

POLLYANNA DANIELLA CANDELORIO

**AVALIAÇÃO DE COMPÓSITOS DE POLIURETANA DE MAMONA E  
VIDROS BIOATIVOS DOPADOS, COM E SEM PRATA, COMO  
MATERIAL PROTÉTICO.**

CAMPO GRANDE  
2011

POLLYANNA DANIELLA CANDELORIO

**AVALIAÇÃO DE COMPÓSITOS DE POLIURETANA DE MAMONA E  
VIDROS BIOATIVOS DOPADOS, COM E SEM PRATA, COMO  
MATERIAL PROTÉTICO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de doutor.  
Orientador: Prof. Dr. José Renato J. Delben

CAMPO GRANDE  
2011

## FOLHA DE APROVAÇÃO

POLLYANNA DANIELLA CANDELORIO

### **AVALIAÇÃO DE COMPÓSITOS DE POLIURETANA DE MAMONA E VIDROS BIOATIVOS DOPADOS, COM E SEM PRATA, COMO MATERIAL PROTÉTICO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de doutor.

Resultado -----

Campo Grande (MS), \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

#### BANCA EXAMINADORA

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Este trabalho é dedicado à minha amada família.*

## AGRADECIMENTOS

- A **Deus**, pela vida, pela paz e pela saúde que Ele tem me dado a cada dia. Sua bondade para comigo é sem medida e seu amor é infinito. Sou muito grata pelos sonhos e planos que Ele tem pra mim, que são muito maiores do que os meus...
- Ao **Prof. Dr. José Renato J. Delben**, minha eterna gratidão pela orientação que resultou em meu crescimento na carreira acadêmica e pela amizade construída na convivência dentro e fora da universidade.
- Ao **Programa de pós-graduação “Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste”** na pessoa do seu Diretor **Prof. Dr. Ricardo Aydos** por esta oportunidade de crescer e aprender.
- À **Profª. Drª. Ângela A.S.T. Delben** por compartilhar todo o conhecimento contribuindo para a realização deste trabalho.
- À **Profª. Drª. Iandara S. Silva** que trabalhou comigo em toda a parte experimental deste trabalho, não medindo esforços para realizar as cirurgias nos ratos, bem como dando todo suporte teórico na área biológica.
- Ao **Prof. Dr. Odair Pimentel** que foi muito parceiro no laboratório, permitindo uma troca de conhecimentos muito importante para o desenvolvimento deste trabalho.
- À **Seila Rojas** por todo conhecimento compartilhado sobre polímeros.
- À **Profª. Drª. Iraceles Aparecida Laura**, que dedicou parte do seu tempo para a observação e obtenção das imagens do microscópio óptico.
- Ao **Prof. Dr. Albert Schiavetto de Souza** por todo suporte estatístico prestado.
- À acadêmica de enfermagem **Karina Burin** por todo apoio e acompanhamento das cirurgias de ratos e obtenção dos corpos de prova.
- Aos colegas **Julio Ferencz, Elias e Luis Felipe** por todo auxílio prestado na obtenção de imagens de MEV e DRX.
- Ao Técnico de laboratório **Evaldo** por estar sempre à disposição nas análises térmicas dos materiais.
- Ao **Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul** por toda a disposição e apoio durante a parte experimental.

- Aos colegas de trabalho **Hildney Oliveira, Alessandro, Davi, Márcia, Érika, Cristiane e Ana Lúcia, Juvenal** e outros pela amizade, apoio, compreensão, conselhos e por abrir as portas quando mais precisei.

*“A maior necessidade do mundo é a de homens - homens que não se compram nem se vendam; homens que no íntimo da alma sejam verdadeiros e honestos; homens que não tenham chamar o erro pelo seu nome; homens, cuja consciência seja tão fiel ao dever como a bússola o é ao polo; homens que permaneçam firmes pelo que é reto, ainda que os céus desabem”.*

*Ellen G. White*

## RESUMO

**Candelorio, PD. Avaliação de compósitos de poliuretana de mamona e vidros bioativos dopados com e sem prata, como material protético.** Campo Grande; 2011. [Tese-Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O desenvolvimento de novos biomateriais é uma área multidisciplinar e tem como foco principal a melhoria da qualidade de vida das pessoas. O polímero de mamona é biocompatível e já é utilizado como substituto ósseo. Porém, a sua composição pode ser melhorada utilizando cargas de reforço como os vidros bioativos visando uma neoformação óssea mais rápida e de qualidade. Neste trabalho, um estudo amplo do biocompósito poliuretana de mamona (PU) e vidro bioativo (VB) de composição 60%Si – 36%CaO - 4%P<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (% em mol) foi realizado. Utilizou-se tanto VB puro como dopado com várias concentrações de prata (VB<sub>Ag</sub>). As partículas de VB e VB<sub>Ag</sub> foram preparadas pelo método Sol-Gel. Este estudo se mostrou bastante complexo, uma vez que se caracterizaram primeiramente as propriedades físico-químicas dos vidros bioativos, em seguida as propriedades físico-químicas de seus compósitos com PU e, finalmente, as propriedades biológicas dos compósitos *in vivo* em fêmures de ratos e *in vitro* utilizando Líquido Corporal Simulado (SBF) objetivando correlacionar as propriedades dos elementos do compósito com as propriedades sinérgicas do compósito. As caracterizações foram realizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análises térmicas (Caloria exploratória diferencial, DSC e Análise termogravimétrica, TGA), Difratometria de Raios-X (DRX) e Espectroscopia Vibracional de Absorção no Infravermelho (FT-IR). Os compósitos com VB<sub>Ag</sub> apresentaram maior bioatividade em SBF, porém os compósitos com VB mostraram melhor adesão ao osso, osteocondução e velocidade de neoformação óssea *in vivo*.

Palavras-chave: Poliuretana de mamona, vidros bioativos, osteocondução, bioatividade

## ABSTRACT

**Candelorio, PD. Evaluation of castor oil polyurethane composites and bioactive glass doped with and without silver, as prosthetic material.** Campo Grande, 2011. [Thesis, Federal University of Mato Grosso do Sul].

The development of new biomaterials is a multidisciplinary area and has mainly focused on improving the quality of life. The castor bean polymer is biocompatible and it has already been used as bone substitute. However, its composition can be improved by using reinforcing fillers such as bioactive glass, seeking a faster and better osteogenesis (bone formation). In this work, a comprehensive study of the castor bean polyurethane biocomposite (PU), and bioactive glass (BG) of composition 60% Si – 36% CaO – 4% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (mol %) was performed. Both pure VB and VB doped with various concentrations of silver (VB<sub>Ag</sub>) were used. The Sol-Gel method was applied to prepare the VB and VB<sub>Ag</sub> particles. This study proved to be quite complex, since it firstly characterized the physicochemical properties of the bioactive glass, secondly the physical-chemical properties of its PU composites, and finally the biological properties of the composites *in vivo* and in femurs of rats *in vitro* using Simulated Body Fluid (SBF) in order to correlate the properties of the elements of the composite with its synergistic properties. The analyses were performed by Scanning Electron Microscopy (SEM), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetric analysis (TGA), X-ray diffractometry (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The composites with VB<sub>Ag</sub> had higher bioactivity in SBF, but the composites of VB showed better adhesion to the bone, osteoconductivity and speed of bone formation *in vivo*.

Keywords: Polyurethane castor, bioactive glass, osteoconductivity, bioactivity

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Descrição dos tipos de biomateriais mais utilizados.....	16
Figura 2 - Biomateriais e sua classificação como biotolerados, bioinertes e bioativos.....	17
Figura 3 - Figura didática para a compreensão da osteogênese de contato osso-implante. ....	17
Figura 4 - Exemplos de Biocerâmicas e interações com tecidos.....	20
Figura 5 - Representação bidimensional: (a) Estrutura da sílica vítrea mostrando a ausência de simetria e periodicidade (b) Estrutura da sílica cristalina. ....	21
Figura 6 - Mudança no volume durante o resfriamento de um líquido.....	22
Figura 7 - Influência da Taxa de resfriamento na temperatura de transição vítrea.....	23
Figura 8 – Vidro com sódio adicionado como elemento modificador. ....	23
Figura 9 – Óxidos clássicos formadores, modificadores de rede e intermediários. ....	24
Figura 10 - Esquematização de neoformação óssea. ....	25
Figura 11 - Diagrama de composição vítrea para ligação óssea.....	26
Figura 12 - Unidade básica de um bloco copolímero de uretano.....	30
Figura 13 - Representação esquemática de ligações cruzadas. Quanto mais ligações cruzadas menos flexível será o polímero.....	31
Figura 14 - Composição química do óleo de mamona. ....	35
Figura 15 a) Ácidos graxos presentes no corpo humano. b) Fórmula estrutural do ácido ricinoleico, componente de maior quantidade no óleo de mamona.....	36
Figura 16 – Fórmulas estruturais de MDI's puros e poliméricos.....	37
Figura 17 - Figura ilustrativa demonstrando a grande diferença que encontramos nos diversos biomateriais. Alguns apresentam arquitetura pobre (lado direito da imagem) o que não permite a sustentação da nova matriz formada, ocasionando uma perda de volume. ....	38
Figura 18 - Organograma representativo da distribuição dos grupos e períodos de observação. ....	47
Figura 19 - Defeito ósseo feito no fêmur do rato. ....	48
Figura 20 - Curvas Tg de VB com diferentes quantidades de Ag; as amostras foram tratadas anteriormente em 600°C/4h.....	52
Figura 21 - FT-IR de VB para as amostras secas em 130°C e 600°C.....	54
Figura 22 - Posição do pico de absorção no Infravermelho com quantidade de prata em VB.	55
Figura 23 - DRX padrão de VB com diferentes quantidades de Ag. ( $\Delta$ ) SiO <sub>2</sub> , ( $\square$ ) Prata, (*) HA. ....	56

Figura 24 - VB com tratamento térmico 600°C e com (a) 0%, (b) 1%, (c) 3% e (d) 5% de Ag .....	57
Figura 25 - DRX obtidas dos compósitos: (a) PU/VB e (b) PU/VBAG. ....	58
Figura 26 - Curvas DSC para compósitos PU/VB (a) mostrando a temperatura $T_I$ e (b) mostrando as temperaturas $T_{g1}$ , $T_2$ e $T_{g2}$ , obtidas a 10 °C/min. ....	60
Figura 27 - Curvas DSC para compósitos PU/VBAG, (a) mostrando $T_I$ , e (b) mostrando as temperaturas $T_{g1}$ , $T_2$ e $T_{g2}$ , obtidas a uma taxa de 10 °C/min. ....	60
Figura 28 - Espectros FT-IR de polímero puro, PU (a) carbonila, (b) grupos isocianatos (c) Estiramento assimétricos (d) Estiramento simétricos de ligações de carbonila -C-H.....	62
Figura 29 - Espectros FT-IR mostrando a absorção correspondente às ligações C-H com grupos carbonilas em compósitos PU/VB e PU/VBAG. ....	63
Figura 30 - Mudança no comprimento de onda ( $n$ ) da vibração de grupos isocianatos como função da concentração de carga (filler). As linhas pontilhadas são unicamente um guia para os olhos. ....	64
Figura 31 - Micrografias MEV de PU/VB (coluna esquerda) e PU/VBAG (coluna direita). Amostras na primeira linha tem 5% de vidro bioativo e 20% na segunda linha. ....	64
Figura 32 - Micrografias MEV de polímeros com 20% VB (esquerda) e 20% VBAG (direita). Zero dias em SBF na primeira linha, 10 dias na segunda linha e 20 dias na terceira linha. .....	66
Figura 33 – Difratoogramas de raios-X dos compósitos para vários períodos de exposição em SBF.a) Compósito com VB b) compósito com VBAG onde HA = Hidroxiapatita, HCA = Hidroxiapatita Carbonatada e Ag = Prata.....	67
Figura 34 – Cortes histológicos dos grupos A (polímero com 20%VBA) e C (polímero com 50% VBA) com tempos de observação 15, 21 e 30 dias.....	69
Figura 35 - Cortes histológicos dos grupos B (polímero com 20%VBAG) tempos de observação 21 e 30 dias .....	70
Figura 36 - Cortes histológicos dos grupos D (polímero com 50%VBAG) tempos de observação 15 e 30 dias.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais grupos funcionais e seus respectivos modos de vibrações, detectadas no FT-IR de VB com e sem tratamento térmico e com várias concentrações de Ag.	<u>53</u>
Tabela 2 - Temperaturas características de PU contendo diferentes concentrações de VB e VBAg.	<u>62</u>
Tabela 3 - Resultados referentes à proliferação de osteoblastos, de acordo com o tempo e o grupo experimental avaliado.	<u>72</u>
Tabela 4 - Resultados referentes à trabécula óssea neoformada, de acordo com o tempo e o grupo experimental avaliado.	<u>73</u>
Tabela 5 - Resultados referentes à degradação do material, de acordo com o tempo e o grupo experimental avaliado.	<u>74</u>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>Ag</b>	Prata
<b>BMPs</b>	Proteínas ósseas morfogenéticas
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no uso de Animais
<b>COR</b>	Composto Ósseo de Ricinus
<b>DRX</b>	Difratometria de raios-X
<b>DSC</b>	Calorimetria Exploratória Diferencial
<b>FT-IR</b>	Espectroscopia Vibracional por Transformada de Fourier
<b>HA</b>	Hidroxiapatita
<b>HAC</b>	Hidroxiapatita Carbonatada
<b>HDI</b>	Hexametileno diisocianato
<b>IPDI</b>	Isofurona diisocianato
<b>MDI</b>	Difenil metano diisocianato
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>NBO</b>	Non-bridging oxygen (Oxigênio não-ligado)
<b>PA</b>	Polímeros de amido
<b>PHA</b>	Polihidroxialcanoato
<b>PLA</b>	Polilactato
<b>PU</b>	Polímero de mamona
<b>PU/VB</b>	Compósito de polímero de mamona com vidro bioativo
<b>PU/VBg</b>	Compósito de polímero de mamona com vidro bioativo dopado com prata
<b>PVC</b>	Cloreto de polivinila
<b>RPM</b>	Rotações Por Minuto
<b>SBF</b>	Simulated Body Fluid
<b>TDI</b>	Diisocianato
<b>TEP</b>	Tetraetilfosfato
<b>T<sub>g</sub></b>	Temperatura de transição vítrea
<b>TGA</b>	Análise Termogravimétrica
<b>T<sub>gHP</sub></b>	Temperatura de transição vítrea da fase rígida dos polímeros
<b>T<sub>gHS</sub></b>	Transição da fase vítrea de segmentos rígidos na fase mista de polímero
<b>VB</b>	Vidro Bioativo
<b>VBAg</b>	Vidro Bioativo dopado com prata

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>15</b>
2.1 Biomateriais	15
2.1.1 Cerâmicas e Biocerâmicas	18
2.1.2 Vidros	20
2.1.3 Vidros Bioativos	24
2.1.4 Polímeros	29
2.1.4.5- Morfologia básica dos elastômeros de poliuretano	30
2.1.4.6 Graus de Cristalinidade dos Polímeros e Degradação	31
2.1.4.7 Compósitos e nanocompósitos: efeito das cargas minerais, agentes de reforço.	32
2.1.4 Poliuiretanos de mamona	34
2.3 Interações dos Biomateriais com os tecidos vivos	37
3.1 Geral	41
3.2 Específicos	41
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>42</b>
4.1 Síntese dos Vidros Bioativos pelo método Sol-Gel e caracterização	42
4.2 Preparação dos Compósitos Polímero/VB	43
4.3 Caracterização físico-química dos Compósitos Polímeros/VB	44
4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
4.3.2 Análise Térmica (DSC/TGA)	45
4.3.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	45
4.3.4 Difractometria de Raios-X (DRX).	45
4.4 Estudo <i>in vivo</i> da bioatividade dos compósitos VB-Polímeros	46
4.4.1 Animais de Experimentação	46
4.4.2 Grupos Experimentais	46
4.4.3 Produção dos defeitos ósseos	47
4.4.4 Eutanásia	49
4.4.5 Procedimentos Histológicos	49
4.4.6 Avaliações Microscópicas e Histológicas	49
4.4.7 Análise Estatística	50
4.5 Estudo <i>in vitro</i> da bioatividade dos compósitos VB/Polímeros	51
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
5.1 Estudo e caracterização físico-química dos VB	52

5.2 Estudo e caracterização físico-química dos compósitos VB/PU _____	58
5.3 Microestrutura e Bioatividade em SBF dos compósitos de Polímero/VB _____	64
5.4 Avaliação microscópica dos implantes ósseos <i>in vivo</i> _____	67
5.4.1 Estudo da biodegradabilidade do compósito _____	68
5.4.2 Estudo da osteoindução _____	71
5.4.3 Estudo da Osteocondução _____	72
5.4.4 Estudo da Degradação do compósito PU/VBA e PU/VBAg _____	73
6 CONCLUSÕES _____	75
7 PROPOSIÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS _____	77
REFERÊNCIAS _____	79
ANEXO I _____	94
PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÉ DE ÉTICA DOS ANIMAIS _____	94
ANEXO II –Tabela com scores _____	95
ANEXO III _____	96
Protocolo para preparação de Simulated Body Fluid (SBF). _____	96

## 1. INTRODUÇÃO

A cada dia, mais e mais, o homem busca obter maior longevidade e qualidade de vida associada à perfeita funcionalidade de seus órgãos e membros, surgindo, então, a necessidade de encontrar alternativas de se reparar tecidos vivos lesionados por traumas e patologias ou substituí-los por próteses artificiais. Uma dessas alternativas é a inserção de materiais sintéticos no corpo que chamamos de biomateriais. Alternativas seriam *autoenxertos*, *xenoenxertos* e *aloenxertos*. Os *autoenxertos* ou *enxertos autógenos* apresentam vantagens biológicas, mas possuem uma série de inconvenientes como um maior período de convalescença, morbidade e susceptibilidade a infecções no sítio doador. Os *xenoenxertos* ou *enxertos xenógenos* são obtidos de outra espécie animal, tal como osso bovino, por isso apresentam diferenças antigênicas bastante pronunciadas, implicando num tratamento mais acurado do enxerto para evitar uma rejeição. Os *aloenxertos*, obtidos de banco de ossos humanos, apresentam risco de contaminação, necessidade de armazenamento especial e controle rígido de infecção (COCHRAN *et al.*, 2001).

Os primeiros pesquisadores procuravam essencialmente propor a utilização de biomateriais para reparo mecânico de lesões teciduais, providenciando suportes não-tóxicos, inertes e bem tolerados, como, por exemplo, a implantação das próteses ortopédicas (BOROJEVIC, 2005). A extensão desse modelo de terapia passou a envolver materiais que estimulam a integração do implante com os tecidos adjacentes, provocando a mobilização e ativação celular, bem como a subsequente produção da matriz extracelular intimamente associada com o material implantado. Os materiais osteocondutores e osteoindutores permitiram, assim, a integração do implante com o novo tecido ósseo gerado em volta ou no interior dos implantes porosos. A experiência de várias décadas de implantes ortopédicos, cardiológicos ou vasculares aponta para a principal dificuldade no desenvolvimento destes procedimentos. Os tecidos vivos renovam continuamente as matrizes estruturais e respondem às demandas específicas, adaptando-se às novas condições com a produção de matrizes reestruturadas e modificadas (remodelação tecidual). Os biomateriais implantados não-degradáveis (titânio, ouro, cerâmicas) e as suas interfaces com o tecido vivo não acompanham estas modificações e sofrem o desgaste que

geralmente requer uma cirurgia complementar ou corretiva. Nessa perspectiva, os biomateriais biodegradáveis procuram responder a este desafio.

A vasta necessidade de biomateriais com morfologia, formas e propriedades específicas para cada aplicação torna a pesquisa nesta área do conhecimento um trabalho interdisciplinar. O sucesso das aplicações destes biomateriais depende de alguns fatores tais como: rotas de síntese, qualidade, esterilidade clínica, processamento em formas variadas e resposta do tecido hospedeiro.

O poliuretano derivado do óleo da mamona é utilizado como biomaterial, apresentando uma fórmula com aspectos favoráveis de processabilidade, flexibilidade de formulação, ausência de emissão de vapores tóxicos e baixo custo (DIAS, 2009). Associados aos vidros bioativos, os polímeros podem apresentar, além de sua osteocondução, uma osteoindução, auxiliando na neoformação mais rápida.

Neste trabalho, propõe-se estudar as propriedades físico-químicas e biológicas do composto formado por polímero de mamona e vidros bioativos puros e dopados com prata, objetivando encontrar um biomaterial que, além de servir como um arcabouço macroporoso que abrigue células osteoprogenitoras e apresente uma ligação química forte osso-implante, tenha, também, características bactericidas, garantindo o prognóstico favorável do enxerto e biodegradabilidade suficiente para que seja substituído pelo tecido ósseo neoformado, não necessitando de procedimento operatório posterior para sua retirada.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Biomateriais**

Biomateriais podem ser materiais naturais ou artificiais, que compõem parte ou toda uma estrutura viva ou equipamento médico que realiza, aumenta ou substitui a função natural por período temporário ou definitivo (HELMUS & TWEDEN, 1995). Outra definição muito aceita para biomaterial é que são substâncias ou combinação destas que não sejam fármacos, de origem natural ou sintética, que podem ser usadas por qualquer que seja o período de tempo, aumentando ou substituindo, parcial ou totalmente, qualquer tecido, órgão ou função do corpo, com a finalidade de manter e ou alterar a qualidade de vida do paciente (WILLIAMS, 1999).

Os biomateriais podem ser polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e macromoléculas naturais (ex.: biopolímeros) que são manufaturados ou processados para se adequarem à utilização em dispositivos médicos que entram em contato íntimo com proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos. A Figura 1 mostra a descrição de diversos biomateriais utilizados no corpo humano.

<i>Biomaterial</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>	<i>Aplicações</i>
<b>Polímeros:</b> Polietileno PTFE Poliéster Poliuretano PMMA Silicone	Elasticidade, fácil fabricação, baixa densidade	Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo	Suturas, artérias, veias; maxilofacial (nariz, orelhas, maxilar, mandíbula, dente); cimento, tendão artificial; oftalmologia
<b>Metais e ligas:</b> Aço inoxidável Liga de Titânio Liga de cobalto-cromo	Alta força de tensão, alta resistência ao desgaste, energia de deformação alta	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda das propriedades mecânicas com tecidos conectivos moles, alta densidade	Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios, hastes); implantes dentários.
<b>Cerâmicas e vidros:</b> Alumina Zircônio Carbono Fosfato de cálcio Porcelana Vidros Bioativos	Boa compatibilidade, resistência à corrosão, inércia, alta resistência à compressão	Baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade, alta densidade	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traquéias artificiais.
<b>Compósitos:</b> Fibra de Carbono Resina termofixa Fibra de carbono-termoplástico Carbono-carbono Fosfato de cálcio-colágeno	Boa compatibilidade, inércia, resistência à corrosão, alta força de tensão	Material de fabricação incompatível	Válvula cardíaca artificial (carbono ou grafite pirolítico), implantes de juntas de joelho (fibra de carbono reforçada com polietileno de alta densidade).

**Figura 1** – Descrição dos tipos de biomateriais mais utilizados.

Como podemos ver na Figura 1, existem muitos tipos de biomateriais para cada tipo de aplicação na área de saúde. Ressaltaremos com mais detalhe a utilização desses materiais na área de odontologia segundo sua natureza físico-química.

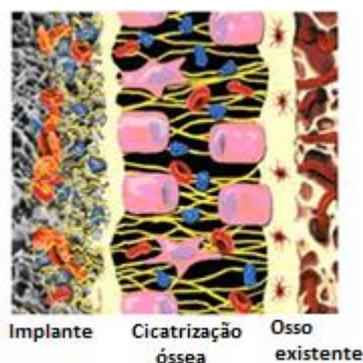
Os materiais utilizados na confecção dos implantes dentais podem ser classificados sob os pontos de vista químicos e biodinâmicos (SYKARAS *et al.*, 2000). Do ponto de vista químico, os materiais podem ser divididos em metais, cerâmicas e polímeros. Do ponto de vista biodinâmico, podemos agrupá-los em biotolerados, bioinertes e bioativos (Figura 2).

