

FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS
COMPÓSITOS COM HIDROXIAPATITA

LEILA CORRÊA BARRETO SIQUEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO DE 2009

FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS COMPÓSITOS COM HIDROXIAPATITA

LEILA CORRÊA BARRETO SIQUEIRA

“Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais do Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais”.

Orientador: Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO DE 2009

FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMATERIAIS COMPÓSITOS COM HIDROXIAPATITA

LEILA CORRÊA BARRETO SIQUEIRA

“Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais do Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais”.

Aprovada em 14 de Julho de 2009

Comissão examinadora:

Prof. DSc. Raúl Ernesto Lopez Palacio (Doutor, Materiais e Processamento) – UENF/CCT-LAMAV

Prof^a. DSc. Elena Lassounskaia (Doutora, Ciências Biológicas) – UENF/CBB-LBR

Prof. DSc. Marco Antônio Gallito (Doutor, Dentística) – UFF

Prof. PhD Rubén J. Sánchez Rodriguez (Ciências Químicas) – UENF/CCT-LAMAV
Orientador

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

47/2009

Siqueira, Leila Corrêa Barreto

Formulação e caracterização de biomateriais compósitos com hidroxiapatita / Leila Corrêa Barreto Siqueira. – Campos dos Goytacazes, 2009.

xv, 136 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados. Campos dos Goytacazes, 2009.

Orientador: Rubén J. Sánchez Rodríguez.

Área de concentração: Polímeros e Compósitos.

Bibliografia: f. 110-119.

1. Biomateriais 2. Hidroxiapatita 3. Poli(3-hidroxibutirato) 4. Biocompósitos 5. Biocompatibilidade I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados II. Título

CDD 620.118

AGRADECIMENTOS

Seria impossível alcançar essa conquista sem um agradecimento especial a pessoas, sem as quais, nada teria conseguido. Entre elas estão:

Meu querido Orientador Rubén J. Sánchez, que soube além de desempenhar o seu papel com muita paciência e amizade, também cultivar em mim o espírito de romper barreiras e não desistir jamais.

Minha especial “Co-orientadora” Elena Lassounskaia, que com carinho e compreensão me fez vencer as dificuldades das práticas de laboratório e realizar os trabalhos necessários.

Querida amiga Professora Teresa Elígio que além das palavras, ajudou a fazer acontecer. Professores que quando solicitados me atenderam com muita atenção – Raúl Ernesto Lopez, Lioudimila Aleksandrovena, Guerold Sergeevitch, Edmilson José Maria, Eduardo Atem, Maria Luisa López, Ana Lúcia Diegues.

Também não menos especiais meus amigos do LAMAV – Djalma Souza, Elaine Santos, Elaine Cristina, Érica Souza, Kamila Amaral, Luciana Lezira, Karina Freitas, Álvaro Lamônica; do CBB – Eduardo Pinheiro, Fabrício Almeida, Marcelle Ribeiro, que muitas vezes me forneceram munção para transpor as barreiras. Funcionários que foram indispensáveis para realização dos trabalhos, dos quais recebi atenção e carinho – Shirlene Chagas, Carlan Ribeiro, Beatriz Ferreira, Giovana Alves, Verônica Rodrigues. Aqueles que por ventura não citei o nome, mas que sabe que foi importante e, que reconheço esse valor.

Meu marido, pelo grande incentivo e paciência pelos fins de semana e feriados sem minha presença. Meus filhos, por saberem seguir os caminhos certos mesmo quando não estava presente para orientá-los. Minha mãe, que mesmo com sua idade avançada ainda vibra com minhas conquistas. Meu pai, que mesmo “não” estando mais aqui, sinto sua energia em momentos de necessidade, provando que sempre está presente. Irmãos e demais familiares que torceram e contribuíram de alguma forma para minha realização.

Acima e antes de tudo ao meu Deus, que me deu garra que não imaginava ter e colocou em meu caminho seres maravilhosos, necessários a cada etapa para que alcançasse essa vitória.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | vii |
| ÍNDICE DE TABELA..... | x |
| RESUMO..... | xii |
| ABSTRACT | xiv |
| CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 – Justificativa | 3 |
| 1.2 – Objetivos..... | 4 |
| 1.2.1 – Objetivo geral | 4 |
| 1.2.2 – Objetivos específicos..... | 4 |
| CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 2.1 – O tecido ósseo - sua estrutura e composição | 5 |
| 2.1.1 – Definição | 5 |
| 2.1.2 – Composição inorgânica e orgânica | 5 |
| 2.1.3 – Composição celular | 8 |
| 2.1.4 – Visão macroscópica | 10 |
| 2.1.5 – Visão microscópica..... | 11 |
| 2.1.6 – Metabolismo ósseo..... | 12 |
| 2.1.7 – Propriedades mecânicas do osso..... | 14 |
| 2.2 – Substitutos ósseos..... | 15 |
| 2.2.1 – Metais e ligas..... | 18 |
| 2.2.2 – Cerâmicas | 21 |
| 2.2.2.1 – Cerâmicas bioinertes..... | 22 |
| 2.2.2.2 – Cerâmicas bioativas | 22 |
| 2.2.3 – Polímeros | 30 |
| 2.2.3.1 – Poli(3-hidroxi-butilato) (PHB)..... | 33 |
| 2.2.3.2 – Quitosana (Q) | 37 |
| 2.2.4 – Biocompósitos polímero/cerâmica..... | 39 |
| 2.2.4.1 – Biocompósito PHB/HAP | 40 |

| | |
|---|----|
| 2.2.4.2 – Biocompósito Q/HAP | 42 |
| 2.2.4.3 – Propriedades mecânicas dos biocompósitos | 43 |
| 2.3 – Interface tecido/implante..... | 47 |
| CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS | 53 |
| 3.1 – Cerâmica utilizada na formulação dos biocompósitos..... | 53 |
| 3.1.1 – Hidroxiapatita (HAP)..... | 53 |
| 3.2 – Polímeros utilizados na formulação dos biocompósitos..... | 53 |
| 3.2.1 – Poli(3-hidroxibutirato) (PHB)..... | 53 |
| 3.2.2 – Quitosana (Q)..... | 53 |
| 3.3 – Biomateriais compósitos | 54 |
| 3.3.1 – Biomateriais compósitos utilizando como fase polimérica PHB e quitosana | 54 |
| 3.3.1.1 – Metodologia de formulação dos biomateriais compósitos PHB/HAP confeção dos corpos de prova..... | 54 |
| 3.3.1.2 – Metodologia de formulação dos biocompósitos Q/HAP e confeção dos corpos de prova..... | 55 |
| 3.4 – Obtenção das células para testes de citotoxicidade dos compósitos <i>in vitro</i> | 56 |
| 3.4.1 – Cultura celular | 56 |
| 3.4.1.1 – Cultura dos fibroblastos murinos I929 | 56 |
| 3.4.1.2 – Obtenção da cultura primária dos osteoblastos murinos..... | 56 |
| 3.4.1.3 – Cultura celular dos macrófagos murinos da linhagem raw2647 | 58 |
| 3.5 – Caracterização dos biomateriais compósitos..... | 58 |
| 3.5.1 – Avaliação mecânica, térmica e estrutural | 58 |
| 3.5.1.1 – Ensaio mecânicos..... | 58 |
| 3.5.1.2 – Análise termogravimétrica (TGA) | 60 |
| 3.5.1.3 – Calorimetria exploratória diferencial (DSC) | 61 |
| 3.5.1.4 – Difração de Raios-X | 61 |
| 3.5.1.5 – Microscópio eletrônico de varredura (MEV) | 62 |
| 3.5.2 – Avaliação da compatibilidade biológica dos compósitos obtidos..... | 62 |
| 3.5.2.1 – Teste de citotoxicidade..... | 63 |
| 3.5.2.2 – Avaliação da capacidade do compósito de induzir produção da citocina inflamatória, fator de necrose tumoral, por macrófagos..... | 64 |
| 3.5.2.2.1 – Teste da quantificação do TNF – α | 64 |
| 3.5.2.3 – Avaliação da integração das células com o compósito | 65 |

