN et al., 2022). Esses íons interagem com proteínas, enzimas e ácidos nucléicos bacterianos, levando à desestruturação da parede celular e por conseguinte, inibição enzimática e morte celular (GODOY-GALLARDO et al., 2021).

Sendo que, a incorporação de prata em biovidros pode ocorrer de diferentes formas: como dopagem iônica durante o processo de fusão, impregnação superficial ou por técnicas sol-gel, cada uma com implicações distintas na liberação iônica, morfologia e resposta biológica (BORGES et al., 2023). Nesse contexto, os biovidros nanoestruturados surgem como uma alternativa tecnológica de última geração, apresentando características morfológicas e estruturais que favorecem a liberação controlada de íons e a interação celular, além de facilitarem a funcionalidade com nanopartículas metálicas (GUPTA et al., 2026).

Contudo, a combinação entre biocompatibilidade celular**,** atividade antibacteriana e resistência à formação de biofilmes em biovidros contendo prata ainda é um grande desafio a ser superado. A liberação excessiva de íons prata pode causar citotoxicidade, enquanto concentrações insuficientes podem não promover efeito bactericida eficiente (LI et al., 2024).

Assim, é necessário encontrar um equilíbrio entre eficácia antimicrobiana e segurança celular, por meio de ensaios *in vitro* padronizados que avaliem não apenas a viabilidade de células humanas, como osteoblastos e fibroblastos, mas também a capacidade do material de inibir o crescimento bacteriano e impedir a formação dos biofilmes.

Dessa forma, esta tese propõe a avaliação *in vitro* da viabilidade celular, da atividade bactericida e da dinâmica de formação de biofilmes em biovidros puros e nanoestruturados com prata**,** buscando compreender como a composição e a morfologia desses materiais influencia suas interações com células humanas e microrganismos. O estudo inclui análises morfológicas e estruturais dos biovidros, ensaios de citotoxicidade, testes antibacterianos frente a cepas clínicas relevantes e avaliação da formação e desorganização de biofilmes em condições simuladas *in vitro*.

Espera-se que os resultados possam contribuir para o desenvolvimento de biomateriais multifuncionais, capazes de atuar na regeneração tecidual e na prevenção de infecções associadas a implantes, ampliando as aplicações clínicas dos biovidros e oferecendo soluções inovadoras para os vastos desafios da medicina regenerativa contemporânea.

# 2 REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1 Biovidros: conceito, composição e propriedades bioativas

Os biovidros são materiais vítreos bioativos compostos por óxidos, tais como dióxido de silício ($SiO_2$), óxido de sódio ($Na_2O$), óxido de cálcio (CaO) e pentóxido de fósforo ($P_2O_5$), formulados de modo a permitir a interação com tecidos biológicos e a indução da formação de uma camada de hidroxiapatita (HA) carbonatada, química e estruturalmente semelhante à fase mineral do tecido ósseo humano (HENCH; POLAK, 2002). O desenvolvimento do primeiro biovidro, o 45S5 Bioglass®, por Larry Hench em 1969, representou um marco nos estudos com biomateriais, sendo ainda hoje amplamente utilizado como referência em pesquisas e aplicações clínicas destes (HENCH, 2006).

A composição clássica do 45S5 inclui cerca de 45% em peso de $SiO_2$, 24,5% de $Na_2O$, 24,5% de CaO e 6% de $P_2O_5$. Essa formulação confere ao material uma estrutura amorfa que favorece a rápida troca iônica com fluidos biológicos, desencadeando a nucleação e o crescimento da camada de hidroxiapatita **(**BENETTI et al., 2024). Esse processo, conhecido como bioatividade, é uma das características mais distintas dos biovidros e está diretamente associado à sua capacidade de formar uma interface sólida com o tecido ósseo, que promove a osteointegração. A bioatividade dos biovidros é frequentemente avaliada por meio de testes *in vitro* em fluidos corpóreos simulados (SBF), que permitem observar a formação da camada bioativa sobre a superfície do material (KOKUBO; TAKADAMA, 2006).

Além da bioatividade, os biovidros apresentam outras propriedades fundamentais, como a biodegradabilidade controlada, o que permite sua reabsorção progressiva pelo organismo ao longo do tempo, e a liberação de íons terapêuticos, dentre eles, cálcio, fósforo e silício, os quais desempenham funções importantes na estimulação da proliferação e diferenciação celular, angiogênese e mineralização óssea (DASH et al., 2023; STORBECK et al., 2026). A taxa de degradação dos biovidros pode ser modulada pela variação na composição química de sua estrutura, possibilitando sua adaptação a diferentes aplicações biomédicas.

Adicionado a isso, os biovidros podem ser preparados para diferentes funcionalidades quando inseridos elementos metálicos, como cobre, zinco, estrôncio e prata, a fim de conferir propriedades antimicrobianas, osteogênicas e angiogênicas ao material (KAZEMIAN et al., 2021; HU et al., 2025). A incorporação de nanopartículas metálicas ou

íons metálicos na matriz vítrea tem se mostrado eficaz no controle de infecções em implantes e na prevenção da formação de biofilmes bacterianos, sem contudo, comprometer a biocompatibilidade do material.

Essas características tornam os biovidros versáteis e promissores para uma ampla gama de aplicações na área da engenharia tecidual e biomateriais, incluindo o recobrimento de próteses e implantes ortopédicos e dentários, substitutos ósseos, enxertos para regeneração óssea e produtos odontológicos restauradores. O contínuo desenvolvimento de novas fórmulas e técnicas de processamento, como a produção de biovidros nanoestruturados ou por impressão 3D, tem ampliado muito o potencial de aplicação desses materiais em contextos clínicos e terapêuticos inovadores **(**DASH et al., 2023; KAZEMIAN et al., 2021).

## 2.2 Biovidros dopados com prata: mecanismos antimicrobianos e aplicações biomédicas

A dopagem de biovidros com prata (Ag) tem sido amplamente explorada como uma estratégia muito eficaz para incorporar propriedades antimicrobianas aos biomateriais, com o objetivo de prevenir infecções associadas a implantes e promover a biossegurança em ambientes clínicos. A prata, na forma iônica ($Ag^+$) ou como nanopartículas (AgNPs), é conhecida por sua ampla ação bactericida, atuando contra bactérias *Gram*-positivas e *Gram*-negativas, além de fungos e vírus (THONGNUEK et al., 2025).

A incorporação da prata na matriz vítrea pode ser realizada por diferentes métodos, onde cada um tem vantagens e desvantagens, como por exemplo, por troca iônica ou sol-gel, sendo este último particularmente vantajoso por permitir o controle da homogeneidade e da morfologia das partículas de prata (SALINAS; VALLET-REGÍ, 2013). Durante a liberação em meios biológicos, os íons prata interagem com estruturas celulares bacterianas, o que promove danos às membranas e desnaturação de proteínas assim como, inibição de enzimas e fragmentação do DNA, culminando na morte celular (MEHER et al., 2024).

Do ponto de vista biomédico, os biovidros dopados com prata apresentam grande potencial para aplicações em recobrimentos de implantes ortopédicos e dentários, preenchimentos ósseos e curativos de feridas, especialmente em contextos clínicos de alto risco para infecções (DASH et al., 2023). Além de sua conhecida atuação antimicrobiana direta, a presença de prata pode influenciar de modo positivo a formação de hidroxiapatita na superfície do biovidro, contribuindo assim para a bioatividade do material (HU et al., 2025).

Contudo, a concentração de prata deve ser criteriosamente controlada, uma vez que teores elevados podem comprometer a viabilidade celular e a biocompatibilidade do material.

Estudos demonstram que concentrações moderadas de Ag+ (entre 0,5% e 2% em peso) são eficazes na inibição bacteriana sem efeitos citotóxicos significativos sobre células osteoblásticas e fibroblásticas (KAZEMIAN et al., 2021; PRASAD et al., 2026). A toxicidade da prata está relacionada à geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e à disfunção mitocondrial em células eucarióticas, o que reforça a importância do equilíbrio entre eficácia antimicrobiana e segurança biológica.

Nos últimos anos, a utilização de prata em escala nanométrica tem despertado grande interesse, devido à maior área superficial e à liberação controlada de íons, o que pode aumentar a eficácia antimicrobiana e minimizar os efeitos colaterais. Biovidros nanoestruturados dopados com prata (Ag-nBGs) têm mostrado desempenho superior em estudos *in vitro*, apresentando rápida formação de HA, excelente adesão celular e potente ação contra patógenos multirresistentes, como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (THONGNUEK et al., 2025; PAJARES-CHAMORRO et al., 2021).

Dessa forma, a associação entre a bioatividade dos biovidros e a ação antimicrobiana da prata representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de biomateriais multifuncionais, com capacidade de estimular a regeneração tecidual e reduzir o risco de infecções, constituindo dessa forma importante avanço para a engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

## 2.3 Viabilidade celular com biovidro puro e biovidros dopados com prata

A avaliação da viabilidade celular é um dos parâmetros essenciais para validar biomateriais destinados ao uso clínico, especialmente em aplicações de engenharia tecidual e medicina regenerativa. Os biovidros, particularmente o Bioglass® 45S5 e suas variantes, demonstram excelente biocompatibilidade, por estimular a adesão, proliferação e diferenciação celular, especialmente de osteoblastos, fibroblastos e células-tronco mesenquimais (HENCH, 2006; BENETTI et al., 2024). Esse comportamento é atribuído à liberação controlada de íons como $Ca^{2+}$, $SiO_4^{4-}$ e $PO_4^{3-}$, que modulam vias de sinalização celular e promovem a mineralização da matriz extracelular (DASH et al., 2023).

No entanto, ao dopar biovidros com prata (Ag), uma preocupação recorrente é a potencial citotoxicidade dos íons $Ag^+$ liberados no meio extracelular. Diversos estudos indicam que a presença de prata pode interferir na viabilidade celular de forma dose-dependente. Em concentrações adequadas, os íons prata exercem efeito antimicrobiano sem com isso comprometer de modo significativo a integridade celular; contudo, em níveis mais

elevados, podem causar estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e apoptose em células eucarióticas (MEHER et al., 2024**;** PRASAD et al., 2026).

Os testes de viabilidade celular realizados com ensaios como MTT, *Alamar Blue*, XTT e *Live/Dead* demonstram que biovidros dopados com até 1% de concentração de prata mantêm níveis aceitáveis de viabilidade celular, especialmente em culturas de células osteoblásticas e fibroblásticas (KAZEMIAN et al., 2021). Além disso, a morfologia celular observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) geralmente mostra boa adesão e espalhamento celular sobre a superfície dos biovidros contendo prata, o que reforça a compatibilidade do material com tecidos biológicos (PAJARES-CHAMORRO et al., 2021).

Outro aspecto relevante é a influência da morfologia e da nanoestrutura dos biovidros dopados com prata na resposta celular. Estudos indicam que sistemas nanoestruturados (Ag-nBGs) promovem melhor desempenho em termos de viabilidade celular e diferenciação osteogênica, uma vez que apresentam maior área superficial e promovem uma liberação iônica mais controlada e sustentada (THONGNUEK et al., 2025; HU et al., 2025). Essa modulação da resposta celular pode ser otimizada com o ajuste da composição vítrea e da densidade de dopagem com prata.

Adicionalmente, a funcionalização superficial dos biovidros com polímeros naturais ou sintéticos, como colágeno, quitosana ou PEG, tem sido investigada como estratégia para mitigar os efeitos citotóxicos da prata, promovendo um microambiente mais favorável à proliferação celular e à regeneração tecidual (SALINAS; VALLET-REGÍ, 2013). Essas abordagens demonstram a versatilidade dos biovidros dopados e a possibilidade de desenvolver sistemas personalizados para aplicações específicas.

Assim, a viabilidade celular em sistemas contendo biovidros puros e dopados com prata depende de uma série de fatores inter-relacionados, incluindo a composição química, concentração de dopagem, estrutura superficial e características físico-químicas do biomaterial. O entendimento desses fatores é fundamental para o desenvolvimento de materiais que conciliem ação antimicrobiana eficaz com elevada biocompatibilidade, ampliando suas aplicações na clínica.

## 2.4 Formação e dinâmica de biofilmes em contato com biovidros e biovidros dopados com prata

A formação de biofilmes representa um dos maiores desafios no contexto clínico, especialmente no que se refere à colonização de superfícies de biomateriais por

microrganismos patogênicos. Os biofilmes são comunidades microbianas organizadas, embebidas em uma matriz extracelular autossintetizada, que aderem a superfícies biológicas ou abióticas. Essa estrutura confere aos microrganismos proteção contra agentes antimicrobianos e resposta imunológica do hospedeiro, tornando as infecções associadas a implantes extremamente difíceis de tratar (COSTERTON et al., 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002).

Os biovidros, por sua vez, apresentam características de superfície que podem influenciar diretamente a adesão microbiana e a formação de biofilmes. De maneira geral, biovidros puros demonstram uma moderada atividade antimicrobiana atribuída à liberação de íons alcalinos e alcalino-terrosos, que alteram o pH e a osmolaridade do microambiente, desfavorecendo o crescimento de determinadas cepas bacterianas (ZHANG et al., 2010). Entretanto, esses efeitos são frequentemente limitados frente a microrganismos multirresistentes ou em ambientes clinicamente desafiadores.

Nesse sentido, a incorporação de prata aos biovidros tem se mostrado uma estratégia eficaz para inibir a formação de biofilmes em sua superfície. Os íons $Ag^{+}$ atuam de forma multifatorial sobre os microrganismos, promovendo a desestabilização da membrana celular, interação com proteínas e ácidos nucléicos, além de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando à morte bacteriana (MORONES et al., 2005; RAJENDRAN et al., 2022). Essa ação antimicrobiana é eficaz tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, incluindo cepas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*, frequentemente associadas a infecções nosocomiais.

Estudos recentes demonstram que biovidros dopados com prata apresentam significativa redução na formação de biofilmes em testes *in vitro*, avaliados por coloração com cristal violeta, quantificação de unidades formadoras de colônia (UFC), microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura (KAZEMIAN et al., 2021; HU et al., 2025). A nanoestrutura dos biovidros também influencia nesse processo: biovidros nanoestruturados dopados com prata (Ag-nBGs) tendem a apresentar liberação iônica mais eficiente e superfície com propriedades antimicrobiana otimizada, dificultando a adesão inicial dos microrganismos e a maturação do biofilme (SALINAS; VALLET-REGÍ, 2013).

Além disso, a prata interfere na expressão de genes relacionados à virulência e à produção de matriz extracelular, modulando negativamente a capacidade de formação de biofilmes em patógenos como *Candida albicans* e *Staphylococcus epidermidis* (CHEN et al., 2023). Tal efeito é particularmente relevante em contextos clínicos onde a formação de biofilmes representa um fator crítico de falha em implantes e enxertos ósseos.

Por fim, a combinação de biovidros com prata a outros agentes antimicrobianos, como óxidos metálicos (ZnO, CuO) ou polímeros antibacterianos, tem sido explorada para potencializar a resistência à formação de biofilmes, criando superfícies multifuncionais e mais eficazes contra infecções persistentes (DASH et al., 2023). No entanto, é fundamental equilibrar a ação antimicrobiana com a biocompatibilidade, garantindo que as concentrações de prata utilizadas sejam suficientes para inibir biofilmes sem comprometer a viabilidade celular, como discutido anteriormente.

## 2.5 Biovidros dopados com európio: propriedades biológicas e aplicações em biomateriais

Os elementos terras raras vêm despertando crescente interesse na área de biomateriais devido às suas propriedades ópticas, magnéticas e biológicas. Entre eles, o európio (Eu) destaca-se por sua elevada estabilidade química e capacidade de emissão luminescente, características que possibilitam sua utilização como marcador em sistemas de bioimagem e rastreamento celular (BÜNZLI, 2010).

A incorporação de íons európio ($Eu^{3+}$) em biovidros tem sido investigada principalmente em materiais destinados à regeneração óssea, uma vez que esse elemento pode atuar sem comprometer a bioatividade característica da matriz vítrea. Estudos demonstram que a presença de európio não interfere significativamente na formação de hidroxiapatita nem na capacidade osteocondutora dos biovidros, mantendo sua compatibilidade com tecidos mineralizados (JONES, 2013; CHEN et al., 2023).

Além das propriedades ópticas, alguns estudos sugerem que o európio pode influenciar processos celulares relacionados à proliferação e diferenciação osteoblástica, embora os mecanismos envolvidos ainda não estejam completamente esclarecidos. Entretanto, diferente dos elementos como prata, cobre ou zinco, o európio não apresenta atividade antimicrobiana expressiva, sendo sua principal contribuição associada ao monitoramento da interação entre biomaterial e tecido hospedeiro (HU et al., 2025).

A utilização de biovidros dopados simultaneamente com prata e európio representa uma estratégia promissora para obtenção de biomateriais multifuncionais capazes de combinar propriedades antimicrobianas com potencial para rastreamento biológico. Nesse contexto, a prata atua principalmente no controle microbiano, enquanto o európio pode contribuir para aplicações diagnósticas e estudos de biodistribuição do biomaterial.

## 2.6 Considerações sobre métodos *in vitro* de avaliação da atividade biológica de biovidros

A avaliação *in vitro* da atividade biológica de biovidros é um passo essencial no desenvolvimento e na validação de novos materiais para aplicações biomédicas. Esses ensaios permitem investigar a interação dos biovidros com células e microrganismos em ambientes controlados, fornecendo informações cruciais sobre sua biocompatibilidade, citotoxicidade, bioatividade e propriedades antimicrobianas antes da realização de testes *in vivo* ou ensaios clínicos (ISO 10993-5, 2009; ANDERSON et al., 2008).

A viabilidade celular é comumente avaliada por meio de ensaios colorimétricos, como o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo), o XTT (tetrazólio sal de sódio) e o Alamar Blue, que mensuram a atividade metabólica mitocondrial das células expostas aos biovidros. Esses testes fornecem uma estimativa indireta da citotoxicidade dos materiais e são amplamente utilizados em linhagens celulares osteoblásticas, fibroblásticas e mesenquimais (MOSMANN, 1983; DASH et al., 2023).

A análise da atividade bactericida dos biovidros é realizada por diferentes métodos, como contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), ensaio de difusão em ágar, ensaios de turbidez (OD600) e métodos baseados em bioluminescência. Esses ensaios avaliam a capacidade dos biovidros puros ou dopados com agentes antimicrobianos de inibir ou matar bactérias patogênicas, sendo geralmente aplicados em cepas clínicas ou de referência, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (ARAÚJO et al., 2021; ABODUNRIN et al., 2024).

Já a dinâmica de formação de biofilmes é investigada por meio de protocolos específicos que simulam o processo de adesão bacteriana, crescimento e maturação do biofilme em superfícies de biovidros. As técnicas incluem coloração com cristal violeta para quantificação da biomassa total, microscopia confocal para visualização tridimensional da estrutura biofilme, e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para análise morfológica da colonização bacteriana. Adicionalmente, métodos moleculares como RT-qPCR podem ser utilizados para avaliar a expressão de genes relacionados à formação de biofilme (HALL-STOODLEY et al., 2004; HALL STOODLEY et al., 2009; CHEN et al., 2023).