<i>Atividade Biodinâmica</i>	<i>Composição Química</i>		
	<i>Metais</i>	<i>Cerâmicas</i>	<i>Polímeros</i>
<i>Biotolerados</i>	Ouro CrCoMo Aço inoxidável		Polietileno Poliamida Polimetilmetacrilato Politetrafluoetileno Poliuretano
<i>Bioinertes</i>	Nióbio Titânio Tântalo	Óxido de alumínio	
<i>Bioativos</i>		Hidroxiapatita Fosfatos de cálcio Fluorapatita Biovidro	Poliuretana de mamona

**Figura 2** - Biomateriais e sua classificação como biotolerados, bioinertes e bioativos.

Materiais biotolerados são aqueles que, quando implantados, não são necessariamente rejeitados pelos tecidos vivos, mas são encapsulados por tecido conjuntivo fibroso.

Materiais bioinertes permitem a aposição óssea sobre suas superfícies, favorecendo a osteogênese de contato que é a migração direta das células formadoras de osso através da matriz do coágulo para superfície do implante. O osso é rapidamente formado sobre a superfície do implante. Quanto mais forte a conexão coágulo-implante maior será o grau da osteogênese de contato como mostra a Figura 3.



**Figura 3** - Figura didática para a compreensão da osteogênese de contato osso-implante. (DAVIES, 1998)

Os materiais bioativos com finalidade ortopédica ou odontológica, além de permitirem a formação óssea sobre a sua superfície, promovem uma interdifusão de íons, formando uma união química ao longo da interface com o tecido vivo. Os materiais bioinertes e bioativos são também chamados de osteocondutores, o que significa que podem atuar como arcabouços permitindo a atividade osteoblástica durante a formação gradual do novo osso (STRNAD *et al.*, 2000; SYKARAS *et al.*, 2000).

O Brasil apresenta um número enorme de pessoas edêntulas. Estas pessoas sofrem o processo de pneumatização de seio maxilar, podendo atingir grandes volumes (BERGH *et al.*, 2000). A reabilitação é necessária nestes indivíduos, entretanto técnicas reabilitacionais de elevação de seio maxilar podem permitir a colocação de implantes (BOYNE, 1980; TATUM, 1986)

Em odontologia, há a necessidade de obter-se biomateriais capazes de permanecer em contato com diferentes tecidos na cavidade bucal, durante certo período de tempo. A reabilitação dentária realizada por meio de implantes osseointegrados possui características especiais, pois na cavidade oral há presença de fluidos orais. Quando o material é inserido, passa pela mucosa e é fixado no tecido ósseo subjacente. A dissipação das forças oclusais no conector protético, tecido mole e osso inclui o aspecto funcional, porém com acentuada complexidade das condições ambientais químicas e mecânicas. (MISCH, 2000). Por isso, tais biomateriais devem apresentar certos requisitos, tais como: biocompatibilidade, biofuncionalidade, bioadesão e outras propriedades mecânicas semelhantes as do osso: módulo de elasticidade, resistência à tração e à fadiga, processabilidade, resistência à corrosão e coeficiente de dilatação térmica.

### 2.1.1 Cerâmicas e Biocerâmicas

O primeiro relato de tentativa de se usar uma cerâmica como Biomaterial foi feito por Dreesman em 1894 (CANO *et al.*, 1999) que sugeriu a utilização do gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ ) para substituir ossos. Devido á baixa resistência mecânica desse material e sua degradação no organismo, o gesso não foi uma boa opção para ser utilizado em implantes.

Por volta da década de 70, alguns tipos de materiais cerâmicos foram mais utilizados e devido às suas propriedades foram classificadas como biocerâmicas. A

primeira biocerâmica muito utilizada foi a alumina densa ( $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ), que possui alta resistência mecânica, definida como bioinerte, biocompatível (HULBERT & COOKE, 1970). É utilizada até hoje em próteses ortopédicas, próteses para a substituição da cabeça do fêmur e a substituição de dentes por dentes artificiais implantáveis (ANUNMANA *et al.*, 2010; HENCH, 1998).

Atualmente, utilizam-se, além da alumina densa, outras cerâmicas como a zircônia ( $\text{ZrO}_2$ ), o dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), os fosfatos de cálcio e as vitrocerâmicas de sílica/fosfato de cálcio (HENCH, 1998). O uso das biocerâmicas tem se estendido desde o emprego isolado do material até outras formas de utilização, como, por exemplo, no revestimento de próteses metálicas, ou na associação com materiais poliméricos, tais como o colágeno. A combinação de hidroxiapatita (HÁ) com colágeno vem sendo sugerida, haja vista que o colágeno constitui-se em agente de união biocompatível e reabsorvível, responsável pela prevenção da migração das partículas cerâmicas até a incorporação pelos tecidos, além de ser um bom suporte para crescimento celular (ROVIRA, 1993; HEMMERLE, 1995).

Devido à diversidade de materiais cerâmicos usados como biomateriais e suas diferentes interações com tecidos vivos, são classificados como biocerâmicas bioinertes e bioativas (HULBERT *et al.*, 1970; ROVIRA *et al.*, 1993). O termo bioinerte não é apropriado porque, de acordo com a Conferência da Sociedade Europeia para Biomateriais realizada na Inglaterra em 1986 (HELMUS & TWEDEN, 1995), todo material induz algum tipo de resposta do tecido hospedeiro, mesmo que mínima. No entanto, o termo ainda é comumente utilizado, tendo sido definido por June Wilson (1997) como sendo um material que apresenta uma resposta interfacial mínima que não resulta na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro, formando uma cápsula fibrosa ao redor do material. Como exemplos de biocerâmicas bioinertes pode-se citar a alumina ( $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ), zircônia ( $\text{ZrO}_2$ ) e dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) (AINA *et al.*, 2007; MONEM *et al.*, 2008). Por outro lado, uma biocerâmica bioativa é definida como aquela que induz uma atividade biológica específica (HULBERT & COOKE, 1970). Como exemplos destas últimas, destacam-se a hidroxiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ], o fosfato tricálcico [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] e os biovidros.

Outra classificação corrente é a estabelecida por Larry Hench (2006), na qual as cerâmicas são agrupadas em 4 classes, de acordo com a resposta desenvolvida na interface tecido vivo/implante, conforme apresentado na Figura 4.

---

<i>Tipo de Biocerâmica</i>	<i>Interações com os tecidos</i>	<i>Exemplos</i>
Inertes	Não há interações químicas nem biológicas	Alumina
Porosas	Ocorre o crescimento interno dos tecidos através dos poros	Aluminatos e hidroxiapatita porosos
Bioativas	Ocorre uma forte ligação na interface osso-implante	Biovidros, hidroxiapatita e vitrocerâmicas
Reabsorvíveis	As cerâmicas são degradadas e substituídas pelos tecidos	Gesso e fosfato tricálcio

**Figura 4** - Exemplos de Biocerâmicas e interações com tecidos. (HENCH, 2006)

Uma das desvantagens apresentadas pelas biocerâmicas é que, como toda a cerâmica, possui baixa tenacidade que restringe seu uso às regiões que não requeiram sustentação. Uma forma de contornar tal restrição é a utilização de metais revestidos com cerâmicas por técnicas como o Plasma Spray, que permitem aliar as vantagens intrínsecas das biocerâmicas com a resistência do metal.

O aumento de porosidade nas cerâmicas pode diminuir sua resistência mecânica, porém favorece o crescimento de tecido através desses poros ocorrendo um forte entrelaçamento do tecido com o implante, e, como consequência disso, aumenta-se a resistência do material in vivo (HENCH, 1991).

A grande questão a ser resolvida ainda hoje é desenvolver uma cerâmica altamente bioativa e biocondutora com resistência mecânica adequada. Um caminho sendo testado é dos compósitos que aliam propriedades de vários materiais em um só. Os tipos de materiais mais promissores para isto são os poliméricos e os vítreos devido às suas propriedades físicas e biológicas.

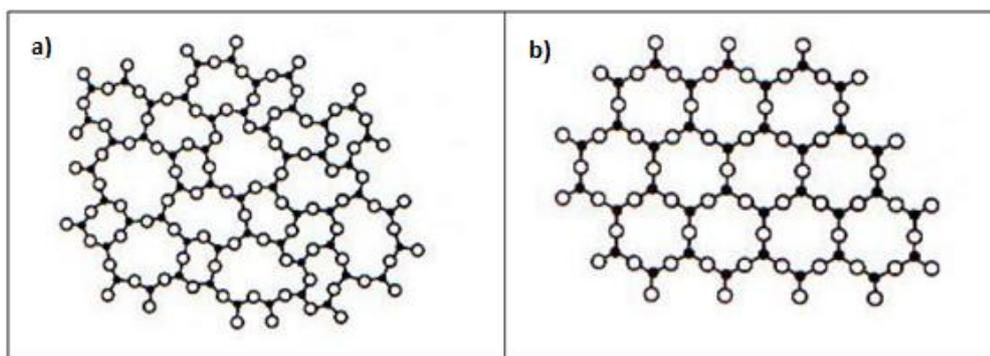
### 2.1.2 Vidros

Na medicina e odontologia, os vidros são utilizados tanto em dispositivos extracorpóreos como também em implantes dentários, aparelhos protéticos, como material de preenchimento para reparação de defeitos ósseos e até mesmo em cirurgia reconstrutiva.

Os vidros foram descobertos por volta de 4000 a.C. Foram encontrados objetos de vidros em túmulos egípcios com aproximadamente 4000 anos de idade, porém este

material pode ser encontrado em seu estado natural desde a formação da terra que se formaram a partir de magmas, rochas vulcânicas que se resfriaram antes de cristalizar. Hoje, o vidro é um material muito comum, presente no cotidiano, nas artes e na tecnologia.

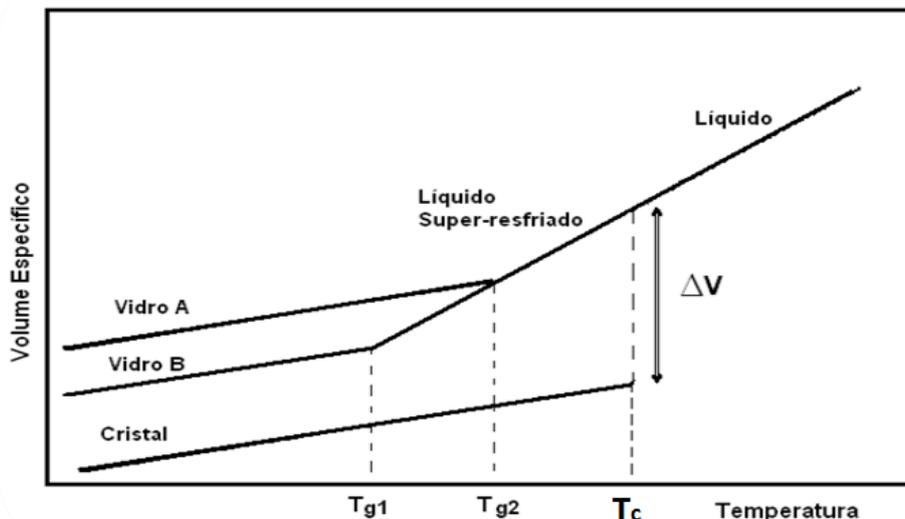
O elemento básico do vidro é a sílica, fornecida pela areia, óxidos fundentes, estabilizantes e substâncias corantes. Possuem um arranjo atômico caracterizado por uma rede tridimensional estendida, a qual apresenta ausência de simetria e periodicidade como mostra a Figura 5a.



**Figura 5** - Representação bidimensional: (a) Estrutura da sílica vítrea mostrando a ausência de simetria e periodicidade (b) Estrutura da sílica cristalina. (SCHOLZE, 1991)

Os vidros podem ser obtidos a partir do método de fusão-resfriamento. Basta aquecer uma mistura constituída pelos elementos que formarão o vidro, até a fusão de todos os elementos e, em seguida, submete-se a massa fundida a um processo de resfriamento rápido, conhecido como *melt-quenching*. O material, no processo de resfriamento, pode passar por dois processos distintos: a transição vítrea e a cristalização (ARAUJO, 1997).

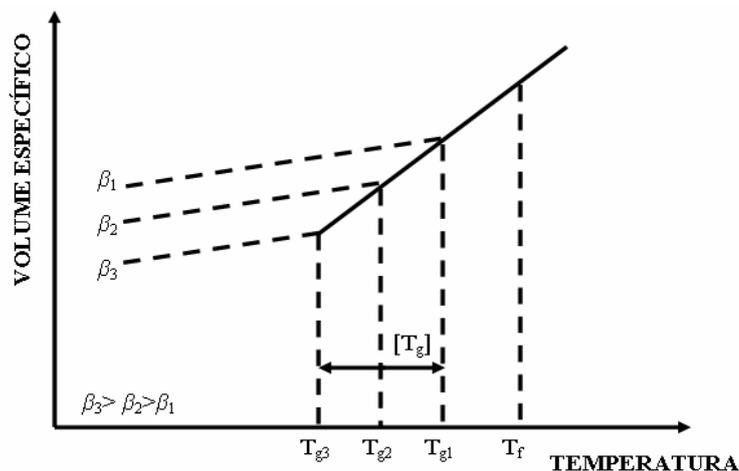
Haverá uma diminuição descontínua do volume se, no processo de resfriamento, a taxa for muito lenta, fazendo com que o material sofra contração sem ocorrer variação da temperatura. Isso ocorre devido à perda de calor latente. A perda de calor é compensada pela diminuição do volume específico. Como ilustra a Figura 6, essa diminuição é devida ao rearranjo atômico, e, conseqüentemente, a diminuição da entropia, ocorrendo cristalização do fundido.



**Figura 6** - Mudança no volume durante o resfriamento de um líquido (ALVES, 2001)

Se a taxa de diminuição da temperatura for muito grande, tal que não permita o rearranjo atômico, haverá uma diminuição contínua do volume do material, que passará do estado líquido para um estado metaestável com grande viscosidade, conhecido como líquido super-resfriado. Haverá um ponto em que a viscosidade será tão grande que a mobilidade atômica será muito pequena, neste ponto, o material adquire o comportamento de um sólido. Esta temperatura na qual ocorre a transição vítrea é conhecida com temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), ou seja, o material deixa de ser um líquido e passa a ser um sólido, mantendo, porém, as características estruturais do líquido. Este sólido produzido por resfriamento rápido é um vidro.

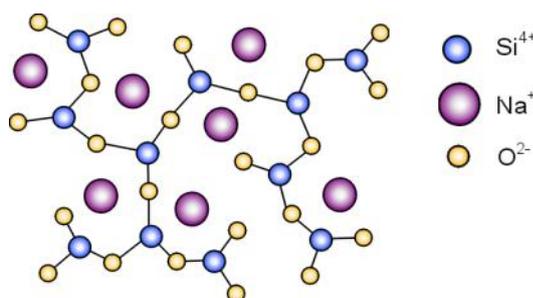
Desse modo, definimos o vidro como sendo um sólido não cristalino que exibe o fenômeno de transição vítrea ( $T_g$ ). Entretanto, a temperatura de transição vítrea não é fixa, ela depende da taxa de resfriamento e do método em que foi obtido como se pode ver na Figura 7.



**Figura 7** - Influência da Taxa de resfriamento na temperatura de transição vítrea (SANCHES, 2007)

Alguns cátions, como o sódio, atuam nos vidros como modificadores de rede, reduzindo a viscosidade dos vidros de sílica fundidos, pois se ligam ionicamente ao oxigênio, interrompendo a continuidade da rede, já que alguns átomos de oxigênio não são mais compartilhados entre dois tetraedros, mas ligados somente a um átomo de silício (Figura 8). O oxigênio que é ligado somente a um átomo de silício na rede vítrea é chamado de oxigênio não-ponteante (AKERMAN, 2000).

Modificadores de rede além de promoverem a estabilização são os responsáveis pela formação de "clusters" na rede tridimensional.



**Figura 8** – Vidro com sódio adicionado como elemento modificador. (AKERMAN, 2000).

Por essa razão, os óxidos alcalinos são utilizados como fundentes que diminuem a viscosidade do vidro, pois quebram algumas ligações.

De uma forma geral, os cátions, cujas ligações com o oxigênio são em torno de 50% iônicas e 50% covalentes, atuam como formadores de rede. Outros cátions, com eletronegatividades muito baixas, cuja ligação com o oxigênio apresenta um caráter

fortemente iônico, atuam como modificadores de rede. E os cátions que, por si só, não formam vidros com facilidade, mas que, misturados aos formadores típicos, podem substituí-los na rede, foram classificados por Stanworth como intermediários (Figura 9) (ALVES, 2001).

FORMADORES	MODIFICADORES	INTERMEDIÁRIOS
SiO <sub>2</sub>	Li <sub>2</sub> O	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
GeO <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> O	PbO
B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> O	ZnO
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	CaO	CdO
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	BaO	TiO <sub>2</sub>
As <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		
V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		

**Figura 9** – Óxidos clássicos formadores, modificadores de rede e intermediários. (ARAÚJO, 1997)

Os vidros também podem ser feitos utilizando-se o método sol-gel que é o processo utilizado neste trabalho. Uma das vantagens deste método deve-se à homogeneidade química em escala molecular que pode ser obtida na preparação dos vidros. O uso de agentes complexantes de íons metálicos permite aumentar a homogeneidade de distribuição destes íons na rede formada pela sílica. Este processo, além de apresentar um custo reduzido em relação aos processos convencionais, abriu inúmeras possibilidades de se produzir materiais com características específicas que não seriam possíveis utilizando os métodos convencionais.

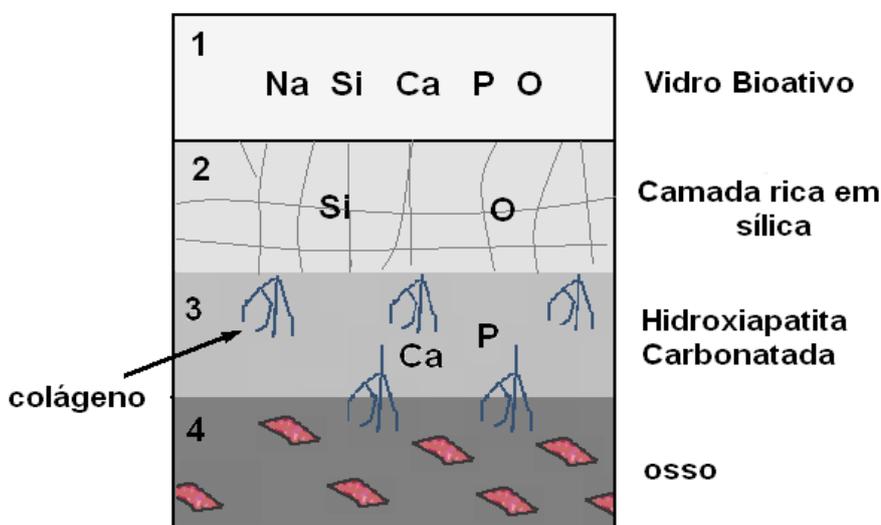
### 2.1.3 Vidros Bioativos

Os vidros bioativos (VB) foram desenvolvidos pelo Prof. Larry L. Hench (1991), que sintetizou vários vidros contendo misturas de sílica, fosfato, óxido de cálcio e sódio. Esses materiais foram desenvolvidos para utilização como implantes e como recobrimento.

Quando imerso em um meio aquoso, a superfície do VB libera íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>. Essas espécies são repostas com íons H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> da solução, através de uma reação de troca iônica que produz uma camada superficial de gel de sílica. Uma camada de apatita amorfa

forma-se no topo da camada de gel de sílica como está esquematizado na Figura 10. Essa hidroxiapatita (HA) amorfa evolui para hidroxiapatita cristalina.

A estrutura da hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  por ser aberta e hospedeira, permite a substituição de todos os seus íons,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{OH}^-$ , mantendo a eletroneutralidade. A substituição desses íons causa alterações notáveis em sua estrutura. A substituição dos íons  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{OH}^-$  pelo íon  $\text{CO}_3^{2-}$  fornece a hidroxiapatita carbonatada, que apresenta um grau de ordem menor e maior solubilidade (Figura 10).



**Figura 10** - Esquematização de neoformação óssea.

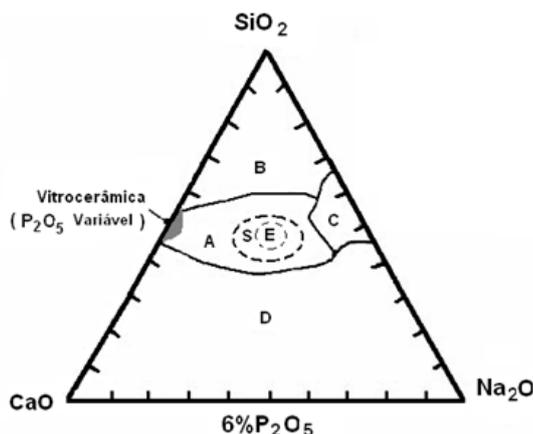
Desde sua descoberta, os VB passaram por muitas mudanças e alterações (HENCH, 2006). Em princípio, era feito por método de fusão de pós com a seguinte composição: 45%  $\text{SiO}_2$ , 24,5%  $\text{CaO}$ , 24,5%  $\text{NaO}_2$  e 6%  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Esta composição foi patenteada com o nome 45S5 bioglass<sup>®</sup>. De acordo com o diagrama da Figura 11, os vidros preparados por fusão com composições relativas à região A são bioativos. Os vidros da região B são inertes e os da região C são biorreabsorvíveis.

A região S abrange vidros com capacidade de se ligar a tecidos moles. Somente composições com taxas de reações muito rápidas formam uma ligação com os tecidos moles. Quando a composição do vidro excede 52% em peso de  $\text{SiO}_2$ , o vidro se ligará ao osso, mas não a tecidos moles (WILSON, 1990).

Os materiais bioativos usados para substituição e reparação de tecidos devem ter uma cinética química controlada de acordo com as mudanças que ocorrem na reparação. Se

a taxa de dissolução é muito rápida, as concentrações iônicas são demasiadamente altas para ser eficaz (região C). Se a taxa é muito baixa (região B), as concentrações são muito baixas para estimular a proliferação e diferenciação celular (HENCH, 2006).

Vidros com níveis altos de bioatividade com rápida formação e ligação ao osso estão na região E da Figura 11, onde todas as composições contêm 6% em peso de  $P_2O_5$  e onde se encontra a composição do Bioglass®.



- A- Região cujas composições se ligam ao tecido ósseo
- B- Região cujas Composições não se ligam ao tecido ósseo (reatividade muito baixa)
- C- Região cujas Composições não se ligam ao tecido ósseo (reatividade muito alta)
- D- Região cujas Composições não se ligam ao tecido ósseo (não forma vidro)
- E- Região de Composição do @Bioglass
- S- Região cujas Composições sem ligam ao tecido mole

**Figura 11** - Diagrama de composição vítrea para ligação óssea. (HENCH, 2006)

Para a formação do VB, reduz-se a concentração de  $SiO_2$ , composto que mantém a estrutura tridimensional do vidro e controla a solubilidade dos outros íons, mantendo a estabilidade do sistema para aumentar a solubilidade do vidro, permitindo a disponibilidade de um maior número de íons ativos na interface do material. A concentração de sódio fica maior para manter um balanço fisiológico destes íons na interface do VB, mantendo um pH local neutro ou levemente alcalino, em torno de 7.4, necessário para promover as várias reações na superfície do material que irão culminar com a formação das camadas bioativas, condutoras da formação óssea. Também é aumentada a concentração de  $CaO$  e introduzido  $P_2O_5$ , por serem importantes para a formação da camada de apatita na superfície do vidro.