| | |
|---|-----|
| 3.5.2.4 – Estatística..... | 66 |
| CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 67 |
| 4.1 – Biomateriais compósitos PHB/HAP | 67 |
| 4.1.1 – Composição e homogeneidade das formulações..... | 67 |
| 4.1.2 – Estabilidade térmica | 69 |
| 4.1.3 – Propriedades mecânicas dos biomateriais compósitos phb-hap..... | 70 |
| 4.1.4 – Grau de cristalinidade dos biomateriais compósitos..... | 77 |
| 4.1.4.1 – Calorimetria diferencial exploratória (DSC) | 77 |
| 4.1.4.2 – Difração de raios-x (DRX) | 78 |
| 4.1.5 – Caracterização morfológica dos biomateriais compósitos..... | 79 |
| 4.2 – Biomateriais compósitos Q/HPA..... | 81 |
| 4.2.1 – Composição e homogeneidade das formulações..... | 81 |
| 4.2.2 – Estabilidade térmica | 83 |
| 4.2.3 - Propriedades mecânicas dos biomateriais compósitos q-hap..... | 84 |
| 4.2.4 – Grau de cristalinidade dos biomateriais compósitos..... | 89 |
| 4.2.4.1 – Calorimetria diferencial exploratória (DSC) | 89 |
| 4.2.4.2- Difração de Raios-X (DRX) | 90 |
| 4.2.6 - Caracterização morfológica dos biomateriais compósitos Q/HAP | 92 |
| 4.3 – Resposta celular aos biomateriais compósitos PHB/HAP e Q/HAP – testes biológicos | 93 |
| 4.3.1- Testes de citotoxicidade..... | 93 |
| 4.3.2 – Avaliação das propriedades pró-inflamatórias dos compósitos..... | 101 |
| 4.4 – Avaliações comparativas..... | 105 |
| 4.4.1 – Entre os materiais formulados (PHB/HAP e Q/HAP) para futuro uso como substitutos ósseos | 105 |
| 4.4.2 – Entre os materiais formulados (PHB/HAP e Q/HAP) e materiais industrializados utilizados como substitutos ósseos..... | 105 |
| CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES | 107 |
| SUGESTÕES E RECOMENDAÇÕES | 109 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 110 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Estrutura macroscópica do osso humano maduro (Vilela, 2007)..... | 6 |
| Figura 2 – Representação da estrutura cristalina hexagonal da hidroxiapatita (Mavropoulos, 1999)..... | 24 |
| Figura 3 – Estrutura molecular da unidade repetitiva do homopolímero PHB (Padermshoke et al., 2005). | 34 |
| Figura 4 – Estrutura molecular da quitosana (Madihally e Matthew, 1999)..... | 37 |
| Figura 5 – Evolução dos biomateriais utilizados como substitutos ósseos (Murugan, 2005)..... | 44 |
| Figura 6 – Um característico relacionamento de tensão-deformação de uma variedade de implantes ósseo (Murugan, 2005). | 45 |
| Figura 7 – Fotografia de microscopia eletrônica de varredura (a) mostram a camada de apatita e (b) sua microestrutura (Ni e Wang, 2002)..... | 50 |
| Figura 8 – Gráfico da perda de massa, do PHB e dos compósitos PHB/X%HAP..... | 67 |
| Figura 9 – Gráfico da perda de massa em relação à temperatura, do compósito PHB/HAP (74/26), em duas regiões do corpo de prova. | 68 |
| Figura 10 – Gráfico da perda de massa (TGA) e da derivada da perda de massa (DTG) do PHB e dos compósitos PHB/X%HAP. | 69 |
| Figura 11 – (a) Gráfico de tensão X deformação plotado para o PHB, os compósitos PHB/X%HAP e para o osso desproteínizado. (b) Micrografia eletrônica do osso desproteínizado (50X). | 71 |
| Figura 12 – Gráfico da variação do módulo de armazenamento com a temperatura, do PHB e dos compósitos PHB/X%HAP..... | 74 |
| Figura 13 – Gráfico da variação da tangente de delta com a temperatura, do PHB e dos compósitos PHB/X%HAP. | 75 |
| Figura 14 – Gráfico da variação do módulo de perda com a temperatura, do PHB e dos compósitos PHB/X%HAP. | 76 |
| Figura 15 – Gráfico de calorimetria diferencial exploratória para o PHB e do compósito PHB/HAP (54/46 %m/m)..... | 77 |
| Figura 16 – Gráfico de difração de Raios-X, do PHB, do compósito PHB/HAP (54/46 % m/m) e da mistura PHB/HAP (54/46 %m/m). | 78 |
| Figura 17 – Micrografia eletrônica das micropartículas de HAP utilizadas na formulação dos compósitos: (a, b) HAP, (1000X) e da região da fratura dos | |

| | |
|--|----|
| compósitos nos corpos de prova: (c) PHB, (d) PHB/HAP (74/26), (e) PHB/HAP (54/46), (f) PHB/HAP (36/64); (5000X)..... | 80 |
| Figura 18 – Gráfico da perda de massa, da Q e dos compósitos Q/X%HAP..... | 82 |
| Figura 19 – Gráfico da perda de massa (TG) e da derivada da perda de massa (DTG), da Q e dos compósitos Q/X%HAP..... | 83 |
| Figura 20 – Gráfico de tensão X deformação plotado para a Q, os compósitos Q/X%HAP e para o osso desproteínizado..... | 85 |
| Figura 21 – Gráfico da variação do módulo de armazenamento com a temperatura, da quitosana e compósitos Q/X%HAP..... | 87 |
| Figura 22 – Gráfico da variação do módulo de perda com a temperatura, da quitosana e compósitos Q/X%HAP..... | 88 |
| Figura 23 – Gráfico da variação da tangente de delta com a temperatura, da quitosana e compósitos Q/X%HAP..... | 89 |
| Figura 24 – Gráfico de calorimetria diferencial exploratória em função da temperatura, da quitosana e do compósito Q/HAP (50/50 %m/m)..... | 90 |
| Figura 25 – Gráfico de difração de Raios-X, da Q, do compósito Q/HAP (50/50 %m/m) e da mistura Q/HAP (50/50 %m/m)..... | 91 |
| Figura 26 – Micrografia eletrônica da região da fratura dos corpos de prova de (a) Q, (b) Q/HAP (79/21), (c) Q/HAP (50/50), (d) Q/HAP (37/63); (3000X)..... | 92 |
| Figura 27 – Estudo da viabilidade celular (fibroblastos L929) em contato direto com PHB, compósitos PHB/X%HAP e osso desproteínizado. Representativo de 3 experimentos independentes sendo * p< 0,05 e *** p<0,001..... | 93 |
| Figura 28 – Estudo da viabilidade celular (fibroblastos L929) em contato direto com Q, compósitos Q/X%HAP e osso desproteínizado. Representativo de 3 experimentos independentes sendo ** p<0,01e *** p<0,001..... | 94 |
| Figura 29 – Número das células necróticas (%) nas culturas dos fibroblastos L929 cultivadas na presença de PHB, compósitos PHB/X%HAP e osso desproteínizado. Representativo de 3 experimentos independentes sendo *** p<0,001..... | 95 |
| Figura 30 – Número das células apoptóticas (%) nas culturas dos fibroblastos L929 cultivadas na presença de PHB, compósitos PHB/X%HAP e osso desproteínizado. Representativo de 3 experimentos independentes..... | 96 |
| Figura 31 – Número das células necróticas (%) nas culturas dos fibroblastos L929 cultivadas na presença de Q, compósitos Q/X%HAP e osso desproteínizado. Representativo de 3 experimentos independentes sendo *** p<0,001..... | 97 |