O uso de biovidros nanoestruturados dopados com prata demanda atenção especial quanto ao controle da liberação iônica, que pode influenciar significativamente os resultados dos ensaios *in vitro*. A taxa de liberação de íons prata ($Ag^{+}$) é geralmente quantificada por espectroscopia de absorção atômica (AAS) ou espectrometria de massa com plasma

indutivamente acoplado (ICP-MS), técnicas que ajudam a correlacionar a atividade antimicrobiana com a concentração liberada do íon metálico (RAJENDRAN et al., 2022).

Outro aspecto importante é a escolha do meio de cultura e das condições de incubação nos ensaios *in vitro*, visto que fatores como pH, temperatura e presença de proteínas séricas podem impactar significativamente tanto a viabilidade celular quanto a atividade antimicrobiana dos biovidros testados (SALINAS; VALLET-REGÍ, 2013). Portanto, é recomendável o uso de protocolos padronizados e a realização de múltiplas repetições experimentais para garantir a confiabilidade e a reprodutibilidade dos dados obtidos.

Por fim, a integração dos resultados *in vitro* com dados obtidos em sistemas tridimensionais (3D), culturas organotípicas ou modelos de co-cultura célula-bactéria tem sido cada vez mais adotada, aproximando os ensaios laboratoriais das condições fisiológicas encontradas no organismo humano (CHEN et al., 2023). Esses modelos avançados proporcionam uma avaliação mais realista da performance biológica dos biovidros, especialmente em contextos clínicos complexos, como infecções ósseas ou regeneração de tecidos comprometidos por biofilmes resistentes.

## 2.7 Mecanismos de ação antibacteriana dos íons prata em materiais biomédicos

A prata (Ag) é reconhecida há séculos por suas propriedades antimicrobianas, e atualmente os íons prata ($Ag^+$) são amplamente utilizados em biomateriais para conferir atividade bactericida, principalmente em implantes e dispositivos médicos (MORONES et al., 2005). Os mecanismos de ação bactericida da prata são multifacetados e envolvem interações químicas e físicas que levam à morte dos microrganismos.

Primeiramente, os íons prata interagem com a membrana celular bacteriana, causando desorganização da estrutura lipídica e aumentando a permeabilidade da membrana, o que resulta em perda de componentes essenciais e morte celular (RAJENDRAN et al., 2022). Essa ação inicial compromete a integridade da célula e facilita a penetração do íon no citoplasma.

No interior da célula, o $Ag^+$ pode se ligar a grupos sulfidrila (-SH) de proteínas, inativando enzimas essenciais para processos metabólicos e de reparo, além de afetar proteínas da parede celular e ribossomos, interrompendo a síntese protéica (MORONES et al., 2005). Além disso, a prata interfere na replicação do DNA bacteriano ao se ligar às bases

nitrogenadas, o que impede a multiplicação e proliferação dos microrganismos (MEHER et al., 2024).

Outro mecanismo importante é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais hidroxila (OH•) e superóxido ($O_2^-$), induzida pela prata. Essas espécies provocam estresse oxidativo dentro das células bacterianas, danificando lipídeos, proteínas e material genético, contribuindo para a apoptose bacteriana (RAJENDRAN et al., 2022).

A eficácia dos íons prata é observada contra uma ampla gama de bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo cepas resistentes a múltiplos antibióticos, o que torna a prata um agente antimicrobiano promissor para o combate a infecções associadas a biofilmes (CHEN et al., 2023). Contudo, a concentração e a taxa de liberação dos íons prata devem ser controladas para evitar efeitos tóxicos em células e tecidos humanos, garantindo um equilíbrio entre atividade antimicrobiana e biocompatibilidade (PRASAD et al., 2026).

Portanto, o entendimento aprofundado dos mecanismos moleculares de ação da prata é fundamental para o desenvolvimento racional de biomateriais nanoestruturados, como biovidros dopados com prata, que combinam propriedades bioativas com capacidade de prevenir infecções, ampliando sua aplicação na medicina regenerativa e implantologia.

## 2.8 Estratégias de dopagem de biovidros com prata: métodos de síntese e controle de liberação iônica

A incorporação de prata em biovidros tem sido uma estratégia eficiente para conferir propriedades antimicrobianas a esses biomateriais, ampliando seu potencial para aplicações clínicas. Os métodos de síntese utilizados para dopar biovidros com prata influenciam diretamente a distribuição dos íons, a morfologia do material e a cinética de liberação dos íons $Ag^+$, o que impacta sua eficácia bactericida e biocompatibilidade (DASH et al., 2023).

Entre as técnicas mais utilizadas destaca-se o método sol-gel, que permite a incorporação homogênea de íons prata na matriz vítrea em baixas temperaturas, preservando as propriedades bioativas do material. Nesse processo, precursores químicos são hidrolisados e condensados para formar um gel, no qual o nitrato de prata ou compostos de prata são adicionados para formação do biovidro dopado (KAZEMIAN et al., 2021). O controle da concentração de prata durante a síntese é fundamental para ajustar a liberação iônica e evitar toxicidade celular.

Outra técnica amplamente aplicada é o método de fusão, que envolve a mistura dos óxidos constituintes do biovidro em altas temperaturas (>1300 °C) para obtenção do vidro

fundido, ao qual a prata pode ser adicionada na forma metálica ou como óxidos (AWAD et al., 2023). Embora esse método garanta boa estabilidade estrutural, a distribuição dos íons prata pode ser menos homogênea que no método sol-gel, impactando a eficácia antimicrobiana.

A dopagem por impregnação pós-síntese consiste na imersão do biovidro já formado em soluções contendo sais de prata, possibilitando a adsorção superficial e posterior liberação dos íons (HU et al., 2025). Essa técnica é simples e econômica, mas apresenta limitações quanto ao controle da liberação prolongada de $Ag^+$ e à durabilidade do efeito antimicrobiano.

O controle da liberação iônica dos biovidros dopados com prata é um aspecto crítico para seu desempenho biológico. Técnicas analíticas como espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectroscopia de absorção atômica (AAS) são empregadas para monitorar a concentração de prata liberada em meios fisiológicos (RAJENDRAN et al., 2022). A liberação controlada e sustentada é desejável para manter efeito bactericida prolongado sem induzir citotoxicidade.

Além disso, a nanoestruturação dos biovidros influencia positivamente a liberação iônica, pois aumenta a área superficial e favorece a dissolução do material, facilitando a liberação gradual de íons prata (SALINAS; VALLET-REGÍ, 2013). Essa característica potencializa a eficácia antimicrobiana e permite o desenvolvimento de superfícies biomiméticas e funcionais.

Em suma, a escolha do método de dopagem e o controle da liberação de prata são determinantes para o sucesso da aplicação clínica dos biovidros dopados, exigindo estratégias que equilibrem propriedades antimicrobianas e biocompatibilidade.

## 2.9 Interações entre células e íons metálicos: efeitos da prata na viabilidade celular *in vitro*

A incorporação de íons metálicos, especialmente prata, em biomateriais tem atraído grande interesse devido à sua potente atividade antimicrobiana. Entretanto, além da eficácia contra microrganismos, é essencial compreender os efeitos desses íons sobre a viabilidade e função das células humanas, pois a toxicidade excessiva pode comprometer a biocompatibilidade do material (PRASAD et al., 2026).

Estudos *in vitro* indicam que os íons prata exercem efeitos citotóxicos dependentes da concentração, tempo de exposição e tipo celular. Concentrações baixas de $Ag^+$ são geralmente compatíveis com a sobrevivência celular, promovendo até mesmo efeitos

benéficos como a modulação da proliferação e diferenciação celular (KAZEMIAN et al., 2021). Por outro lado, concentrações elevadas podem induzir danos celulares via estresse oxidativo, interferência mitocondrial e dano ao DNA, culminando em apoptose ou necrose **(**MEHER et al., 2024).

Células osteoblásticas, fibroblásticas e mesenquimais têm sido amplamente utilizadas como modelos para avaliar a citotoxicidade da prata em biomateriais ósseos. Em geral, esses estudos revelam que a liberação controlada de íons prata, típica de biovidros nanoestruturados, é capaz de manter a viabilidade celular acima de 70%, parâmetro considerado aceitável segundo normas internacionais (ISO 10993-5, 2009), sem prejuízo à proliferação e função celular (DASH et al., 2023).

Além disso, mecanismos moleculares como a ativação de vias antioxidantes intracelulares, incluindo o sistema glutationa e enzimas superóxido dismutase, podem contribuir para a tolerância celular à presença de prata (PRASAD et al., 2026). A nanoescala dos biovidros dopados com prata também influencia positivamente essas interações, promovendo uma liberação mais controlada e minimizando o efeito tóxico direto (SALINAS; VALLET-REGÍ, 2013).

Portanto, a avaliação da viabilidade celular *in vitro* em presença de biovidros dopados com prata é imprescindível para garantir a segurança do material, sendo necessária a otimização das concentrações e formas químicas de prata para promover um balanço adequado entre efeito bactericida e compatibilidade biológica (ABODUNRIN et al., 2024).

## 2.10 Resposta inflamatória e imunomodulação induzida por biovidros dopados

A resposta inflamatória constitui uma etapa fundamental do processo de reparação tecidual e regeneração óssea. Após a implantação de um biomaterial, ocorre a ativação de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, que participam da remoção de debris celulares e da liberação de mediadores químicos capazes de modular as fases subsequentes do reparo (ANDERSON et al., 2008).

Os biovidros apresentam a capacidade de modular a resposta inflamatória por meio da liberação controlada de íons bioativos. Esses íons influenciam diretamente a atividade celular local, promovendo recrutamento celular, angiogênese e formação de tecido mineralizado. A intensidade e a duração da resposta inflamatória dependem de fatores como composição química, tamanho de partículas, velocidade de degradação e presença de dopantes metálicos (JONES, 2013).

Entre os principais mediadores envolvidos nesse processo destacam-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), o interferon gama (IFN-γ) e a interleucina-10 (IL-10). O TNF-α desempenha papel importante nas fases iniciais da inflamação, favorecendo o recrutamento celular e a remodelação tecidual. Por outro lado, a IL-10 atua como citocina antiinflamatória, regulando a intensidade da resposta imune e prevenindo danos teciduais excessivos. Já o IFN-γ está relacionado à ativação de macrófagos e à modulação da imunidade celular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2021).

Estudos recentes demonstram que biomateriais dopados com prata podem induzir respostas imunológicas dependentes da concentração do dopante. Em concentrações moderadas, a prata pode estimular mecanismos inflamatórios transitórios benéficos para o reparo tecidual. Entretanto, concentrações mais elevadas podem prolongar a resposta inflamatória local, influenciando a dinâmica de regeneração óssea (PRASAD et al., 2026).

Dessa forma, a compreensão da interação entre biomateriais, células inflamatórias e mediadores imunológicos é essencial para o desenvolvimento de sistemas capazes de associar atividade antimicrobiana à adequada regeneração tecidual.

## 2.11 Matriz extracelular, deposição de colágeno e regeneração óssea

A regeneração óssea envolve uma sequência coordenada de eventos biológicos que culminam na formação de tecido mineralizado funcional. Durante esse processo, a deposição e remodelação da matriz extracelular desempenham papel central, fornecendo suporte estrutural para adesão celular, angiogênese e mineralização (ABREU et al., 2024).

O colágeno constitui o principal componente orgânico da matriz óssea, sendo responsável por aproximadamente 90% da fração protéica do tecido. Entre os diferentes tipos de colágeno, destacam-se os tipos I e III. O colágeno tipo III está associado às fases iniciais da cicatrização e formação de tecido conjuntivo imaturo, enquanto o colágeno tipo I representa a forma predominante do tecido ósseo maduro e mecanicamente resistente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Durante a reparação óssea ocorre inicialmente aumento da deposição de colágeno tipo III, seguido por sua substituição progressiva por colágeno tipo I. Essa transição é considerada um importante marcador de maturação da matriz extracelular e de evolução do processo regenerativo. Assim, maiores proporções de colágeno tipo I geralmente indicam estágios mais avançados de reparação tecidual (ABREU et al., 2024).

Diversos estudos demonstram que biovidros bioativos podem estimular a síntese de colágeno por osteoblastos e fibroblastos, favorecendo a organização da matriz extracelular e a formação óssea. A liberação de íons silício e cálcio parece desempenhar papel importante nesse processo, estimulando a expressão de genes relacionados à produção de colágeno e mineralização (JONES, 2013).

Nesse contexto, a análise qualitativa e quantitativa da deposição de colágeno constitui ferramenta amplamente utilizada para avaliação do potencial regenerativo de biomateriais destinados à reconstrução óssea.

## 2.12 Caracterização físico-química de biovidros dopados: aplicações de FTIR, DRX, FRX e MEV

A caracterização físico-química é uma etapa indispensável no desenvolvimento de biovidros, uma vez que as propriedades estruturais do material influenciam diretamente sua bioatividade, degradação e desempenho biológico. Entre as técnicas mais empregadas destacam-se a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), a difração de raios X (DRX), a fluorescência de raios X (FRX) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JONES, 2013).

A FTIR permite identificar grupos funcionais presentes na rede vítrea, sendo amplamente utilizada para caracterização de ligações Si–O–Si, grupos fosfato e hidroxilas. Alterações nas bandas espectrais podem indicar modificações estruturais decorrentes da incorporação de dopantes metálicos (DASH et al., 2023).

A DRX é utilizada para avaliar o grau de cristalinidade dos biovidros e identificar possíveis fases cristalinas formadas durante a síntese ou após tratamentos térmicos. A presença de fases como hidroxiapatita, fosfato tricálcico e wollastonita pode influenciar significativamente a bioatividade e a resposta biológica do material (SALINAS; VALLET-REGÍ, 2013).

A fluorescência de raios X (FRX) possibilita determinar a composição elementar dos biovidros, permitindo confirmar a incorporação de elementos dopantes e verificar a homogeneidade química do material. Essa técnica é particularmente importante em sistemas contendo metais bioativos, como prata e elementos terras raras.

Por sua vez, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) fornece informações detalhadas sobre a morfologia superficial, distribuição de partículas, rugosidade e organização estrutural dos biovidros. Características morfológicas como aumento da área superficial e

rugosidade podem influenciar diretamente a adesão celular, a formação de hidroxiapatita e a atividade antimicrobiana do biomaterial (KAZEMIAN et al., 2021).

Em conjunto, essas técnicas permitem compreender a relação entre estrutura, composição e desempenho biológico dos biovidros, constituindo ferramentas fundamentais para o desenvolvimento de biomateriais multifuncionais destinados à regeneração óssea e ao controle de infecções.

## 2.13 Modelos de biofilme em testes *in vitro*: desafios e perspectivas para avaliação de biomateriais

Os biofilmes bacterianos representam um grande desafio para a medicina moderna devido à sua alta resistência a antimicrobianos e ao sistema imunológico do hospedeiro. Em biomateriais, como os biovidros, a formação de biofilmes sobre a superfície pode comprometer a integração do implante e promover infecções crônicas (HALL-STOODLEY et al., 2004; HALL STOODLEY et al., 2009).

Para avaliar a capacidade de biomateriais em inibir ou prevenir a formação de biofilmes, são utilizados diferentes modelos *in vitro* que simulam a adesão, maturação e dispersão bacteriana. Esses modelos incluem culturas monoclonais em placas de microtitulação, modelos estáticos e dinâmicos em sistemas de fluxo, e co-culturas com múltiplas espécies bacterianas para melhor representar a complexidade dos biofilmes encontrados *in vivo* (CHEN et al., 2023).

Entre os métodos para quantificação do biofilme, destaca-se a coloração com cristal violeta, que permite mensurar a biomassa total aderida, e a microscopia confocal de varredura (CLSM), que possibilita a visualização tridimensional e avaliação da viabilidade bacteriana em diferentes camadas do biofilme (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) também é empregada para análise morfológica detalhada da colonização bacteriana na superfície do biomaterial (ABODUNRIN et al., 2024).

Apesar dos avanços, os modelos *in vitro* apresentam limitações, tais como a dificuldade em reproduzir as condições fisiológicas reais, como o fluxo sanguíneo, a presença de células do sistema imunológico e a variabilidade das espécies bacterianas. Além disso, a heterogeneidade das superfícies dos biomateriais pode influenciar os resultados, tornando imprescindível o uso de protocolos padronizados para comparação entre estudos (SALINAS; VALLET-REGÍ, 2013).

A incorporação de modelos tridimensionais (3D) e sistemas microfluídicos tem sido uma estratégia para superar essas limitações, possibilitando o estudo da formação de biofilmes sob condições mais próximas do ambiente clínico (CHEN et al., 2023). Tais abordagens favorecem o desenvolvimento de biomateriais, como biovidros nanoestruturados dopados com prata, capazes de prevenir efetivamente a adesão bacteriana e a formação de biofilmes resistentes.

Assim, a compreensão detalhada dos processos de formação de biofilmes e a aplicação de modelos *in vitro* robustos são fundamentais para a avaliação do desempenho antimicrobiano dos biovidros e para o avanço de materiais biomédicos mais seguros e eficazes.

## 2.14 Nanotecnologia aplicada a biovidros: vantagens estruturais e funcionais dos nanobiovidros

A nanotecnologia tem revolucionado a área de biomateriais, especialmente no desenvolvimento de biovidros com propriedades otimizadas para aplicações clínicas. Os nanobiovidros apresentam características estruturais e funcionais superiores em relação aos biovidros convencionais, principalmente devido ao aumento da área superficial específica, que potencializa suas interações biológicas (SALINAS; VALLET-REGÍ, 2013).

A redução da escala para a faixa nanométrica, geralmente entre 1 e 100 nm, promove uma maior reatividade da superfície, acelerando a liberação controlada de íons bioativos como cálcio, fósforo e, no caso dos nanobiovidros dopados, prata (KAZEMIAN et al., 2021). Essa liberação favorece a formação rápida da camada de hidroxiapatita, essencial para a bioatividade e integração óssea do material (HENCH; POLAK, 2002).

Além disso, os nanobiovidros demonstram capacidade aprimorada de induzir respostas celulares, estimulando a proliferação, diferenciação e mineralização de células osteogênicas e outros tipos celulares envolvidos na regeneração tecidual (DASH et al., 2023). A superfície nanoestruturada mimetiza a matriz extracelular natural, facilitando a adesão celular e promovendo sinais bioquímicos favoráveis.

No contexto da incorporação de prata, a nanotecnologia permite uma distribuição mais homogênea e eficiente dos íons $Ag^{+}$ na matriz vítrea, possibilitando uma liberação controlada que maximiza a atividade bactericida e minimiza a toxicidade (PRASAD et al., 2026). Essa funcionalização é fundamental para o combate à colonização bacteriana e formação de biofilmes, problemas críticos em implantes médicos.

Além dos aspectos biológicos, os nanobiovidros apresentam propriedades físicas e químicas melhoradas, como maior estabilidade mecânica e resistência à degradação prematura, ampliando sua durabilidade e eficiência *in vivo* (SALINAS; VALLET-REGÍ, 2013).