Por volta de 1991, com as melhorias técnicas, Rounan Li, Clark e Hench mostraram que o VB poderia ser obtido pelo método sol-gel com a composição 70% $SiO_2$  e 30% $CaO$

(LI *et al.*, 1992). VB obtidos pelo processo convencional são bioativos até a concentração de sílica igual a, aproximadamente, 60% em mol, enquanto que os VB por via sol-gel são bioativos, mesmo a concentrações de sílica iguais a 90% em mol, possibilitando a obtenção de materiais mais resistentes mecanicamente, com potencial uso para arcabouços em implantes ósseos. Isso porque o método sol-gel proporciona um aumento da superfície de reatividade e degradabilidade em relação aos VB obtidos pelo método de fusão (HENCH, 2006).

Os VB fabricados pelo método sol-gel apresentam maior velocidade de formação da HA em estudo com Líquido Corpóreo Simulado, do inglês, Simulated Body Fluid (SBF), apresentando, portanto, maior índice de bioatividade quando comparado aos vidros fundidos com os mesmos constituintes (PEREIRA, 1994). Isso se deve à maior liberação de sílica solúvel, induzindo à nucleação dos cristais de HA nos poros do vidro (GREENSPAN, 1997; RADIN, 1997), a um maior controle das propriedades texturais do material, como a área superficial, o volume dos poros, à distribuição homogênea dos tamanhos dos poros e à modificação da superfície de sílica (DE FARIAS, 2000).

Por muito tempo acreditou-se que para ser bioativo, o material deveria conter fósforo e cálcio. Esses resultados foram interpretados quantitativamente em termos do aumento da supersaturação do fluido circunvizinho com relação à apatita, devido à dissolução do íon cálcio dos vidros. Entretanto, Ohtsuki (1992) e colaboradores mostraram que a composição não bioativa,  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ , apresenta maior grau de supersaturação que o vidro bioativo,  $\text{CaO-SiO}_2$ , e concluíram que o aumento de saturação de cálcio e fósforo pode não ser tão relevante para a deposição da apatita. Mostraram ainda que vidros que não continham cálcio e fósforo também podem ser bioativos, pois a formação de uma camada de sílica hidratada na superfície do vidro é a característica que mais influencia a bioatividade do material.

A sílica é um polímero inorgânico formado por grupos siloxanos (Si-O-Si) em seu interior e de grupos silanóis (Si-OH) em sua superfície. A alta densidade dos grupos silanóis existentes na superfície da sílica amorfa é considerada responsável pelo crescimento da HA e pela formação de osso no Bioglass® e em vitrocerâmicas. Os grupos silanóis presentes em vidros induzem a formação da HA em maior extensão que as superfícies de sílica cristalinas ou tratadas termicamente (LI *et al.*, 1992).

Para melhorar as propriedades mecânicas à resposta biológica, diferentes elementos foram adicionados aos VB's, tais como zinco, titânia, magnésio, zircônia, boro e prata. O

zinco melhorou as propriedades mecânicas e a formação do osso *in vitro* e *in vivo*, pois aumentou a ligação do osso com o vidro, diminuiu a solubilidade em SBF aumentando a osteocondutividade do VB (AINA *et al.*, 2007). A titânia é miscível em matriz vítrea a altas temperaturas e induz a separação de fase quando a temperatura diminui. A titânia induz a formação da cristalização do cálcio-fosfato e aumenta a durabilidade química quando na presença de SBF formando ligações Ti-O-P que são mais fortes do que P-O-P (MONEM, 2008; BALAMURUGAN, 2007). O magnésio também é biocompatível e agiliza o crescimento de osteoblastos *in vitro*, promovendo sua diferenciação (EFFLANDT *et al.*, 2002; BALOSSIER *et al.*, 2007).

Em alguns trabalhos, SiO<sub>2</sub> é substituído por B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nos VB 45S5 (NING *et al.*, 2007; MARION *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2006). Observou-se que a camada de HA se forma mais rapidamente com a presença de boro, pois ajuda no crescimento e diferenciação de células humanas mesenquimais. Os vidros de boro foram totalmente convertidos em HA em menos de 4 dias, enquanto os vidros com boro e sílica se converteram parcialmente após 70 dias e ainda apresentaram resíduos de SiO<sub>2</sub>.

Atualmente, vem se desenvolvendo VB com prata na composição, porque a prata é bacteriostática e bactericida e não causa danos em células humanas, favorecendo o período pós-operatório de um implante (LEPPARANTA *et al.*, 2008; BELLANTONE *et al.*, 2000; CLUPPER *et al.*, 2001). A ação antibacteriana do VB está associada com o alto pH, concentração iônica e pressão osmótica. Devido a essas propriedades biológicas da prata, ela é incorporada em biomateriais, tais como poliuretanos, HA e vidros sem comprometer sua bioatividade.

O principal requisito quanto à morfologia dos materiais porosos é a existência de porosidade aberta (interconectiva) com diâmetros de poros superiores a 100 µm para permitir vascularização adequada (DUBINI, 1967). Essa interconectividade pode ser alcançada com a adição de agentes porogênicos, como aditivos orgânicos ou matrizes porosas. No entanto, há um compromisso entre porosidade e resistência mecânica (LEMOS & FERREIRA, 2000).

Devido às baixas propriedades mecânicas do VB como fragilidade, os vidros são combinados com metais, polímeros ou fibras para produzir um compósito. William (BONFIELD, 2004) teve sucesso clínico na utilização do compósito formado por partículas de HA com matriz de polietileno, para reconstrução da orelha.

Os materiais conhecidos como *biomateriais de terceira geração* são os materiais que, além de serem bioativos, são absorvíveis pelo organismo. Geralmente, são polímeros e têm aplicações em engenharia de tecidos, reconstituição de ossos e em mineralização em dentística.

#### 2.1.4 Polímeros

Polímeros são moléculas gigantes que apresentam unidades que se repetem. A unidade fundamental (molécula) é chamada de monômero e sua repetição  $2x$ ,  $3x$ ...  $nx$  dá origem ao ( $2x$ ) dímero, ( $3x$ ), trímero ( $nx$ ), polímero - mais de 100 unidades. Os polímeros podem ter origem natural como amido, celulose e proteínas, ou de origem artificial como isopor, PVC (cloreto de polivinila), teflon, poliéster, nylon, etc. (MANO, 1999).

Os polímeros podem ser naturais obtidos de plantas e de animais, tais como madeira, borracha, algodão, lã, couro, seda etc., ou sintéticos obtidos em geral de derivados do petróleo.

Os polímeros chamados de biopolímeros têm como matéria-prima principal para sua manufatura uma fonte de carbono renovável, geralmente um carboidrato derivado de vegetais cujos plantios comerciais são realizados em larga escala como cana-de-açúcar, milho, batata, trigo e beterraba; ou um óleo vegetal extraído de soja, girassol, palma, ou outra planta oleaginosa. Os biopolímeros mais conhecidos são o polilactato (PLA), polímeros de amido (PA), polihidroxialcanoato (PHA), goma xantana (XAN).

O PLA é um poliéster produzido por síntese química a partir de ácido láctico obtido por fermentação bacteriana de glicose extraído do milho, com uso potencial na confecção de embalagens, itens de descarte rápido e fibras para vestimentas e forrações.

Os PA são polissacarídeos, modificados quimicamente ou não, produzidos a partir de amido extraído de milho, batata, trigo ou mandioca. Pode ser utilizado na produção de embalagens e itens de descarte rápido e, também, em blendas com polímeros sintéticos na confecção de filmes flexíveis.

Os polímeros do tipo PHA constitui uma ampla família de poliésteres produzidos por bactérias através de biossíntese direta de carboidratos de cana-de-açúcar ou de milho,

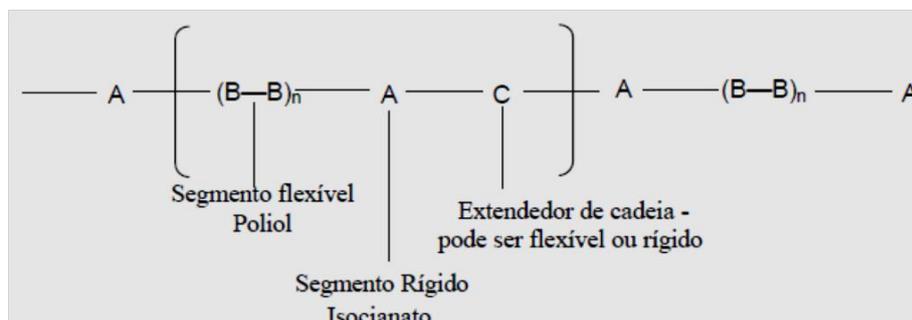
ou de óleos vegetais extraídos principalmente de soja e palma. Dependendo da composição monomérica, o polímero pode ser utilizado na produção de embalagens, itens de descarte rápido e filmes flexíveis. Os PHAs são usados em aplicações médicas e farmacêuticas (fios de sutura cirúrgica, implantes ósseos, fármacos de liberação lenta, etc.). Na agricultura, os PHAs são usados em produtos de liberação de reguladores de crescimento de plantas ou de pesticidas.

O XAN é um exopolissacarídeo produzido por microrganismos a partir de carboidratos extraídos de milho ou cana-de-açúcar, com ampla utilização na área de alimentos e uso potencial na de cosméticos e na exploração de petróleo.

A versatilidade em se obter materiais com propriedades diferentes fez com que os poliuretanos se tornassem um dos principais polímeros deste século. A aplicação que mais recentemente vem sendo estudada por diferentes pesquisadores é a utilização do poliuretano como biomaterial (GEORGE *et al.*, 2002)

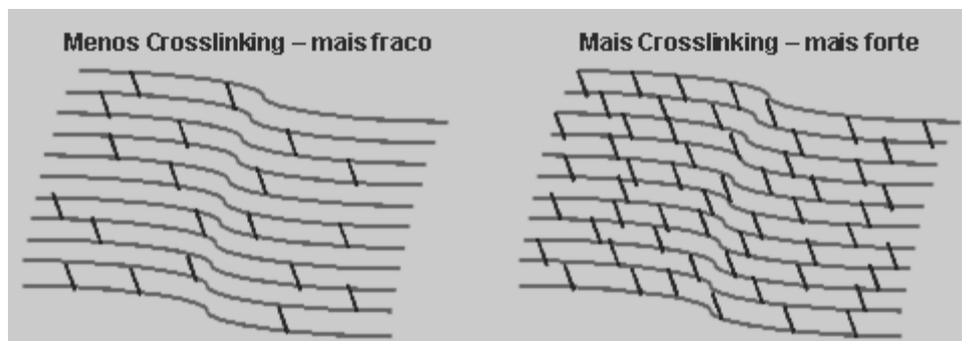
#### 2.1.4.5- Morfologia básica dos elastômeros de poliuretano

Um elastômero de uretano pode ser considerado como um bloco linear de um copolímero do tipo mostrado na Figura 12. Este polímero de estrutura segmentada pode variar suas propriedades em torno de uma larga faixa de dureza e resistência, através da modificação dos seus três componentes básicos: polioliol, diisocianato e extensor de cadeia (agente de cura). Por exemplo, a dureza pode variar dentro de uma faixa que vai desde valores bem baixos, tais como uma gelatina até valores bem altos como a dos plásticos rígidos.



**Figura 12** - Unidade básica de um bloco copolímero de uretano

A estrutura segmentada está relacionada com propriedades como flexibilidade representada pelo segmento flexível (poliol), entrelaçamento de cadeias, forças de interação intermoleculares cadeias e ligações cruzadas (*crosslinking*), Figura 13.



**Figura 13** - Representação esquemática de ligações cruzadas. Quanto mais ligações cruzadas menos flexível será o polímero.

Por exemplo, a existência de grupos ureia na cadeia pode dar origem à formação de ligações biureto, concretizando as ligações cruzadas entre as cadeias. A mobilidade das cadeias macromoleculares depende significativamente da natureza química e do tamanho dos segmentos flexíveis. Para a obtenção de boas propriedades elastoméricas, especialmente resistência ao impacto, o segmento flexível deve ser amorfo e possuir baixa temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ).

#### 2.1.4.6 Graus de Cristalinidade dos Polímeros e Degradação

O grau de cristalinidade é uma propriedade dos polímeros que interfere em sua cinética de degradação (NIELSEN & HANSEN, 2005). Os polímeros não formam sólidos cristalinos ou amorfos como os metais e outras moléculas de baixo peso molecular; eles formam sólidos com uma fase cristalina e outra amorfa. A relação estequiométrica entre essas duas fases é chamada de grau de cristalinidade, que é expresso em porcentagem. Nessas fases cristalinas pode-se ter a formação de cristalitos com diferentes morfologias.

O grau de cristalinidade pode ser controlado pela taxa de resfriamento do molde durante o processamento, ou pelo uso de aditivos chamados de agentes nucleantes, como por exemplo, o talco (SAIDI *et al.*, 2003).

O grau de cristalinidade afeta diversas propriedades finais de um polímero, como transparência a luz, propriedade de barreira a gases e propriedades mecânicas de tração e impacto (RABELLO, 2000).

A adsorção de líquidos pelo polímero e as formas de degradação também dependem do grau de cristalinidade, pois a difusão de líquidos para o interior de um polímero, além de depender da natureza química do líquido, depende também da existência de volume livre na massa polimérica. O volume livre é composto por poros e, também, depende do grau de cristalinidade do polímero.

Alguns processos de degradação são favorecidos nas regiões mais próximas da superfície do polímero. Quando o polímero é formulado, espera-se que os aditivos estabilizantes estejam uniformemente distribuídos e dispersos na massa polimérica. Assim, um processo de degradação superficial causará um consumo maior de aditivos nesta região. Se a migração de aditivos para a superfície da massa polimérica for inibida por um maior grau de cristalinidade o efeito estabilizante será amenizado. A maior mobilidade das cadeias poliméricas na fase amorfa (acima da  $T_g$ ) também favorecerá as reações radicalares (reação química envolvendo radicais livres), acelerando os processos de degradação.

Desse modo, nota-se que, apesar do grau de cristalinidade não estar diretamente ligado aos processos degradativos, ele afetará de forma indireta as reações que ocorrem durante o processo de degradação de um polímero.

#### 2.1.4.7 Compósitos e nanocompósitos: efeito das cargas minerais, agentes de reforço.

Os compósitos são materiais heterogêneos multifásicos, formados por, pelo menos, uma fase contínua e uma descontínua (ANDRADE *et al.*, 2001). A fase contínua é um polímero responsável pela transferência de esforços e denominada matriz polimérica. A fase descontínua é chamada de carga (em inglês *filler*).

Se uma carga entra na formulação do material com o principal objetivo de reduzir custos, ela é chamada de carga de enchimento ou carga “inerte”, mas também altera as

propriedades finais do material polimérico. Para aumentar a resistência a esforços mecânicos, utilizamos uma carga de reforço ou agente de reforço. As propriedades mecânicas dos compósitos vão depender do tipo de interação entre a matriz e o agente de reforço. Nos dois casos obtém-se um material heterogêneo multifásico (HULL, 1981)

O carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) é um exemplo de carga inerte ou carga de enchimento muito usada em termoplásticos. Este composto inorgânico é extraído diretamente de jazidas naturais e contém também carbonato de magnésio (até 0,5 % em massa), óxido de ferro (até 0,2 % em massa) e umidade (até 0,2 % em massa). Ele pode conter outras impurezas dependendo da jazida, do método de extração e do processo de purificação. A umidade presente nesta carga também pode atuar em processos de degradação por hidrólise. Assim, dependendo do grau de pureza e de hidratação, os carbonatos não serão tão inertes como parecem e poderão iniciar reações de degradação oxidativa ou por hidrólise. Uma boa característica dos carbonatos é a sua baixa abrasividade em relação aos equipamentos de processamento evitando a contaminação do polímero com metais.

A sílica também é usada como carga e apresenta uma variação muito grande de propriedades que dependem do tamanho de partícula, da área superficial e da contaminação com íons metálicos. Em trabalhos com o envelhecimento térmico e fotoquímico de polipropileno contendo 0,1 a 1,0 % em massa de diferentes tipos de sílica, observou-se que o efeito de aceleração da formação de grupos carbonila (evidenciados pelo espectro de infravermelho) está mais relacionado com a presença de contaminantes metálicos do que com o tipo de sílica (SUAREZ & BIASI, 2003). Os metais detectados nas sílicas usadas foram alumínio, titânio e ferro. Nesse caso, a ordem crescente de reatividade dos respectivos óxidos é: titânio, ferro e alumínio.

Quando se usa a fibra de vidro silanizada, obtém-se, também, uma boa adesão fibra/matriz e não há contaminantes que poderiam atuar como pró-degradantes. No entanto, durante o processo de degradação da poliolefina, formam-se grupos polares, tais como: peroxila, carbonila, carboxila, hidroxila, etc. A formação desses grupos polares deteriora a adesão fibra/matriz, como demonstrado por Rabello e colaboradores (2001).

Os nanocompósitos poliméricos não são sistemas heterofásicos do ponto de vista macroscópico, uma vez que, como já diz o nome, a fase mineral tem dimensões nanométricas, mas serão tratados aqui, porque as nano cargas podem ser classificadas como carga funcional por alterarem de forma significativa alguma propriedade do

polímero, tal como: resistência à flexão, flamabilidade, temperatura de deflexão térmica, etc. Os nanocompósitos poliméricos já são produzidos em escala industrial há duas décadas e estão expandindo as suas aplicações de forma bastante acelerada.

#### 2.1.4 Poliuretanas de mamona

A mamona, cientificamente denominada *Ricinus communis* L., é uma planta da família *euphorbiáceas*. A mamoneira é uma planta exótica de origem afro-asiática e encontrada em grande quantidade na Etiópia e na Índia.

A menção dessa planta é feita desde a antiguidade, pois, segundo autores clássicos, era utilizada pelos egípcios e conhecida como “planta milagrosa”.

No Brasil, sua introdução se deu durante a colonização portuguesa, por ocasião da vinda dos escravos africanos e é conhecida sob as denominações de mamoneira, rícino, carrapateira, bafureira, baga e palma-criste; na Inglaterra e Estados Unidos, pelo nome de "castor bean" e "castor seed" (BELTRÃO, 2004).

O Brasil já foi o maior produtor mundial de mamona (573 mil toneladas em 1974) e o maior exportador de seu óleo, que é o mais importante constituinte da semente de mamona. A planta se dá bem na região Nordeste, área em que pequenas famílias de agricultores encontram dificuldades em produzir bens comercializáveis que lhes garantam sustento. Atualmente, é o terceiro no *ranking* (perde para Índia e China), mas tem potencial para aumentar rapidamente sua participação no mercado, já que dispõe de tecnologia e área para plantio.

Deste óleo de mamona obtém-se um polímero com grandes aplicações na área da saúde principalmente na ortopedia como substituto ósseo. Este polímero foi desenvolvido em 1984, pelo Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros da Escola de Engenharia de São Carlos, USP-SP. Inúmeras experiências foram realizadas com a poliuretana desde 1984, mas somente em 1999 o produto foi aprovado pelo Ministério da Saúde do Brasil, com registro nº 10171110079, e no ano de 2003 foi aprovado pela FDA (Federal Drug Administration), agência do governo Norte-americano (ERENO, 2003).

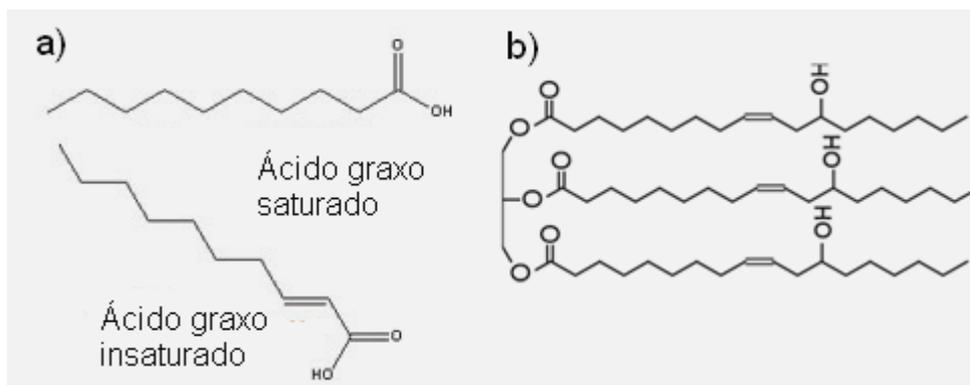
A formação de um polímero se dá através da reação química entre um pré-polímero e um polioliol (ambos obtidos por modificação do óleo de mamona, usando técnicas especiais

de ativação uretana). O óleo de mamona é na realidade um poliéster, formado por três moléculas do ácido ricinoléico, cada uma delas com um grupo hidroxila no carbono 12, propício para a polimerização por meio de ligações uretanas. Os grupos hidroxila do ácido ricinoléico reagem com os grupos isocianatos do pré-polímero difenilmetanodiisocianato para formar o polímero. Devido à alta reatividade dos compostos, contendo grupo isocianatos é feita, geralmente, uma pré-polimerização com um poliol, aumentando sua massa molecular, deixando uma porcentagem de isocianato livre para reagir com o poliol final.

Este material tem se demonstrado totalmente compatível com os organismos vivos, não apresentando rejeição. Isso é explicado pela composição química do material (Figura 14), pois o polímero tem, em sua composição, uma cadeia de ácidos graxos, cuja estrutura molecular é semelhante aos ácidos graxos do corpo humano (Figura 15 a) e, por isso, as células não reconhecem a resina de mamona como um corpo estranho (CLARO NETO, 1997). De acordo com Goneli (2008), o óleo de mamona apresenta características químicas que o diferem dos demais óleos vegetais, possuindo em sua composição aproximadamente 90% do ácido ricinoleico, um ácido graxo pouco frequente nos óleos vegetais, cuja fórmula estrutural é apresentada na Figura 15b.

Nome ácido		Porcentagem (%)
Ácido ricinoleico	$C_{18}H_{34}O_3$	89,5
Ácido oléico	$C_{18}H_{34}O_2$	4,2
Ácido linoléico	$C_{18}H_{32}O_2$	3,0
Ácido esteárico	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	1,0
Ácido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$	1,0
Ácido Dihidroxiesteárico	$C_{18}H_{36}O_4$	0,7
Ácido linolênico	$C_{17}H_{29}COOH$	0,3
Outros		0,3

**Figura 14** - Composição química do óleo de mamona. (CLARO NETO, 1997).

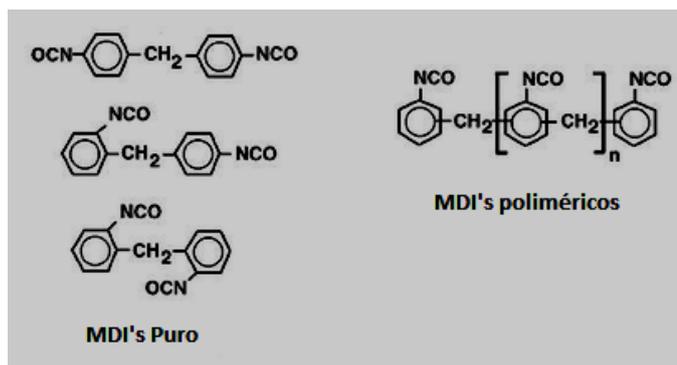


**Figura 15** a) Ácidos graxos presentes no corpo humano. b) Fórmula estrutural do ácido ricinoleico, componente de maior quantidade no óleo de mamona

Como a substância básica do polímero, o óleo de rícino é um ácido graxo que se comporta como um lipídeo, a sua degradação ocorre por um mecanismo de lipólise (IGNÁCIO, 1997). Uma das aplicações deste polímero como biomaterial está sendo como cimento ósseo para implantes de próteses e reparador em perdas ósseas (OHARA, 1995). Quando implantado em falhas ósseas que possuem irrigação sanguínea, promove o crescimento de células, que vão recompondo o osso original em substituição ao polímero, ou seja, este vai sendo metabolizado e em seu lugar ocorre um crescimento ósseo (DEL CARLO, 2003).