| | |
|--|-----|
| Figura 32 – Número das células apoptóticas (%) nas culturas dos fibroblastos L929 cultivadas na presença de Q, compósitos Q/X%HAP e osso desproteínizado. Representativo de 3 experimentos independentes. | 97 |
| Figura 33 – Micrografia de fluorescência de osteoblastos diferenciados da medula óssea de camundongos C57Bl/6 (200X). | 98 |
| Figura 34 – Estudo da viabilidade celular (osteoblastos - células primárias) em contato direto com o PHB e o compósito PHB/HAP (74/26 %m/m). | 99 |
| Figura 35 – Estudo da viabilidade celular (osteoblastos - células primárias) em contato direto com a Q e o compósito Q/HAP (79/21 %m/m). | 100 |
| Figura 36 – Ensaio de citotoxicidade (fibroblastos L929) pela presença de TNF- α desprendidos por macrófagos estimulados por PHB, compósito PHB/HAP (74/26 %m/m) e osso desproteínizado. | 102 |
| Figura 37 – Ensaio de citotoxicidade (fibroblastos L929) pela presença de TNF- α desprendidos por macrófagos estimulados por Q, compósito Q/HAP (79/21 %m/m) e osso desproteínizado. | 103 |
| Figura 38 – Micrografia eletrônica de fibroblastos L929 (a) em expansão, 2300X, (b) formando monocamada, 200X; sobre o compósito PHB/HAP (74/26 %m/m). | 104 |

ÍNDICE DE TABELA

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Relação de alguns dados correspondentes à estrutura microscópica do tecido ósseo (Misch, 2000; Newman et al., 2004) | 7 |
| Tabela 2 – Relação dos fatores de crescimento da matriz orgânica óssea, suas funções e forma de armazenamento (Misch, 2000) | 8 |
| Tabela 3 – Tipos de tecido ósseo e suas características (Misch, 2000) | 11 |
| Tabela 4 – Propriedades mecânicas do osso (Patra, 2000; Galego et al., 2000)..... | 14 |
| Tabela 5 – Apresentação de cerâmicas, cimentos e vidro bioativo avaliados comercialmente, característica mecânica e porosidade (Habraken et al., 2007) | 16 |
| Tabela 6 – Propriedades mecânicas dos metais e das ligas utilizadas nos implantes cirúrgicos (Murugan, 2005) | 21 |
| Tabela 7 – Propriedades Técnicas de Algumas Cerâmicas Utilizadas como Biomateriais (Murugan, 2005) | 22 |
| Tabela 8 – Vantagens e Desvantagens da Cerâmica de Fosfato de Cálcio (CFC) (Misch, 2000)..... | 23 |
| Tabela 9 – Abreviações de compostos de CaP, com fórmula química correspondente e razão Ca/P (Fernandes e Laranjeira, 2000; Habraken et al., 2007) | 23 |
| Tabela 10 – Composição mineral do osso e da hidroxiapatita (Moreira, 2000)..... | 25 |
| Tabela 11 – Propriedades mecânicas de polímeros (Murugan, 2005; Godbole, 2003; Ramakrishna, 2001) | 31 |
| Tabela 12 – Relação dos polímeros usados em compósitos com cerâmicas até o momento (Habraken et al., 2007)..... | 40 |
| Tabela 13 – Implantes celular/acelular usados em tratamento clínico ósseo (Murugan, 2005)..... | 46 |
| Tabela 14 – Composição das formulações dos biomateriais compósitos PHB/X%HAP | 68 |
| Tabela 15 – Resultados obtidos a partir do teste mecânico de flexão | 72 |
| Tabela 16 – Dados referentes à porcentagem de cristalinidade determinada através da análise das amostras por difração de Raios-X | 78 |
| Tabela 17 – Composição das formulações dos biomateriais compósitos Q/X%HAP..... | 82 |
| Tabela 18 – Resultados obtidos a partir do teste mecânico de flexão | 86 |

Tabela 19 – Dados referentes à porcentagem de cristalinidade determinada através da análise das amostras por difração de Raios-X.91

RESUMO

A busca por um substituto ósseo ideal tem incentivado pesquisas já há algumas décadas. Inicialmente os materiais mais utilizados eram metais, cerâmicos ou polímeros, que eram utilizados separadamente, hoje o interesse está voltado para materiais compósitos resultantes da associação desses materiais. O material compósito possui a vantagem de possibilitar a associação das propriedades de cada material utilizado, podendo assim atender melhor as exigências para cada necessidade de uso.

Vários são os materiais utilizados como biomateriais. Entretanto, quando se deseja que esse material seja substituído por novo osso os materiais a serem utilizados devem possibilitar a sua substituição, ou seja, serem reabsorvíveis. Voltadas para essas necessidades as pesquisas foram direcionadas para a associação de matrizes poliméricas, que são reabsorvíveis, com cerâmicas apatitas, que possuem as características da estrutura inorgânica óssea.

Biomateriais com matrizes poliméricas (poli(3-hidroxiбутирато) (PHB) e quitosana (Q)) associadas à hidroxiapatita (HAP) foram formuladas e avaliadas quanto as suas propriedades dinâmico-mecânicas, térmicas, morfológicas e biológicas. Os resultados encontrados revelaram biomateriais com propriedades mecânicas comparáveis aos já existentes, tais como tensão máxima de ruptura de 23,38 MPa, módulo elástico de 4,5 GPa e módulo de armazenamento de 5430 MPa à 25°C para a composição PHB/HAP (54/46) e ainda tensão máxima de ruptura de 6,90 MPa, módulo elástico de 0,71 GPa e módulo de armazenamento de 1240 MPa à 25°C para Q/HAP (50/50). Na avaliação das propriedades biológicas os testes *in vitro* dos biocompósitos formulados mostraram que ambos os sistemas, PHB/HAP e Q/HAP, são biocompatíveis.

A associação das partículas de HAP com o PHB nos biocompósitos mostrou que estes apresentaram o balanço das propriedades pretendido. As propriedades mecânicas obtidas nas análises dinâmico-mecânicas mostraram um aumento dos módulos de armazenamento para os compósitos com concentração de 26 e 46% de HAP em relação ao polímero utilizado nas formulações. Por microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que as partículas de hidroxiapatita apresentaram boa distribuição no compósito exercendo um efeito de reforço na matriz, possibilitando assim a formação de um material com propriedades mecânicas

próximas as do tecido ósseo. Para os biocompósitos formulados com quitosana e HAP foi observada uma redução na porcentagem de deformação e resistência máxima à fratura com a adição de HAP em relação à matriz.