No entanto, desafios técnicos relacionados à síntese em escala industrial, caracterização e padronização dos nanobiovidros ainda são obstáculos a serem superados para sua plena aplicação clínica (ABODUNRIN et al., 2024). O avanço nessa área depende do desenvolvimento de métodos de produção seguros, econômicos e ambientalmente sustentáveis.

Em resumo, a nanotecnologia aplicada aos biovidros representa uma fronteira promissora para o desenvolvimento de biomateriais com múltiplas funcionalidades, combinando bioatividade, biocompatibilidade e propriedades antimicrobianas para promover uma regeneração tecidual eficaz e segura.

## 2.15 Avaliações comparativas entre biovidros convencionais e nanoestruturados: implicações para aplicação clínica

A comparação entre biovidros convencionais e nanoestruturados tem sido foco de diversas pesquisas devido às diferenças marcantes em suas propriedades físico-químicas, biológicas e antimicrobianas, que impactam diretamente sua eficácia e segurança na aplicação clínica (DASH et al., 2023).

Os biovidros convencionais, caracterizados por partículas com dimensões micrométricas, apresentam bioatividade satisfatória, promovendo a formação de hidroxiapatita e integração óssea eficiente (HENCH; POLAK, 2002). Contudo, sua menor área superficial limita a taxa de liberação iônica, resultando em respostas celulares mais lentas e uma capacidade antimicrobiana relativamente inferior (SALINAS; VALLET-REGÍ, 2013).

Em contrapartida, os biovidros nanoestruturados apresentam aumento significativo da área superficial e porosidade, o que favorece a dissolução acelerada e liberação controlada de íons terapêuticos, incluindo íons prata, melhorando a atividade bactericida e a indução à regeneração celular (KAZEMIAN et al., 2021). Estudos demonstram que nanobiovidros dopados com prata exibem maior eficácia na inibição da formação de biofilmes em comparação com biovidros convencionais, sem comprometer a viabilidade celular quando adequadamente dosados (ABODUNRIN et al., 2024).

Além disso, as propriedades mecânicas dos nanobiovidros também são aprimoradas, com maior resistência à fratura e melhor adaptação morfológica em interfaces com tecido ósseo, aspectos críticos para a durabilidade dos implantes (AWAD et al., 2023). A nanoestrutura favorece ainda a funcionalização do material com outros elementos bioativos, ampliando seu espectro de aplicações clínicas, que incluem regeneração óssea, odontologia restauradora e recobrimentos antimicrobianos (DASH et al., 2023).

Apesar dos benefícios, os biovidros nanoestruturados apresentam desafios técnicos, como a necessidade de controle rigoroso na síntese para evitar aglomeração das nanopartículas, que pode afetar a homogeneidade e propriedades finais do material (SALINAS; VALLET-REGÍ, 2013). Questões relacionadas à toxicidade em longo prazo e resposta imune ainda demandam investigação aprofundada para garantir a segurança clínica (PRASAD et al., 2026).

Em síntese, as avaliações comparativas indicam que os biovidros nanoestruturados dopados com prata apresentam vantagens significativas frente aos biovidros convencionais, especialmente na promoção da bioatividade e controle de infecções. Contudo, a aplicação clínica requer a otimização dos processos de fabricação e um balanço cuidadoso entre atividade antimicrobiana e biocompatibilidade.

## 2.16 Técnicas analíticas para avaliação da formação de biofilmes e liberação iônica em biovidros dopados com prata

A avaliação precisa da formação de biofilmes bacterianos e da liberação iônica em biovidros dopados com prata é fundamental para compreender a eficácia antimicrobiana e o impacto biológico desses materiais. Diversas técnicas analíticas são empregadas para caracterizar esses fenômenos, proporcionando dados qualitativos e quantitativos essenciais para o desenvolvimento e otimização dos biomateriais (CHEN et al., 2023).

Para análise da formação e estrutura dos biofilmes, métodos microscópicos são amplamente utilizados. A microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) permite a visualização tridimensional e a avaliação da viabilidade celular dentro do biofilme, especialmente quando combinada com corantes fluorescentes diferenciadores de células vivas e mortas (HALL-STOODLEY et al., 2004; HALL STOODLEY et al., 2009). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) oferece imagens detalhadas da morfologia da superfície do biovidro e da colonização bacteriana, permitindo a observação das etapas iniciais da adesão e maturação do biofilme (ABODUNRIN et al., 2024).

Complementarmente, técnicas colorimétricas, como a coloração com cristal violeta, quantificam a biomassa total do biofilme aderido, fornecendo dados rápidos e reprodutíveis sobre a capacidade do biomaterial em inibir a formação bacteriana (CHEN et al., 2023). Ensaios de quantificação de ATP e metabólitos bacterianos também são empregados para avaliar a atividade metabólica das bactérias presentes no biofilme.

Quanto à liberação iônica, técnicas espectrométricas como a espectrometria de absorção atômica (AAS) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) são ferramentas padrão para quantificação precisa dos íons prata liberados em soluções simuladoras do meio fisiológico (RAJENDRAN et al., 2022). Essas técnicas possibilitam o monitoramento em tempo real da cinética de liberação, importante para correlacionar a concentração de íons à atividade bactericida e citotoxicidade.

Outros métodos complementares incluem a espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), que permite a análise química superficial do biovidro e a confirmação da presença de prata e seus estados de oxidação (AWAD et al., 2023). A difração de raios X (XRD) é utilizada para avaliar a cristalização e possíveis alterações estruturais após dopagem.

A combinação dessas técnicas analíticas permite uma avaliação abrangente da interação dos biovidros dopados com prata com o ambiente biológico, elucidando mecanismos de ação antimicrobiana e biocompatibilidade, e subsidiando o desenvolvimento de biomateriais otimizados para uso clínico.

## 3. JUSTIFICATIVA

Os biovidros bioativos têm sido amplamente estudados devido à sua capacidade de estimular a regeneração óssea e promover a integração entre biomateriais e tecidos biológicos. No entanto, infecções associadas à colonização bacteriana e à formação de biofilmes ainda representam uma das principais causas de falhas em procedimentos reconstrutivos e na utilização de implantes biomédicos.

Nesse contexto, a incorporação de íons metálicos em biovidros surge como uma estratégia promissora para agregar novas funcionalidades aos biomateriais. A prata destaca-se por sua reconhecida atividade antimicrobiana, enquanto o európio apresenta propriedades que podem ampliar as aplicações desses materiais sem comprometer sua bioatividade. Entretanto, ainda são limitados os estudos que avaliam simultaneamente os efeitos da associação desses elementos sobre a atividade antibacteriana, a citocompatibilidade e os processos relacionados à regeneração tecidual.

Dessa forma, este estudo justifica-se pela necessidade de desenvolver e investigar vidros bioativos multifuncionais dopados com prata e európio, buscando compreender sua interação com microrganismos e células do hospedeiro. Os resultados poderão contribuir para o desenvolvimento de biomateriais mais seguros e eficazes para aplicações em regeneração tecidual e controle de infecções associadas a implantes biomédicos.

## 4. HIPÓTESE

Biovidros nanoestruturados multifuncionais dopados com prata e európio apresentam desempenho biológico superior ao dos biovidros convencionais, uma vez que a liberação controlada de íons bioativos promove simultaneamente atividade antibacteriana e antibiofilme, elevada citocompatibilidade e modulação da resposta inflamatória, favorecendo a regeneração óssea. Esse efeito depende da concentração dos dopantes e das alterações estruturais induzidas na matriz vítrea.

# 5. OBJETIVOS

## 5.1 Objetivos gerais

Avaliar a influência da dopagem com prata e európio nas propriedades físico-químicas, antibacterianas, citocompatíveis e regenerativas de vidros bioativos multifuncionais.

## 5.2 Objetivos específicos

- Produzir vidros bioativos dopados com prata e európio.
- Caracterizar física, química e morfologicamente os materiais obtidos.
- Avaliar a atividade antibacteriana contra microrganismos associados a infecções relacionadas a biomateriais.
- Analisar a capacidade de inibição da formação de biofilmes bacterianos.
- Determinar a citocompatibilidade dos materiais por meio de ensaios celulares.
- Avaliar a resposta inflamatória induzida pelos biomateriais.
- Investigar a deposição e maturação de colágeno como indicadores de potencial regenerativo.
- Comparar os efeitos biológicos das diferentes concentrações de prata incorporadas aos vidros bioativos.

## 6. REFERÊNCIAS

**ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S.** *Imunologia celular e molecular*. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2021.

**ABODUNRIN, O. D.; SEMLALI, A.; EL MABROUK, K.; BRICHA, M.** Biocompatibility and antimicrobial efficacy of silver-doped borosilicate bioactive glass for tissue engineering application. *Ceramics International*, Oxford, v. 50, n. 23, pt. B, p. 50535-50547, 2024. DOI: 10.1016/j.ceramint.2024.09.399.

**ABREU, H.; LALLUKKA, M.; MIOLA, M.; SPRIANO, S.; VERNÈ, E.; RAINERI, D.; LEIGHEB, M.; RONGA, M.; CAPPELLANO, G.; CHIOCCHETTI, A.** Human T-cell responses to metallic ion-doped bioactive glasses. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 25, n. 8, art. 4501, 2024. DOI: 10.3390/ijms25084501.

**ANDERSON, J. M.; RODRÍGUEZ, A.; CHANG, D. T.** Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*, London, v. 20, n. 2, p. 86-100, 2008. DOI: 10.1016/j.smim.2007.11.004.

**ARAUJO, M. S.; SILVA, A. C.; CABAL, B.; BARTOLOMÉ, J. F.; MELLO-CASTANHO, S.** *In vitro* bioactivity and antibacterial capacity of 45S5 Bioglass®-based compositions containing alumina and strontium. *Journal of Materials Research and Technology*, Rio de Janeiro, v. 13, p. 154-161, 2021. DOI: 10.1016/j.jmrt.2021.04.053.

**AWAD, K.; AHUJA, N.; YACOUB, A. S.; BROTTO, L.; YOUNG, S.; MIKOS, A.; ASWATH, P.; VARANASI, V.** Revolutionizing bone regeneration: advanced biomaterials for healing compromised bone defects. *Frontiers in Aging*, Lausanne, v. 4, art. 1217054, 2023. DOI: 10.3389/fragi.2023.1217054.

**BENETTI, F.; OLIVEIRA, P. H. C. de; ANDRADE, M. P. B. de; CANTIGA-SILVA, C.; SIVIERI-ARAÚJO, G.; DEZAN JÚNIOR, E.; GOMES-FILHO, J. E.; DINIZ, I. M. A.; REIS-PRADO, A. H. dos; SOUZA, M. T.; ZANOTTO, E. D.; CINTRA, L. T. A.** Cytotoxicity, biocompatibility, and calcium deposition capacity of 45S5 Bioglass experimental paste and Bio-C Temp: in vitro and in vivo study using Wistar rats. *Journal of Functional Biomaterials*, Basel, v. 15, n. 7, p. 184, 2024. DOI: 10.3390/jfb15070184.

**BORGES, R.; OLIVEIRA, J. S. S.; QUEIROZ, A. P.; ZAMBANINI, T.; HANASHIRO, A. M.; LIMA, N. B.; SCHNEIDER, J. F.; MARCHI, J.** On the structure of Ag-containing sol-gel bioactive glasses: a surface crystal growth of metallic silver removes its network modifier role in the glass structure. *Open Ceramics*, Amsterdam, v. 16, art. 100449, 2023. DOI: 10.1016/j.oceram.2023.100449.

**BÜNZLI, J.-C. G.** Lanthanide luminescence for biomedical analyses and imaging. *Chemical Reviews*, Washington, v. 110, n. 5, p. 2729-2755, 2010. DOI: 10.1021/cr900362e.

**CHEN, J.; LIAO, S.; KONG, Y.; XU, B.; XUAN, J.; ZHANG, Y.** 3D-printed mesoporous bioactive glass scaffolds for enhancing bone repair via synergetic angiogenesis and osteogenesis. *Materials & Design*, Oxford, v. 232, art. 112089, 2023. DOI: 10.1016/j.matdes.2023.112089.

**COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, Washington, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318.

**DASH, P. A.; MOHANTY, S.; NAYAK, S. K.** A review on bioactive glass, its modifications and applications in healthcare sectors. *Journal of Non-Crystalline Solids*, Amsterdam, v. 614, art. 122404, 2023. DOI: 10.1016/j.jnoncrysol.2023.122404.

**DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.

**GODOY-GALLARDO, M.; ECKHARD, U.; DELGADO, L. M.; DE ROO PUENTE, Y. J. D.; HOYOS-NOGUÉS, M.; GIL, F. J.; PEREZ, R. A.** Antibacterial approaches in tissue engineering using metal ions and nanoparticles: from mechanisms to applications. *Bioactive Materials*, Amsterdam, v. 6, n. 12, p. 4470-4490, 2021. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.04.033.

**GUPTA, A.; KURIAN, A. G.; JAIN, S. K.; SINGH, R. K.; KIM, H.-W.** Bioactive glasses in the new era: technological advances and targeted therapies. *Advances in Colloid and Interface Science*, Amsterdam, v. 352, art. 103835, 2026. DOI: 10.1016/j.cis.2026.103835.

**HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P.** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, London, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004. DOI: 10.1038/nrmicro821.

**HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P.** Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, Oxford, v. 11, n. 7, p. 1034-1043, 2009. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x.

**HENCH, L. L.** The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, New York, v. 17, n. 11, p. 967-978, 2006. DOI: 10.1007/s10856-006-0432-z.

**HENCH, L. L.; POLAK, J. M.** Third-generation biomedical materials. *Science*, Washington, v. 295, n. 5557, p. 1014-1017, 2002. DOI: 10.1126/science.1067404.

**HU, H.; GUAN, J.; LI, Z.; CAI, G.; HAN, X.; WANG, D.** From benchtop to bedside: precision-engineered bioactive glass-based implants revolutionizing bone defect reconstruction. *Materials Today Advances*, Amsterdam, v. 28, art. 100663, 2025. DOI: 10.1016/j.mtadv.2025.100663.

**INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.** *ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Geneva, 2009.

**JONES, J. R.** Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 4457-4486, 2013. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.08.023.

**JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J.** *Histologia básica: texto e atlas*. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

**KAZEMIAN, Z.; VARZANDEH, M.; LABBAF, S.** A facile synthesis of mono dispersed spherical silver doped bioactive glass nanoparticle. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, New York, v. 32, n. 3, p. 29, 2021.

**KOKUBO, T.; TAKADAMA, H.** How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials*, Amsterdam, v. 27, n. 15, p. 2907-2915, 2006. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.

**LI, H.; XU, H.** Mechanisms of bacterial resistance to environmental silver and antimicrobial strategies for silver: a review. *Environmental Research*, Amsterdam, v. 248, art. 118313, 2024. DOI: 10.1016/j.envres.2024.118313.

**MEHER, A.; TANDI, A.; MOHARANA, S.; CHAKROBORTY, S.; MOHAPATRA, S. S.; MONDAL, A.; DEY, S.; CHANDRA, P.** Silver nanoparticle for biomedical applications: a review. *Hybrid Advances*, v. 6, art. 100184, 2024. DOI: 10.1016/j.hybadv.2024.100184.

**MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J. T.; YACAMAN, M. J.** The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, Bristol, v. 16, n. 10, p. 2346-2353, 2005. DOI: 10.1088/0957-4484/16/10/059.

**MOSMANN, T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

**PAJARES-CHAMORRO, N.; WAGLEY, Y.; MADUKA, C. V.; YOUNGSTROM, D. W.; YEGER, A.; BADYLAK, S. F.; HAMMER, N. D.; HANKENSON, K.; CHATZISTAVROU, X.** Silver-doped bioactive glass particles for *in vivo* bone tissue regeneration and enhanced methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) inhibition. *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, Amsterdam, v. 120, art. 111693, 2021. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111693.

**PRASAD, A.; SOWJANYA, V.; MANUEL, J.; RAO, P. V.; MADABOOSI, N.; PRASAD, P. S.** Silver-doped bioactive spherical glass ceramic nanoparticles with enhanced osteogenic and antibacterial properties for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Amsterdam, v. 730, art. 139019, 2026. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2025.139019.

**RAJENDRAN, G.; BHANU, D.; ARUCHAMY, B.; RAMANI, P.; PANDURANGAN, N.; BOBBA, K. N.; OH, E. J.; CHUNG, H. Y.; GANGADARAN, P.; AHN, B. C.** Chalcone: a promising bioactive scaffold in medicinal chemistry. *Pharmaceuticals*, Basel, v. 15, n. 10, art. 1250, 2022. DOI: 10.3390/ph15101250.

**SALINAS, A. J.; VALLET-REGÍ, M.** Bioactive ceramics: from bone grafts to tissue engineering. *RSC Advances*, Cambridge, v. 3, n. 28, p. 11116-11131, 2013. DOI: 10.1039/C3RA40318K.

**SIQUEIRA, L. de; CAMPOS, T. M. B.; CAMARGO, S. E. A.; THIM, G. P.; TRICHÊS, E. S.** Structural, crystallization and cytocompatibility evaluation of the 45S5 bioglass-derived glass-ceramic containing niobium. *Journal of Non-Crystalline Solids*, Amsterdam, v. 555, art. 120629, 2021. DOI: 10.1016/j.jnoncrysol.2020.120629.

**STORBECK, M.; BUCHER, C. H.; SCHMIDT-BLEEK, K.** The biological basis of bone regeneration. In: GALLI, C. (ed.). *Intelligent osteogenesis*. Cambridge: Academic Press, 2026. p. 17-32.

**THONGNUEK, P.; SUKPARANGSI, W.; JOMRIT, J.; DAMRONGSAKKUL, S.; SRIBOONAIED, P.; CAO, C.; PRASOPTHUM, A.** Silver-doped mesoporous bioactive glass nanoparticles with core-shell architecture: enhanced *in vitro* bioactivity, antibacterial efficacy, and biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Hoboken, v. 113, n. 12, art. e70000, 2025. DOI: 10.1002/jbm.a.70000.