Comercialmente, a poliuretana de mamona é conhecida como Composto Ósseo de Ricinus (COR). É composto por um pré-polímero derivado de isocianato, um poliálcool poliéster derivado do óleo de mamona e carbonato de cálcio. Este produto apresenta uma polimerização de baixa exotermia (40-45°C), enquanto os outros polímeros têm reações exotérmicas que atingem 50-100°C, o que provoca necrose celular do tecido. A polimerização “in loco”, na própria falha óssea, não mostra sinais de comprometimento necrótico (pela reação exotérmica). Não houve sinais de retardo da reparação ou aparecimento de foco inflamatório mais exuberante, quando comparado ao enxerto autógeno (JACQUES *et al.*, 2004).

Os pré-polímeros são compostos contendo grupos isocianatos e são encontrados em duas classes distintas: aromáticos, onde os mais utilizados são o difenilmetano diisocianato (MDI) e o tolueno diisocianato (TDI); alifáticos, sendo mais utilizado o hexametileno diisocianato (HDI) e o isofurona diisocianato (IPDI). O pré-polímero utilizado neste trabalho foi sintetizado a partir de do MDI (Figura 16) e de um poliálcool derivado de óleo de mamona.



**Figura 16** – Fórmulas estruturais de MDI's puros e poliméricos

A produção de compósitos de matriz polimérica dotados de uma fase bioativa é uma forma de se minimizar as desigualdades mecânicas entre materiais bioativos e tecidos vivos. Nesse caso, a combinação entre polímeros e agentes de reforço específicos permite a produção de materiais com grande bioatividade e comportamento mecânico comparável ao de tecidos vivos. (MOURSI, 2002).

A poliuretana de mamona comercializada é misturada ao carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) como agente de reforço, que é um material biocompatível e osteocondutor (GUILLEMIN *et al.*, 1987). Neste trabalho, o carbonato de cálcio será substituído por vidros bioativos de composição 60% SiO<sub>2</sub>, 36% CaO e 4% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> com e sem Ag com o propósito de observar sua propriedade osteoindutora.

### 2.3 Interações dos Biomateriais com os tecidos vivos

Cada biomaterial possui uma função específica para uma determinada aplicação e que depende de suas propriedades. As complicações oriundas dos dispositivos implantados irão variar de acordo com a sua aplicação. Por exemplo, infecções e biodegradação irão afetar dispositivos que têm aplicações de longa duração como próteses permanentes e válvulas cardíacas (HELMUS & TWEDEN, 1995).

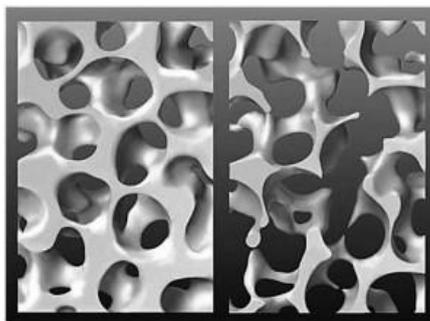
Os biomateriais utilizados em enxertos ósseos podem apresentar duas propriedades muito importantes que levam à regeneração do tecido ósseo, são elas: osteocondução, osteoindução e osteogênese.

A osteocondução é caracterizada pelo crescimento ósseo por aposição do osso existente ou sobre o mesmo.

As poliuretanas de mamonas são conhecidas como materiais osteocondutores. O termo osteocondução aplica-se ao processo tridimensional observado quando estruturas porosas são implantadas no osso ou adjacências (Figura 17). O processo é caracterizado por um crescimento inicial de tecido fibrovascular que invade a estrutura e é seguido por deposição de osso novo diretamente sobre ela. O material osteocondutor age como um arcabouço passivo, cuja presença direciona o crescimento interno de osso e de tecido fibrovascular (CORNELL & LANE, 1998).

O processo de osteocondução, para ocorrer, necessita de osso ou células mesenquimais diferenciadas. A reparação em torno de implantes osseointegrados é um processo osteocondutivo. Além das poliuretanas, outros materiais osteocondutivos mais comuns em implantodontia são aloplásticos. As hidroxiapatitas naturais e biocerâmicas compoem a maior parte dessa categoria. (hidroxiapatitas - HA, Bio oss, Osteograft N, Perioglass, Biogran). Eles são tanto não reabsorvíveis como reabsorvíveis. Para as áreas onde se planeja a colocação de implantes os materiais reabsorvíveis são preferidos.

A osteocondução de um material está relacionada à sua porosidade (quantidade de poros, tamanho de poros). Segundo Dubini, materiais macroporosos no contexto químico apresentam tamanhos de poros da ordem de  $0,1\mu\text{m}$  (DUBINI, 1967). No entanto, para que um biomaterial seja considerado macroporoso, ele deve apresentar poros da ordem do diâmetro Harvesiano ( $50$  a  $250\mu\text{m}$ ), ou poros maiores que  $100\mu\text{m}$ .



**Figura 17** - Figura ilustrativa demonstrando a grande diferença que encontramos nos diversos biomateriais. Alguns apresentam arquitetura pobre (lado direito da imagem) o que não permite a sustentação da nova matriz formada, ocasionando uma perda de volume.

Se por um lado, a presença de osso dentro de poros do material implantado é evidência de osteocondução, por outro lado, se a formação de osso ocorre quando o

implante é colocado em tecido mole, evidenciando a diferenciação celular, então ele é osteoindutor (WHITE & SHORS, 1986; VAN EEDEN & RIPAMONTI, 1994).

Segundo Zaffe, é altamente impróprio falar de osteoindução quando um material é implantado em um local esquelético como tendão, ligamento ou músculo ou quando em cultura de osteoblastos. Somente o critério de formação de osso em tecido vivo em locais extraesqueléticos ectópicos comprova a verdadeira capacidade osteoindutora de um material (ZAFFE, 2005). Recentemente, a capacidade de osteoindução de biocerâmicas é estudada por diversos autores (PENGHUA *et al.*, 2010; MOZAFARI *et al.*, 2010; EMADI *et al.*, 2010) utilizando SBF. Apesar das controvérsias a respeito da capacidade osteoindutora, estudos indicam grande eficácia de utilização das biocerâmicas no tratamento de vários defeitos ósseos, mesmo se conhecendo apenas partes dos mecanismos pelos quais elas atuam. DeForge (1997) observou excelente regeneração óssea quando utilizou o biovidro na manutenção do processo alveolar da mandíbula e maxilar de cães após extrações dentárias e tratamentos de defeitos ósseos. Oonish e colaboradores, trabalhando com diversos substitutos ósseos, relataram proliferação óssea mais rápida do que a hidroxiapatita sintética (OONISH, 1999). Franco e colaboradores fizeram uma pesquisa em 2001 utilizando hidroxiapatita em defeitos provocados em tíbia de cães e obtiveram ótimos resultados na formação de trabéculas ósseas (FRANCO, 2001). Fujishiro *et al.*, utilizaram hidroxiapatita e biovidros separadamente em fêmur de coelho e constataram que o biovidro estimula uma formação trabecular mais rápida que a hidroxiapatita (FUJISHIRO, 1997).

Um trabalho feito em 2009 (NASSER, 2009), inserindo polímero de mamona puro e com os dopantes nanopartículas de Sílica e Zircônia, verificou que os implantes de polímeros sem dopante apresentaram maior quantidade de tecido ósseo maduro. Porém, em contradição, observou que este polímero acrescido de 10% de sílica apresentou maior quantidade de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, sugerindo que a sílica tem um potencial osteoindutor. Isso significa que a sílica pode contribuir para a diferenciação celular, mas precisa estar associada a outros componentes como cálcio e fósforo para que ocorra a formação de tecido ósseo maduro. Por isso justifica-se a utilização de vidros bioativos que associam todos esses componentes.

Silva Júnior (2001) avaliou a bioatividade em SBF de compósitos com Vidro Bioativo de silicato de cálcio, fósforo e sódio em matriz de Poli(Metacrilato de Metila). Verificou-se que, por meio de Espectroscopia no infravermelho (FT-IR), ocorre

deposição de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) na superfície dos materiais após 20h na presença de SBF.

Um estudo, em 2005, avaliou a bioatividade em SBF de compósitos de polihidroxibutirato (PHB), um polímero obtido de bactérias, com vidros bioativos formados por sílica, cálcio, fósforo e magnésio. A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) apresentou a formação de uma camada de Ca e P com sete dias em SBF (GUERRA NETO, 2005).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Estudar o comportamento físico-químico e biológico do polímero de mamona como substituto ósseo em defeito diafisário no fêmur de ratos frente a alterações secundárias à associação vidros bioativos dopados e não dopados com prata.

#### 3.2 Específicos

- Avaliar a interação do vidro bioativo com o polímero com e sem prata destacando cristalinidade, porosidade e degradabilidade em SBF;
- Avaliar histologicamente a biocompatibilidade do polímero de mamona dopado com as nanopartículas de VB;
- Analisar o potencial osteogênico e a capacidade osteocondutora do polímero de mamona com VB com e sem a adição de Ag;
- Verificar o potencial osteoindutor do VB associado ao polímero de mamona;
- Comparar, em diferentes períodos de observação, a qualidade do tecido ósseo neoformado ao redor e no interior dos materiais implantados, e a interação do compósito polímero de mamona com VB às células ósseas.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Síntese dos Vidros Bioativos pelo método Sol-Gel e caracterização

Sintetizou-se vidros bioativos na forma de partículas submicrométricas na composição 60%SiO<sub>2</sub>-36%CaO-4%P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> com 0, 1, 3 e 5% molar de prata, usando-se a técnica Sol-Gel. Esta técnica requer baixas temperaturas de síntese e proporciona maior homogeneidade na distribuição dos cátions na matriz vítrea e alta porosidade (SMITH & KNOWLES, 2007). As etapas para produção dos vidros bioativos foram:

(1) Em um béquer foram adicionados sequencialmente: 103,5mL de água deionizada, 90 mL de Etanol e 5,76 mL de Ácido Nítrico 2M.

(2) A seguir foram adicionados 29,7mL de Tetraetilortosilicato (TEOS), 3,03mL de Tetraetilfosfato, (TEP) e 21,408g de Nitrato de Cálcio.

(4) A prata foi adicionada em excesso à composição molar, nas quantidades de 0,1307, 0,3920, e 0,6533g na forma de nitrato de prata o que corresponde a 1, 3 e 5 mol%.

(5) Hidróxido de Amônia foi adicionado em gotas sob agitação até o início da gelatização.

(6) Após a gelatização as amostras foram secas a 130 °C por 24h e, em seguida, tratadas a 600°C por 4h para a eliminação dos resíduos da reação, compostos orgânicos, hidroxilas e estabilização da estrutura vítrea. As seguintes composições relativas foram adotadas:

SiO<sub>2</sub> = 60% em mol

CaO = 36% em mol

P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> = 4% em mol

(7) A desaglomeração das partículas primárias em partículas menores de VB foi obtida por trituração utilizando um almofariz.

O produto final foi um pó fino, branco e inodoro que quando acrescido de prata torna-se acinzentado, dependendo da quantidade deste metal e que foi guardado em ambiente escuro e seco para evitar a redução da prata.

As amostras recém preparadas e as tratadas em 600°C foram caracterizadas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA), num

aparelho TA 50 – Shimadzu com cadinhos de platina em atmosferas de ar seco e nitrogênio. Com essas análises foi possível inferir sobre a temperatura adequada de estabilização do VB e a influência da inclusão da prata sobre o conteúdo de resíduos da reação.

Em complemento, fez-se FT-IR (Espectroscopia vibracional por transformada de Fourier no infravermelho), num NEXUS 670, Termo Nicolet, velocidade 0, 1564 cm/s, 64 varreduras e resolução de  $8,0 \text{ cm}^{-1}$ . Esse método de caracterização nos permite detectar as principais ligações químicas presentes nas estruturas, bem como as energias de vibração dessas ligações.

Determinou-se a morfologia das partículas, num aparelho de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) JEOL 6830LV. A aplicação desta técnica permitiu a avaliação do grau aglomeração dos grãos (porosidade e coalescência) de VB de diferentes amostras e do tamanho das partículas primárias. Foram obtidas micrografias com magnificações de 500 e 10.000 aumentos para a caracterização da morfologia dos grãos de VB bem como de sua superfície.

Por Difractometria de Raios-X, determinaram-se as fases cristalinas, num Rigaku-Rotaflex, modelo RU200B, com câmara “multipurpose”, radiação CuK entre 10 e 60°, 50 kV e 100 mA. Para analisar os dados obtidos utilizou-se o banco de dados JSPDS.

## **4.2 Preparação dos Compósitos Polímero/VB**

O polímero é um biomaterial produzido pela empresa Biomecânica e aprovado pela Anvisa nº 10171110079 denominado Bioosteo<sup>®</sup>. É exportado em forma de kit contendo, separadamente, uma ampola com 18 g de Poliol, uma ampola com 20 g de pré-polímero e mais uma ampola com 20 g de carbonato de cálcio. Porém, nesse estudo, descartou-se o carbonato de cálcio, substituindo-o pelos vidros bioativos com várias concentrações.

Os compósitos foram preparados pela mistura, primeiramente, dos VB com o pré-polímero para um homogeneização, e, em seguida, o poliol foi adicionado à mistura sempre na proporção 1:0,65 em concentração de poliol para pré-polímero. As misturas foram realizadas em almofariz com ação mecânica manual. Após a homogeneização final, o material foi colocado em um molde e o processo de cura ocorreu sob pressão máxima de

30 Psi por 15 minutos. A pressão foi aplicada para diminuir a formação de bolhas que resultam da liberação de CO<sub>2</sub> durante o processo de polimerização. Seguindo este método, foram obtidas as amostras de polímeros com 0,7; 5; 10 e 20 % de VB dopados com 0 e 5% de Ag denominado por PU/VB e PU/VBAg, respectivamente.

Os compósitos foram armazenados em sacos plásticos etiquetados e somente os que foram utilizados para o estudo *in vivo* foram esterilizados com Óxido de Etileno (ETO).

### **4.3 Caracterização físico-química dos Compósitos Polímeros/VB**

As caracterizações físico-químicas dos compósitos foram realizadas utilizando as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Análise Termogravimétrica (TGA), Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (FT-IR) e Difractometria por Raios X (DRX).

#### 4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os compósitos de polímeros com vidros bioativos foram observados pelo microscópio eletrônico de varredura da marca JEOL modelo 6830 LV no Laboratório de Materiais do departamento de Física da UFMS. Para isso, as amostras receberam recobrimento com ouro, material condutor para escoamento dos elétrons, a fim de evitar o acúmulo de cargas que repelem o feixe de elétrons incidentes inviabilizando a formação de imagem. Foram obtidas micrografias com magnificações de 500 e 10.000 aumentos para a caracterização da morfologia (porosidade e coalescência).

#### 4.3.2 Análise Térmica (DSC/TGA)

As amostras foram analisadas por Calorimetria Exploratória Diferencial e por Termogravimetria em equipamentos da marca Shimadzu modelo TA50H, equipado com cadinho de platina sob fluxo de 100 mL.min<sup>-1</sup> de nitrogênio e em ar seco e taxa de aquecimento 5°C/min . Estes métodos nos permitiram identificar as transformações físico-químicas que envolvem perdas de massas tais como evaporação, desorção de água livre, de água ligada (hidroxilas) ou decomposições envolvendo perda de água de estrutura, descarbonatação, decomposição de compostos orgânicos. Isso nos permitiu inferir a respeito da estabilidade térmica dos compósitos polímero/VB e polímero/VBAg.

#### 4.3.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A absorbância das amostras ao Infravermelho foi avaliada utilizando pastilhas de KBr e obtidas com um espectrofotômetro marca Nicolet modelo NEXUS 670 em 0,1564 cm/s, 64 scannings com resolução de 8,0 cm<sup>-1</sup> em uma faixa de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup> utilizando pastilhas de KBr.

Este método de caracterização auxiliou na investigação da composição química dos compósitos dando-nos informações sobre a estrutura molecular a partir de espectros vibracionais pela absorção de energia para o estiramento (deformação axial) e flexão (deformação angular) das ligações entre átomos de diferentes grupos funcionais detectando quaisquer mudanças na composição, bem como modificações estruturais.

#### 4.3.4 Difratometria de Raios-X (DRX).

Os difratogramas de raios-X das amostras foram obtidos em um equipamento marca Rigaku–Rotaflex modelo RU200B com radiação CuK operado a 50kV e 100mA. Os padrões de difração foram analisados usando-se dados do “*Joint Committee on Powder*

*Diffraction Standards*” (JCPDS), atualmente denominado “*International Centre for Diffraction Data*” (ICDD). O padrão de difração foi responsável pela verificação de estruturas cristalinas dos compósitos, permitindo-nos calcular os parâmetros da rede cristalina e identificar as fases cristalinas e amorfas.

#### **4.4 Estudo *in vivo* da bioatividade dos compósitos VB-Polímeros**

##### 4.4.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados 60 ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar albino, com peso corpóreo variando entre 230 e 350 gramas, adultos, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS.

Os animais ficaram confinados em gaiolas de 0,15m<sup>2</sup> e mantidos em fotoperíodo de 12 horas, temperatura e umidade mantidas por ar condicionado, ruídos mínimos, ração sólida e água “ad libitum”, ficando sob observação por um período de dois dias, antes da utilização no experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados após aprovação pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/ CEUA/UFMS em reunião de 24 de outubro de 2008 com protocolo n° 189/2008 (ANEXO 1).

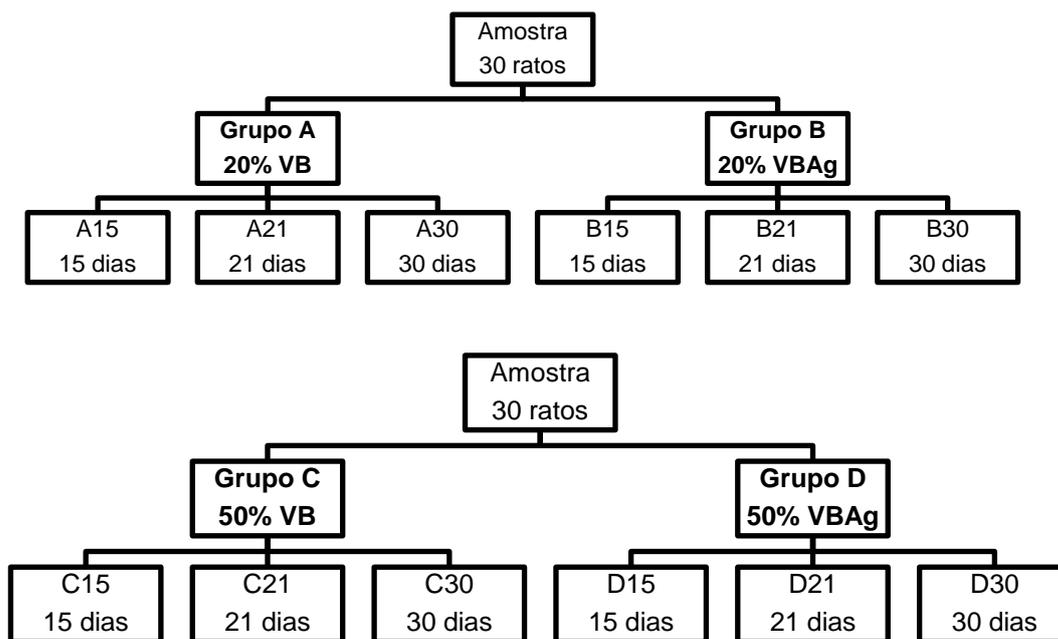
##### 4.4.2 Grupos Experimentais

Os animais disponíveis foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais:

- **Grupo A:** Defeito ósseo preenchido com polímero de mamona com 20 % de VB
- **Grupo B:** Defeito ósseo preenchido com polímero de mamona com 20 % de VB dopado com prata (VBAg)

- **Grupo C:** Defeito ósseo preenchido com polímero de mamona com 50 % de VB
- **Grupo D:** Defeito ósseo preenchido com polímero de mamona com 50 % de VB dopado com prata (VBAg)

Todos os grupos foram subdivididos em três subgrupos em função do tempo de observação (15, 21 e 30 dias), com cinco animais em cada subgrupo conforme ilustrado na Figura 18.



**Figura 18** - Organograma representativo da distribuição dos grupos e períodos de observação.

#### 4.4.3 Produção dos defeitos ósseos

O experimento foi realizado no laboratório de Técnica Cirúrgica e experimental do Biotério da UFMS, em Campo Grande – MS, no período compreendido entre os meses de março e julho de 2010.

Procedimentos:

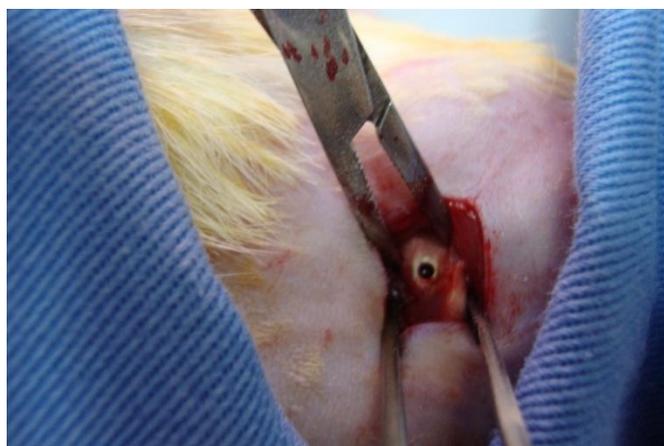
No pré-operatório, todos os animais foram inspecionados, a fim de se verificar o estado da pele, presença de secreção nas narinas e características das fezes, para certificarmos se encontravam-se com boa saúde, caso contrário, seriam rejeitados.

Como medicação pré-anestésica foi utilizada 1mg/Kg de Butorfanol via subcutânea e como anestesia foi utilizada a associação de quetamina (5%) e Xilazina (2%) nas doses de 5 mg/Kg e 0,2 mg/Kg por via intraperitoneal.

Depois de constatado plano anestésico, foi realizada a raspagem dos pelos na face lateral do membro posterior esquerdo e sob técnica asséptica feito o acesso à face Crânio-lateral da diáfise do fêmur.

O animal foi então, posicionado em decúbito lateral e a incisão de acesso ao fêmur esquerdo foi realizada com um bisturi. Após a incisão da fácia lata, foi localizada a diáfise femoral e na face crânio-lateral, a aproximadamente 5,00 mm da epífise proximal, realizou-se um defeito ósseo de 2,00 mm de diâmetro, empregando uma ponta diamantada do tipo esférica nº 1016 (KG Sorensen) acopladas a uma furadeira da marca Mini Drill, 3.6V, 10000 RPM sob irrigação constante com soro fisiológico perfurando a cortical óssea até atingir o canal medular.

O defeito ósseo (Figura 19) criado na face crânio-lateral da diáfise femoral foi preenchido pelo polímero de mamona com VB em blocos pré-moldados de 2,00 mm de diâmetro por 1,00 mm de espessura e implantados sob pressão. Todos os corpos de provas foram anteriormente esterilizados com Óxido de Etileno (ETO).



**Figura 19** - Defeito ósseo feito no fêmur do rato.

Após o preenchimento do defeito no nível da cortical óssea, conforme o material de cada grupo foi feita a síntese dos planos com mononylon 4-0.

Os ratos foram devolvidos às suas gaiolas e alimentados com ração e água à vontade e apoio imediato dos membros operados, para tanto receberam o analgésico Butorfanol na dose de 1mg/Kg.

#### 4.4.4 Eutanásia

Decorrido o período de observação de 15, 21 e 30 dias, os animais foram submetidos à eutanásia com injeção letal de Tiopental Sódico (Cristália Tiopental) na dosagem de 100 mg/Kg.

Após terem sido cuidadosamente dissecados os tecidos moles, os fêmures dos animais foram desarticulados, removidos e, em seguida, as peças foram imersas em frascos de vidros herméticos, individuais, com formol tamponado a 10% e encaminhadas para estudo histológico.