Os biocompósitos formulados, PHB/HAP e Q/HAP nas distintas composições, além de não apresentarem citotoxicidade, mostraram possibilitar uma alta viabilidade celular, permitindo inclusive a fixação e expansão de células em sua superfície, sendo considerados biocompatíveis. O crescimento celular foi obtido na composição PHB/HAP (74/26 %m/m) sendo possível avaliar sua fixação e expansão por microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

The search for an ideal bone substitute has been motivating researches in the last decades. As starting point the metallic, ceramic and polymeric materials were used separately, and today the interest is focused on the union of these materials that results in composites. The composite material possesses the advantage of making possible the association of desirable properties of each material used, and also it could assist better the demands of use necessities.

Several materials can be used as biomaterials. Nevertheless, when the material needs to be substituted by a new bone, this material should make possible its substitution, and it means that it could be reabsorbed. Because of these necessities, the researches towards the association of reabsorbed polymeric matrices with ceramic of the apatite family have been increasing, mainly the ones that possess the characteristics of the bone inorganic portion.

Biomaterials with polymer matrices (polyhydroxybutyrate – PHB and chitosan (CH) associated to hydroxyapatite (HA) were evaluated according to their dynamic-mechanic, thermal and morphologic analysis. The results showed biomaterials with mechanical properties compared with the existing ones, such as maximum strain of 23.3 Mpa, elastic modulus of 4,5 GPa and Storage module of 5430 MPa at 25°C to the composition PHB/HA (54/46) and rupture stress of 6.9 MPa, elastic modulus 0.71 GPa and storage modulus of 1240 MPa at 25°C for Q/HAP (50/50). During the biological properties experiment, the *in vitro* tests of the biocomposites formulated showed that both systems, PHB/HA and CH/HA, are biocompatible.

The HA and PHB particle association in biocomposites showed satisfactory results. The mechanical properties obtained in dynamic mechanical analysis indicated an increasing of the storage modulus to the composites with 26 and 46% concentration of HA related to the polimer used in formulations. By scanning electronic microscopy, the observation showed that hydroxyapatite particles have good dispersion to performance reinforcement effect in the matrix and it is able to obtain materials with better mechanical properties. On the other hand, there was a percentage deformation reduction ϵ and fracture maximum resistance with HA addition compared to the matrix.

The biocomposites formulated, PHB/HA and CH/HA in distinct compositions, did not show any cytotoxicity and also had high cellular viability, allowing cell fixation

and expansion above the surface and therefore considered biocompatible. The cellular growth was obtained in the PHB/HA (74/26 %m/m) composition, being possible to assess its fixation and expansion by scanner electronic microscopy technique.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

A nossa sociedade apresenta uma expectativa de vida que vem sendo aumentada a cada dia, ao mesmo tempo em que convive com a realidade de seus corpos deteriorarem-se muito antes do tempo requerido. Uma das conseqüências do envelhecimento é a diminuição da resistência dos ossos e o aumento da probabilidade de fratura e perda óssea. Diante desse problema o desenvolvimento de biomateriais para implantes ósseos é um tema que ocupa um lugar privilegiado nas pesquisas de materiais.

A lacuna deixada por tecido ósseo perdido tem representado um problema em situações cirúrgicas. O crescimento de tecido conectivo nesses defeitos é freqüente, impedindo assim a formação de novo tecido ósseo o que pode causar aberrações anatômicas e distúrbios funcionais, sendo necessário então, o uso de materiais de enxertos e ou implantes para possibilitar o adequado preenchimento desses defeitos.

Numerosos métodos e materiais alternativos têm sido utilizados na tentativa de estimular a osteogênese. O mais comum tem sido o implante de osso autógeno fresco que pode ser colhido de várias partes do corpo do próprio paciente como: da cavidade bucal (regiões da mandíbula e maxila), da crista ilíaca, parte anterior da tíbia, ou ainda da região posterior do fêmur. Outro método usa implante de osso em pó (enxerto alógeno) ou vários enxertos disponíveis comercialmente e diferentes fosfatos de cálcio (materiais sintéticos). Nos anos mais recentes, muitas pesquisas têm sido concentradas no potencial osteogênico inerente a alguns materiais de implante. No entanto, as pesquisas também estão avançando no desenvolvimento de materiais ditos osteocondutores, ampliando o leque de escolha do ideal, para cada caso, pelo cirurgião. A diferença básica entre os materiais osteogênicos e os osteocondutores é que os primeiros são biologicamente ativos, enquanto os outros são totalmente inertes, servindo apenas como material de preenchimento e podendo até ser englobado pelo tecido ósseo neoformado passando a fazer parte do novo tecido. O sucesso do enxerto ósseo, provavelmente dependerá em parte da rápida reabsorção do material sobre a superfície e a simultânea substituição deste por novo tecido ósseo do receptor.

Os biomateriais mais usados hoje como implantes teciduais estão dentro de duas grandes categorias: sais inorgânicos, polímeros naturais e sintéticos. A

hidroxiapatita, fosfato tricálcio e sulfato de cálcio são os sais inorgânicos mais usados como substitutos ósseos ou preenchimento de vazio. Colágeno e glicosaminoglicano – materiais base são polímeros naturais largamente usados e, polianidridos (PLA, PGA e copolímero PLA/PGA) são os polímeros sintéticos mais comumente usados. Essa lista é bastante curta, mas representa os materiais que tem uma longa história de uso seguro e efetivo em dispositivos médicos. O foco em implante ósseo tem, no entanto, sido para desenvolver produtos eficazes que combine esses materiais bem caracterizados. Em meio aos desafios para otimizar o comportamento do material composto para implante ósseo tem sido identificado e construído materiais de enxerto que tem o balanço apropriado de eficácia, biocompatibilidade, força e reabsorção, quando desejada. O osso é formado primariamente de colágeno tipo I, hidroxiapatita e células responsáveis pela atividade metabólica no esqueleto. Uma maneira simples e efetiva para desenvolver um material de enxerto o mais próximo do osso, tem sido a cópia da forma e composição, desses componentes do próprio osso autógeno (Poser, 2001).

A hidroxiapatita (HAP) lidera a lista de materiais usados como substitutos ósseos, pois possui semelhanças estruturais e características da composição que contém o osso natural, o que possibilita ligações químicas fortes entre este material de enxerto e o tecido ósseo do hospedeiro quando estão em contato íntimo. A força de associação entre o osso e a hidroxiapatita indica que existe uma ligação direta do osso com a HAP, mais comumente via uma modificação fisiológica e recristalização da superfície cristalina da HAP. Estas reações resultam em uma forte interação interfacial associada à formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HAC) na superfície do implante. Ainda assim esse material possui o inconveniente de migrar quando colocado puro num determinado sítio ósseo (Poser, 2001; Galego et al., 2000).

Os Poli (hidroxialcanoatos) (PHAs) produzidos por bactérias como reserva alimentar estocada intracelularmente, possuem comprovada biocompatibilidade e biodegradabilidade (Zhao et al, 2003). Os copolímeros PHA mais importantes são os poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBVs). Eles têm propriedades físicas e mecânicas comparáveis a termoplásticos convencionais como os polietileno e polipropileno (Luo et al., 2002).

Os PHAs, em particular os de cadeia lateral curta (PHB e copolímeros contendo o co-monômero hidroxivalerato), tem sido utilizados na formulação de

compósitos com HAP com o intuito de aproveitar suas propriedades, física, mecânica e biológica, além de evitar a migração das partículas de HAP da região do implante antes do crescimento de novo tecido. (Galego et al., 2000).

A utilização de novas metodologias, partindo de matrizes poliméricas biodegradáveis e biocompatíveis, para a formulação de biocompósitos a partir da HAP assim como o estudo biológico desses dá continuidade ao trabalho anterior iniciado pelo grupo de pesquisa. Permitindo assim, dispor de um material para ser avaliado *in vivo* no laboratório com a perspectiva de disponibilizar um novo biomaterial para ser usado como substituto ósseo.