# APÊNDICE A - (Comprovante de submissão artigo)

ACS Omega

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

## Multifunctional Bioactive Glasses Doped with Silver and Europium: Antibacterial, Cytocompatible, and Regenerative Responses

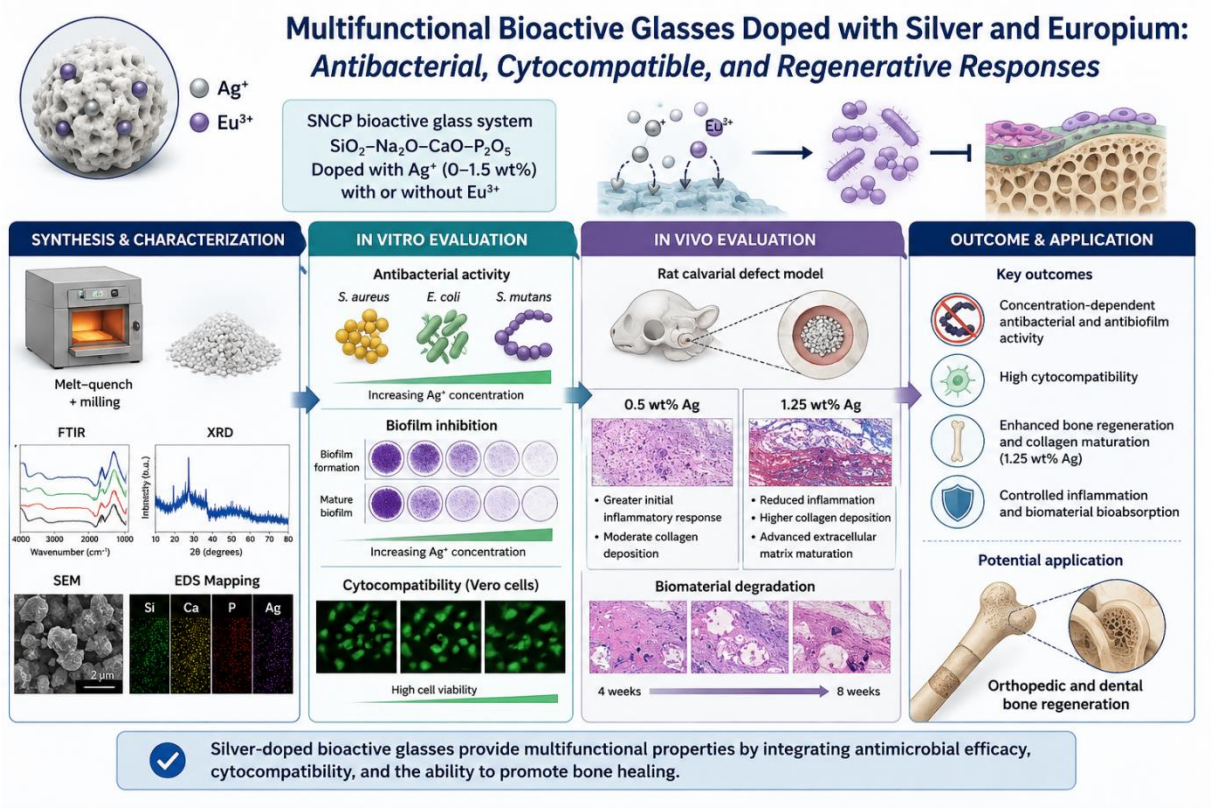
| | |
|---|---|
| Journal: | *ACS Omega* |
| Manuscript ID | ao-2026-09163y |
| Manuscript Type: | Article |
| Date Submitted by the Author: | 03-Aug-2026 |
| Complete List of Authors: | Seabra, Odival; Universidade Federal do Triangulo Mineiro Faculdade de Medicina, Federal University of Triângulo Mineiro, Rua Vigário Carlos<br>Matos, Beatriz; Universidade Federal do Triangulo Mineiro Faculdade de Medicina, Federal University of Triângulo Mineiro, Rua Vigário Carlos<br>Perini, Hugo; Federal University of Triângulo Mineiro, Institute of Exact, Natural and Educational sciences<br>Pereira, Sanívia Aparecida de Lima; Universidade de Uberaba, Laboratory of Cell and Molecular Biology, UNIUBE - University of Uberaba, Uberaba, MG, Brazil / Cefores, UFTM - Federal University of Triângulo Mineiro<br>Dantas, Noelio ; Universidade Federal de Alagoas, Physics Institute<br>Silva, Anielle Christine; Universidade Federal de Alagoas, Physics Institute<br>Silva, Marcos; Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology<br>Andrade, Anderson; Federal University of Triângulo Mineiro, Institute of Exact, Natural and Educational sciences<br>Rosa, Rodrigo; Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology |
| | |

SCHOLARONE MANUSCRIPTS

# APÊNDICE B – Artigo Científico

Multifunctional Bioactive Glasses Doped with Silver and Europium: Antibacterial, Cytocompatible, and Regenerative Responses

## TOC GRAPHIC



**ABSTRACT**

Nanostructured bioactive glasses have emerged as promising biomaterials for bone repair, particularly when functionalized with ions capable of providing antimicrobial properties. This study aimed to evaluate the biological performance of bioactive glasses doped with silver and europium through physicochemical characterization, *in vitro* assays, and *in vivo* evaluation in an experimental model. Structural characterization confirmed the formation of a typical $SiO_2$–$Na_2O$–$CaO$–$P_2O_5$ glass network, with structural modifications associated with silver incorporation. *In vitro* results demonstrated that silver-containing formulations exhibited concentration-dependent antibacterial and antibiofilm activity against Staphylococcus aureus, Escherichia coli, and Streptococcus mutans, while maintaining high cytocompatibility in Vero cells. Europium incorporation did not significantly influence the evaluated biological parameters.

Based on these findings, formulations containing 0.5 weight percent (wt%) and 1.25 wt% silver were selected for *in vivo* evaluation in a rat calvarial defect model. The results showed that silver concentration directly modulated tissue response, with 0.5 wt% promoting a more pronounced initial inflammatory response, whereas 1.25 wt% was associated with increased collagen deposition and extracellular matrix maturation.

In conclusion, silver doping confers multifunctional properties to bioactive glasses, highlighting their potential for bone tissue engineering applications. The dopant concentration plays a critical role in balancing antimicrobial efficacy and biological response.

**Keywords:** Nanostructured bioactive glass; Silver; Antibacterial activity; Biofilm; Bone regeneration.

## 1. INTRODUCTION

Biomaterials intended for bone regeneration have been extensively investigated over the past decades, driven by the increasing demand for effective therapeutic strategies to treat bone defects resulting from trauma, infection, and surgical procedures. Among these materials, bioactive glasses have attracted considerable attention because of their remarkable bioactivity and their ability to establish chemical bonds with bone tissue, thereby promoting osteoconduction and tissue regeneration.[1–3]

Despite these advantages, conventional bioactive glasses exhibit limited intrinsic antimicrobial activity, which remains a major challenge for their clinical application. Bacterial adhesion and subsequent biofilm formation on the surface of implanted biomaterials are among the leading causes of implant failure, as biofilms provide microorganisms with enhanced resistance to antimicrobial agents and host immune defenses.[4–6] Clinically relevant bacterial species, including *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus mutans*, are frequently associated with biomaterial-related infections, highlighting the need for multifunctional biomaterials capable of combining bioactivity with effective antimicrobial properties.

The incorporation of metallic ions, particularly silver (Ag), into bioactive glasses has been widely explored as an effective strategy to impart antibacterial activity. Silver exhibits broad-spectrum antimicrobial activity through the sustained release of $Ag^+$ ions, which interact with bacterial cell membranes, intracellular proteins, and nucleic acids, ultimately inhibiting bacterial growth and inducing cell death.[7–9] However, the biological performance of silver-containing biomaterials is strongly dependent on silver concentration. Although increasing silver content generally enhances antibacterial efficacy, excessive ion release may induce cytotoxic effects, thereby impairing cell viability and compromising tissue regeneration.[10]

Therefore, strategies capable of modulating the biological performance of silver-doped bioactive glasses are essential to achieve an appropriate balance between antimicrobial efficacy and biocompatibility. In this context, rare-earth elements such as europium (Eu) have emerged as promising dopants for bioactive glass systems. Although europium is not traditionally recognized as an antimicrobial agent, its incorporation may influence the biological behavior of the material by modifying physicochemical interactions at the biomaterial–tissue interface and potentially affecting ionic release dynamics.[11,12]

Furthermore, most published studies have focused on isolated biological evaluations, generally restricted to antimicrobial or cytotoxicity assays, without systematically integrating cellular responses with *in vivo* tissue performance. Such fragmented approaches limit the identification of formulations exhibiting an optimal overall biological profile. Consequently, a

significant knowledge gap remains regarding the comprehensive biological assessment of silver- and europium-doped bioactive glasses, particularly considering their simultaneous effects on antibacterial activity, biofilm modulation, cytocompatibility, and tissue regeneration.

Accordingly, the present study proposes an integrated biological evaluation of nanostructured bioactive glasses doped with silver and europium. Initially, multiple formulations containing different silver concentrations, with or without europium incorporation, were subjected to *in vitro* assays to investigate antibacterial activity, biofilm inhibition, and cytocompatibility. Based on these findings, the formulations exhibiting the most favorable biological performance were selected for subsequent evaluation in a rat calvarial critical-sized bone defect model, where inflammatory response, biomaterial bioabsorption, collagen deposition, extracellular matrix remodeling, and systemic inflammatory cytokine profiles were investigated.

This integrated experimental approach provides a comprehensive understanding of the biological behavior of multifunctional bioactive glasses and contributes to the identification of promising formulations for future orthopedic and dental applications. By simultaneously combining antimicrobial activity, cytocompatibility, and regenerative potential, these materials represent an attractive strategy for the development of next-generation multifunctional biomaterials for bone tissue engineering.

# 2. MATERIALS AND METHODS

## 2.1. Synthesis and Physicochemical Characterization of Nanostructured Bioactive Glasses

Nanostructured bioactive glasses were synthesized within the $SiO_2$–$Na_2O$–CaO–$P_2O_5$ (SNCP) system using the conventional melt-quenching method. Analytical-grade precursors, including silicon dioxide ($SiO_2$), sodium carbonate ($Na_2CO_3$, as the $Na_2O$ source), calcium carbonate ($CaCO_3$, as the CaO source), and phosphorus pentoxide ($P_2O_5$), were used to obtain silicate-based bioactive glass compositions.

The precursor materials were weighed according to compositional ranges typically employed for bioactive glasses ($SiO_2$: 30–60 weight percent (wt%), $Na_2O$: 10–40 wt%, CaO: 10–40 wt%, and $P_2O_5$: 1–10 wt%) and homogenized prior to thermal processing. The mixtures were melted at high temperature under controlled conditions sufficient to ensure complete decomposition of the carbonates and formation of a homogeneous molten phase, followed by rapid cooling to obtain amorphous materials.

Doped formulations were prepared by incorporating metallic oxides into the base composition prior to melting. Silver was introduced as silver oxide ($Ag_2O$) at different concentrations within a predefined range for biological evaluation. Additionally, europium-containing formulations were prepared by incorporating europium oxide ($Eu_2O_3$), either alone or in combination with silver, in order to investigate its potential modulatory effect on the biological performance of the materials.

Silver concentrations were established based on preliminary antibacterial and biofilm studies, covering a concentration range suitable for evaluating dose-dependent effects. Dopants were incorporated as oxide-derived species within the glass matrix, following bioactive glass systems previously described in the literature.

Specific processing parameters are protected by a patented technology (Brazilian Patent Application No. BR 10 2023 000062 2). Nevertheless, the overall synthesis strategy adopted ensures reproducibility of the system while preserving its physicochemical characteristics.

Physicochemical characterization was performed for the base bioactive glass (SNCP) and for the formulations containing 0.5 wt% and 1.25 wt% silver, which were selected based on their biological performance for subsequent *in vivo* evaluation. X-ray diffraction (XRD) was used to investigate the structural characteristics of the materials and to identify amorphous and crystalline phases.

The chemical composition was determined by X-ray fluorescence (XRF), to qualitatively confirm the constituent elements of the glass system as well as the incorporation of the dopant.

Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was employed to identify the characteristic functional groups of the glass network.

The morphology and surface microstructure of the bioactive glasses were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Prior to analysis, the samples were sputter-coated with gold and examined under high-vacuum conditions to evaluate surface topography, particle distribution, and morphological characteristics at different magnifications.

These analyses were performed to establish the structural, compositional, and morphological characteristics of representative formulations of the system, providing the basis for comparative interpretation of the biological performance among the different experimental groups.

### 2.2. *In Vitro* Biological Evaluation and Selection of Experimental Formulations

The biological performance of the formulations was initially assessed through a comprehensive *in vitro* approach, including antibacterial activity, biofilm modulation, and cytocompatibility, with the aim of identifying the compositions exhibiting the most favorable performance for subsequent *in vivo* evaluation.

Antibacterial activity was evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus mutans*. Standardized bacterial suspensions were incubated with different concentrations of the materials (1000 to 7.81 μg/mL), and bacterial growth was quantified by spectrophotometric analysis after incubation. The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest concentration capable of inhibiting visible bacterial growth.

Biofilm assays were performed under two experimental conditions: inhibition of biofilm formation and eradication of pre-established biofilms. In the first condition, bacteria were incubated with the materials during the adhesion and growth phases. In the second condition, mature biofilms were exposed to the experimental formulations. In both approaches, biofilm viability was assessed using a colorimetric assay based on metabolic activity, and the results were expressed as the percentage of inhibition relative to the control groups.

Cytocompatibility was evaluated using Vero cells (ATCC CCL-81) cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% $CO_2$. Cells were seeded into 96-well plates at a density of $1 \times 10^4$ cells per well and incubated for 24 h to allow cell adhesion.

Bioactive glass extracts were prepared by incubating the materials in culture medium for 24 h, followed by filtration. Cells were then exposed to serial dilutions of the extracts for an additional 24 h. Cell viability was determined using the MTT assay, with absorbance measured at 570 nm. The results were expressed as the percentage of cell viability relative to

the untreated control.

Based on the integrated biological evaluation, the formulations containing 0.5 wt% and 1.25 wt% silver exhibited the most favorable balance between antimicrobial efficacy and cytocompatibility and were selected for subsequent *in vivo* evaluation.

For the *in vitro* experiments, all experimental formulations were evaluated, including the base bioactive glass (SNCP), bioactive glasses doped with different silver concentrations, and formulations containing europium either alone or in combination with silver. This approach allowed comparative evaluation of the biological performance according to dopant composition and concentration.

### 2.3. *In Vivo* Experimental Model

For the *in vivo* study, the formulations exhibiting the best performance in the *in vitro* assays, considering antibacterial activity, biofilm modulation, and cytocompatibility, were selected. Thus, only the compositions presenting the most favorable biological profile were included in the experimental bone defect model.

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA/UNIUBE; protocol nº. 004/2021) and were conducted in accordance with international guidelines for animal experimentation.

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing between 140 and 160 g were used. Animals were housed under controlled environmental conditions with free access to food and water.

Under general anesthesia, critical-sized calvarial bone defects were created using a trephine bur under continuous irrigation with sterile saline solution. The defects were standardized to 4 mm in diameter and approximately 1.5 mm in depth and were created in the parietal bone adjacent to the sagittal suture while preserving the integrity of the dura mater.

Animals were randomly allocated into experimental groups ($n$ = 10), including a control group (blood clot), the undoped bioactive glass (Ag-0.00), and silver-doped formulations selected based on the *in vitro* findings. Following implantation, the surgical sites were sutured, and the animals were maintained under postoperative monitoring. Euthanasia was performed after 4 weeks by anesthetic overdose.

### 2.4. Histological, Histomorphometric, and Systemic Analyses

At the end of the experimental period, calvarial specimens were harvested, fixed in 10% buffered formalin, decalcified in EDTA, processed routinely, and embedded in paraffin. Serial histological sections (5 μm) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological evaluation.

Inflammatory cell infiltration was assessed using a semiquantitative scoring system (0–3) and

subsequently categorized as absent/mild (0–1) or moderate/intense (2–3).[13] Tissue organization and integration with the host tissue were qualitatively evaluated. Residual biomaterial particles were quantified as an indicator of bioabsorption in both the central and peripheral regions of the defect.

Collagen deposition was evaluated by Picrosirius Red staining under polarized light microscopy. Quantitative analysis allowed determination of total collagen content as well as the relative proportions of type I collagen (red/yellow birefringence) and type III collagen (green birefringence), providing information regarding extracellular matrix maturation and tissue remodeling.

For systemic evaluation of the inflammatory response, blood samples were collected by cardiac puncture, centrifuged, and plasma was stored at −80 °C until analysis. Plasma concentrations of IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, and IFN-γ were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the manufacturer's instructions.

### 2.5. Statistical Analysis

Data are presented as mean ± standard deviation. Data normality was assessed using the D'Agostino–Pearson normality test. Parametric data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparisons test. Nonparametric data were analyzed using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

## RESULTS

### Physicochemical Characterization of Nanostructured Bioactive Glasses

Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis revealed characteristic vibrational bands of the silicate network in both formulations (Figure 1A and B). In the SNCP bioactive glass, prominent bands were observed at approximately 1014, 780, and 450 $cm^{-1}$, corresponding to Si–O–Si vibrations, in addition to signals at approximately 576 $cm^{-1}$ assigned to phosphate ($PO_4^{3-}$) groups, confirming the formation of a typical silicate–phosphate glass matrix. Furthermore, bands at approximately 3443 and 1640 $cm^{-1}$ indicated the presence of hydroxyl groups and adsorbed water, which are important for the surface reactivity of the material (Figure 1A).

In the silver-containing formulation, similar bands were observed, with slight shifts and intensity changes in the 1100–1000 $cm^{-1}$ region, suggesting interaction of the dopant with the glass network (Figure 1B). Although silver does not exhibit characteristic FTIR absorption

bands, subtle modifications in the spectral profile indicate its incorporation into the matrix as ionic species.