#### 4.4.5 Procedimentos Histológicos

Para o preparo dos corpos de provas as peças obtidas pelo item 4.4.4 foram descalcificadas utilizando ácido nítrico a 5% por três dias e, logo após, foram neutralizados com sulfato de sódio a 5 % por 24 h.

A etapa seguinte foi desidratação com álcool isopropílico nas concentrações 70 %, 80 %, 95 % e 100 % durante 30 minutos cada. Para a retirada de impurezas da amostra tecidual, deixando-a transparente e translúcida, realizou-se a diafanização pelo xilol em três etapas de 30 minutos cada e a impregnação de parafina com a temperatura à 65 °C em duas etapas de 20 minutos cada.

A parafina foi imersa em um molde para a realização da microtomia com cortes em 5  $\mu$ . Após os cortes, foi feita a desparafinização, hidratação do corte, coloração em Hematoxilina-Eosina (H-E) e coloração especial em Tricrômio de Masson (T-M). Para finalizar, foi realizada a montagem em resina (entellan) com uma lamínula.

#### 4.4.6 Avaliações Microscópicas e Histológicas

Os corpos de provas preparados de acordo com o item 4.4.5 foram avaliados microscopicamente, utilizando um microscópio ótico acoplado a uma câmara de fotografia

digital para obtenção das imagens histológicas. As avaliações macroscópicas e histológicas do comportamento do material, após implantação ou da reação dos sítios de implantação, são utilizadas com o intuito de observar características de biocompatibilidade, osseointegração e reação inflamatória, entre outras.

#### 4.4.7 Análise Estatística

Para a análise estatística, utilizou-se o método qualitativo-quantitativo (SCHETTERT, 1999), onde se considerou o seguinte escore para proliferação osteoblástica, indicando osteoindução e Trabéculas ósseas neoformadas (TON) indicando osteocondução.

- (0) Ausente – ausência de osteoblastos e TON.
- (1) Leve – 1/3 do campo de visão preenchido por osteoblastos ou TON
- (2) Moderado – 2/3 do campo de visão preenchido por osteoblastos ou TON
- (3) Intenso – 100 % do campo de visão preenchido por osteoblastos ou TON

Para avaliar a substituição óssea, observou-se a degradação polimérica de acordo com o seguinte SCORE:

- (0) Ausente – Ausência de Polímero – 100 % de degradação – polímero totalmente substituído por tecido ósseo maduro.
- (1) Leve – 1/3 do campo de visão preenchido por polímero
- (2) Moderado – 2/3 do campo de visão preenchido por polímero
- (3) Intenso – 100 % do campo de visão preenchido por polímero – não houve degradação do polímero

Com esses dados construiu-se a tabela que está anexa (ANEXO 2).

A análise estatística foi realizada utilizando-se o “Software” SigmaStat, versão 2.0, considerando um nível de significância de 5 %. Os resultados foram obtidos utilizando o teste de Kruskal-Wallis (SHOTT,1990), seguido pelo pós-teste de Dunn para comparação entre os tempos analisados e entre os grupos experimentais, em relação aos escores de proliferação de osteoblastos, neoformação de trabécula óssea e degradação do

material. Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva e na forma de tabelas.

#### **4.5 Estudo *in vitro* da bioatividade dos compósitos VB/Polímeros**

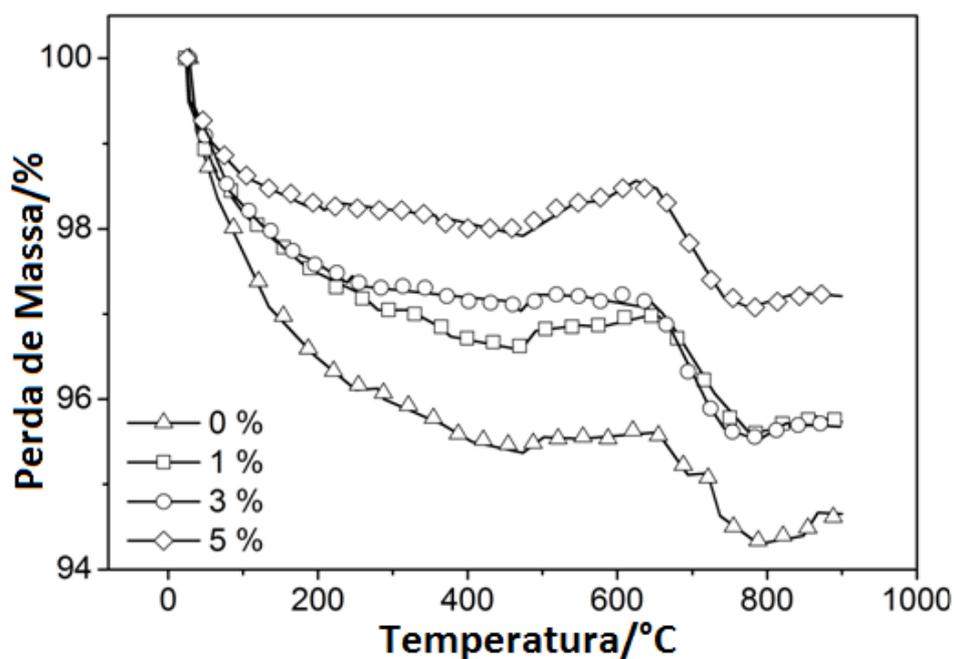
A bioatividade foi avaliada *in vitro* por imersão dos compósitos em SBF, conforme descrito por Kokubo e colaboradores (KOKUBO et al., 1990). A solução de SBF foi preparada de acordo com o descrito no ANEXO 3 e o teste de bioatividade realizado como a seguir:

- (1) Em tubos de ensaio, foi adicionado em cada um, 1,0 mL de SBF, 10 mg da amostra.
- (2) As amostras foram então incubadas a 35 °C nos períodos de 0, 10 e 20 dias.
- (3) A cada intervalo de 0, 10 e 20 dias de bioatividade, um tubo foi esgotado e o precipitado foi lavado com água destilada.
- (4) Cada amostra foi a seguir seca a 50 °C em estufa por 24 h e armazenada para posterior análise morfológica de acordo com o item 4.4.1 e para a detecção das fases cristalinas por meio de DRX, conforme descrito no item 4.3.4.
- (5) A formação de HA, após o período de 10 dias, comprovou a natureza bioativa do material.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo e caracterização físico-química dos VB

A Figura 20 apresenta as curvas TG das amostras com diferentes conteúdos de prata e previamente tratadas a 600 °C/4h. Todas apresentaram uma perda de massa contínua até aproximadamente 500 °C. Essa perda se deve à água adsorvida durante o armazenamento após o tratamento de estabilização a 600 °C e que foi liberada sob aquecimento durante a medida.



**Figura 20** - Curvas TGA de VB com diferentes quantidades de Ag; as amostras foram tratadas anteriormente em 600 °C/4h.

Quanto maior o conteúdo de prata, menor é a perda de massa. Isso significa que a prata reduz a quantidade de água adsorvida durante o armazenamento, ou seja, a higroscopicidade do VB.

Nesta classe de vidros bioativos, a afinidade com a água é proporcional ao número de oxigênios não ligantes que denominaremos Si-O-NBO devido ao inglês *non-bridging oxygen*. A higroscopicidade é correlacionada com os oxigênios não ligantes encontrados na superfície do vidro, tanto externa como nos poros.

Elementos modificadores causam o surgimento de oxigênios não ligantes, provocando uma descontinuidade na matriz vítrea (AGUIAR *et al.*,2008 ). Isso é um fator positivo quando se quer um material que seja degradável ou solúvel em SBF, pois esses grupos Si-O-NBO aumentam o grau de depolimerização da estrutura, controlando, desse modo, a dissolução da sílica pela formação de silanol.

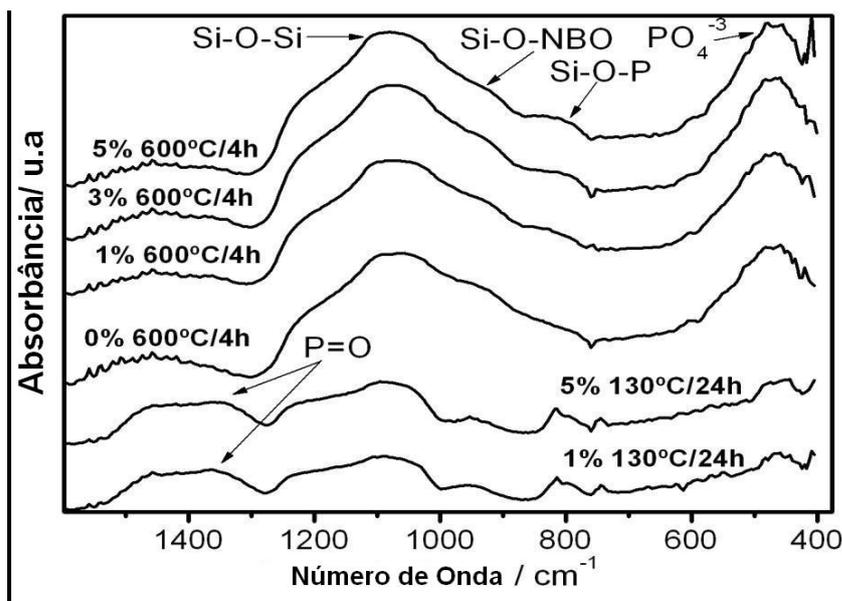
O íon da prata é modificador de rede e deveria aumentar o número de oxigênios não ligantes. Contudo, em nossas amostras, nota-se um efeito oposto: a quantidade de Si-O-NBO é ligeiramente reduzida com o aumento da quantidade de prata, como podemos observar nas medidas de FTIR.

Nas curvas FT-IR, Figura 21, podem-se identificar os principais modos vibracionais que estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** - Principais grupos funcionais e seus respectivos modos de vibrações, detectadas no FT-IR de VB com e sem tratamento térmico e com várias concentrações de Ag.

Tipo de ligação	Número onda (cm <sup>-1</sup> )
Si-O-Si estiramento	1000–1200
Si-O-NBO estiramento	890–975
Si-O-Si flexão	750
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> flexão antissimétrica	570–600

As ligações de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> flexão antissimétrica estão associadas ao fósforo em sítios da matriz vítrea com maior simetria (*crystal-like environment*). Para as amostras tratadas a 600 °C as bandas em 1000-1200 cm<sup>-1</sup> e 500 cm<sup>-1</sup> apresentaram grande intensidade e largura devido à densificação da estrutura vítrea com aumento do número desses sítios de ligações, em comparação aos picos das amostras somente secas a 130 °C. Um aumento do ordenamento estrutural foi confirmada (CIECINSKA,2003) pelo aumento da banda de PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>.

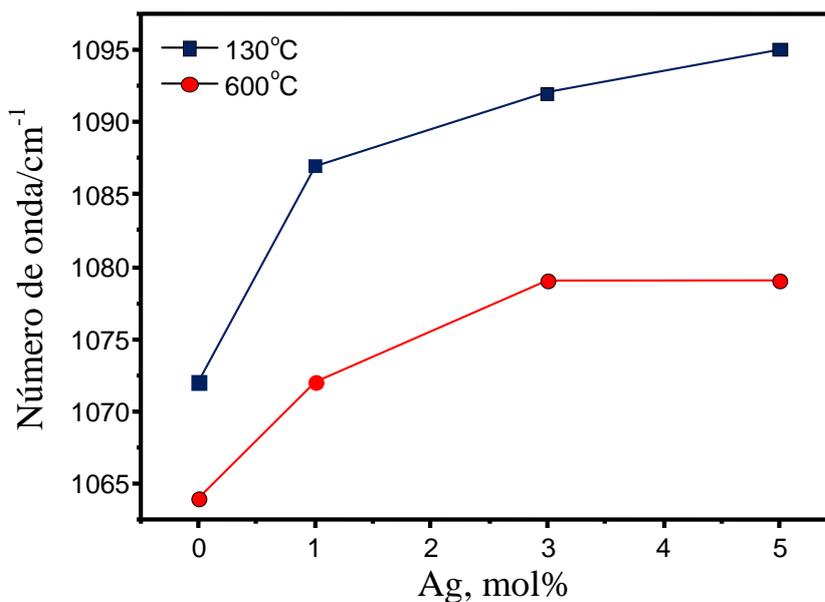


**Figura 21** – Espectros FT-IR de VB para as amostras secas em 130 °C e 600 °C.

As amostras contendo 3 % e 5 % de Ag apresentaram aumento das bandas atribuídas ao oxigênio ligado (bridging oxygen, BO) em relação à atribuída ao Si-O-NBO e ao fosfato. Este fato pode causar uma redução da solubilidade de VB em SBF, explicando a diminuição da higroscopicidade para o VB com o aumento da quantidade de Ag. Na Figura 22, temos um gráfico com as variações dos picos de infravermelho referentes às ligações Si-O-Si para as amostras de VB com várias concentrações de Ag, que não receberam tratamento térmico e para as amostras tratadas a 600 °C. Notamos que as energias de ligações referentes a Si-O-Si diminuíram consideravelmente com o tratamento térmico e aumentaram com o aumento da quantidade de prata.

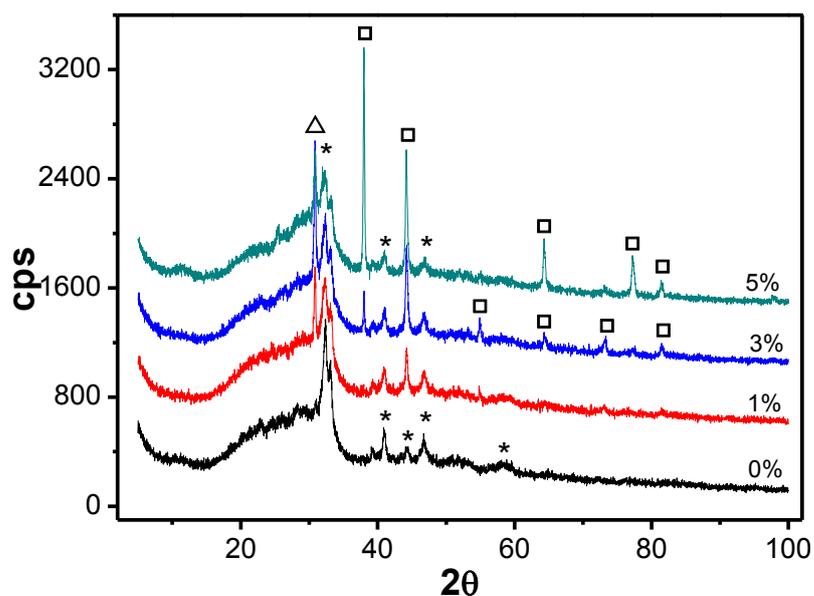
Verifica-se que o tratamento térmico, também denominado estabilização térmica, foi muito importante para estes vidros bioativos, haja vista que contribuiu para eliminar hidroxilas contidas nos poros, água de ligação e resíduos de compostos orgânicos provocando uma densificação da estrutura. A redução na energia média de ligação, neste caso, deve-se mais à mudança da estrutura que a sua densificação, diferente do que veremos com a inclusão de prata na matriz vítrea.

Dentro da mesma curva, ainda na Figura 22, percebemos que a adição de prata aumenta a energia de ligação, contribuindo, também, para a densificação da estrutura, agora não mais por eliminação de resíduos, mas pela redução da quantidade de oxigênios não ligante (Si-O-NBO). Nesse caso, não ocorre mudança de estrutura, mas eliminação dos defeitos tipo vacância.



**Figura 22** - Posição do pico de absorção no Infravermelho com quantidade de prata em VB.

Os difratogramas de raios-X das amostras, contendo diferentes teores de prata, estão apresentados na Figura 23. As curvas possuem características principalmente de materiais amorfos correspondendo aos VB. No entanto, apresentaram uma cristalização muito incipiente de quartzo e HA, formada durante a síntese do VB no período de secagem da amostra. Estes sítios cristalinos são identificados quando se observa picos de pequena amplitude e grande largura de reflexão. As linhas de reflexão da prata metálica são bem mais estreitas e intensas, porque não decorrem necessariamente de uma cristalização a partir da matriz vítrea, mas aparentemente de uma “precipitação” de fase metálica.

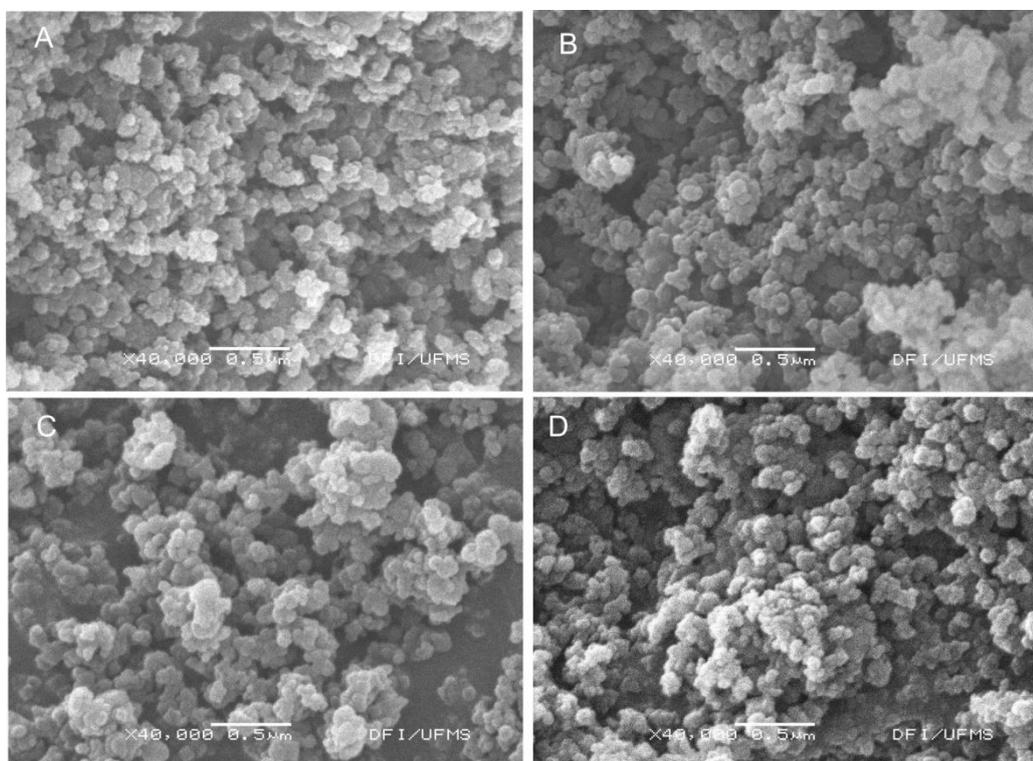


**Figura 23** - DRX padrão de VB com diferentes quantidades de Ag. (Δ) SiO<sub>2</sub>, (□) Prata, (\*) HA.

Parte da prata se dissolve na matriz vítrea, ocupando sítios específicos e o excesso cristaliza em prata metálica em forma de partículas muito pequenas. A presença de nanopartículas de prata no material é uma condição vantajosa do ponto de vista microbiológico, pois durante o processo de dissolução do vidro, essas partículas serão liberadas, atuando como bactericida no organismo. A prata é bactericida mais eficiente na forma de nano partículas do que na forma de sais. As formas iônicas de prata ao se ligarem a proteínas e ácidos nucleicos parecem ter a sua atividade antimicrobiana reduzida (BRETT, 2006). Em geral, os íons Ag<sup>+</sup> são muito reativos e combinam-se com aminoácidos como cisteína e outros compostos como tioglicolato de sódio contendo grupos tióis (LIAU, *et al.*, 1997), com cloretos e proteínas séricas, perdendo sua atividade bactericida (LYCZAK & SCHECHTER, 2005). Estes últimos autores mostraram a importância da liberação controlada de Ag<sup>+</sup> no efeito bactericida, quando em presença de proteínas séricas. Partículas grandes de prata metálica (1 a 2 mm) ou nanométricas (70 nm) liberam em meio líquido íons Ag<sup>+</sup> muito lentamente e, conseqüentemente, estes são adsorvidas pelas proteínas e perdem atividade. Nitrato de prata em solução é altamente dissociável e libera Ag<sup>+</sup> rapidamente, que, também, forma complexos com proteínas, após exibirem curto período de atividade antibacteriana. As nanopartículas, ao contrário, apresentam grande área superficial em relação ao seu volume sendo fortemente reativas (WIJNHOFEN, *et al.*, 2009). Nano cristais de prata (<50 nm) não são complexados por

proteínas séricas e podem ser absorvidos pelas células bacterianas, liberando  $Ag^+$  no seu interior e nas proximidades das membranas celulares onde atuam. Dessa forma, exibem atividade antibacteriana por períodos prolongados, mesmo em presença de altas concentrações de proteínas séricas.

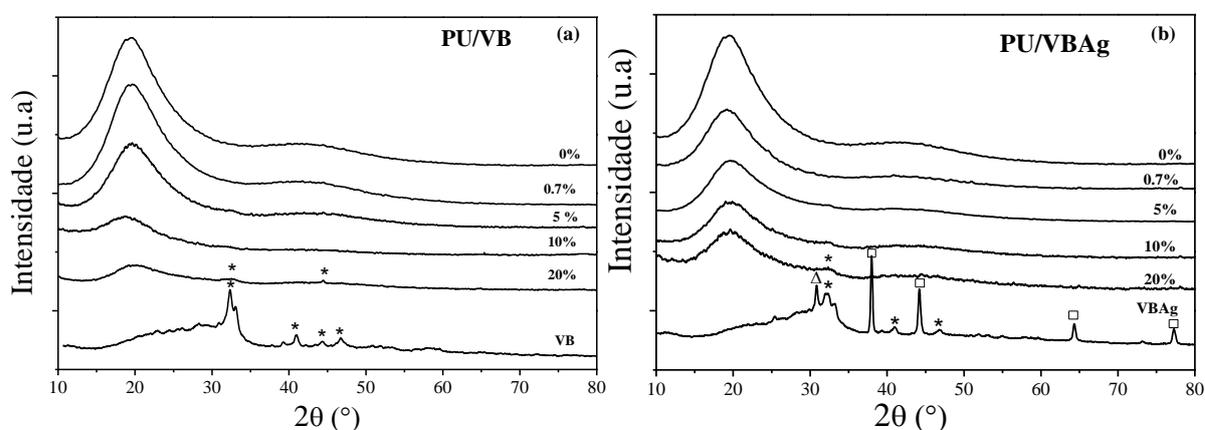
As micrografias obtidas por MEV das amostras de VB com 0, 1, 3 e 5 % de Ag estão apresentadas na Figura 24. Verifica-se que as partículas estão parcialmente aglomeradas com tamanho médio de partículas acima de 100 nm. Isso mostrou a necessidade de se fazer uma desaglomeração dessas partículas, fazendo uma moagem mecânica. A incorporação de Ag não causou alteração significativa na morfologia dos grãos.



**Figura 24** - VB com tratamento térmico 600°C e com (a) 0%, (b) 1%, (c) 3% e (d) 5% de Ag

## 5.2 Estudo e caracterização físico-química dos compósitos VB/PU

A Figura 25 apresenta os difratogramas de raios-X dos vidros bioativos com 0 % de prata, denominado VB (Figura 25a) e 5 % de prata denominado VBAG (Figura 25b), que foram estudadas no item 5.1 juntamente com os difratogramas dos compósitos formados de polímeros com várias concentrações desses vidros bioativos.



**Figura 25** - DRX obtidas dos compósitos: (a) PU/VB e (b) PU/VBAg.

O difratograma da amostra de referência (PU com 0% de VB ou VBAg) apresentou dois halos. As difratometrias dos compósitos PU com os vidros bioativos não apresentaram picos de cristalização dos VB e VBAg devido à baixa adição frente à sensibilidade do equipamento.

No entanto, podemos observar que, quando o VB e VBAg foram adicionados à matriz polimérica, a intensidade do halo principal diminuiu com a quantidade de VB e VBAg.