1.1 – JUSTIFICATIVA

Desenvolver biocompósitos que possam ter propriedades comparáveis ou mesmo superiores as dos materiais utilizados para preenchimento ósseo existentes no mercado, tais como triosite, interpore, cementek dentre outros. Os compósitos desenvolvidos devem possuir características como a semelhança de composição e morfologia com o tecido ósseo, que são apresentadas pela hidroxiapatita, bem como possibilitar a conformação da matriz polimérica (PHB e ou Q) e sua reabsorção pelo corpo humano a uma velocidade controlada. Desse modo teremos o processo de incorporação da hidroxiapatita ao tecido ósseo enquanto a matriz será lentamente reabsorvida podendo ser substituída por um novo osso. Sendo assim, pode ser desenvolvido um biomaterial que possua melhores resultados clínicos que as hidroxiapatitas existentes no mercado e, se possível a custos reduzidos, contribuindo para uma melhor qualidade de vida do ser humano.

Ainda o presente trabalho pretende concretizar o interesse científico entre a Faculdade de Odontologia de Campos (FOC) e a Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) na área de biomateriais ao desenvolver um material de interesse na área odontológica e realizar sua caracterização aproveitando o perfil científico dos especialistas da área. Inicialmente com os estudos realizados na presente dissertação assim como estudos *in vitro* relativos à absorção de água, taxa de biodegradação e influência da porosidade na bioincorporação destes compostos, citotoxicidade, etc. e, em trabalhos futuros *in vivo*, para avaliar a atividade celular na presença do compósito e a possibilidade do compósito ser osseointegrado.

1.2 – OBJETIVOS

1.2.1 – OBJETIVO GERAL

Formular biocompósitos a partir da mistura de HAP de origem sintética utilizando duas diferentes matrizes poliméricas (poli(3-hidroxi-butirato) (PHB) e quitosana (Q)) de origem natural avaliando suas propriedades térmicas, mecânicas e biológicas através de testes *in vitro* visando sua aplicação na área odontológica.

1.2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reduzir a taxa de migração da HAP como substituto ósseo através da formulação de biocompósitos.
- Formular e caracterizar biocompósitos HAP/ PHB e HAP/Q.
- Desenvolver uma formulação com a resistência mecânica comparável com a exibida pelo osso humano.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das matrizes poliméricas utilizadas na formulação dos biocompósitos.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – O TECIDO ÓSSEO - SUA ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO

2.1.1 – DEFINIÇÃO

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto, tendo como função suportar as partes moles e proteger órgãos vitais, como os contidos na caixa craniana e torácica e no canal raquidiano. Em suas cavidades internas aloja e protege a medula óssea, que dá origem as células do sangue. Além de dar apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, ele também constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular. Além dessas funções, os ossos funcionam como depósitos de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses íons importantes nos líquidos corporais (Junqueira e Carneiro, 1999).

2.1.2 – COMPOSIÇÃO INORGÂNICA E ORGÂNICA

O tecido ósseo é composto em dois terços por substância inorgânica e em um terço por matriz orgânica. A porção inorgânica é constituída principalmente por minerais cálcio e fosfato, além de hidroxilas, carbonatos, citratos e traços de outros íons, como sódio, magnésio e flúor. Os sais minerais apresentam-se sob a forma de cristais de hidroxiapatita de tamanho ultramicroscópico, constituindo aproximadamente dois terços da estrutura óssea (Newman et al., 2004).

Existe uma relação direta entre a idade do osso e a sua densidade mineral. Após uma fase de maturação de aproximadamente uma semana, o ósteon recém-formado é mineralizado por um grande número de cristais de hidroxiapatita relativamente pequenos. Durante este período de mineralização primária, os osteoblastos depositam cerca de 70% do mineral encontrado no osso vivo maduro. A mineralização secundária, os 30% restantes, é um fenômeno de crescimento de cristais não-celulares, que ocorre em um período de alguns meses. A Figura 1 mostra a estrutura macroscópica de um osso humano maduro. As Alterações na mineralização podem ser seguidas utilizando-se a microrradiografia de alta

resolução, que fornece um índice fisiológico geral de atividade de modelagem e remodelagem (Misch, 2000).

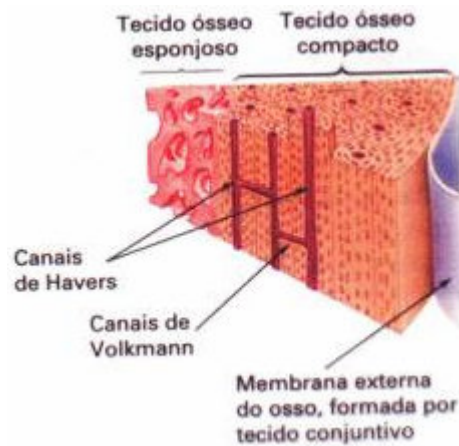


Figura 1 – Estrutura macroscópica do osso humano maduro (Vilela, 2007).

O osso pode reduzir os esforços por meio da justaposição ou redução óssea, da formação ou reabsorção e, da alteração do módulo de elasticidade ou rigidez, modificando o conteúdo mineral. É possível observar destruição celular quando as tensões excedem 69 N/mm^2 , entretanto uma tensão de $24,8 \text{ N/mm}^2$ estimulará o crescimento ósseo (Misch, 2000).

A matriz orgânica é formada principalmente (90%) por colágeno tipo I, também apresentando pequenas quantidades de proteínas não-colágenas, como osteocalcina, osteonectina, proteína morfogenética óssea (POM), fosfoproteínas e proteoglicanas, conforme mostrado na Tabela 1 (Newman et al., 2004).

Na matriz orgânica estão localizados alguns fatores de crescimento do osso que podem aumentar a formação e a mineralização do osso, induzir as células mesenquimatosas indiferenciadas a diferenciarem-se em células ósseas, ou desencadear a liberação de vários fatores de crescimento do osso ou fatores de ênfase das células. Esses fatores de crescimento, que são importantes para a regeneração óssea, podem ser divididos em cinco grupos: fator de crescimento derivado das plaquetas (FCDP), fator de crescimento dos fibroblastos (FCF), fator de crescimento β -tricálcio (FTC- β), fator de crescimento similar à insulina (FCI) e proteína óssea morfogenética (POM) (Misch, 2000).

Tabela 1 – Relação de alguns dados correspondentes à estrutura microscópica do tecido ósseo (Misch, 2000; Newman et al., 2004)

| Composição | Mineralização | Estrutura inorgânica | Matriz orgânica | Resposta óssea à tensão |
|-------------------------------|---|---|-------------------------|---|
| 2/3 – substâncias inorgânicas | 70% - osteoblastos | Cristais de hidroxiapatita – ultramicroscópico | 90% colágeno tipo I | > 69 N/mm ² = reabsorção |
| 1/3 – matriz orgânica | 30% - crescimento de cristais não-celulares | Minerais cálcio e fosfato, hidroxilas, carbonatos, citratos e traços de sódio, magnésio e flúor | Proteínas não colágenas | = 24,8 N/mm ² = crescimento ósseo |

Os FCDPs são produzidos por osteoblastos e ativados por macrófagos. Eles são armazenados nas plaquetas e no osso, têm as características de um hormônio de cicatrização, agindo como um quimioatrativo e recrutando células mesenquimatosas para a ferida. As plaquetas ativadas também aumentam a hemostasia, atraindo plaquetas adicionais para o local, que libertam trombina, tromboxano A₂ e difosfato de adenosina (Misch, 2000).