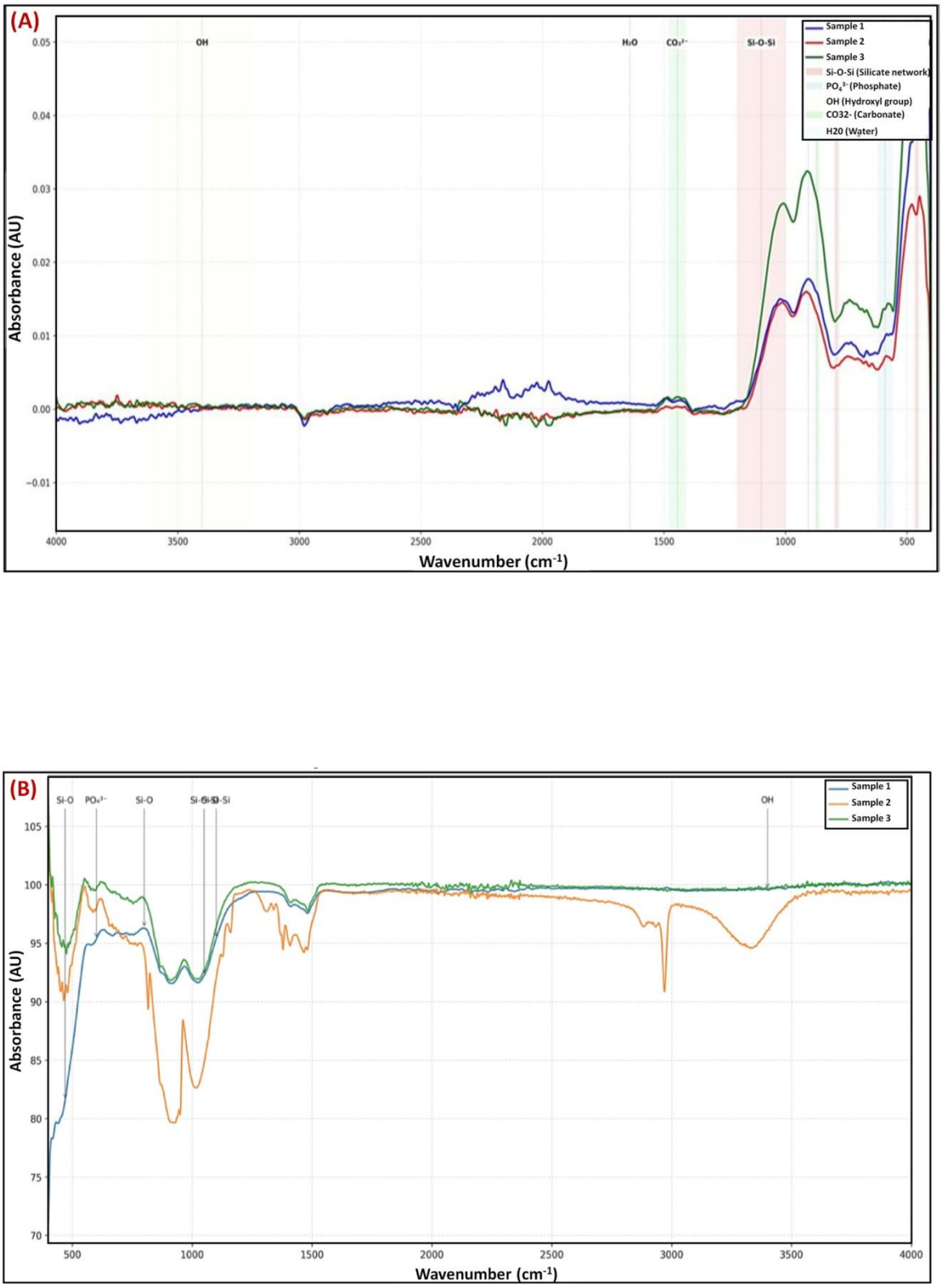



**Figure 1.** Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra of nanostructured bioactive glasses: (A) base bioactive glass (SNCP) and (B) silver-doped bioactive glass (Ag-1.25%). Characteristic bands of the silicate network (Si–O–Si), as well as phosphate ($PO_4^{3-}$) and

hydroxyl ($OH^-$) groups, are observed. The doped formulation exhibits a spectral profile similar to that of the base material, with slight variations in band intensity and/or position, suggesting silver incorporation into the glass matrix without significant alteration of its fundamental structure.

X-ray diffraction (XRD) analysis revealed distinct behavior between the formulations (Figure 2A and B). The base bioactive glass exhibited a predominantly amorphous pattern, characterized by a diffuse halo centered at approximately 30° (2θ), with no well-defined crystalline peaks, indicating a typical glassy structure. The estimated crystallinity was below 7%, corroborating the amorphous nature of the material (Figure 2A).

In contrast, the silver-containing formulation exhibited a partially crystalline pattern, consisting of an amorphous halo associated with well-defined diffraction peaks in specific regions of the diffractogram (Figure 2B). Crystalline phases compatible with hydroxyapatite, wollastonite, and tricalcium phosphate (β-TCP) were identified, together with reflections attributed to metallic silver ($Ag^0$) and silver oxide ($Ag_2O$). The estimated crystallinity was approximately 9.9%, suggesting that silver incorporation promoted nucleation and partial crystallization of the glass matrix.

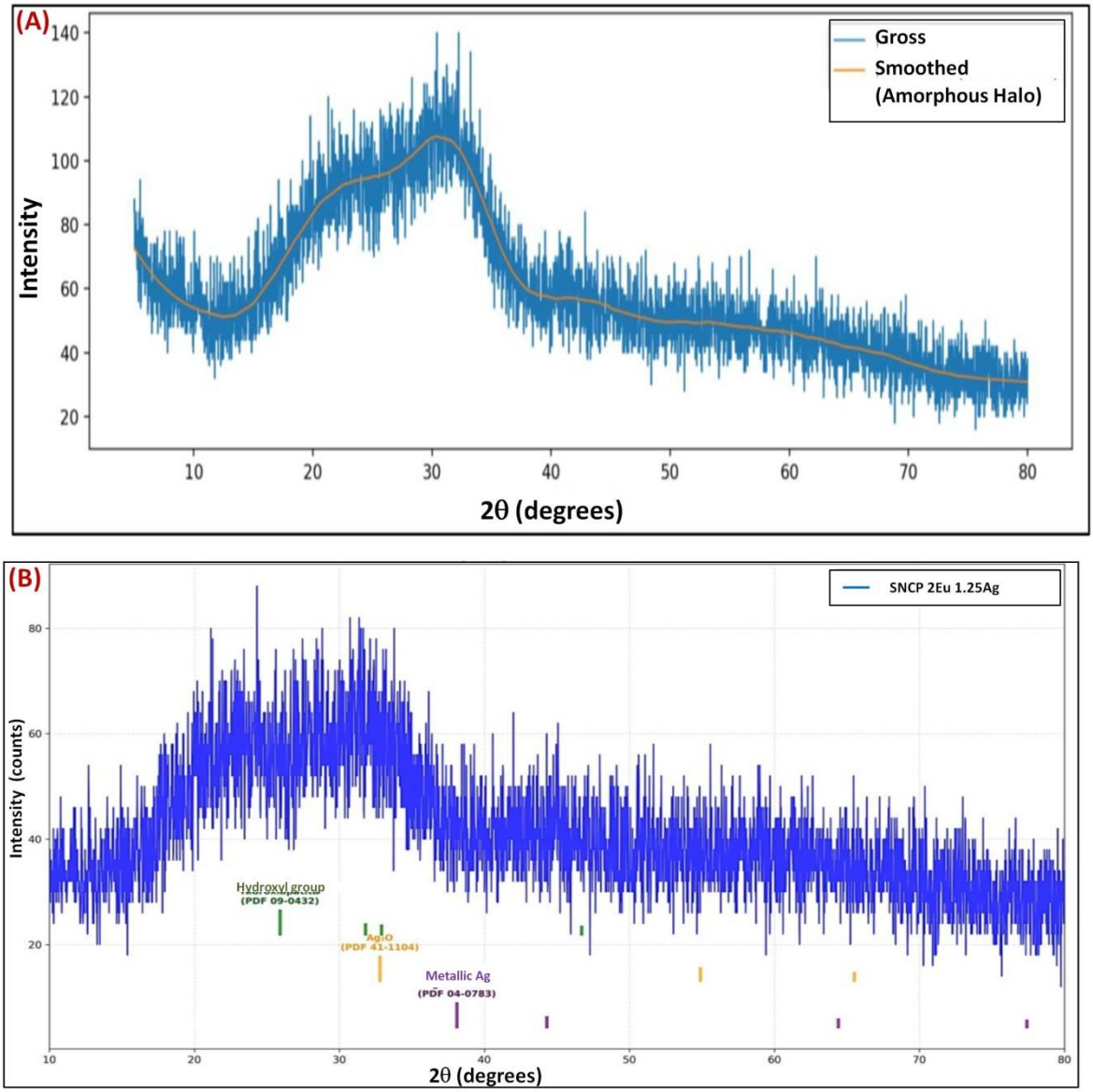



**Figure 2.** X-ray diffraction (XRD) patterns of nanostructured bioactive glasses: (A) base bioactive glass (SNCP) and (B) silver-doped bioactive glass (Ag-1.25%). The SNCP pattern exhibits a diffuse halo characteristic of an amorphous structure. The Ag-1.25% formulation presents an amorphous halo associated with discrete diffraction peaks, indicating the presence of partially crystalline phases and suggesting structural modification resulting from silver doping.

X-ray fluorescence (XRF) analysis confirmed that the materials exhibited a composition compatible with $SiO_2$–$Na_2O$–CaO–$P_2O_5$ bioactive glasses, demonstrating the presence of the major elements responsible for forming the glass network. In the doped formulation, silver was detected, confirming its incorporation into the material matrix. Minor elements were also identified at low concentrations without altering the characteristic overall composition of the system.

Overall, the results demonstrate that silver incorporation did not significantly alter the fundamental chemical structure of the bioactive glass but promoted relevant structural modifications, including increased crystallinity and the formation of bioactive phases. These findings suggest that silver doping may simultaneously influence the bioactivity and antimicrobial properties of the material without compromising the integrity of the glass matrix.

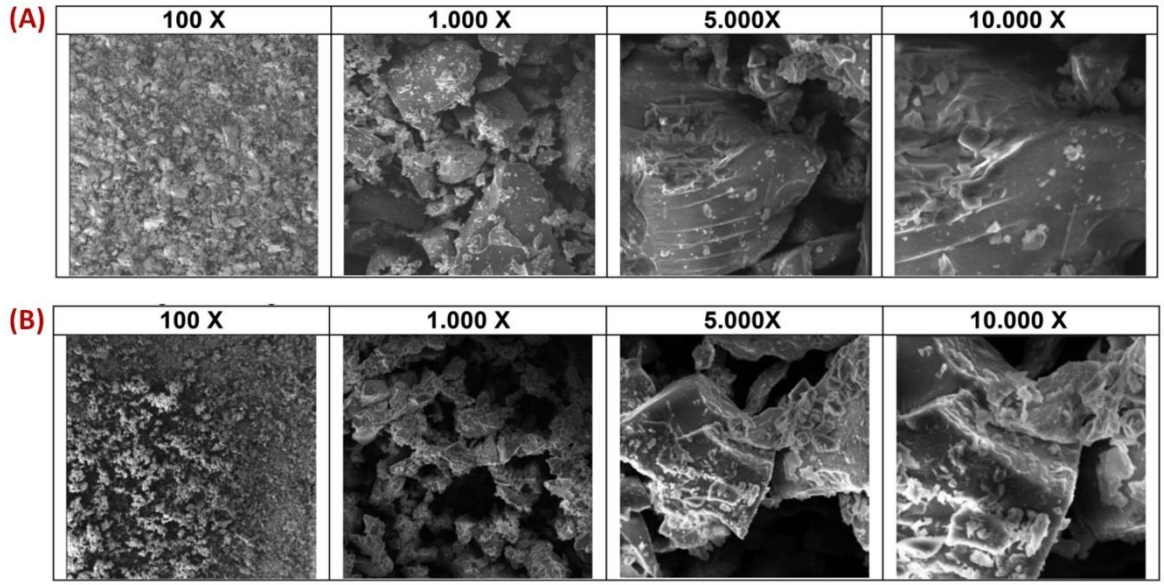



**Figure 3.** Scanning electron microscopy (SEM) images of nanostructured bioactive glasses at different magnifications. (A–D) Base bioactive glass (SNCP) and (E–H) silver-doped bioactive glass (Ag-1.25%). Images were acquired at magnifications of 100×, 1000×, 5000×, and 10,000×, revealing irregularly shaped particles with rough surfaces and heterogeneous topography at multiple scales.

Scanning electron microscopy (SEM) micrographs (Figure 3A and 3B) revealed that both samples consisted of irregularly shaped particles with predominantly rough surfaces, exhibiting heterogeneous topography at different magnifications. The base bioactive glass (SNCP) (Figure 3A) showed agglomerates of particles with poorly defined contours, suggesting the disorganized structural arrangement typically observed in chemically synthesized glass materials.

The sample containing 1.25% silver (Figure 3B) maintained the overall morphological pattern observed for the base bioactive glass, with no pronounced changes in particle shape. However, a slight increase in surface roughness and topographical heterogeneity was

observed, which may be associated with silver incorporation into the glass matrix. Regions displaying different image contrasts may also indicate local compositional variations, suggesting a non-uniform distribution of the dopant.

Overall, the results indicate that silver addition did not compromise the structural integrity of the bioactive glass, preserving its main morphological characteristics while promoting subtle surface modifications that may be relevant to functional properties such as bioactivity and antimicrobial activity.

**Cytocompatibility Evaluation and Selection of Experimental Formulations**

The cytocompatibility of the bioactive glasses was evaluated by means of the MTT cell viability assay using Vero cells exposed to different concentrations of the experimental formulations (Figure 4).

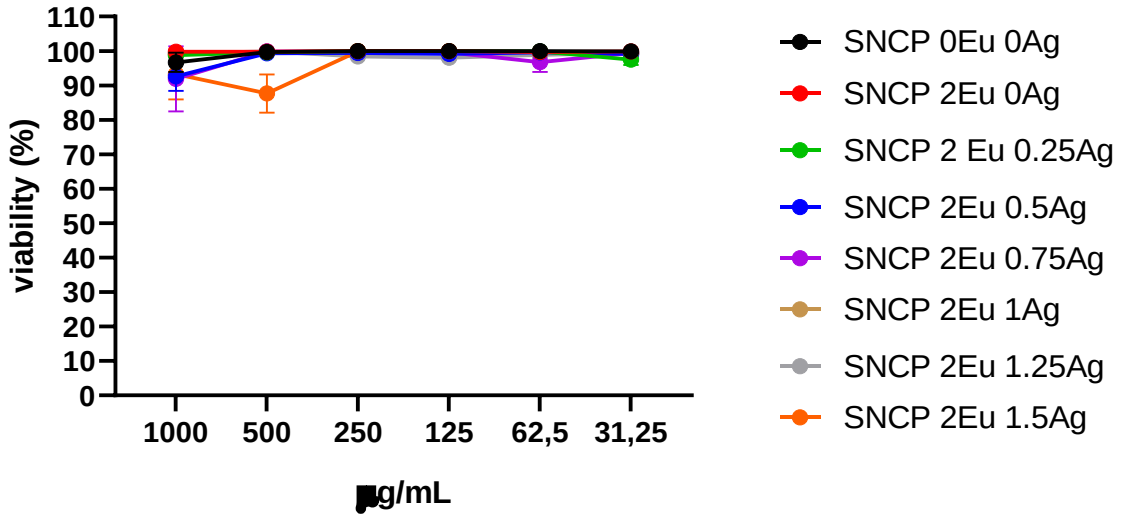



**Figure 4.** Cell viability (%) determined by the MTT assay in Vero cells following exposure to different concentrations of nanostructured bioactive glasses containing varying silver and europium contents. Data are presented as mean ± standard deviation. High cytocompatibility was observed for all formulations, with a slight reduction in cell viability at the highest concentrations.

Overall, all formulations exhibited high cell viability, with values close to or above 90% across most of the concentrations evaluated. The base bioactive glass (SNCP) showed a consistent biological profile, maintaining cell viability close to 100% throughout the entire concentration range tested.

The europium-containing formulations associated with different silver concentrations also exhibited a cytocompatible profile, with no evidence of relevant cytotoxicity. A slight reduction in cell viability was observed at higher concentrations for some formulations containing higher silver contents; however, this reduction did not significantly compromise the biological response.

Overall, these results indicate that silver incorporation, within the concentration range evaluated, did not induce significant cytotoxic effects, whereas the presence of europium did not substantially affect cell viability under the experimental conditions employed.

Based on these findings, the base bioactive glass (SNCP) and the europium-containing formulations doped with 0.5 wt% and 1.25 wt% silver were selected for the subsequent stages of biological evaluation. The selection was based on the balance between high cell viability and antimicrobial performance, allowing comparison between the control material and formulations containing different levels of silver doping.

**Antibacterial Activity and Biofilm Modulation**

The antibacterial activity of the bioactive glasses was evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus mutans* by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), as well as their effects on biofilm formation and the viability of pre-established biofilms (Figures 5–7). Data are presented as mean ± standard deviation and were analyzed by one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Overall, the base bioactive glass (SNCP) did not exhibit significant antibacterial activity, showing values comparable to those of the control group at all concentrations evaluated, with no statistically significant differences ($p > 0.05$). Similarly, the incorporation of europium alone did not produce a relevant antibacterial effect, indicating that this element did not directly contribute to bacterial growth inhibition.

In contrast, the silver-containing formulations exhibited concentration-dependent antibacterial activity, with statistically significant reductions in bacterial viability compared with the control and silver-free groups ($p < 0.05$). For *Staphylococcus aureus*, high susceptibility to the silver-doped formulations was observed, with significant inhibition of bacterial growth at intermediate concentrations (250–125 μg/mL), particularly in groups containing ≥0.5 wt% silver, which differed significantly from the SNCP and europium-only groups ($p < 0.05$). At the highest concentrations, some formulations with higher silver contents almost completely inhibited bacterial growth.

The minimum inhibitory concentration (MIC) analysis corroborated these findings, demonstrating a significant reduction in MIC values for formulations containing higher silver

contents, particularly those with 0.75, 1.0, and 1.25 wt% Ag ($p < 0.05$), whereas the silver-free groups exhibited high MIC values that did not differ significantly from the control group.

In the biofilm formation assay, the silver-containing formulations significantly reduced bacterial adhesion ($p < 0.05$), with the effect becoming more pronounced as silver concentration increased. The formulations containing 0.5 wt% and 1.25 wt% silver consistently exhibited the greatest inhibition of biofilm formation under the different experimental conditions, differing significantly from the silver-free groups ($p < 0.05$).

Similarly, evaluation of pre-established biofilms demonstrated a significant reduction in bacterial viability in the silver-containing groups ($p < 0.05$), although the magnitude of inhibition was lower than that observed during biofilm formation. Nevertheless, formulations containing ≥0.5 wt% silver maintained statistically significant differences compared with both the control and silver-free groups, demonstrating their ability to affect mature biofilms.

Collectively, these findings demonstrate that the antibacterial and antibiofilm activities of the bioactive glasses were directly associated with the presence and concentration of silver, whereas europium did not exert a significant effect on these parameters. The formulations containing 0.5 wt% and 1.25 wt% silver exhibited the best overall biological performance and were therefore selected for subsequent evaluation in the *in vivo* experimental model.