Padrões de difratometria de raios-X de polímeros semicristalinos geralmente apresentam picos. Contudo, é bem conhecido que a morfologia de polímeros depende da natureza e comprimento dos segmentos rígidos, os quais formam zonas tridimensionais espacialmente arranjadas e predominantemente paracristalinas (WILKE, 1983). Dessa maneira, os halos observados nas medidas de raios X obtidas para o polímero e compósitos polímeros/vidros bioativos têm sido associados à ordem de curto alcance das estruturas

locais de PU formado pelos segmentos rígidos. Os resultados observados na Figura 25 foram associados à maior desordem na estrutura polimérica gerada pela adição de VB e VBAG. A inclusão das partículas de vidro diminui a mobilidade das cadeias poliméricas e impedem o ordenamento durante o processo de cura.

Os segmentos rígidos são compostos pelos extensores de cadeias formados pelo óleo da mamona.

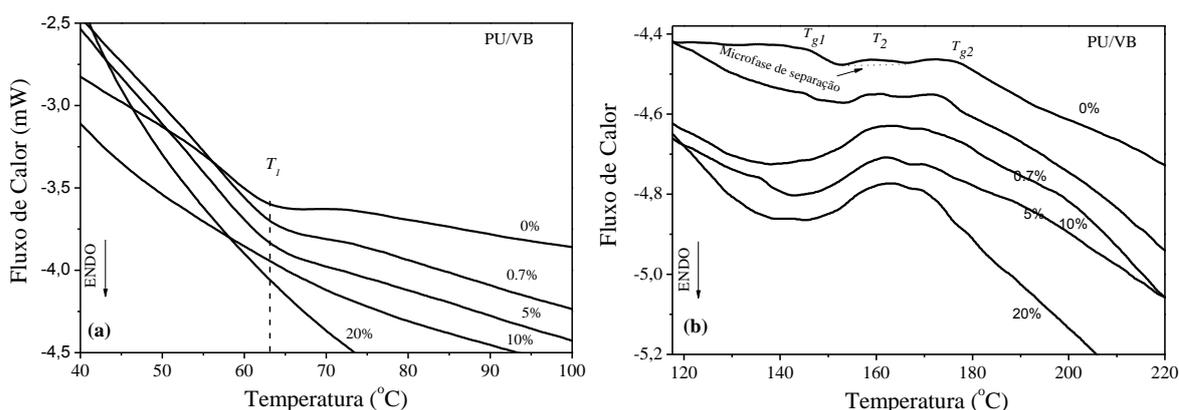
O polímero de mamona é feito de dois componentes: polioliol (derivado do óleo) e pré-polímero (polioliol + MDI). O pré-polímero é a parte rígida deste polímero.

O grau de ligações cruzadas, principalmente formado pelo hidrogênio entre grupos uretanos adjacentes, depende da proximidade e do espaçamento entre os segmentos rígidos. A distância média entre as cadeias poliméricas  $\langle R \rangle$ , em angstrom, pode ser calculada pela aplicação da Equação (1), utilizando a posição angular do halo com maior intensidade, observado nas medidas de difração de raios-X (HALASA *et.al.*, 1991).

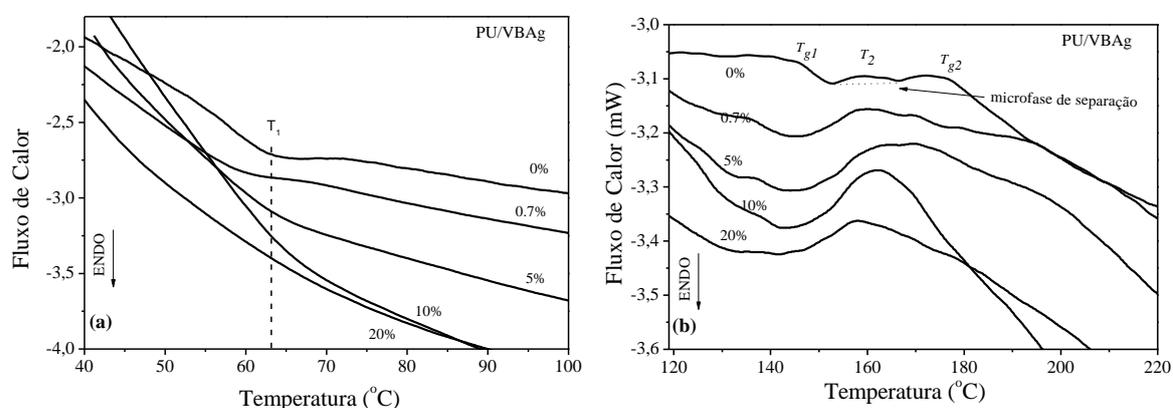
$$\langle R \rangle = \frac{5}{8} \times \frac{\lambda}{\sin\theta} \quad (1)$$

A posição do halo igual a  $19.5 \pm 0.4 \text{ \AA}$  não apresenta mudança com a adição de VB ou VBAG, conseqüentemente, a distância média entre as cadeias poliméricas não variou, nem mesmo a largura mudou com a adição de carga (filler). Então, a carga não muda a estrutura de curto alcance, nem a ordem. Porém, a diminuição da intensidade do halo indica um aumento quantitativo de volume amorfo no polímero em detrimento das porções paracrystalinas. Isso ocorre devido à distribuição não homogênea das partículas de VB com a tendência de formar clusters.

Curvas DSC de polímeros e seus compósitos com VB e VBAG estão mostradas nas Figuras 26 e 27, respectivamente. Em  $63^\circ\text{C}$  um pequeno pico endotérmico é observado nas curvas de DSC para o polímero referido por T<sub>1</sub>. Com o aumento da concentração de VB acima de 5% em peso, este pico não foi observado. Dois picos foram identificados como temperatura de transição vítrea, T<sub>g1</sub> e T<sub>g2</sub> e um pico exotérmico, com o máximo em T<sub>2</sub>, aparecendo imediatamente após a primeira transição vítrea. As temperaturas T<sub>g1</sub> e T<sub>g2</sub> foram designadas para as temperaturas de transição vítrea de segmentos rígidos presentes na fase mista (composta pelos segmentos rígidos e flexíveis) e para a fase rígida pura, respectivamente, como suposto por Saiani et al. (SAIANI *et.al.*, 2001).



**Figura 26** - Curvas DSC para compósitos PU/VB (a) mostrando a temperatura  $T_1$  e (b) mostrando as temperaturas  $T_{g1}$ ,  $T_2$  e  $T_{g2}$ , obtidas a  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ .



**Figura 27** - Curvas DSC para compósitos PU/VBAg, (a) mostrando  $T_1$ , e (b) mostrando as temperaturas  $T_{g1}$ ,  $T_2$  e  $T_{g2}$ , obtidas a uma taxa de  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Eisenbach (EISENBACH *et al.* 1986) observou um evento endotérmico nas curvas DSC de polímeros poliuretanos em aproximadamente  $60^\circ\text{C}$  e atribuiu a perda de organização dos segmentos rígidos N-H...C=O, de segmentos rígidos na região interfacial entre segmentos rígidos e flexíveis. A ausência deste pico endotérmico em  $60^\circ\text{C}$  nas curvas de DSC para os materiais compósitos fundidos tem sido atribuída a uma melhor dispersão dos segmentos rígidos e flexíveis, portanto, um aumento na separação de fase, os quais proporcionam uma região interfacial mais estreita e ordenada (FINNIGAN *et al.*, 2004). As amostras de polímero puro utilizadas nesse trabalho apresentaram este pico endotérmico em  $63\text{ }^\circ\text{C}$  ( $T_1$ ), denotando uma ordem interfacial na região de segmentos rígidos e flexíveis. No entanto, com o aumento da concentração de VB este pico não foi observado. A inclusão de VB puro e dopado com Ag no polímero, em concentração acima

de 5%, impede esta ordem na região interfacial da separação de fase, durante a cura do polímero.

Pukánszky e colaboradores (2008) observaram uma separação nanofásica em polímeros elastômeros segmentados. Concluíram que esta separação de fase foi causada pela mudança na composição, os quais levam à mudança nos grupos –OH. Uma extensão disso, tanto quanto o tamanho e propriedades da fase dispersa, também depende da composição. Um evento exotérmico, observado por Finnigan (2004) e co-autores durante medidas DSC, foi atribuído à separação da fase mista (segmento rígido + flexível), fornecendo uma maior mobilidade aos segmentos rígidos, causando, provavelmente, uma redução na região interfacial entre as fases mista e rígida devido a um maior ordenamento das regiões rígidas. Observamos também este pico exotérmico, com o máximo em  $T_2$ , imediatamente após  $T_{g1}$  (primeira transição vítrea).

Há uma coexistência de eventos térmicos na faixa de 60 a 140 °C, os quais poderiam ser atribuídos à temperatura de fusão causada pelo desordenamento dos segmentos rígidos formados por MDI e a transição vítrea de segmentos puros rígidos, respectivamente.

O estudo da influência térmica sobre as múltiplas temperaturas de fusão em blocos altamente rígidos de poliuretanas foi publicado por Saiani e colaboradores (2001). A morfologia das amostras foi atribuída à formação de uma região pura de segmentos rígidos e uma fase mista (segmentos rígidos + flexíveis). A separação de microfases na região de fase mista dos polímeros foi causado por um tratamento térmico, proporcionando duas transições vítreas  $T_{gHP}$  (Temperatura de transição vítrea da fase rígida) e  $T_{gHS}$  (Transição da fase vítrea de segmentos rígidos na fase mista). Assim,  $T_{g1}$  e  $T_{g2}$ , em nossos resultados poderiam ser atribuídas às temperaturas de transição vítrea de segmentos rígidos na região interfacial e para as regiões de segmentos rígidos, respectivamente.

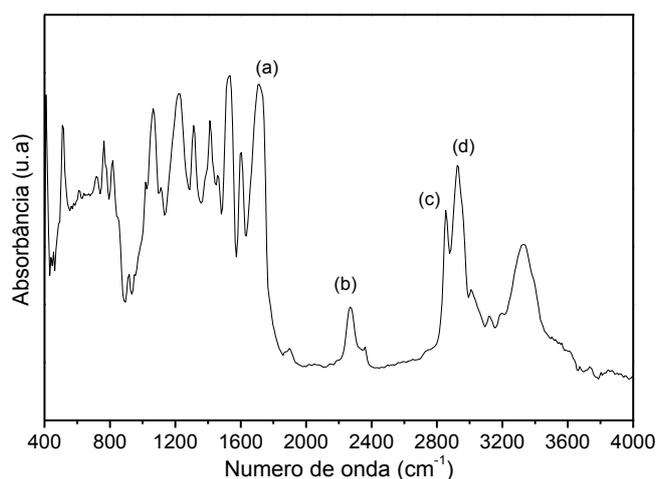
É bem conhecido que a inclusão de partículas (micro ou nanopartículas), em diferentes matrizes poliméricas, pode diminuir a mobilidade molecular de redes o que causa um aumento na temperatura  $T_g$  (BERNARDI *et al*, 2008). Após a inclusão de VB e VBAG, nenhuma mudança significativa foi observada nas temperaturas de transição vítrea, considerando o erro ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), mas um evento térmico torna-se mais amplo e mais intenso com o aumento da concentração de VB e principalmente com a inclusão de VBAG. Além disso,  $T_{g2}$  foi mais evidente nas curvas DSC dos compósitos PU/VB enquanto que a  $T_{g1}$  foi mais bem identificado nas curvas DSC das amostras PU/VBAG devido à sobreposição dos

eventos térmicos. Temperaturas características observadas nas curvas DSC de amostras PU, PU/VB e PU/VBAG estão sumarizadas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Temperaturas características de PU contendo diferentes concentrações de VB e VBAG.

Carga (Massa %)	PU/VB ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )				PU/VBAG ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )			
	$T_1$ ( <i>endo</i> )	$T_{g1}$	$T_2$ ( <i>exo</i> )	$T_{g2}$	$T_1$ ( <i>endo</i> )	$T_{g1}$	$T_2$ ( <i>exo</i> )	$T_{g2}$
<b>0</b>	63	145	159	177	63	145	159	177
<b>0.7</b>	63	145	159	173	60	136	159	170
<b>5</b>	63	-	163	170	64	137	165	172
<b>10</b>	-	136	161	171	-	138	162	-
<b>20</b>	-	-	161	171	-	140	156	-

A Figura 28 mostra uma absorção FT-IR representativa do PU. A vibração molecular de interesse foi identificada como: (a) carbonila ( $\sim 1712\text{ cm}^{-1}$ ), (b) grupos isocianatos ( $\sim 2270\text{ cm}^{-1}$ ), (c) estiramento assimétrico de ligações carbonila, -C-H, ( $\sim 2855\text{ cm}^{-1}$ ) e (d) estiramento simétrico das ligações carbonila ( $\sim 2926\text{ cm}^{-1}$ ). Todas as amostras apresentaram vibrações correspondentes aos grupos isocianatos, -N=C=O, que são característicos de uma cura incompleta do polímero.

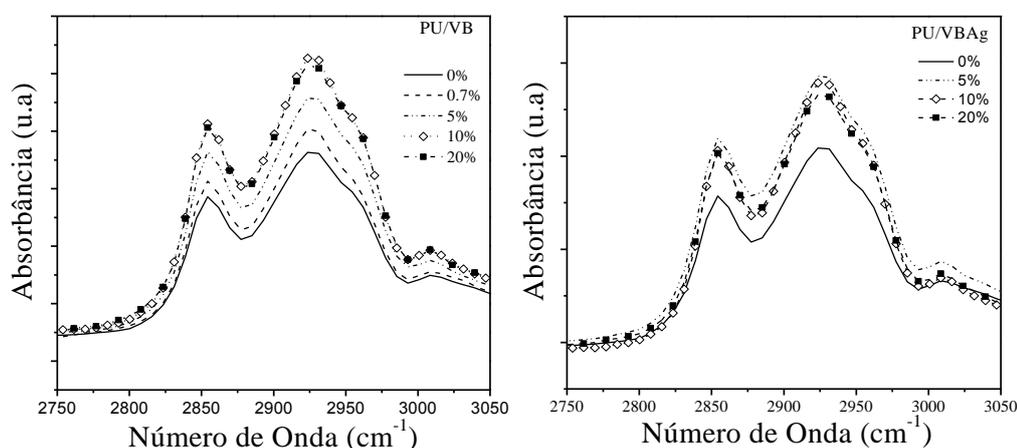


**Figura 28** - Espectros FT-IR de polímero puro, PU (a) carbonila, (b) grupos isocianatos (c) Estiramento assimétricos (d) Estiramento simétricos de ligações de carbonila -C-H.

Foi possível avaliar um significativo caráter alifático do óleo de mamona (ligações C-H em  $2980\text{--}2940\text{ cm}^{-1}$ ). Todos os polióis apresentaram uma banda intensa de ligações

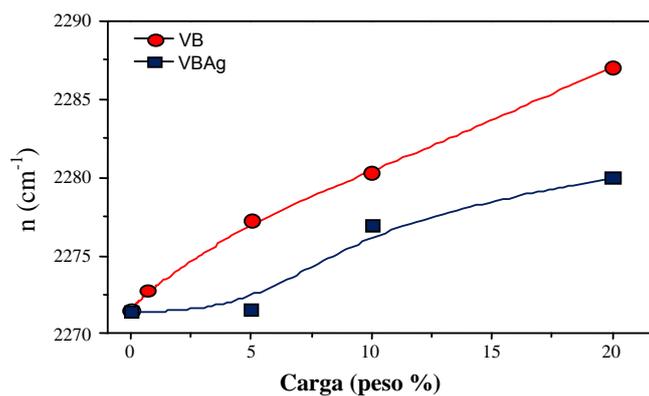
O-H em  $4000\text{ cm}^{-1}$ , e de C–O relativos aos éteres e ésteres presentes nas estruturas ( $1100$  e  $1210\text{ cm}^{-1}$ ). A absorção em  $1700\text{ cm}^{-1}$  é muito intensa no espectro de óleo de mamona devido a predominância de estruturas tipo poliéster.

Quando a cura do polímero é completada, a vibração de isocianatos tende a desaparecer, enquanto as linhas espectrais correspondentes a ligações de estiramento simétrico e assimétrico de carbonilas ( $2855\text{ cm}^{-1}$  e  $2926\text{ cm}^{-1}$ ) aumentam. Após a inclusão de VB e VBAG, as bandas de vibração para as ligações C-H com a carbonila mostraram grande intensidade, como pode ser observado na Figura 29. Este resultado sugere um aumento na cura do polímero com a adição de VB e isto é claramente dependente da concentração para compósitos PU/VB.



**Figura 29** - Espectros FT-IR mostrando a absorção correspondente as ligações C-H com grupos carbonilas em compósitos PU/VB e PU/VBAG.

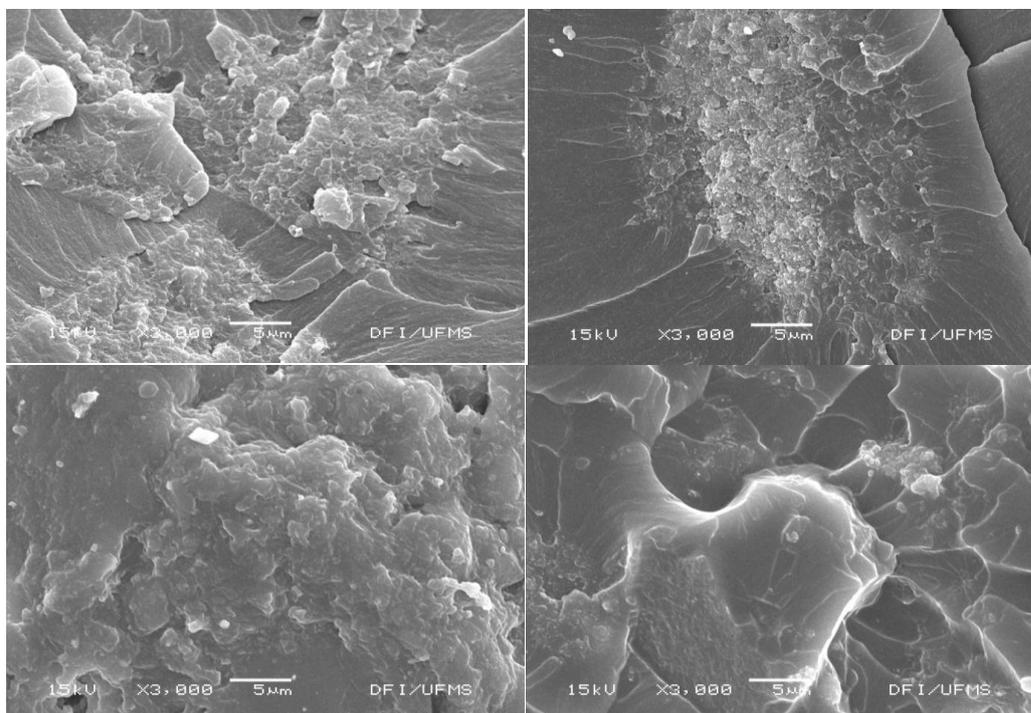
A energia de vibração de grupos isocianatos aumenta com a inclusão de VB e VBAG. No entanto, o VB apresentou maior influência na energia de vibração como pode ser observado na Figura 30. Este resultado pode ser atribuído à distorção na molécula de isocianato, devido à mudança do empacotamento da matriz polimérica com a adição de VB. Este resultado está de acordo com os resultados de DRX, que sugere uma estrutura mais desordenada para os compósitos PU/VB e PU/VBAG.



**Figura 30** - Mudança no comprimento de onda ( $n$ ) da vibração de grupos isocianatos como função da concentração de carga (filler). As linhas pontilhadas são unicamente um guia para os olhos.

### 5.3 Microestrutura e Bioatividade em SBF dos compósitos de Polímero/VB

A morfologia das superfícies fraturadas das amostras, obtidas por medidas de MEV estão apresentadas na Figura 31. Os compósitos com 5 e 20% de VB e VBaAg foram escolhidos para serem representantes de todas as composições.



**Figura 31** - Micrografias MEV de PU/VB (coluna esquerda) e PU/VBaAg (coluna direita). Amostras na primeira linha tem 5% de vidro bioativo e 20% na segunda linha.

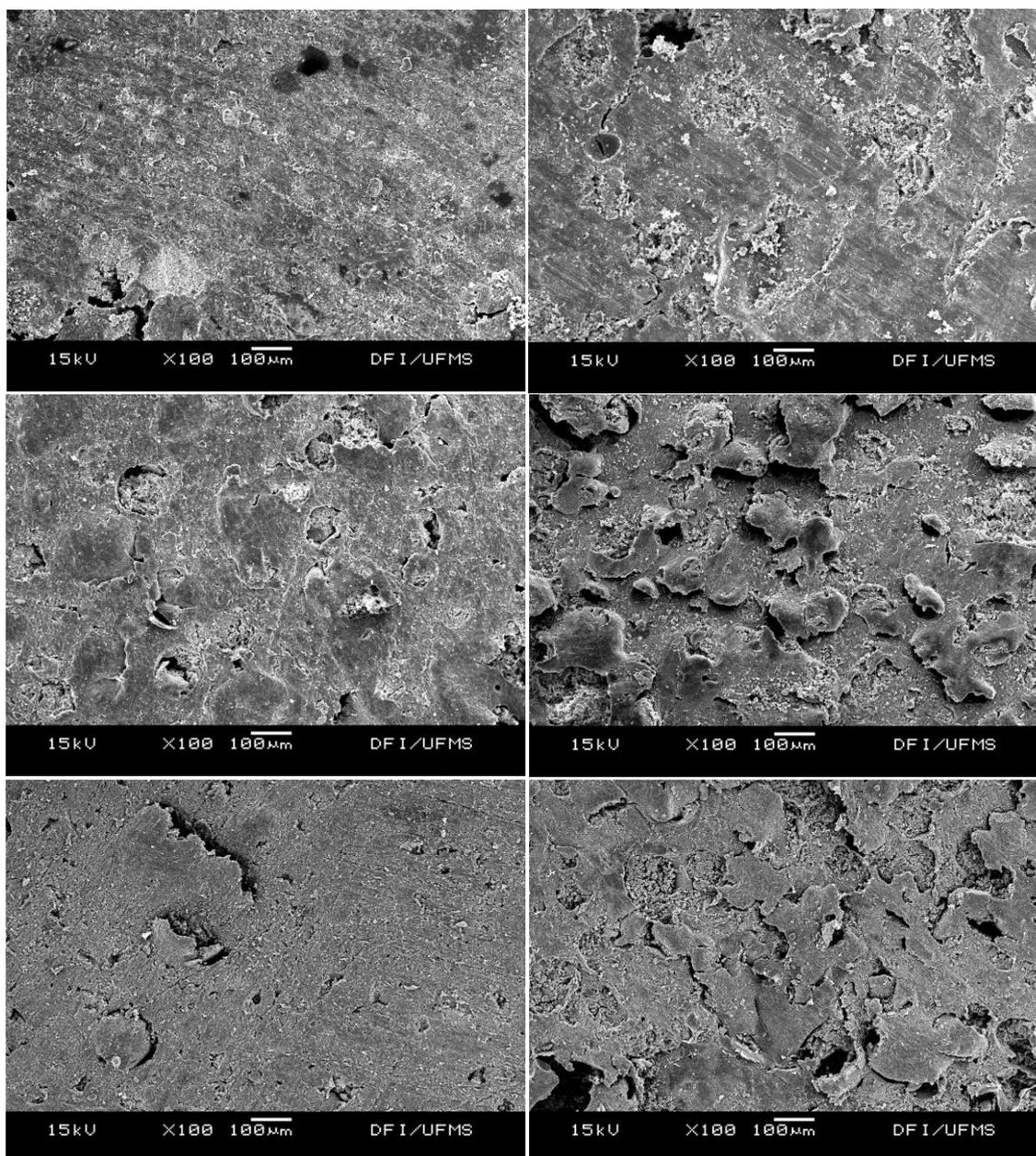
Duas regiões diferentes são identificadas na Figura 31. Há aglomerados que são compósitos de VB com polímero embebidos na matriz polimérica. As partículas de VB dispersam melhor que as VBAG e formaram grandes aglomerados com fronteiras menos definidas. Este resultado pode ser atribuído ao potencial de ligação de hidrogênio entre PU e VB, porque os grupos hidroxilas presentes na superfície do VB são capazes de formar pontes de hidrogênio, provavelmente, com os segmentos rígidos do poliuretano. Uma maior afinidade desses grupos hidroxilas apresentados pelo VB em comparação ao VBAG poderia ser responsável pela maior dispersão na matriz polimérica como vimos nas caracterizações físico-químicas dos VBA no item 5.1.