Os FCFs são armazenados na matriz óssea extracelular e dividem muitas das fontes dos FCDPs. Os FCFs podem estimular a proliferação de osteoblastos. Eles estimulam a formação óssea em rede e são potentes fatores angiogênicos (Misch, 2000).

O FTC-β, tem no osso o local de armazenamento mais abundante do corpo e, ele tem sua ação como um mitogênio fraco para as células osteoblásticas humanas. Atua ainda como indutor de quimiotaxia e estimula a formação da matriz extracelular nas células osteoblásticas. O FTC-β₁ ativa os fibroblastos para que formem procolágeno, que deposita colágeno dentro da ferida, sugerindo que o reparo do tecido mole e duro seja aumentado pelo FTC-β (Misch, 2000).

A POM (Proteína Óssea Morfogenética) representa um termo coletivo, agrupando 13 proteínas (POM-1 a POM-13), que foram purificadas e clonadas. Elas podem ser produzidas por osteoblastos e armazenadas no osso. A POM-2 recombinante humana (POM-2rh) e outras foram produzidas e demonstrou-se que elas induzem a uma seqüência completa de ossificação endocondral, mesmo em um período reduzido, nos defeitos grandes. A principal vantagem é que, enquanto o

isolamento da POM nos ossos cadavéricos produz apenas 0,1 mg de POM por quilograma de osso, a POM-2rh pode prontamente ser produzida para o uso difundido (Misch, 2000). A Tabela 2 apresenta um resumo das características dos fatores de crescimento presentes na matriz orgânica do osso.

Tabela 2 – Relação dos fatores de crescimento da matriz orgânica óssea, suas funções e forma de armazenamento (Misch, 2000)

| Nome | Abreviação | Armazenamento | Função |
|--|-------------------|------------------------------|--|
| <i>Fator de crescimento derivado das plaquetas</i> | FCDP | Nas plaquetas e nos ossos | Quimioatrativo - recruta células mesenquimatosas e aumenta homeostasia |
| <i>Fator de crescimento dos fibroblastos</i> | FCF | Na matriz óssea extracelular | Estimulam formação óssea em rede e potente fator angiogênico |
| <i>Fator de crescimento β-tricálcio</i> | FTC- β | No osso | Mitogênico fraco, induz quimiotaxia e ativa fibroblastos |
| <i>Proteína óssea morfogenética (13 proteínas)</i> | POM | No osso | *POM-2rh – induz a ossificação endocondral |

*POM-2rh – POM-2 recombinante humana.

2.1.3 – COMPOSIÇÃO CELULAR

As células ósseas são: (1) os osteócitos, situados em cavidades ou lacunas no interior da matriz; (2) os osteoblastos, responsáveis pela produção da parte orgânica da matriz; (3) os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas, que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelação dos ossos e (4) as osteoprogenitoras, células derivadas do mesênquima embrionário, podem passar por divisões mitóticas e têm o potencial de se diferenciar em osteoblastos (Gartner, 2003).

Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, que são: colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas. Também podem concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. A

matriz óssea, recém-formada, adjacente aos osteoblastos ativos e, que não está calcificada ainda, é denominada osteóide (Gartner, 2003).

A membrana celular dos osteoblastos é rica na enzima fosfatase alcalina. Estas células secretam altos níveis de fosfatase alcalina, durante a formação ativa do osso, elevando os níveis dessa enzima no sangue. Dessa forma, o clínico pode acompanhar a formação de osso medindo o nível de fosfatase alcalina no sangue (Gartner, 2003).

Os osteócitos são os osteoblastos encontrados aprisionados no interior da matriz óssea. Eles ocupam as lacunas, das quais partem canalículos preenchidos por projeções citoplasmáticas responsáveis pela comunicação entre os osteócitos, mantendo a troca de pequenas moléculas e íons entre eles. Apesar das características ultra-estruturais dos osteócitos (pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi pequeno e núcleo com cromatina condensada) indicarem pequena atividade sintética, os osteócitos são essenciais para a manutenção da matriz óssea. Sua morte é seguida por reabsorção da matriz (Gartner, 2003).

Os osteoclastos são células grandes, móveis, multinucleadas, apresentando 150µm de diâmetro, chegam a conter até 50 núcleos e seu citoplasma é acidófilo. Achava-se que estas células originavam-se da fusão de muitos monócitos provenientes do sangue, mas a evidência mais recente mostra que eles têm um precursor da medula óssea em comum com os monócitos, a célula progenitora granulócito-macrófago (GM-CFU). Estas células precursoras são estimuladas pelo fator estimulador de colônias de macrófagos e por ligante osteoprotegerina (OPGL) para entrarem em mitose. Na presença de osso, estes precursores de osteoclastos fundem-se e produzem osteoclastos multinucleados. Eles têm a função de reabsorção do tecido ósseo e, depois disso, provavelmente estas células sofrem apoptose. A atividade de reabsorção óssea dos osteoclastos é regulada por dois hormônios, o hormônio paratireoideano e a calcitonina, produzidos respectivamente pela paratireóide e pela tireóide. Existe outro fator, a osteoprotegerina, que não apenas inibe a diferenciação destas células em osteoclastos, mas também suprime a capacidade dos osteoclastos de reabsorverem osso. São encontrados nas depressões da matriz escavadas pela ação enzimática, conhecidas como lacunas de Howship. Essas células secretam ácido (H^+), colagenase e outras enzimas que atacam a matriz e liberam Ca^{2+} . Os produtos da degradação sofrem endocitose

pelos osteoclastos e são degradados ainda mais em aminoácidos, monossacarídeos e dissacarídeos, sendo então liberados nos capilares próximos (Gartner, 2003).

As células osteoprogenitoras localizam-se na camada celular interna do periósteo, revestindo canais de Havers e no endósteo, mantendo sua capacidade de passar por mitoses. Além do potencial de se diferenciar em osteoblastos, em certas condições de baixa tensão de oxigênio, estas células podem diferenciar-se em células condrogênicas (ativas no processo de produção da cartilagem). As células osteoprogenitoras são fusiformes e têm um núcleo oval pouco corado; estas células são mais ativas durante o período de crescimento ósseo intenso (Gartner, 2003).

Todas as superfícies ósseas são cobertas por camadas de tecido conjuntivo com diferenciação osteogênica. O tecido que recobre a superfície óssea externa é denominado periósteo, enquanto o tecido localizado nas cavidades ósseas internas é chamado de endósteo. Essas camadas de tecido contribuem para o processo de remodelação óssea (Newman et al., 2004).

2.1.4 – VISÃO MACROSCÓPICA

A observação de um osso cortado longitudinalmente, no que se refere a densidade, mostra dois tipos diferentes de estrutura óssea e, a distribuição dessa estrutura de forma mecanicamente eficiente nos fornecerá a arquitetura óssea básica. O osso denso da superfície externa é constituído por osso compacto, enquanto a porção porosa da cavidade medular é formada por osso esponjoso ou trabecular. O osso esponjoso internamente exhibe trabéculas ósseas ramificadas e espículas projetando-se da superfície interna do osso compacto para a cavidade da medula. Ainda nesse osso, temos arranjos irregulares de lamelas e, estas contêm lacunas abrigando osteócitos, que são nutridos por difusão da cavidade medular, que está preenchida com medula óssea (Gartner, 2003).