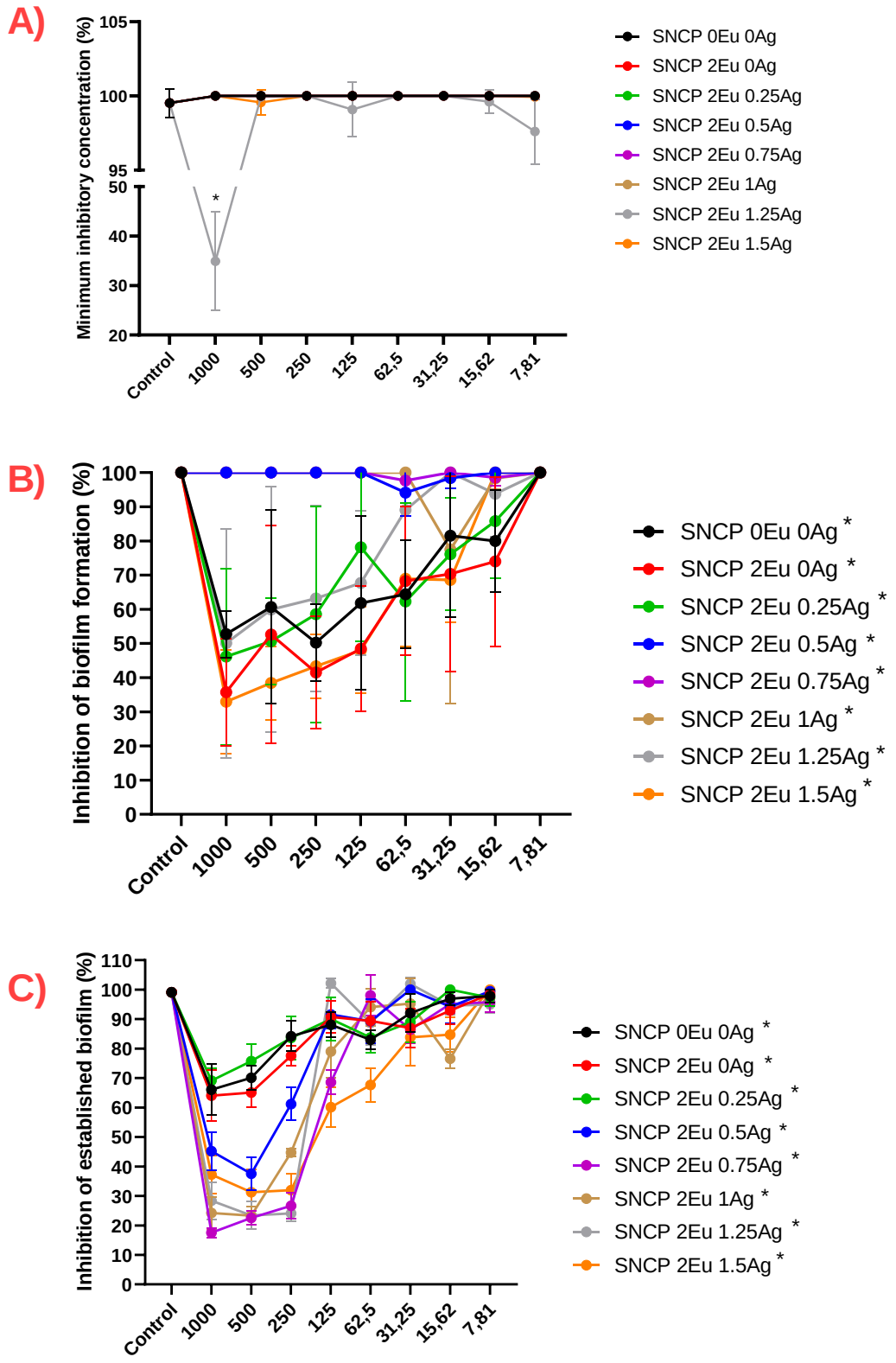



**Figure 5.** Antibacterial activity and antibiofilm effects of nanostructured bioactive glasses against *Staphylococcus aureus*. (A) Minimum inhibitory concentration (MIC); (B) inhibition of biofilm formation; and (C) reduction of pre-established biofilm. Data are presented as mean ± standard deviation ($n \geq 3$) and were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Groups identified by different letters differ significantly ($p < 0.05$).

Silver-containing formulations (≥0.5 wt%) significantly reduced bacterial viability and exhibited greater inhibition of biofilm formation than the SNCP and europium-only groups.

Results similar to those observed for *Staphylococcus aureus* were obtained for *Escherichia coli*, although greater variability was detected at intermediate concentrations, as reflected by the wider dispersion of the data. Overall, *E. coli* exhibited lower susceptibility than *S. aureus*, which may be attributed to structural differences between Gram-negative and Gram-positive bacterial cell walls. Nevertheless, formulations containing higher silver contents significantly reduced bacterial viability compared with the control and silver-free groups (one-way ANOVA, Tukey's test, $p < 0.05$), particularly at the highest concentrations (Figure 6).

For *Streptococcus mutans*, silver-doped formulations also exhibited marked antibacterial activity, significantly reducing bacterial viability ($p < 0.05$), particularly in groups containing ≥0.5 wt% silver. Greater antibacterial efficacy was observed at higher silver concentrations, with consistent statistical differences relative to the SNCP and europium-only groups (Figure 7).

Biofilm formation assays demonstrated that silver-containing formulations significantly inhibited the initial bacterial adhesion of all evaluated species ($p < 0.05$). This effect was more pronounced for the formulations containing 0.5 wt% and 1.25 wt% silver, which consistently exhibited the highest percentages of biofilm inhibition across the concentration range tested and differed significantly from the silver-free groups.

Consistent with these findings, assays performed on pre-established biofilms demonstrated that silver-doped bioactive glasses significantly reduced the viability of mature biofilms ($p < 0.05$), although to a lesser extent than that observed for the inhibition of initial biofilm formation. This pattern indicates that the antibacterial effect is more effective during the early stages of bacterial adhesion and biofilm development, possibly due to the greater susceptibility of planktonic bacteria and immature biofilms.

Overall, these results confirm that the antibacterial and antibiofilm activities of the bioactive glasses were directly associated with the presence and concentration of silver, whereas europium incorporation did not significantly influence these parameters ($p > 0.05$). The formulations containing 0.5 wt% and 1.25 wt% silver demonstrated the best overall biological performance, combining high antimicrobial efficacy with preserved cytocompatibility, and were therefore selected for evaluation in the *in vivo* experimental model.

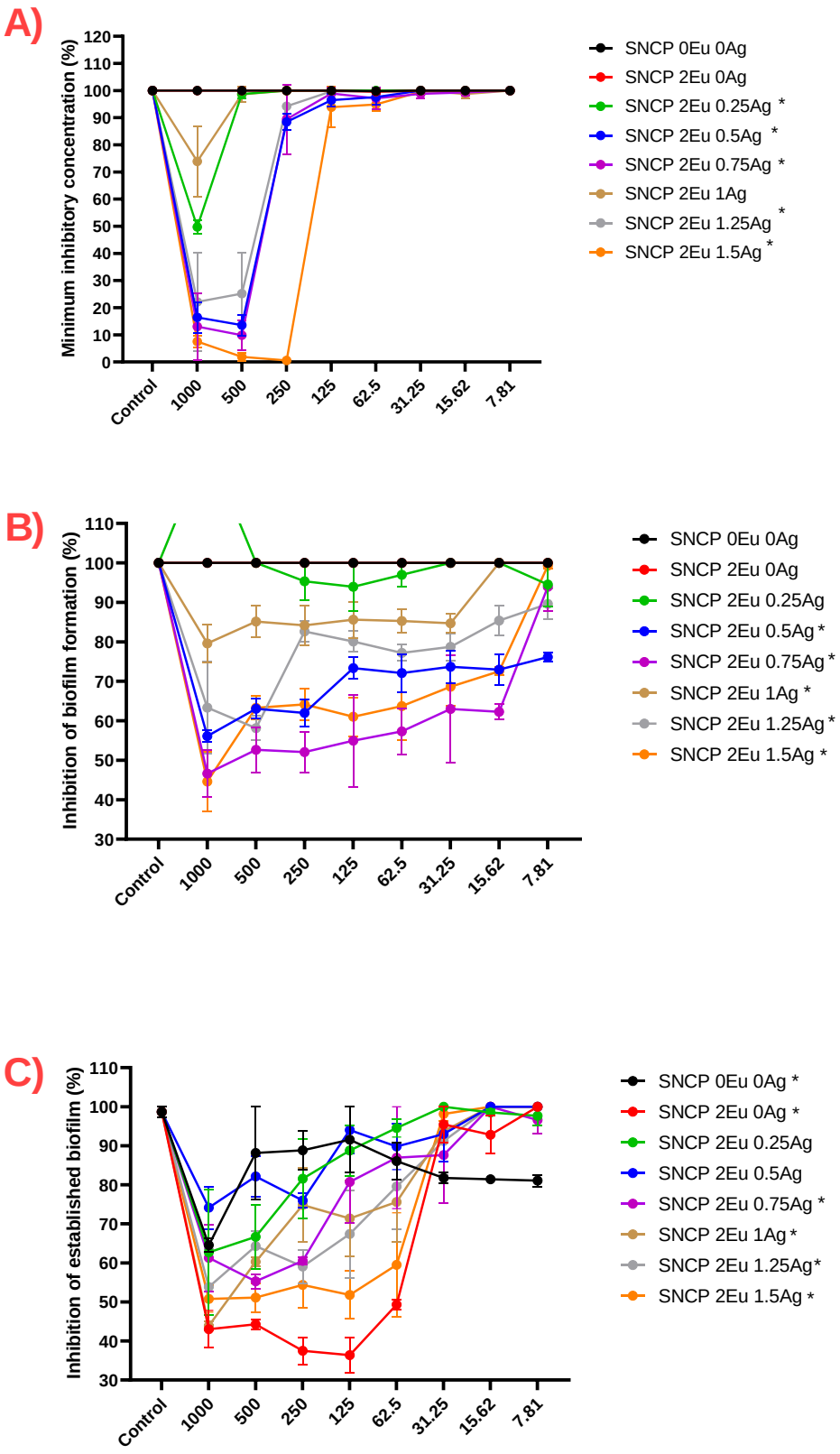



**Figure 6.** Antibacterial activity and antibiofilm effects of nanostructured bioactive glasses against *Escherichia coli*. (A) Minimum inhibitory concentration (MIC); (B) inhibition of biofilm formation; and (C) reduction of pre-established biofilm. Data are presented as mean ± standard deviation ($n \geq 3$) and were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Groups identified by different letters differ significantly ($p < 0.05$). *Escherichia coli*

exhibited lower susceptibility than *Staphylococcus aureus*; however, formulations containing higher silver contents significantly reduced bacterial viability.

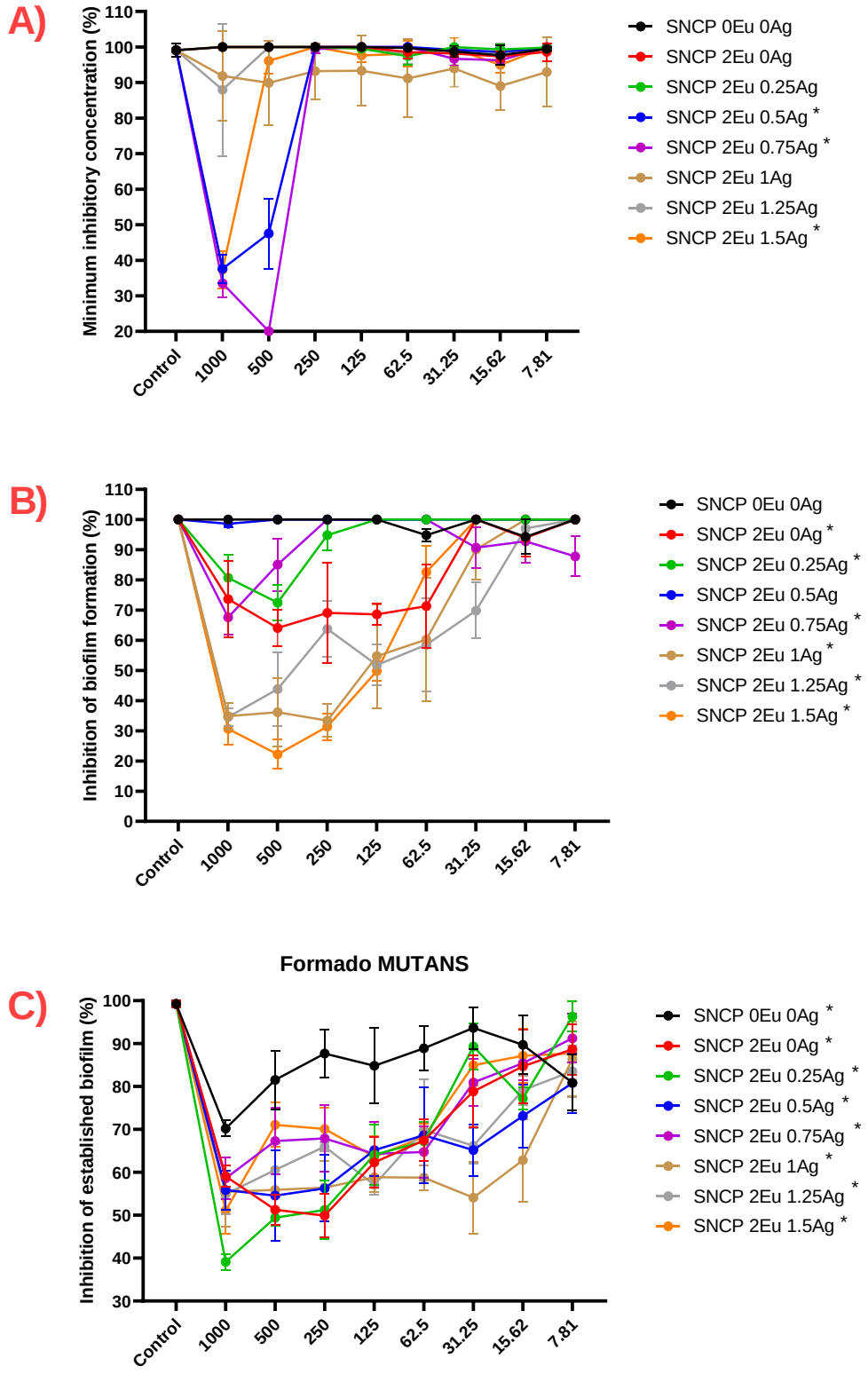



**Figure 7.** Antibacterial activity and antibiofilm effects of nanostructured bioactive glasses against *Streptococcus mutans*. (A) Minimum inhibitory concentration (MIC); (B) inhibition of biofilm formation; and (C) reduction of pre-established biofilm. Data are presented as mean ±

standard deviation ($n \geq 3$) and were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Groups identified by different letters differ significantly ($p < 0.05$). Silver-containing formulations significantly reduced bacterial viability and biofilm formation, particularly at the highest silver concentrations.

### Histological, Histomorphometric, and Systemic Analyses

Inter-examiner agreement for the histological analyses was excellent, with a Cohen's Kappa coefficient of 0.97 ± 0.03, indicating high reproducibility and reliability of the obtained data.

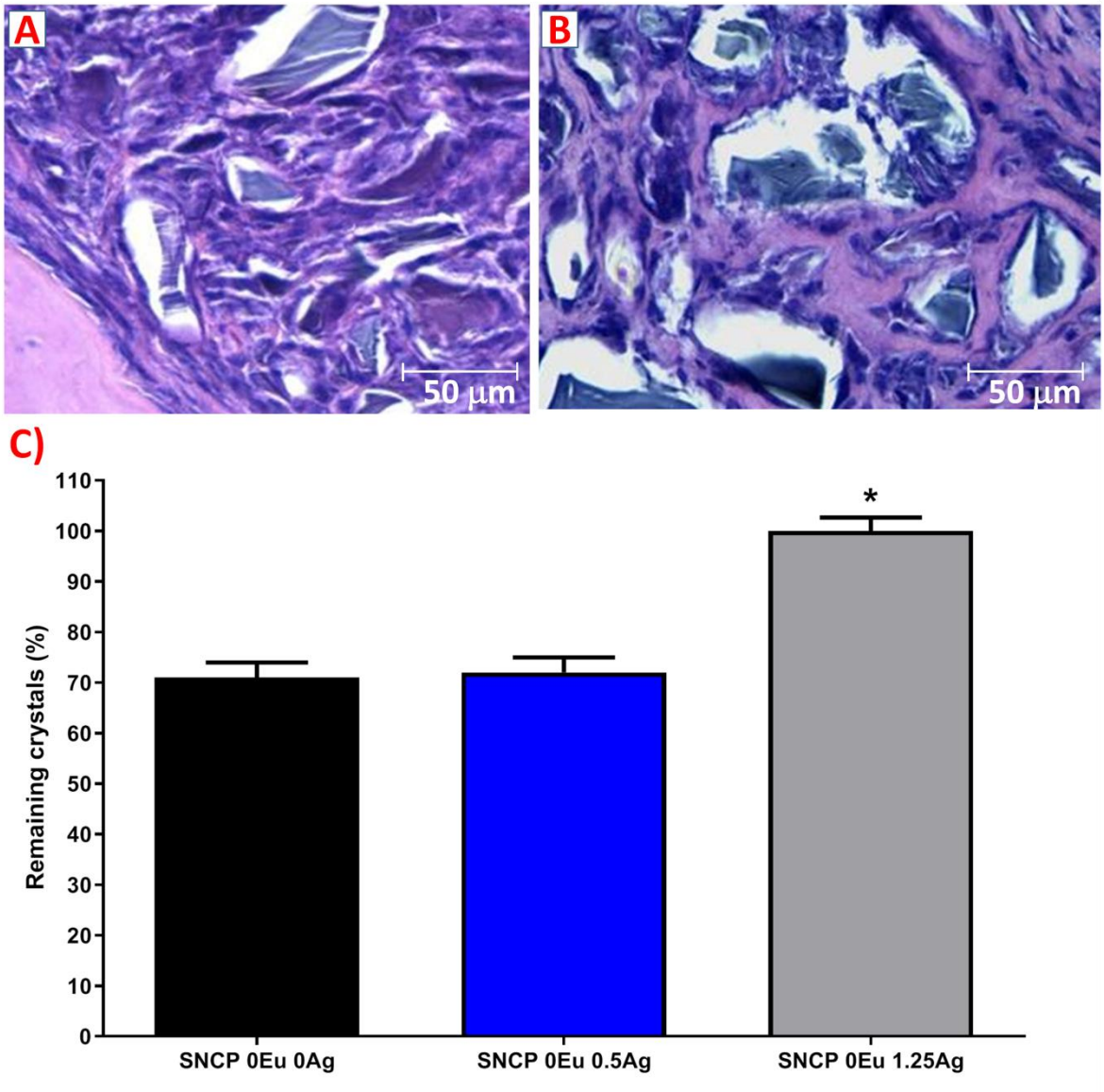



**Figure 8.** Histological sections of rat calvarial defects and quantification of residual particles in the SNCP-0Eu-1.25Ag group. (A) Bone tissue occupying the defect area, with underlying fibrous connective tissue interspersed among the biomaterial particles (hematoxylin and eosin staining, 400×, scale bar = 50 µm). (B) Newly formed tissue within the bone defect showing abundant silver-containing particles (black) surrounded by fibrous connective tissue

(hematoxylin and eosin staining, 400×, scale bar = 50 μm). (C) Quantification of residual biomaterial particles within the bone defect. Data are presented as mean ± standard deviation. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. $p < 0.05$ compared with the other groups. The formulation containing 1.25 wt% silver exhibited the highest amount of residual material, indicating lower bioabsorption during the experimental period.