A morfologia das amostras observadas no MEV está de acordo com os resultados observados pelo DRX. A melhor dispersão do VB na matriz polimérica pode estar associada à maior influência do VB sobre o desordenamento do PU, como observado pela diminuição do halo na difração de raios-X.

A Figura 32 mostra micrografias de compósitos com 20% em massa de VB e VBAG após terem sido imersas em SBF por 0, 10 e 20 dias. As micrografias revelam dois processos quase que simultâneos, mas distintos entre si. Um é a degradação do polímero e outro é a formação de hidroxiapatita na superfície dos compósitos.

Verifica-se que em presença de SBF os defeitos (trincas e poros) aumentam significativamente, colocando em evidência as regiões com diferentes conteúdos de VB e VBAG. Este processo é significativamente mais intenso nas amostras, contendo VBAG nas quais o compósito sofre até mesmo uma esfoliação e placas se destacam da superfície. Isso reflete e corrobora todos os resultados anteriores que indicam uma interação entre PU e carga bastante diferente para VB e VBAG.

A inclusão dos vidros bioativos aumenta a porosidade do polímero, causando uma maior infiltração do SBF. Isso, por outro lado, aumenta a degradação do polímero e o contato das partículas de vidro com o SBF. Fechando o ciclo, um maior aumento da porosidade ocorre tanto pela degradação do polímero quanto pela dissolução, seguido de recristalização das partículas de vidro. Tal fato torna-se um ciclo fechado com realimentação positiva.

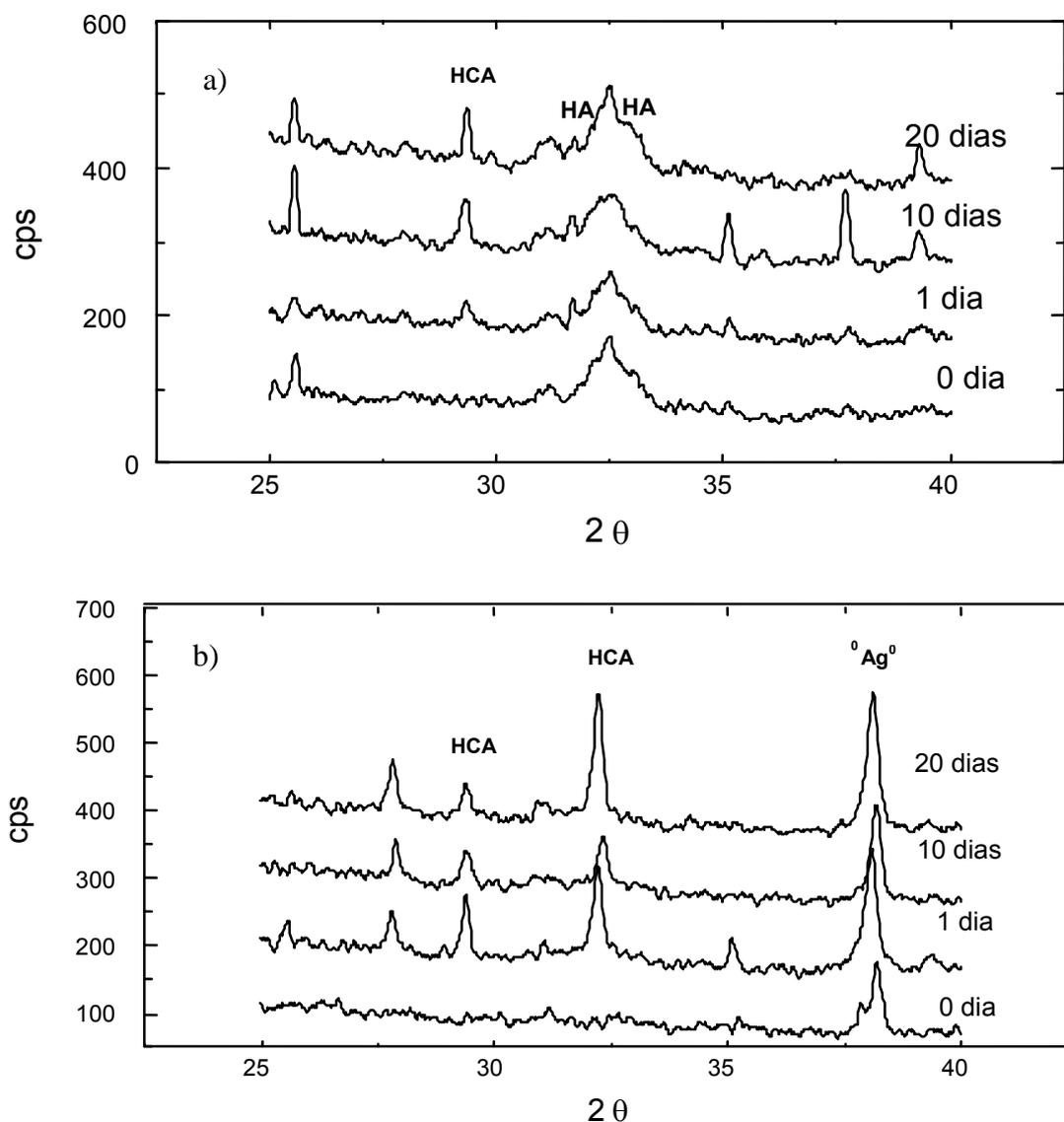


**Figura 32** - Micrografias MEV de polímeros com 20% VB (esquerda) e 20% VBAG (direita). Zero dias em SBF na primeira linha, 10 dias na segunda linha e 20 dias na terceira linha.

A melhor dispersão do VB em comparação com o VBAG faz que, finalmente, aos 20 dias de exposição, se forme uma superfície plana de partículas pequenas de hidroxiapatitas no compósito com VB e uma mistura de placas de hidroxiapatitas com partículas pequenas e aglomerados de partículas grandes no compósito com VBAG.

Em adição a esta evidência morfológica da diferença nas cinéticas de formação (cristalização) de hidroxiapatita, temos os difratogramas de raios-X (Figura 33) obtidos para os compósitos imersos em SBF por vários períodos. Enquanto que os compósito com

VBAg favorecem fortemente a formação de hidroxiapatita carbonatada; o compósito com VB apresenta a formação da hidroxiapatita além da hidroxiapatita carbonatada.



**Figura 33** – Difratoogramas de raios-X dos compósitos para vários períodos de exposição em SBF.a) Compósito com VB b) compósito com VBAg onde HA = Hidroxiapatita, HCA = Hidroxiapatita Carbonatada e Ag = Prata

#### 5.4 Avaliação microscópica dos implantes ósseos *in vivo*

Para a realização da análise do comportamento dos compósitos implantados, levaremos em conta dois fatores: a) a quantidade (presença) de material polimérico em

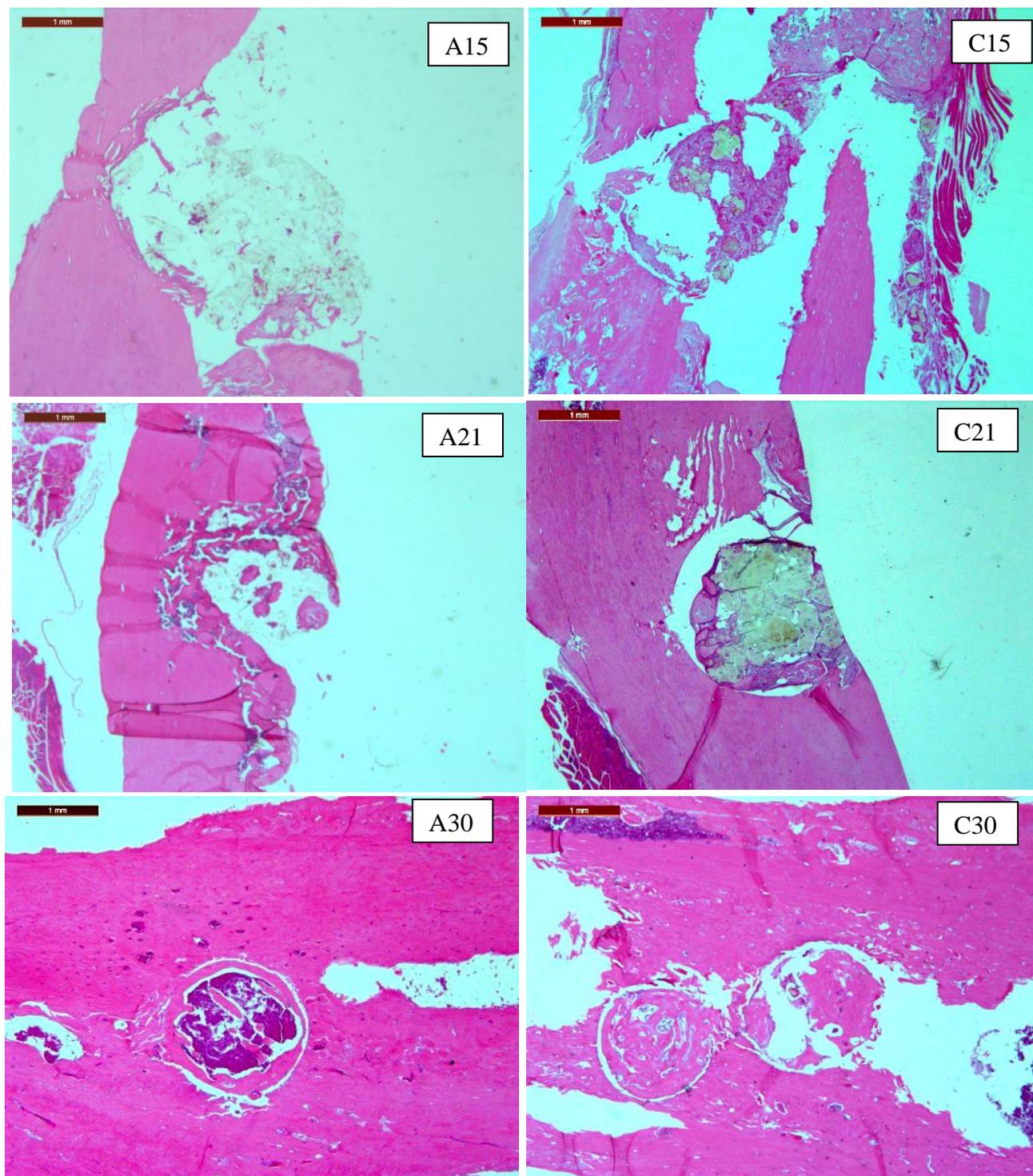
função do tempo e b) a presença de elementos indicativos do processo de crescimento ósseo. Esses elementos seriam osteócitos, osteoblastos e trabéculas ósseas. A diminuição do material polimérico é indicativo da degradação e reabsorção do implante e, portanto, uma medida da biodegradabilidade do mesmo, enquanto que a presença de células e trabéculas é uma medida da osteocondutividade e possível osteoindutividade do compósito.

#### 5.4.1 Estudo da biodegradabilidade do compósito

A Figura 34 mostra imagens de cortes histológicos dos grupos A e C (implantes de polímero com 20 e 50% de concentração de VB respectivamente) nos tempos de observação 15, 21 e 30 dias. As imagens foram obtidas com aumento 25 X.

As amostras com apenas 15 dias de observação apresentam ainda muito polímero, mas com o passar dos dias a quantidade do compósito diminui significativamente e com 30 dias o polímero foi quase totalmente reabsorvido. Para este tempo, ambas as amostras apresentam quase que somente componentes ósseos ou formadores ósseos.

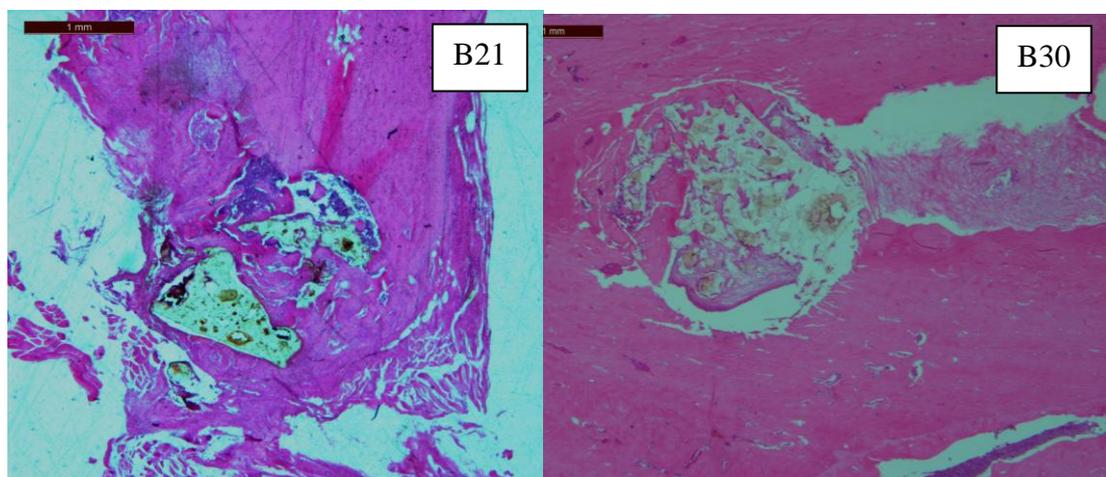
Comparando as amostras com o mesmo tempo de implante, mas com quantidades de VB diferentes, observamos que a biodegradabilidade do compósito com maior quantidade de VB é significativamente maior. Isto se torna mais evidente para as amostras com 15 e 30 dias.



**Figura 34** – Cortes histológicos dos grupos A (polímero com 20%VBA) e C (polímero com 50% VBA) com tempos de observação 15, 21 e 30 dias.

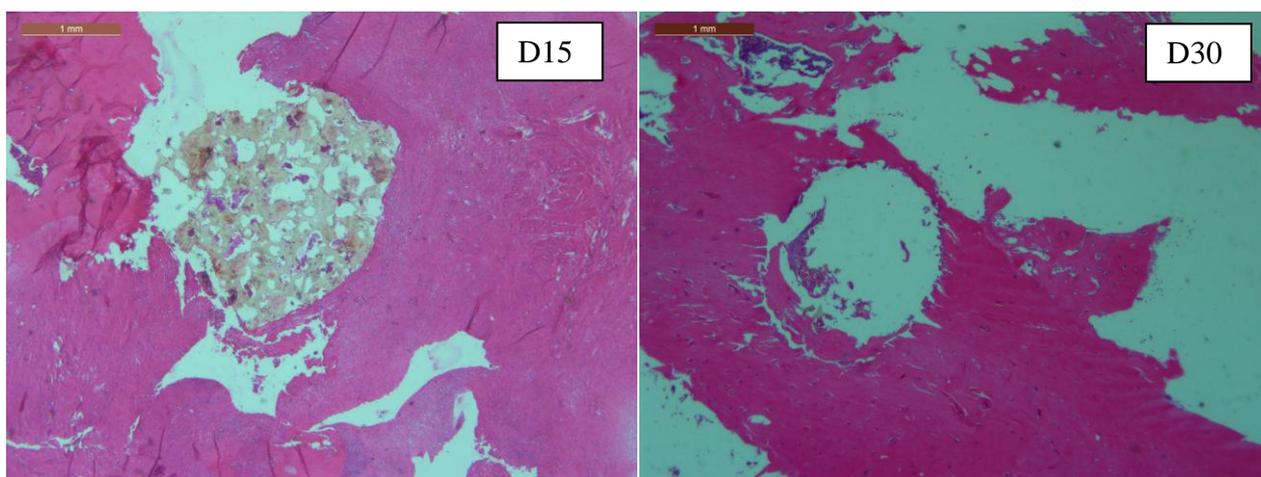
Notamos que os animais dos grupos B e D, que receberam 20 e 50 % VB dopados com 5% molar de Prata (VBAg), respectivamente, apresentaram muita dificuldade para a retirada dos implantes, devido a uma grande formação de tecido fibroso ao redor dos implantes.

A Figura 35 apresenta o Grupo B em 21 e 30 dias em aumentos de 2,5X. Nota-se que, mesmo após 30 dias, há presença de muito polímero e algumas regiões bem escuras devido à prata. No entanto, com 30 dias, o osso não foi totalmente neoformado; houve presença de trabéculas ósseas no interior do defeito preenchido com polímero.



**Figura 35** - Cortes histológicos dos grupos B (polímero com 20% VBAg) tempos de observação 21 e 30 dias

A Figura 36 apresenta o grupo D em 15 e 30 dias em aumentos de 2,5X. Podemos observar que o defeito com 15 dias apresenta ainda muito polímero e com 30 dias vemos apenas o defeito, sem polímero e sem tecido ósseo, sugerindo que o compósito não aderiu ao osso.



**Figura 36** - Cortes histológicos dos grupos D (polímero com 50% VBAg) tempos de observação 15 e 30 dias.

Em contradição com os testes em SBF, nos quais as amostras dopadas com prata se apresentaram mais biodegradáveis, nos testes *in vivo*, o compósito não foi reabsorvido integralmente, mesmo após 30 dias de implante. Isso pode ser explicado possivelmente pelo seu encapsulamento em tecido fibroso reduzindo a irrigação pelo fluido corpóreo.

Em consequência, podemos dizer que os testes *in vitro* são muito limitados para se concluir inequivocamente sobre as potencialidades de um biomaterial, uma vez que não levam em conta inúmeros processos fisiológicos que irão interferir nos processos de reabsorção, osteocondução e osteoindução.

Em adição à avaliação qualitativa realizada sobre a biodegradabilidade, baseada em alguns parâmetros mais quantitativos serão apresentados a seguir.

#### 5.4.2 Estudo da osteoindução

Para o estudo da Osteoindução, levamos em conta a proliferação de osteoblastos. Quanto maior a proliferação de osteoblastos em função do tempo, maior a osteoindução. Na Tabela 3, estão apresentados os resultados referentes à proliferação de osteoblastos, de acordo com o tempo e o grupo experimental avaliado.

Houve diferença significativa entre os tempos analisados, em relação à proliferação de osteoblastos, tanto no grupo A, em que o defeito ósseo foi preenchido com polímero de mamona com 20% de VB, como no grupo C, em que o defeito ósseo foi preenchido com polímero de mamona com 50% de VB (teste de Kruskal-Wallis, Grupo A:  $p=0,012$ ; Grupo C:  $p=0,003$ ). Em ambos os grupos, o escore de proliferação de osteoblastos após 21 e 30 dias foi significativamente maior do que aquele observado após 15 dias (pós-teste de Dunn,  $p<0,05$ ).

**Tabela 3** - Resultados referentes à proliferação de osteoblastos, de acordo com o tempo e o grupo experimental avaliado.

Tempo	Escore de proliferação de osteoblastos			
	VB		VB + Ag (Polim)	
	A 20%	C 50%	B 20%	D 50%
<b>15 dias</b>	1 (2) Ba	1 (2) Ba	1 (2) Aa	3 (2) Aa
<b>21 dias</b>	3 (1) Aa	3 (0) Aa	2 (2) Aa	2 (3) Aa
<b>30 dias</b>	3 (1) Aa	3 (0) Aa	3 (2) Aa	3 (3) Aa

Os dados estão apresentados na forma de mediana (faixa de variação). Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os dias. Mesmas letras minúsculas nas linhas indicam diferença não significativa entre os tratamentos.

Comparando, agora, os grupos que receberam polímeros com VBA com e sem prata, observamos, ainda na Tabela 3, que nos grupos B e D, em que o defeito ósseo foi preenchido com polímero de mamona com 20% e 50% de VB, dopado com prata, respectivamente, não houve diferença entre os tempos, em relação ao escore de proliferação de osteoblastos (teste de Kruskal-Wallis, Grupo B:  $p=0,071$ ; Grupo D:  $p=0,720$ ).

Em nenhum dos tempos analisados houve diferença entre o grupo A e o Grupo B, em relação ao escore de proliferação de osteoblastos (teste de Mann-Whitney, 15 dias:  $p=1,000$ ; 21 dias:  $p=0,548$ ; 30 dias:  $p=0,690$ ). Com relação aos grupos C e D, também não houve diferença em nenhum dos tempos analisados em relação ao escore de proliferação de osteoblastos (teste de Mann-Whitney, 15 dias:  $p=0,063$ ; 21 dias:  $p=0,190$ ; 30 dias:  $p=0,310$ ).

#### 5.4.3 Estudo da Osteocondução

Neste caso, consideramos o número de trabéculas ósseas neoformadas ligado à osteocondução do biomaterial. Quanto maior o número de trabéculas ósseas neoformada em menor tempo, melhor é a propriedade osteocondutora do material.

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados referentes à trabécula óssea neoformada, de acordo com o tempo e o grupo experimental avaliado.

Houve diferença significativa entre os tempos analisados, em relação à neoformação de trabécula óssea, tanto no grupo A como no grupo C (teste de Kruskal-Wallis, Grupo A:  $p=0,008$ ; Grupo C:  $p<0,001$ ). No grupo A, o escore de trabécula óssea neoformada após 21 dias foi significativamente maior do que aquele observado após 15 dias (pós-teste de Dunn,  $p<0,05$ ). Já no grupo C, o escore de trabécula óssea neoformada após 30 dias foi significativamente maior do que aquele observado após 15 dias (pós-teste de Dunn,  $p<0,05$ ).

**Tabela 4** - Resultados referentes à trabécula óssea neoformada, de acordo com o tempo e o grupo experimental avaliado.

Tempo	Escore de trabécula óssea neoformada			
	VB		VB + Ag (Polim)	
	A 20%	C 50%	B 20%	D 50%
<b>15 dias</b>	0 (0) Ba	0 (0) Ba	0 (2) Aa	0 (0) Aa
<b>21 dias</b>	3 (1) Aa	3 (2) ABa	2 (2) Aa	1 (3) Aa
<b>30 dias</b>	3 (3) ABa	3 (0) Aa	3 (3) Aa	3 (3) Aa

Os dados estão apresentados na forma de mediana (faixa de variação).

Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os dias.

Mesmas letras minúsculas nas linhas indicam diferença não significativa entre os tratamentos.

Comparando os grupos com e sem prata na composição notamos que em nenhum dos tempos analisados, houve diferença entre o grupo A e o Grupo B em relação ao escore de trabécula óssea neoformada (teste de Mann-Whitney, 15 dias:  $p=0,310$ ; 21 dias:  $p=0,310$ ; 30 dias:  $p=1,000$ ) e também não houve diferença entre o grupo C e D, em relação ao escore de trabécula óssea neoformada (teste de Mann-Whitney, 15 dias:  $p=1,000$ ; 21 dias:  $p=0,286$ ; 30 dias:  $p=0,310$ ).

#### 5.4.4 Estudo da Degradação do compósito PU/VBA e PU/VBAg

Na Tabela 5, estão apresentados os resultados referentes à degradação do material, de acordo com o tempo e o grupo experimental avaliado.

Constatou-se que houve diferença significativa entre os tempos analisados, em relação à degradação do material, tanto no grupo A como no grupo C.

Nestes dois grupos, o escore de degradação do material após 30 dias foi significativamente maior do que aquele observado após 15 dias (pós-teste de Dunn,  $p < 0,05$ ). Além disso, no grupo C, o escore de degradação do material após 21 dias também foi significativamente maior do que aquele observado após 15 dias (pós-teste de Dunn,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 5** - Resultados referentes à degradação do material, de acordo com o tempo e o grupo experimental avaliado.