O tamanho e o formato do osso são determinados por uma interação de fatores genéticos e ambientais. Os ossos das corticais externa e interna e secções adjacentes do mesmo osso variam consideravelmente em função da carga funcional recebida (Newman et al., 2004).

2.1.5 – VISÃO MICROSCÓPICA

O tecido ósseo é formado sob várias configurações. Determinados fatores como a idade, a função e o histórico fisiológico irão determinar a composição de quatro tipos de tecidos microscópicos ósseos: trançado, lamelar, fibroso e composto. Na Tabela 3 estão resumidos os dados microscópicos do tecido ósseo.

Tabela 3 – Tipos de tecido ósseo e suas características (Misch, 2000)

| Tipo de osso | Formação | Força | Conteúdo mineral | Resistência clínica | Velocidade de formação |
|---------------------|--|---------------|-------------------------|---------------------------------|---|
| <i>Trançado</i> | Área de crescimento ou próximo a uma lesão | Muito pequena | Baixo | Não resiste a cargas funcionais | Rápido – 30 a 50 $\mu\text{m}/\text{dia}$ ou + |
| <i>Lamelar</i> | Osso maduro | Alta | Alto | Principal suporte de cargas | Relativamente lenta - <1.0 $\mu\text{m}/\text{dia}$ |
| <i>Fibroso</i> | Nas inserções de ligamento e tendão | — | — | — | — |
| <i>Composto</i> | Osso lamelar depositado em matriz de osso trançado | Alta | Alto | Adequada para suportar cargas | Variável |

O osso trançado é um tipo de tecido ósseo altamente celular, com rápida formação (30 a 50 $\mu\text{m}/\text{dia}$ ou mais) em resposta ao crescimento ou a uma lesão. Quando comparado com o osso maduro, ele apresenta um conteúdo mineral relativamente baixo, orientação das fibras mais aleatória e força muito pequena. O osso trançado é mais maleável que o osso lamelar maduro, em função disso ele tem um papel importante na estabilização no início da cicatrização dos implantes endósseos, visto que ele tolera mais o micromovimento relativo associado à cicatrização da interface. Apesar de ele ser capaz de estabilizar um implante sem carga, esse osso trançado não tem força para resistir às cargas funcionais (Misch, 2000).

O osso lamelar é o principal tecido de suporte de carga do esqueleto adulto maduro. Ele é o componente principal dos ossos cortical e trabecular maduro. Em adultos, as lamelas são formadas a uma velocidade relativamente lenta (< 1,0 $\mu\text{m}/\text{dia}$), tendo uma matriz extremamente organizada e densa mineralização. O osso

lamelar é histologicamente semelhante, independentemente da idade em que é formado (Misch, 2000).

O osso fibroso está localizado em áreas de inserções de ligamento e tendão, ao longo das superfícies formadoras de osso. Os estriamentos são orientados ao longo do padrão lamelar subjacente. Estes estriamentos são extensões das fibras de Sharpey, compostas por fibras colágenas provenientes do tecido conjuntivo adjacente, que se inserem diretamente no osso. O osso fibroso nos maxilares é formado adjacente ao ligamento periodontal dos dentes fisiologicamente migrados (Misch, 2000).

O osso composto é um osso lamelar depositado em uma matriz de osso trançado. Durante o crescimento rápido e a cicatrização do ferimento, um retículo de osso trançado altamente poroso cresce e captura os vasos sanguíneos ao longo de uma superfície endóstea ou perióstea. O retículo trançado preenche então o espaço perivascular com lamelas de alta qualidade, que resulta em um osso composto com uma força adequada para suportar carga. Dependendo do ritmo da formação do retículo, o osso resultante será uma variação da compactação trabecular fina (osteons primários) ou grossa (osso espiralado) (Misch, 2000).

2.1.6 – METABOLISMO ÓSSEO

A remodelação, ou remodelagem é a principal via de alteração na forma óssea, resistência a esforços, reparo de feridas e, homeostasia de cálcio e fosfato do organismo. A associação de mediadores mecânicos, metabólicos, bioelétricos e locais (fatores de crescimento e citocinas) regulam o fisiologismo ósseo. Em condições fisiológicas, a formação do osso é principalmente regulada pela carga funcional, ou seja, o esforço a que é submetido. Por outro lado, os mediadores biomecânicos do metabolismo do cálcio (hormônio da paratireóide, estrogênio, vitamina D entre outros) predominam no controle da reabsorção óssea. A remodelagem é definida como uma modificação ou reestruturação interna do osso previamente existente (Misch, 2000).

A modelagem é uma atividade específica da superfície (aposição ou reabsorção), que produz uma alteração em cadeia no tamanho e/ou formato do osso. Esse processo se realiza de forma independente, o que significa dizer que a ativação celular caminha isoladamente para a formação ou a reabsorção. Por

definição, o osso compacto e o trabecular são considerados como blocos de tecido, sendo assim, a modelagem refere-se a uma alteração generalizada nas dimensões gerais do córtex ou do osso esponjoso. A modelagem é um mecanismo fundamental do crescimento, da atrofia e da reorientação (Misch, 2000).

O osso contém 99% de íons cálcio do corpo e, portanto é a principal fonte de liberação de cálcio quando os níveis de cálcio no sangue diminuem; esse processo é controlado pela glândula paratireóide. A baixa de cálcio no sangue é mediada por receptores nas células principais da glândula paratireóide, as quais liberam então o hormônio paratireóide (PTH). O PTH estimula os osteoblastos a liberarem interleucina 1 e 6, as quais estimulam os monócitos a migrarem para a área do osso. O fator de inibição de leucina (LIF), secretado pelos osteoblastos, coalesce monócitos em osteoclastos multinucleados, os quais então reabsorvem o osso liberando íons cálcio da hidroxiapatita para o sangue. Tal liberação normaliza os níveis sangüíneos de cálcio. Um mecanismo de retroalimentação dos níveis normais de cálcio sangüíneo desativa a secreção de PTH da glândula paratireóide. Nesse meio tempo, os osteoclastos reabsorvem matriz orgânica junto com a hidroxiapatita. A quebra do colágeno da matriz orgânica libera vários substratos osteogênicos, os quais estão ligados covalentemente com o colágeno e, isso por sua vez estimula a diferenciação dos osteoblastos que finalmente depositam o osso. Essa interdependência dos osteoblastos e osteoclastos na remodelação são denominadas “coupling” (Newman et al., 2004).

Com o envelhecimento, há uma tendência de a reabsorção óssea superar a sua reposição. Isso resulta em diminuição absoluta do volume trabecular (modelagem catabólica) e também do tamanho e da quantidade de trabéculas (remodelagem). Quando as trabéculas do osso esponjoso secundário são perdidas por causa de uma doença ou do envelhecimento, elas não são imediatamente repostas. Uma osteopenia relativa é classificada como osteoporose, se os sintomas de deficiência esquelética ocorrerem. As fraturas do pulso, coluna vertebral e quadris são os problemas mais comuns. Para que o suporte esquelético seja mantido, deve-se procurar manter a massa esquelética com uma dieta adequada, exercícios físicos e suplementos hormonais (Misch, 2000).

2.1.7 – PROPRIEDADES MECÂNICAS DO OSSO

O osso é um material compósito natural, com uma micro-estrutura complexa, sendo um material poroso e denso. Numa visão macroscópica, já referida, ele é classificado como cortical e trabecular. O osso cortical denso apresenta maior capacidade de suportar cargas que os ossos trabeculados mais porosos. Os valores para o módulo de elasticidade do osso cortical e do osso trabeculado apresentados na Tabela 4 foram tomados como uma média de vários valores citados na literatura (Patra, 2000). Para esses valores, o osso foi considerado isotrópico, linear, elástico, homogêneo e, seco.