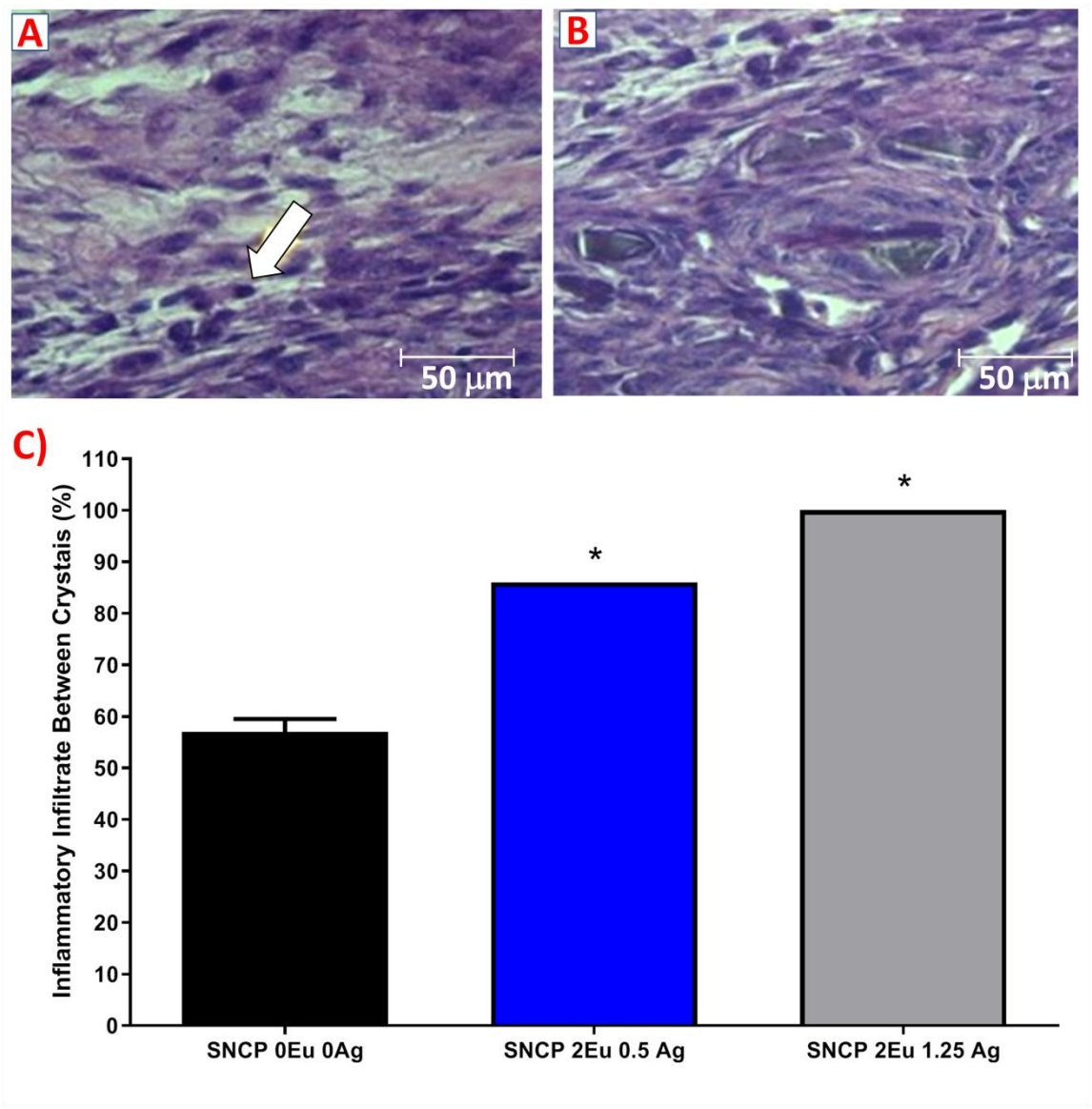



**Figure 9.** Histological sections and quantification of inflammatory cell infiltration in the central region of the bone defect (between biomaterial particles). (A) Area beneath the margin of the bone defect showing mild infiltration of mature lymphocytes (arrow). (B) Dispersed biomaterial particles in the SNCP-0Eu-1.25Ag group (hematoxylin and eosin staining, 400×, scale bar = 50 μm). (C) Quantification of inflammatory infiltrate in the central region of the defect. Data are presented as mean ± standard deviation. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. $p < 0.05$ compared with the SNCP

group. Silver-containing formulations, particularly the 1.25 wt% Ag group, exhibited significantly greater inflammatory cell infiltration.

The analysis of residual biomaterial particles within the bone defect demonstrated significant differences among the experimental groups (Figure 8). The SNCP group exhibited mean values close to 70%, whereas the formulation containing 0.5 wt% silver did not significantly differ from the base material ($p > 0.05$). In contrast, the group containing 1.25 wt% silver exhibited a significantly greater percentage of residual particles (99.6%), differing statistically from all other groups ($p < 0.05$), indicating a lower degree of bioabsorption during the experimental period.

Evaluation of inflammatory cell infiltration in the central region of the defect (between the biomaterial particles) revealed a progressive increase in the inflammatory response in the silver-containing groups (Figure 9). The SNCP group exhibited relatively low mean values (57%), whereas formulations containing 0.5 wt% (65%) and 1.25 wt% (100%) silver showed significantly greater inflammatory cell infiltration ($p < 0.05$), suggesting enhanced early interaction between the biomaterial and the host tissue.

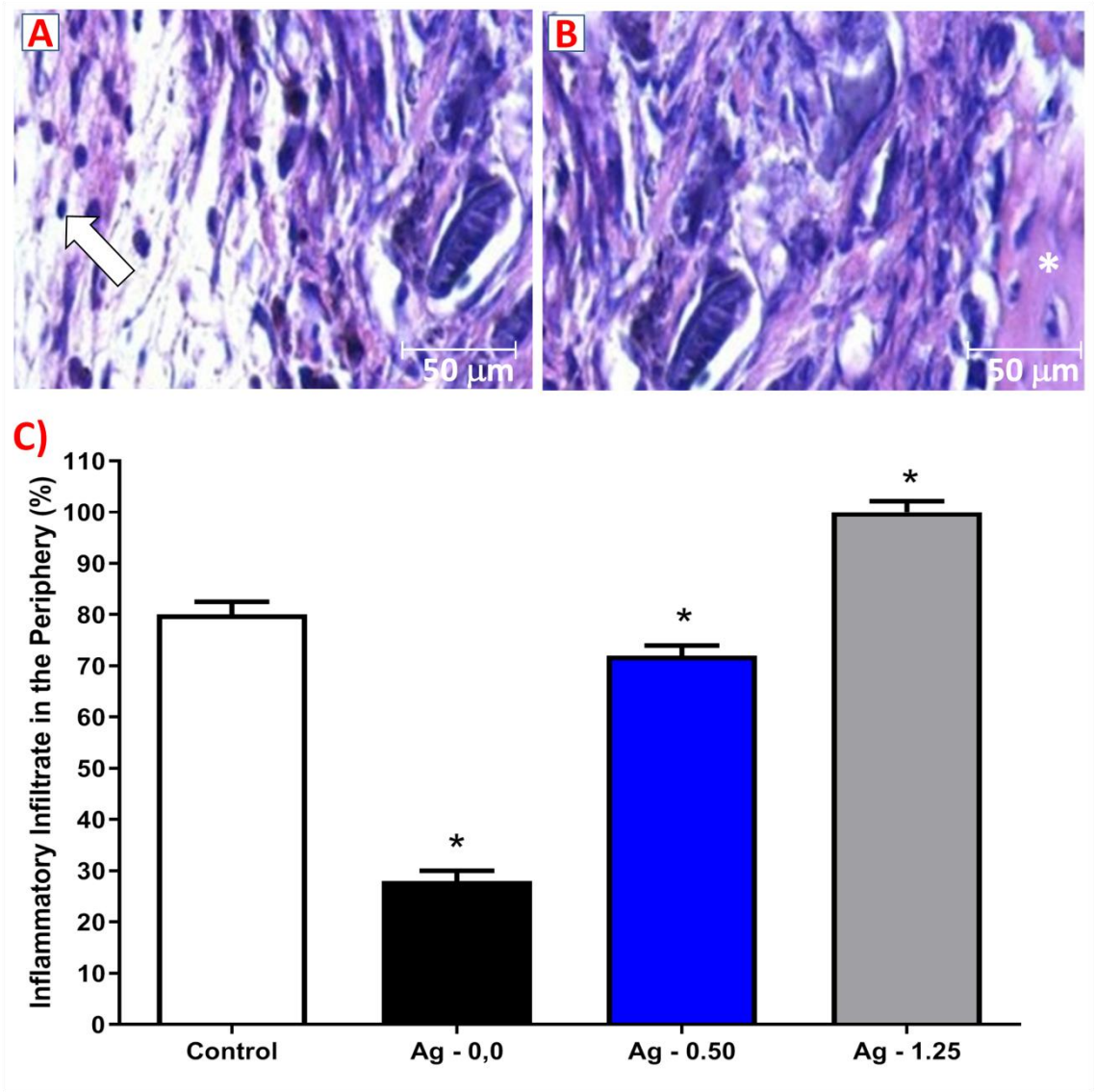



**Figure 10.** Histological sections and quantification of inflammatory cell infiltration in the peripheral region of the lesion (SNCP-0Eu-1.25Ag). (A) Scattered mature lymphocytes (arrow). (B) Biomaterial particles located at the periphery of the bone defect in association with mature bone tissue (asterisk) (hematoxylin and eosin staining, 400×, scale bar = 50 µm). (C) Quantification of inflammatory infiltrate in the peripheral region of the lesion. Data are presented as mean ± standard deviation. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. $p < 0.05$. The SNCP group exhibited the lowest peripheral inflammatory response, whereas the 1.25 wt% silver formulation showed significantly increased inflammation.

Analysis of the peripheral region of the lesion demonstrated a distinct inflammatory profile (Figure 10). The SNCP group exhibited a significantly lower inflammatory infiltrate (28%) than the control group (80%) ($p < 0.05$), indicating greater biocompatibility in this region. The formulation containing 0.5 wt% silver exhibited intermediate values (72%), whereas the group containing 1.25 wt% silver showed significantly greater inflammatory cell infiltration (100%) ($p < 0.05$), suggesting a more intense and persistent inflammatory response.

Systemic cytokine analysis revealed differential modulation of the inflammatory response (Figure 11). No statistically significant differences were observed for IFN-γ among the experimental groups ($p > 0.05$). In contrast, IL-10 levels were significantly increased in the group containing 0.5 wt% silver (99.85 pg/mL), indicating a more pronounced anti-inflammatory response ($p < 0.05$). Conversely, the formulation containing 1.25 wt% silver exhibited markedly lower IL-10 levels (24.13 pg/mL), suggesting reduced anti-inflammatory modulation.

TNF-α analysis demonstrated a marked increase in the group containing 0.5 wt% silver (712.22 pg/mL), differing significantly from all other experimental groups ($p < 0.05$), whereas the control, SNCP, and 1.25 wt% silver groups exhibited low cytokine levels. These findings suggest a more pronounced acute inflammatory response associated with the intermediate silver concentration.

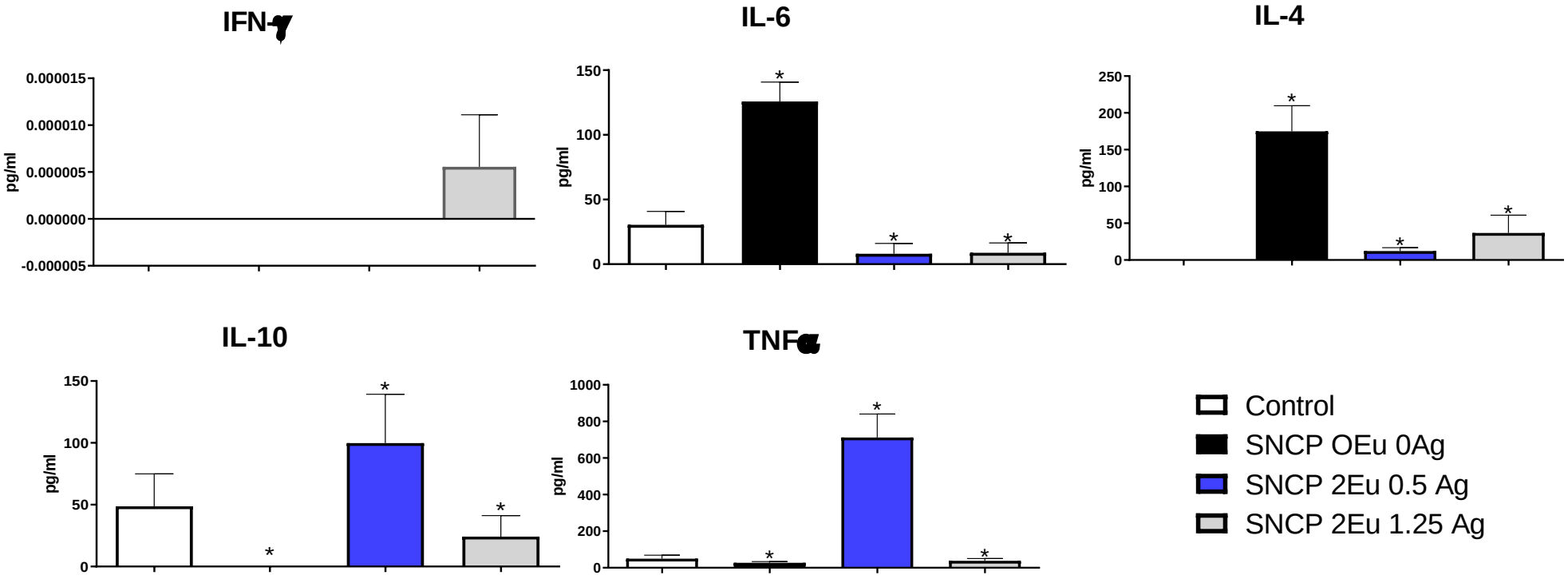



**Figure 11.** Plasma levels of IFN-γ, IL-10, and TNF-α. Data are presented as mean ± standard deviation. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. $p < 0.05$. Increased IL-10 and TNF-α levels were observed in the group containing 0.5 wt% silver, indicating a concentration-dependent modulation of the inflammatory response.

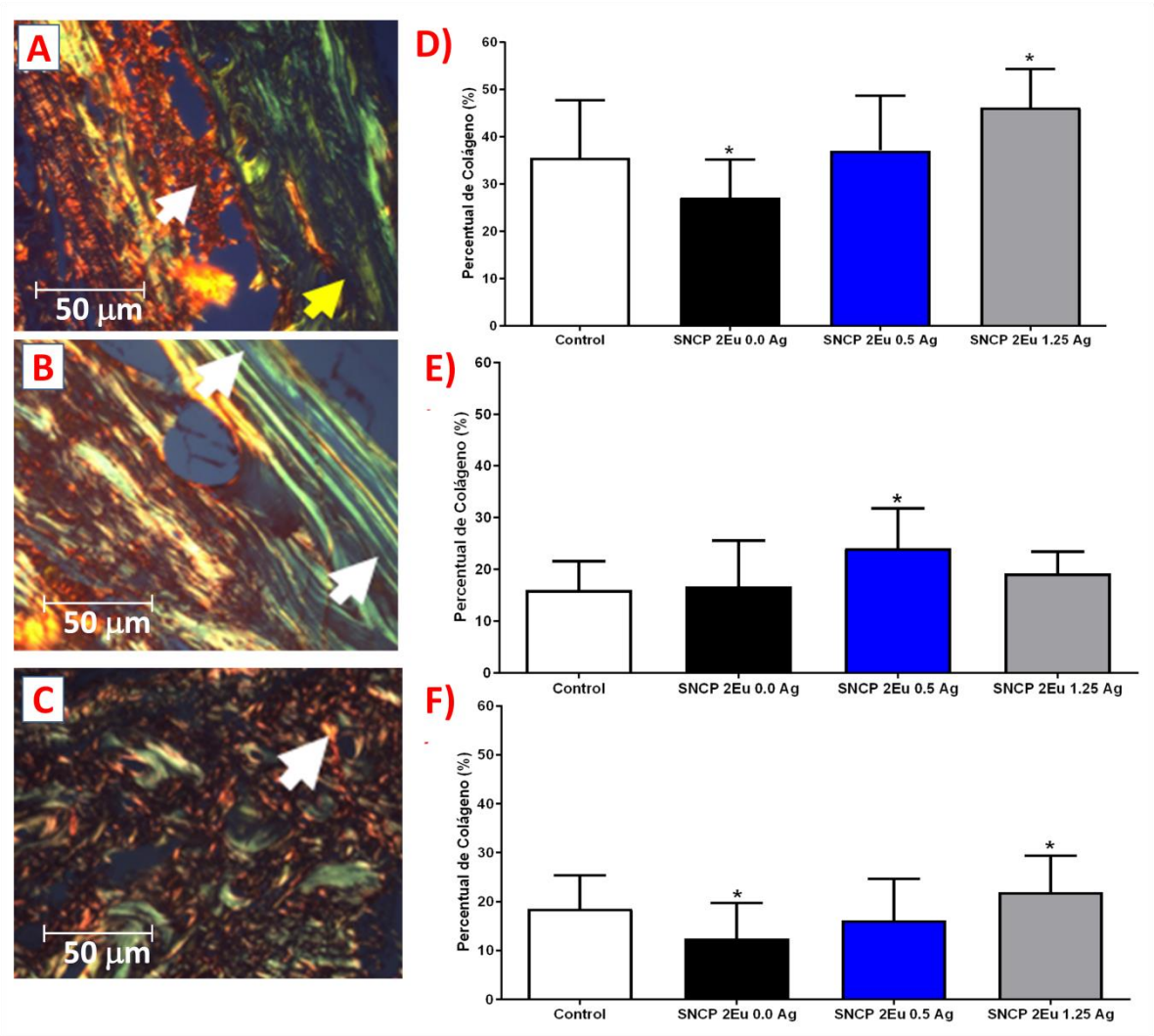



**Figure 12.** Qualitative and quantitative analysis of collagen deposition within the bone defect. (A) Total collagen; (B) type III collagen; and (C) type I collagen, evaluated by Picrosirius Red staining under polarized light. White arrows indicate type I collagen fibers (red/yellow), whereas the yellow arrow indicates type III collagen fibers (green). Scale bars = 50 µm. Quantification of (D) total collagen, (E) type III collagen, and (F) type I collagen in the experimental groups. Data are presented as mean ± standard deviation. $p < 0.05$ compared with the control group or as indicated by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

Polarized light microscopy following Picrosirius Red staining demonstrated differences in collagen fiber organization and maturation among the experimental groups (Figure 12A–C). Type I collagen fibers, identified by their red and yellow birefringence, exhibited greater intensity and organization in the groups treated with silver-containing bioactive glasses. In

contrast, type III collagen fibers, observed as green birefringence, were variably distributed among the groups, reflecting different stages of the tissue repair process.

Quantitative analysis of total collagen (Figure 12D) revealed the highest percentage in the group treated with the bioactive glass containing 1.25 wt% silver (46.21%), which differed significantly from the SNCP-2Eu-0Ag group (27.15%; $p < 0.05$). The formulation containing 0.5 wt% silver exhibited intermediate values (37.10%), with no statistically significant difference compared with the control group.

Analysis of the individual collagen fractions demonstrated that type III collagen (Figure 12E), which is characteristic of the early stages of tissue repair, was significantly higher in the group treated with 0.5 wt% silver (24.05%; $p < 0.05$), suggesting an active remodeling phase. In contrast, type I collagen (Figure 12F), which is associated with extracellular matrix maturation and the formation of organized tissue, reached its highest percentage in the group containing 1.25 wt% silver (21.10%), differing significantly from the SNCP-2Eu-0Ag group ($p < 0.05$).