Tempo	Escore de degradação do material			
	VB		VB + Ag (Polim)	
	A 20%	C 50%	B 20%	D 50%
<b>15 dias</b>	1 (1) Aa	1 (1) Aa	1 (3) Aa	1 (0) Ba
<b>21 dias</b>	2 (2) ABa	1 (3) Aa	3 (2) Aa	2 (2) ABa
<b>30 dias</b>	3 (1) Aa	3 (1) Aa	2 (2) Aa	3 (1) Aa

Os dados estão apresentados na forma de mediana (faixa de variação).

Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os dias. Mesmas letras minúsculas nas linhas indicam diferença não significativa entre os tratamentos.

Comparando-se os grupos que receberam VBA com prata e sem prata, em nenhum dos tempos analisados, houve diferença entre o grupo A e B, em relação ao escore de degradação do material (teste de Mann-Whitney, 15 dias:  $p=0,841$ ; 21 dias:  $p=0,686$ ; 30 dias:  $p=0,310$ ) e também não houve diferença, em nenhum dos tempos analisados entre os grupos C e D em relação ao escore de degradação do material (teste de Mann-Whitney, 15 dias:  $p=0,413$ ; 21 dias:  $p=0,343$ ; 30 dias:  $p=1,000$ ).

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com as discussões feitas neste trabalho, pode-se concluir que a estrutura dos VB's pode ser estabilizada em 600 °C para todas as composições estudadas.

A inclusão de prata na matriz vítrea diminui a sua higroscopicidade o que nos levaria a supor preliminarmente que quanto maior a quantidade de prata na matriz menor a solubilidade e, portanto, menor a biodegradabilidade.

A prata altera a cinética de cristalização do vidro, uma vez que as amostras sem Ag cristalizaram-se, principalmente, como HA e as amostras contendo 3 e 5% de Ag cristalizaram-se nas fases HA, sílica e Ag metálica.

A inclusão de partículas de VB ou VBAG na matriz polimérica causou primordialmente uma perda de cristalinidade dos segmentos rígidos do polímero. Em outras palavras, a parte polimérica do compósito permaneceu amorfa com inclusão de partículas acima de 20% em peso. Isso tem como consequência, em polímeros biodegradáveis, aumento de porosidade e um aumento da biodegradabilidade.

As partículas de VB ficaram mais bem dispersas na matriz que as partículas de VBAG e, assim, foram esperados que a heterogeneidade e porosidade dos compósitos com VBAG fossem muito maiores, tendo como consequência uma maior degradabilidade do polímero com prata. De fato, os testes de bioatividade *in vitro* mostraram que os compósitos com VBAG foram muito mais degradados para o mesmo tempo de exposição. Devido a isso, as partículas ficaram com o decorrer do tempo de exposição ao SBF, muito mais expostas e em contato com o SBF nos compósitos contendo VBAG e a deposição de HA foi mais intensa.

No entanto, enquanto no compósito com VBA ocorreu a deposição de HA, no com VBAG ocorreu a deposição de HA carbonatada.

Desses resultados preliminares, esperava-se que a menor solubilidade do VBAG fosse compensada pela maior degradabilidade da matriz polimérica contendo este tipo de vidro. Os testes *in vivo* não corroboraram esta conclusão prévia.

Os testes *in vivo* mostraram que os compósitos com VBAG causaram a formação de tecido fibroso em torno do implante, dificultando sua adesão ao osso. Dessa forma, a degradação do compósito contendo prata ficou bastante comprometida. No entanto, onde

ocorreu adesão, o desenvolvimento do osso parece ter seguido velocidade semelhante para amostras com ou sem prata.

De forma geral, compósitos de poliuretana e vidros bioativos parecem aumentar a degradabilidade, a deposição de hidroxiapatita e a velocidade de crescimento ósseo.

## 7 PROPOSIÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

É interessante investigar proximamente:

- Uma composição contendo prata em menor quantidade para evitar respostas inflamatórias;
- Adição de outros íons influentes nos processos inflamatórios ou no processo de regeneração óssea;
- Controlar a macroporosidade dos compósitos para investigar a osteocondutividade mais precisamente;
- Utilizar animais de maior porte e com velocidade de regeneração óssea mais lenta para podermos investigar no tempo o progresso radial do crescimento ósseo. Utilizando implantes de maior diâmetro;
- Inserir o compósito polímero de mamona com vidro bioativo em ossos medulares.
- Diminuir o número de grupos estudando aumentando o número de ratos por grupo para obter melhorias nas análises estatísticas.



## REFERÊNCIAS

Aguiar H, Solla EL, Serra J, Gonzalez P, Leon B, Malz F, Raman and NMR study of bioactive Na<sub>2</sub>O-MgO-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2008; 345(45):5004-8.

Aina V, Perardi A, Bergandi L, Malavasi G, Menabue L, Morterra C, Ghigo D, Cytotoxicity of zinc-containing bioactive glasses in contact with human osteoblasts. *Chemico-Biol. Interact.* 2007; 167(3) 207-18.

Akerman M, Natureza, estrutura e propriedades do Vidro, Centro técnico de elaboração do vidro- CETEV [on line], Nov 2000 [acesso em 2 de agosto de 2011]. Disponível em: <http://www.saint-gobain.cetev.com.br/ovidro/vidro.pdf>

Alves OL, Vidros. [Edição Especial]. *Química Nova na Escola*. 2001; 9-20.

Andrade CT, Coutinho FMB, Dias ML, Lucas EF, Oliveira CMF, Tabak D., *Dicionário de polímeros*, Rio de Janeiro, Editora Interciência, 2001, p. 29.

Anunmana C, Anusavice KJ, Mecholsky Jr. JJ, Interfacial toughness of bilayer dental ceramics based on a short-bar, chevron-notch test. *Dental Materials*. 2010; 26, 111-7.

Araujo, E. B. Vidro: uma breve história, técnicas de caracterização e aplicações na tecnologia. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, 1997; 19(3): 325-9.

Balamurugan A, Rebelo AHS, Kannan S, Ferreira JMF, Michel J, Balossier G, et al. Characterization and in vivo evaluation of sol-gel derived hydroxyapatite coatings on Ti6Al4V substrates. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*.2007; 81(2): 441-7.

Balossier G, Balamurugan A, , Michel J, Kannan S, Benhayoune H, Rebelo AHS, Ferreira JMF, Bioglass system  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Mg-P}_2\text{O}_5$  Sol Gel derived – preparation and *in vitro* characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2007;83(2):546-53.

Bellantone M, Coleman NJ, Hench LL. Bacteriostatic action of a novel four-component bioactive glass. *Journal of Biomedical Materials Research*.2000;51(3)484-90.

Beltrão, N. E. de M. A Cadeia da Mamona no Brasil, com Ênfase para o Segmento PeD: Estado da Arte, Demandas de Pesquisa e Ações Necessárias para o Desenvolvimento. Campina Grande: Embrapa – CNPA. 20p., 2004 (Embrapa – CNPA. Documentos, 129).

Bergh JPA, Anatomical aspects of sinus floor elevations. *Clin. Oral Impl. Res.*, Copenhagen, 2000; 11:256-265

Bernardi MIB, Rojas SS, Andreetta MRB, Rastelli ANS, Hernandez AC, Bagnato VS. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2008;94(3):791-796.

Bonfield W, Rea SM, Biocomposites for medical applications, *J. Aust. Ceram. Soc.* 2004;40(1): 43-57.

Borojevic R, Balduino A, Terapias Celulares e Bioengenharia Tecidual. In: Luis MIR. *Genômica*. Editora ATHENEU; 2005:295

Boyne PJ, James RA, Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone, *J. Oral Surg.*, Chicago. 1980;38:613–16.

Brett DW. A discussion of silver as an antimicrobial agent, alleviating the confusion. *Ostomy Wound Management.*, 2006;52(1)34-41.

Cano JM, Hachem A, Ruzafa AG, Rodriguez D, Sabate AF, Santos LA. Sulfato de cálcio associado á gentamicina como material de substituição óssea. *Rev Bras Ortop.*, 1999;34(5): 355-360.

Ciecinska M. Thermal analysis of gel-derived bioactive phospho-silicate glasses. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. v.72, n.1, p. 199-207, 2003.

Claro Neto S, Caracterizações físico-químicas de um poliuretano derivado do óleo de mamona utilizado para implantes ósseos, tese de doutorado, São Carlos, 1997.

Clupper DC, Hench LL. Bioactive response of Ag-doped tape cast Bioglass (R) 45S5 following heat treatment. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*.2001;12(10): 917-21.

Cochran DL, von Arx T, Hermann JS, Schenk RK, Higginbottom FL, Buser D. Lateral ridge augmentation and implant placement: an experimental study evaluating implant osseointegration in different augmentation materials in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001;16(3):343-54.

Cornell CN, Lane JM, Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop*. 1998;355:267-73.

Davies JE, Mechanisms of Endosseous Integration. *International Journal of Prosthodontics*. 1998;11(5):391-401.

De Farias R F, Airoidi C, Síntese e reatividade de sílica lamelar, *Quim. Nova*. 2000;23:88-93.

DeForge DH, Evaluation of Bioglass®/Peroglass synthetic bone graft particulate in the dog and cat, *Journal of Veterinary Dentistry*. 1997;14:141-145.

Del Carlo, R. J.; Kawata, D.; Vilorio, M. I.V.; Oliveira, D. R.; Silva, A. S.; Marchesi, D.R.; Galvão, S. R.; Azevedo, P.; Monteiro, B.S. Polímero derivado de mamona acrescido de cálcio, associado ou não à medula óssea autógena na reparação de falhas ósseas. *Ciência Rural*.2003;33(6):1081-8.

Dias PCJ, Granato L, Ramanho LTO, Oliveira JA, Pretel H, Ricinus Communis biocompatibility histological study in the nose of Cebus paella monkeys. *Braz J Otorhinolaryngol*.2009; 3( 75):350-5.

Dubini M.M., Adsorption in micropores. *L.Colloid interface. Sci*. 1967;23(4):487-499.

Efflandt SE, Magne P, Douglas WH, Francis LF, Interaction between bioactive glasses and human dentin, *Journal of materials science: materials in medicine*. 2002;13: 557-565.

Eisenbach CD, Baumgartner M, Gunter C. In: Lal J, Mark JE, editors. *Advances in elastomers and rubber elasticity*, New York: Plenum. 1986. pp. 51.

Emadi R, Tavangarian F, Roohani Esfahani SI, *Biodegradable and bioactive properties of a novel bone scaffold coated with nanocrystalline bioactive glass for bone tissue engineering*, *Materials Letters*.2010; 64:1528–31.

Ereno D. *Engenharia de materiais próteses de mamona*. *Pesqui. Fapesp*. 2003;91:66-71.

Finnigan B, Martin D, Halley P, Truss R, Campbell K, *Morphology and properties of thermoplastic polyurethane nanocomposites incorporating hydrophilic layered silicates* *Polymer* 2004;45:2249-60.

Franco KL, Borges APB, Vilória MIV, Fernandes ES, Fehlberg AF., *Hidroxiapatita sintética pura, hidroxiapatita sintética associada ao colágeno e hidroxiapatita sintética associada ao lipossoma como substitutos ósseos em defeitos provocados na tíbia de cães: aspectos da osteointegração à microscopia de luz transmitida*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.2001; 53:431-6.

Fujishiro Y, Hench LL., Oonishi H., *Quantitative rates of in vivo bone generation for Bioglass, and hydroxyapatite particles as bone graft substitute*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 8:649-652., 1997

George S, Nair PD, Risbud MV, Bhone RR. *Nonporous polyurethane membranes as Islet immunoisolation matrices – Biocompatibility studies*. *Journal of Biomaterials Applications*.2002;16:327-40.

Goneli, A. L. D. Variação das Propriedades Físico-Mecânicas e da Qualidade da Mamona (*Ricinus Communis* L.) durante a secagem e o armazenamento [Tese], Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais;2008.

Greenspan D C, Zhong J P, La Torre G P, Booher M, 23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society for Biomaterials, New Orleans, EUA, 1997.

Guerra Neto MD, Polyhydroxybutyrate-Bioglass Composite Characterization regarding Morphology and Microhardness, *Revista Matéria*. 2005;10(1):31-36.

Guillemin G, Patat JL, Fournie J, et al. The use of coral as a bone graft substitute. *J. Biomed Mater Res*. v. 21, n.5, p. 557-567, 1987.

Halasa AF, Wathen GD, Hsu WL, Matrana BA, Massie JM. *Journal of Applied Polymer Science* 1991;43:183-190.

Helmus MN, Tweden K. *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*, Part A – Wise D, Trantolo DJ, Altobelli D E, Yaszemski M J, Gresser J D, Schwartz ER. (NewYork: Marcel Dekker) – 1995

Hemmerle J, Leize M, Voegel JC. Long-term behavior of a hydroxyapatite collagen-glycosaminoglycan biomaterial used for oral-surgery - a case-report. *J. Mat. Sci.- Mat. In Medic*.1996;6:360-6.

Hench LL, *Bioceramics*. *J. Am. Ceram. Soc.*1998;81(7):1705–28.

Hench LL, The story of Bioglass. *J. Mater. Sci: Mater. Med.*2006;17: 967-78.

Hench LL. Bioceramics: From Concept to clinic, *J. Am. Ceram. Soc.*, 1991;74(7):1487-1510.

Huang WH, Day DE, Kittiratanapiboon K, Rahaman MN. Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine.* 2006;17(7):583-96.

Hulbert S F, Cooke F W, Compatibility of bioceramics with physiological environment. *Biomed. Mater. Symp.*1970;4(1).

Hull D. "An introduction to composite materials". Cambridge University Press, New York, 1981.

Ignácio H, Mazzer N, Barbieri CH, Chierici G. Uso da poliuretana derivada do óleo de mamona para preencher defeitos ósseos diafisários segmentares do rádio: estudo experimental em coelhos. *Rev Bras Ortop* 1997; 32(10):815-21.

Jacques JW, Fagundes DJ, de Figueiredo AS, Inouye CM, Scapulatempo RP, Sassioto MCP, et al. The role of the ricin polyurethane as substitute of the bone autogenous graft in rabbits. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias* . 2004;31(4):236-41.

Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic. *Journal of Biomedical Materials Research*.1990;24(6):721-34.

Lemos AF, Ferreira JMF. Porous bioactive calcium carbonate implants processed by starch consolidation. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*.2000;11(1):35-40.

Lepparanta O, Vaahtio M, Peltola T, Zhang D, Hupa L, Hupa M, et al. Antibacterial effect of bioactive glasses on clinically important anaerobic bacteria in vitro. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*. 2008;19(2):547-51.

Li R, Clarck AE, Hench LL, *J. Appl. Biomat*.1992;2:231.

Liau SY, Read DC, Pugh WJ, Furr JR, Russell AD. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups, relationship to the antibacterial action of silver ions. *Letters in Applied Microbiology*. 1997;25(4):279-83.

Lyczak JB & Schechter PJ. Nanocrystalline silver inhibits antibiotic-antiseptic-resistant bacteria. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2005;77(2):60.

Mano EB, Mendes LC, “Introdução a Polímeros”, Editora Edgard Blucher, São Paulo, 1999.

Marion NW, Liang W, Reilly GC, Day DE, Rahaman MN, Mao JJ. Borate glass supports the in vitro osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Mechanics of Advanced Materials and Structures*. 2005;12(3): 239-46.

Misch CE, Objective vs subjective methods for determining vertical dimension of occlusion. *Quintessence International*. 2000;31(4):280-2.

Monem AS, ElBatal HA, Khalil EMA, Azooz MA, Hamdy YM. Hamdy, In vivo behavior of bioactive phosphate glass-ceramics from the system  $P_2O_5$ - $Na_2O$ - $CaO$  containing  $TiO_2$ . *J Mater Sci: Mater Med*.2008;19(3):1097-108.

Moursi AM, Winnard AV, Winnard PL, Lannutti JJ, Seghi RS, Enhanced osteoblast response to a polymethylmethacrylate–hydroxyapatite composite. *Biomaterials*. 2002;23:133-144.

Mozafari M, Moztarzadeh F, Tahriri M, Investigation of the physico-chemical reactivity of a mesoporous bioactive  $SiO_2$ – $CaO$ – $P_2O_5$  glass in simulated body fluid, *Journal of Non-Crystalline Solids* 2010;356:1470–8.

Nasser RS, Estudo do comportamento do polímero de mamona como material de substituição óssea em defeito diafisário no fêmur de ratos frente a alterações secundárias à associação com nanopartículas de sílica e zircônia. Dissertação de Mestrado, UFMS, Campo Grande, 2009.

Nielsen TB, Hansen CM, *Polym. Degrad. Stab.* 89 (2005) 513.

Ning J, Yao A, Wang DP, Huang WH, Fu HL, Liu X, et al. Synthesis and in vitro bioactivity of a borate-based bioglass. *Materials Letters*.2007; 61(30):5223-6.

Ohara GH, Kojima KE, Rossi JC, Telles M, Soares TVC, Salomão C. Estudo experimental da biocompatibilidade do polímero poliuretano da mamona implantada intra - óssea e intra - articular em coelhos. *Acta Ortop Bras* 1995; 3(2):62-8.

Ohtsuki C, Kokubo T, Yamamuro T, J. *Non-Cryst. Solids*. 1992;143: 84.

Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Kushitani S & Iwaki H, Comparative bone ingrowth behavior in granules of bioceramic material of various sizes. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1999;44:31-43.

Penghua Y, Jinqing W, Sheng L, Junfei O, Ziqiang L, Shengrong Y, “Green” synthesis of highly ordered mesoporous bioactive glass using acetic anhydride as the catalyst, *Journal of Non-Crystalline Solids*. 2010; 356:1514-1518.

Pereira M M, Clark A E, Hench L L, *J. Mater. Synth. Process*.1994;2:189.

Pukánszky BJ, Bagdi K, Tóvölgyi Z, Varga J, Botz L, Hudak S, Dóczy T, *European Polymer Journal* 2008;44:2431-38.

Rabello MS, “Aditivação de Polímeros”, Editora Artliber, São Paulo, 2000, págs. 80 a 85.

Rabello MS, Tocchetto RS, Barros LA, D'Almeira JRM, White JR, *Plastics Rubbers and Composites*, 30 (2001) 132.

Radin S, Ducheyne P, Reicin K E, Lee M H, 23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Society for Biomaterials, New Orleans, EUA, 1997.

Rovira A, Bareille R, Lopez I, Rouais F, Bordenave L, Rey C, Rabaud M. Preliminary-report on a new composite-material made of calcium-phosphate, elastin peptides and collagens. *J. Mater. Sci.*1993;4:372-80.

Saiani A, Daunch WA, Verbeke HJ, Leenslag W, Higgins JS. *Macromolecules* 2001;34:9059-68.

Saidi LF, Mortensen K. Almdal, *Polym. Degrad. Stab.* 82 (2003) 451.

Sanches, RC, *Nucleação e Cristalização de Vidros  $20\text{Li}_2\text{O}80\text{TeO}_2$* . [Dissertação]. Ilha Solteira, SP, 2007.

Schettert, SI, *Estudo morfológico da regeneração óssea em coelhos submetidos a complementação de cálcio na alimentação*. São Paulo, 1999. Tese.

Scholze H, *Glass nature, Structure and Properties*, Ed. Springe–Verlag, United States, 1991.

Shott S, *Statistics for health professionals*. London: W.B. Saunders Company, 1990.

Silva Júnior PE, Compósitos bioativos obtidos a partir da inserção de vidro bioativo em matriz de poli (metacrilato de metila), *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2001;11(3):109-115.

Smith, J.C. Knowles, J. *Mater Sci* 2007;42: 9827.

Strnad Z, Strnad J, Povysil C, Urban K, Effect of plasma-sprayed hydroxyapatite coating on the osteoconductivity of commercially pure titanium implants. *International Journal Of Oral & Maxillofacial Implants*. 2000;15(4): 483-90.

Suarez JCM, Biasi RS, *Polym. Degrad. Stab*.2003; 82:221.

Sykaras N, Iacopino A M, Marker VA, Triplett RG, Woody R D. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review, *The International journal of oral & maxillofacial implants*2000;15(5): 675-90.

Tatum H, Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dental Clinics North America*, Philadelphia.1986;30: 207-229.

Van Eeden, SP, Ripamonti U, Bone differentiation in porous hydroxyapatite in baboons is regulated by the geometry of the substratum: implications for reconstructive craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1994;93(4):959-66.

White E, Shors EC, Biomaterial aspects of interpore 200 porous hydroxyapatite. Dent Clin North Am. 1986;30(1):49-67.

Wijnhoven SWP, Peijnenburg W, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EHW, Nano-silver - a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. Nanotoxicology. 2009;3(2):109.

Wilke W. Colloid & Polymer Science 1983;261:656-60.

Williams DF, Dictionary of Biomaterials, Liverpool University Press, (1999)

Wilson N D, "Bonding of Soft Tissues to Bioglass®", in Handbook of Bioactive Ceramics vol. 1: Bioactive Glasses and Glass-Ceramics, edited by T. Yamamuro, L.L. Hench and J. Wilson (CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990).

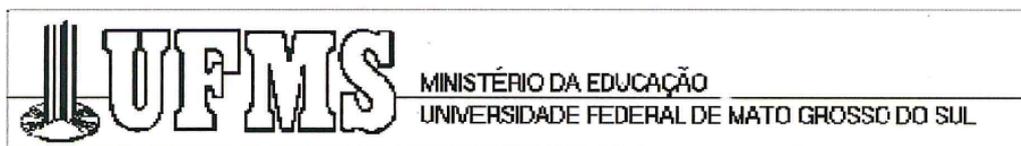
Wilson J, Anales de Química 1997, 93, 15.

Zaffe D., Review- Some considerations on biomaterials and bone. Micron. 2005;36:583-592.



## ANEXO I

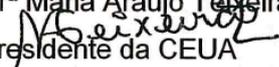
## PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÉ DE ÉTICA DOS ANIMAIS



## C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 189/2008 da Mestranda Pollyanna Daniella Candelorio, sob a orientação da Prof. José Renato Jurkevicz Delben, referente ao projeto de pesquisa “**Estudo e caracterização de compósitos de poliuretana e vidros bioativos dopados e não dopados com prata**”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 24 de outubro de 2008.

Campo Grande (MS), 25 de outubro de 2008.

Dr<sup>a</sup> Maria Araújo Teixeira  
  
Presidente da CEUA



### ANEXO III

#### Protocolo para preparação de Simulated Body Fluid (SBF).

1. Lavar bem a parede da garrafa e do bastão de um vidro com solução 1N-HCl, detergente neutro, e água destilada deionizada. Secar bem.
2. Colocar 500 mL de água destilada deionizada em uma garrafa de polietileno e fechá-la com tampa de vidro.
3. Com a agitação da água de um agitador magnético e dissolva os reagentes, um a um na ordem dada na tabela abaixo (um após o outro após totalmente dissolvido).
4. Ajustar a temperatura da solução a 36,5°C em banho Maria, e ajuste o pH da solução em pH 7,40 agitando-a e titulando com uma solução de HCl 1N gota a gota.
5. Transferir a solução da garrafa de polietileno para um frasco volumétrico de vidro. Adicione água usada para lavar a garrafa de polietileno ao frasco da solução.
6. Ajustar o volume total da solução a um litro pela adição de água destilada deionizada, e agite o frasco a 20°C.
7. Transferir a solução do frasco à garrafa de polietileno e estoque a garrafa no refrigerador a 5-10°C (se ocorrerem precipitados não use essa solução nem seu container novamente).

Reagentes para a preparação de SBF (pH7.40, 1L)

Ordem	Reagente	Quantidade
(1)	NaCl	7.996 g
(2)	NaHCO <sub>3</sub>	0.350 g
(3)	KCl	0.224 g
(4)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0.228 g
(5)	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.305 g
(6)	1M-HCl	40 mL
(Aproximadamente 90 % da quantidade total de HCl será adicionada)		
(7)	CaCl <sub>2</sub>	0.278 g
(8)	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.071 g
(9)	(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	6.057 g