Collectively, these findings indicate that silver incorporation directly influenced collagen deposition and maturation. The formulation containing 1.25 wt% silver promoted the formation of a more mature collagen matrix, as demonstrated by the increased deposition of total collagen and type I collagen. In contrast, the formulation containing 0.5 wt% silver exhibited a higher proportion of type III collagen, suggesting an intermediate stage of bone repair.

## DISCUSSION

The results of the present study demonstrate that silver doping of nanostructured bioactive glasses promotes relevant structural and biological modifications, directly influencing antimicrobial activity, inflammatory response, and bone regeneration. Overall, the findings confirm that the biological performance of these biomaterials is strongly dependent on silver concentration, whereas europium incorporation did not exert a significant effect on the evaluated parameters.

From a structural perspective, FTIR and XRD analyses demonstrated that silver incorporation did not compromise the formation of the silicate-phosphate glass network but promoted changes in its structural organization, including increased crystallinity and the formation of bioactive phases such as hydroxyapatite and tricalcium phosphate. These findings are consistent with previous studies demonstrating that the incorporation of metallic ions may act

as nucleating agents, promoting partial crystallization of the glass matrix and modulating its bioactivity.[14-16] The presence of these crystalline phases is particularly relevant because they are associated with the formation of an apatite layer, which is essential for bonding with bone tissue.

The irregular morphology and high surface roughness observed by SEM are also consistent with previous reports indicating that heterogeneous surfaces with high specific surface area promote protein adsorption, cell attachment, and enhanced ionic release.[17] These characteristics are particularly important in the context of bioactivity and antimicrobial performance, since the interaction between the biomaterial surface and the biological environment plays a critical role in determining biological behavior.

Regarding cytocompatibility, all formulations exhibited high cell viability, even in the presence of silver, indicating that the concentrations evaluated remain within a biologically safe range. These findings agree with previous studies demonstrating that silver cytotoxicity is highly dependent on both concentration and ion release kinetics, allowing antimicrobial activity to be achieved without compromising cell viability when silver content is appropriately controlled.[18,19]

The antibacterial activity observed in the present study further confirms the central role of silver as the antimicrobial component of bioactive glasses. Formulations containing ≥0.5 wt% silver significantly reduced bacterial viability and biofilm formation in a concentration-dependent manner. This behavior is consistent with the well-established mechanisms of $Ag^+$ ions, which include disruption of bacterial cell membranes, inhibition of respiratory enzymes, and induction of oxidative stress.[20]

The greater susceptibility of *Staphylococcus aureus* compared with *Escherichia coli* observed in this study can be explained by the structural differences between Gram-positive and Gram-negative bacteria. The outer membrane present in Gram-negative bacteria acts as an additional permeability barrier against metallic ions, thereby reducing bacterial susceptibility.[21,22] Similar findings have been reported for other silver-containing bioactive glasses, supporting the consistency of the present results.

With respect to biofilm modulation, silver-containing bioactive glasses were more effective in preventing bacterial adhesion than in eliminating mature biofilms. This behavior has been widely reported in the literature and is attributed to the highly organized extracellular polymeric matrix and the reduced metabolic activity characteristic of mature biofilms.[23] Therefore, the present findings reinforce the potential application of these biomaterials as preventive strategies against implant-associated infections.

The *in vivo* findings revealed a particularly relevant concentration-dependent effect of silver on inflammatory response and bone regeneration. The formulation containing 0.5 wt% silver significantly increased both TNF-α and IL-10 expression, indicating activation of the inflammatory response accompanied by regulatory anti-inflammatory mechanisms. This profile suggests a controlled acute inflammatory response, which is considered beneficial for tissue repair because the initial inflammatory phase is essential for cellular recruitment and activation of regenerative processes.[24,25]

Conversely, the formulation containing 1.25 wt% silver exhibited lower IL-10 expression and greater peripheral inflammatory cell infiltration, indicating a more persistent inflammatory response. This behavior may be associated with increased ionic release resulting from the higher silver concentration, leading to greater local inflammatory stimulation. Previous studies have demonstrated that excessive silver concentrations may prolong the inflammatory response and negatively affect the dynamics of tissue regeneration.[26]

Despite the more pronounced inflammatory response, the formulation containing 1.25 wt% silver exhibited greater total collagen deposition and a significant increase in type I collagen, indicating enhanced maturation of the bone extracellular matrix. These findings suggest that although inflammation was more persistent, tissue repair progressed, possibly as a consequence of the greater structural stability of the material and its lower degradation rate, as evidenced by the higher amount of residual biomaterial particles.

In contrast, the formulation containing 0.5 wt% silver exhibited a greater proportion of type III collagen, which is characteristic of the early stages of tissue repair, suggesting that this group remained in an intermediate stage of bone regeneration. This observation is in agreement with previous reports describing the transition from type III to type I collagen as an important indicator of extracellular matrix maturation during bone healing.[27]

Overall, the results demonstrate a complex balance among antimicrobial activity, inflammatory response, and tissue regeneration. Intermediate silver concentrations (0.5 wt%) promoted a more dynamic biological environment characterized by controlled inflammation, potentially accelerating the early stages of tissue repair, whereas higher silver concentrations (1.25 wt%) favored extracellular matrix deposition but resulted in lower bioabsorption and greater persistence of inflammation.

Finally, the absence of a significant biological effect associated with europium suggests that its primary contribution may be related to optical or imaging properties, as previously described in the literature, rather than directly influencing bioactivity or antimicrobial

performance.[28] This finding provides relevant information for the future application of europium in multifunctional bioactive glass systems.

Taken together, the present findings reinforce the potential of silver-doped bioactive glasses as multifunctional biomaterials capable of combining antimicrobial activity with regenerative properties. However, they also emphasize the importance of precisely controlling silver concentration to achieve an optimal balance between antimicrobial efficacy and a favorable biological response.

## 5. CONCLUSIONS

Silver-doped nanostructured bioactive glasses exhibited concentration-dependent antibacterial and antibiofilm activities without compromising cytocompatibility. The formulations containing 0.5 wt% and 1.25 wt% silver demonstrated the most favorable balance between antimicrobial efficacy and biological performance.

In the *in vivo* model, silver concentration directly modulated tissue response. The formulation containing 0.5 wt% silver promoted a more active early inflammatory response, whereas the formulation containing 1.25 wt% silver enhanced collagen deposition and extracellular matrix maturation.

Overall, the results demonstrate that modulation of silver concentration is a key determinant of the biological performance of nanostructured bioactive glasses, highlighting their potential as multifunctional biomaterials for bone repair applications.

## REFERÊNCIAS

**1.** FU, Qi; SAIZ, Eduardo; RAHAMAN, Mohammad Nazrul; TOMSIA, Antoni P. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, n. 7, p. 1245–1256, 2011. DOI: 10.1016/j.msec.2011.04.022.

**2.** FAN, Min; YAN, Jun; TAN, Hui; BEN, Dong; HE, Qing; HUANG, Zhi; HU, Xia. Nanostructured gel scaffolds for osteogenesis through biological assembly of biopolymers via specific nucleobase pairing. **Macromolecular Bioscience**, v. 14, n. 11, p. 1521–1527, 2014. DOI: 10.1002/mabi.201400320.

**3.** LIU, Jingwen; CHEN, Jishizhan; HEYRAUD, Agathe; SHARMA, Aikta; LAMARI, Meryem; TALLIA, Francesca; JONES, Julian R.; LEE, Peter D. Comparative mechanical characterisation of 13–93 bioactive glass and hybrid scaffolds for bone regeneration. **Scientific Reports**, v. 16, n. 1, p. 15905, 2026. DOI: 10.1038/s41598-026-46620-9.

**4.** MINKIEWICZ-ZOCHNIAK, Agnieszka; JARZYNKA, Sylwia; IWAŃSKA, Agnieszka; STROM, Karin; IWAŃCZYK, Beata; BARTEL, Monika; MAZUR, Marta; PIETRUCZUK-PADZIK, Agnieszka; KONIECZNA, Marta; AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ, Elżbieta; OLĘDZKA, Grażyna. Biofilm formation on dental implant biomaterials by *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with cystic fibrosis. **Materials**, v. 14, n. 8, p. 2030, 2021. DOI: 10.3390/ma14082030.

**5.** VERMA, Sheetal; KHAN, Asma; VENKATESH, Vimala; WALIULLAH, Shah; KUMAR, Deepak; RASHMI. Biofilm formation and antibiotic resistance in orthopaedic implant infections: a molecular analysis of *icaA*, *icaD*, and *mecA* genes in an Indian cohort. *Indian* **Journal of Orthopaedics**, v. 60, n. 1, p. 100–109, 2025. DOI: 10.1007/s43465-025-01594-0.

**6.** DAS, Tanmay; NEJADNIK, Mohammad Reza; RODRÍGUEZ, Víctor V.; LIU, Yang; SUBBIAHDOSS, Guruprasad. Biomaterial-associated infections: their development, characterization, prevention and treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 251, p. 114595, 2025. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2025.114595.

**7.** THONGNUEK, P.; SUKPARANGSI, W.; JOMRIT, J.; DAMRONGSAKKUL, S.; SRIBOONAIED, P.; CAO, C.; PRASOPTHUM, A. Silver-Doped Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles With Core-Shell Architecture: Enhanced In Vitro Bioactivity, Antibacterial Efficacy, and Biocompatibility. **Journal of Biomedical Materials Research Part** A, v. 113, n. 12, p. e70000, 2025. DOI: 10.1002/jbma.70000.

**8.** VALAPPIL, S. P.; PICKUP, D. M.; CARROLL, D. L.; HOPE, C. K.; PRATTEN, J.; NEWPORT, R. J.; SMITH, M. E.; WILSON, M.; KNOWLES, J. C. Effect of silver content on the structure and antibacterial activity of silver-doped phosphate-based glasses. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4453–4461, 2007. DOI: 10.1128/AAC.00605-07.

**9.** YIN, I. X.; ZHANG, J.; ZHAO, I. S.; MEI, M. L.; LI, Q.; CHU, C. H. The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 2555–2562, 2020. DOI: 10.2147/IJN.S246764.

**10.** ZHANG, Y.; DAI, Z.; LI, X.; HE, A.; ZHENG, J.; DING, M.; LI, Q.; MOU, Y.; YANG, D.; XIU, W.; DONG, H. Emerging non-antibiotic strategies for implant-associated biofilm infections by reprogramming the dysregulated immune microenvironment. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 12, n. 1, p. 42, 2026. DOI: 10.1038/s41522-025-00907-3.

**11.** SHENDAGE, S. S.; KAMBLE, G.; CHAVAN, R.; JADAV, N. R.; DOONG, R.-A.; CHANG, J.-Y.; GHULE, A. V. Bioactive glass for bone tissue regeneration: focusing on the key biological properties. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 12, n. 1, p. 71–89, 2026. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.5c01283.

**12.** HOPPE, A.; GÜLDAL, N. S.; BOCCACCINI, A. R**.** A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2757–2774, 2011. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.004.

**13.** RIBEIRO, G. H.; TREVISAN, R. O.; OBATA, M. M.; DESIDÉRIO, C. S.; SEABRA, O.; ETCHEBEHERE, R. M.; OLIVEIRA, C. J.; DANTAS, N. O.; SILVA, A. C.; PERINI, H. F.; SILVA, M. V.; PEREIRA, S. A.; ROSA, R. C. Dose-dependent immunomodulatory effects of

silver-doped nanostructured bioglasses in calvarial bone repair. **Journal of Biological Methods**, 2026.

**14.** GONZALO-JUAN, I.; XIE, F.; BECKER, M.; TULYAGANOV, D. U.; IONESCU, M.; LAUTERBACH, S.; DE ANGELIS RIGOTTI, F.; FISCHER, A.; RIEDEL, R. Synthesis of silver modified bioactive glassy materials with antibacterial properties via facile and low-temperature route. **Materials**, v. 13, n. 22, p. 5115, 2020. DOI: 10.3390/ma13225115.

**15.** ABREU, H.; LALLUKKA, M.; MIOLA, M.; SPRIANO, S.; VERNÈ, E.; RAINERI, D.; LEIGHEB, M.; RONGA, M.; CAPPELLANO, G.; CHIOCCHETTI, A. Human T-cell responses to metallic ion-doped bioactive glasses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 8, p. 4501, 2024. DOI: 10.3390/ijms25084501.

**16.** PRASAD, A.; SOWJANYA, V.; MANUEL, Jerold; RAO, P. Venkateswara; MADABOOSI, Narayanan; PRASAD, P. Syam. Silver-doped bioactive spherical glass ceramic nanoparticles with enhanced osteogenic and antibacterial properties for bone tissue engineering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 730, p. 139019, 2026. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2025.139019.

**17.** WOOD, J.; PALMS, D.; LUU, Q. T.; VASILEV, K.; BRIGHT, R. Investigating simulated cellular interactions on nanostructured surfaces with antibacterial properties: insights from force curve simulations. **Nanomaterials**, v. 15, n. 6, p. 462, 2025. DOI: 10.3390/nano15060462.

**18.** CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. **Toxicology Letters**, v. 176, n. 1, p. 1–12, 2008. DOI: 10.1016/j.toxlet.2007.10.004.

**19.** KIRMANIDOU, Y.; SIDIRA, M.; BAKOPOULOU, A.; TSOUKNIDAS, A.; PRYMAK, O.; PAPI, R.; CHOLI-PAPADOPOULOU, T.; EPPLE, M.; MICHAILIDIS, N.; KOIDIS, P.; MICHALAKIS, K. Assessment of cytotoxicity and antibacterial effects of silver nanoparticle-doped titanium alloy surfaces. **Dental Materials**, v. 35, n. 9, p. e220–e233, 2019. DOI: 10.1016/j.dental.2019.06.003.

**20.** KHALIFA, H. O.; OREIBY, A.; MOHAMMED, T.; ABDELHAMID, M. A. A.; SHOLKAMY, E. N.; HASHEM, H.; FEREIG, R. M. Silver nanoparticles as next-generation antimicrobial agents: mechanisms, challenges, and innovations against multidrug-resistant bacteria**. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 15, p. 1599113, 2025. DOI: 10.3389/fcimb.2025.1599113.

**21.** GUEDES, João; GONÇALVES, Diana B.; RODRIGUES, Cláudia F.; PARPOT, Paula; FONSECA, Ana M.; ALMEIDA-AGUIAR, Carla; NEVES, Isabel C. Antimicrobial agents based on metal-ion zeolite materials: a multivariate approach to microbial growth inhibition. **RSC Advances**, v. 15, n. 43, p. 36380–36392, 2025. DOI: 10.1039/D5RA05465F.

**22.** IVANKOVIC, Tomislav; TURK, Helena; HRENOVIC, Jasna; SCHAUPERL, Zdravko; IVANKOVIC, Marica; RESSLER, Antonia. Antibacterial activity of silver doped hydroxyapatite toward multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 458, p. 131867, 2023. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2023.131867.

**23.** HALL-STOODLEY, Luanne; COSTERTON, J. William; STOODLEY, Paul. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95–108, 2004. DOI: 10.1038/nrmicro821.

**24.** NEWMAN, Hannah; SHIH, Yu V.; VARGHESE, Siddharth. Resolution of inflammation in bone regeneration: from understandings to therapeutic applications. **Biomaterials**, v. 277, p. 121114, 2021. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121114.

**25.** WANG, Yuqiang; ZHANG, Ziyan; SUN, Xuedi; PIAO, Chengdong. Recent progress in immunomodulation-based strategies for bone repair. **Regenerative Therapy**, v. 31, p. 101054, 2026. DOI: 10.1016/j.reth.2025.101054.

**26.** LUO, Shenghui; XIAO, Wei; WEI, Xinjian; JIA, Wentao; ZHANG, Changqing; HUANG, Wenhui; JIN, Dongxiao; RAHAMAN, Mohammad Nazrul; DAY, Delbert E. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of silver-containing borate bioactive glass. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 95B, n. 2, p. 441–448, 2010. DOI: 10.1002/jbm.b.31735.

**27.** BOSCARO, Diamante; SIKORSKI, Pawel. Spheroids as a 3D *in vitro* model to study bone and bone mineralization. **Biomaterials Advances**, v. 157, p. 213727, 2024. DOI: 10.1016/j.bioadv.2023.213727.

**28.** PANTULAP, Uraiporn; ARANGO-OSPINA, Monica; BOCCACCINI, Aldo R. Bioactive glasses incorporating less-common ions to improve biological and physical properties. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 33, n. 1, p. 3, 2022. DOI: 10.1007/s10856-021-06626-3.

ACKNOWLEDGMENTS:

The authors acknowledge the financial and institutional support from FAPEMIG (RED-00224-23 – Rede Mineira de Nanobioplataformas Translacionais), CNPq, CAPES, and FUNEPU.

## APÊNDICE C - Lista participação de coautores

Odival Seabra[1], Beatriz Sodré Matos[1]; Hugo Felix Perini[2], Sanívia Aparecida de Lima Pereira[3], Noelio Oliveira Dantas4, Anielle Christine Almeida Silva5, Marcos Vinicius da Silva[1], Anderson Assunção Andrade[1] , Rodrigo César Rosa[1]*

[1] Institute of Biological and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Rua Vigário Carlos, 100, Abadia, Uberaba, MG 38025-350, Brazil.

[2] nstitute of Exact, Natural and Educational Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Avenida Randolfo Borges Júnior, 1400, Uberaba, MG 38064-200, Brazil.

[3] Laboratory of Cell and Molecular Biology, University of Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil; CEFORES, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Rua Vigário Carlos, 100, Abadia, Uberaba, MG 38025-350, Brazil.

[4] Institute of Physics, Federal University of Alagoas (UFAL), Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins, Maceió, AL 57072-900, Brazil.

[5] Laboratory of New Nanostructured and Functional Materials, Institute of Physics, Federal University of Uberlândia (UFU), Santa Mônica Campus, Block A, Room 217, Av. João Naves de Ávila, 2121, Santa Mônica, Uberlândia, MG, Brazil.

[†]*These authors contributed equally to this work.*

*Corresponding author: Rodrigo César Rosa (rodrigo.rosa@uftm.edu.br)

# ANEXO A - Parecer Aprovação do Comitê de Ética

Uniube Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA–004/2021 Uberaba, 12 de julho de 2021.

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo n° 004/2021 relativos ao projeto intitulado **"Osteointegração e dinâmica da resposta imune de diferentes concentrações de íons prata e dióxido de titânio no sistema vítreo SNCP luminescente (2Eu) no reparo de lesão experimental de furca em molar e defeito ósseo na calvária de ratas"** que tem como responsável a **Profª. Sanívia Aparecida de Lima Pereira,** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei n° 11.794/08.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the protocol n° 004/2021 related to the project entitled **"Osteointegration and dynamics of the immune response of different concentrations of silver ions and titanium dioxide in the luminescent vitreous system SNCP (2eu) in the repair of experimental molar furcal lesion and bone defect in rat calvaria"** under the supervision of **Profª. Sanívia Aparecida de Lima Pereira,** is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law n° 11.794/08.

Atenciosamente,

**Profa. Joely Ferreira Figueiredo Bittar**
Coordenadora do CEEA-UNIUBE