A composição não homogênea e anisotrópica da estrutura óssea fornece diferentes valores para módulos de elasticidade quando o osso é testado em variados locais. A anisotropia está presente no tecido ósseo, pois as propriedades medidas neste tecido serão dependentes da direção realizada, sendo assim ele apresenta um valor para o módulo no sentido transversal diferente do valor do módulo no sentido longitudinal. Esses valores diferentes devem-se em parte, a condição composta do osso, ou seja, as fibras colágenas formam diferentes agrupamentos dependendo do tipo do osso, diferindo de um material com comportamento ortotrópico. O comportamento ortotrópico de um material compósito de fibra / matriz é dado pela direção das fibras que geralmente define seu comprimento e, a matriz definindo as propriedades transversais (Patra, 2000).

Tabela 4 – Propriedades mecânicas do osso (Patra, 2000; Galego et al., 2000)

| Material | Módulo de Young (GPa) | Resistência à Compressão (MPa) | Coefficiente de Poison |
|-------------------------|------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Osso Cortical</i> | 7.5 | 137,8 | 2.7 |
| <i>Osso Trabeculado</i> | 0.5 | 41,4 | 0.3 |

A razão entre a tensão e a deformação, dentro do limite elástico, nos fornece o módulo de Young, também chamado de módulo de elasticidade, sendo a deformação totalmente reversível e proporcional à tensão. O módulo de elasticidade é aplicado tanto na tração quanto na compressão e, refere-se ao coeficiente angular do gráfico de tensão/deformação obtido no ensaio. Quanto maior for esse módulo, mais rígido será o material ou menor será a deformação elástica resultante de uma determinada tensão aplicada (Callister, 2000).

2.2 – SUBSTITUTOS ÓSSEOS

Em odontologia, o termo substituto ósseo é utilizado rotineiramente para nomear biomateriais que são utilizados em diversas situações, tais como: para o preenchimento de defeitos ósseos, de alvéolos pós-exodontia, de espaços “vazios” entre os implantes osseointegrados instalados imediatamente e as paredes alveolares do terço cervical, bem como para preenchimento do seio maxilar. Esses biomateriais são levados ao organismo, por procedimentos cirúrgicos, recebendo denominações comumente utilizadas como: implante, enxerto ou transplante (Carvalho et al., 2004).

Um substituto ósseo para preencher as solicitações do tecido ósseo natural, deverá ter as seguintes características: (1) ser aceito com pequena ou nenhuma reação inflamatória, (2) ser rapidamente revascularizado, (3) ser substituído por novo tecido ósseo do receptor, e (4) sofrer a menor reabsorção de superfície pelo receptor (Bell, 1964). Na Tabela 5, estão relacionados alguns biomateriais disponíveis comercialmente, à base de CaP utilizados como substitutos ósseos.

Implante é o termo utilizado para definir qualquer dispositivo médico constituído por um ou mais biomateriais que é colocado no corpo, sepultado parcial ou totalmente abaixo do epitélio onde a intenção é deixá-lo por um significativo período de tempo. É considerado todo biomaterial que não apresenta células vivas; podemos citar como exemplo: hidroxiapatita, vidro bioativo, implante e, outros (Carvalho et al., 2004).

Enxerto é uma peça de tecido que é transferida de um local doador para um local receptor com o objetivo de reconstruir o local receptor. Este tecido pode ou não receber tratamento durante a transferência. Implica na presença de tecido com vitalidade que foi obtido e utilizado no mesmo tempo cirúrgico. Exemplo: enxerto gengival livre, enxerto de tecido conjuntivo, enxerto ósseo autógeno em forma de partícula ou em bloco (Carvalho et al., 2004).

O transplante aplica-se a uma estrutura completa, tal como um órgão, que é transferido de um local para outro ou de uma pessoa para outra com o objetivo de restabelecer a função (Carvalho et al., 2004).

Tabela 5 – Apresentação de cerâmicas, cimentos e vidro bioativo avaliados comercialmente, característica mecânica e porosidade (Habracken et al., 2007)

| Cerâmica/ Cimento | Consistência | Produto final | Resistência à compressão (MPa) | Porosidade |
|------------------------------|--|-----------------------------------|---|----------------------|
| <i>Biosorb</i> | β -TCP | Grânulos Ca/P=1.49-1.51 | 15–150 MPa | 5–45% macro+micro |
| <i>Chronos</i> | β -TCP | Grânulos | 7.5 MPa | 60–80% macro |
| <i>Endobon</i> | HA bovina | Grânulos | 2.5–16 MPa | Alta |
| <i>Interpore</i> | HA (coral) | Grânulos | Alta | 35% |
| <i>Pro-Osteon</i> | HA (coral) | Grânulos | 2–4 MPa | 65% |
| <i>Triosite</i> | 60% HA 40% α -TCP | Grânulos Ca/P=1.6 | > 10 MPa | 70% macro+micro |
| <i>Vitoss</i> | β -TCP | Grânulos | Baixa | 88–92% macro |
| <i>Biopex</i> | 75% α -TCP 18% TTCP 5% DCPD 2% HA | HA | \pm 80MPa | Micro |
| <i>Calcibon</i> | 61% α -TCP 26% DCPA 10% CaCO ₃ 3% pHA | Cálcio deficiente CA Ca/P=1.53 | 60–70 MPa | 44% micro |
| <i>Cementek</i> | α -TCP TTCP Ca(OH) ₂ | HA, Ca/P=1.64 | 20 MPa | 50% micro |
| <i>Bioglass 45S5</i> | 45% SiO ₂ 24.5% Na ₂ O 24.5% CaO 6% P ₂ O ₅ | Diferentes formas/filmes | | Baixa |

Abreviações da tabela: α/β -TCP, α/β -fosfato tricálcio; HA, hidroxiapatita; TTCP, fosfato de tetracálcio; DCPD, fosfato dicálcio dihidrato; DCPA, fosfato dicálcio anidro; CaCO₃, carbonato de cálcio; pHA, hidroxiapatita precipitada; TTCP, fosfato de tetracálcio; Ca(OH)₂, hidróxido de cálcio; SiO₂, dióxido de silício; Na₂O, óxido dissódio.

Biomaterial é qualquer substância, excluindo os fármacos, ou combinação de substâncias, sintética ou natural quanto à origem, que pode ser utilizado em qualquer período de tempo, como tratamento total ou parcial, aumento ou reposição de qualquer tecido, órgão ou função do corpo. O termo material biomédico pode ser utilizado como sinônimo (Carvalho et al, 2004).

Os biomateriais são classificados normalmente de acordo com sua origem, quanto ao seu mecanismo de ação e de acordo com seu comportamento fisiológico.

Quanto à forma que interagem com os tecidos adjacentes podem ser: biotoleráveis, aqueles que não estabelecem uma osseointegração verdadeira, levando a formação de uma cápsula fibrosa, geralmente delgada, acelular e contínua; bioinertes são os que estabelecem contato direto com o tecido ósseo circundante; bioativos estabelecem osseointegração direta e, também interagem com os tecidos vizinhos de forma a estimular a proliferação de células, a síntese de produtos específicos e a adesão celular (Carvalho et al, 2004).

Quanto ao mecanismo de ação, podem ser: osteocondutor, refere-se a capacidade do biomaterial em conduzir o desenvolvimento de novo tecido ósseo através de sua matriz de suporte (arcabouço). A matriz deve ser reabsorvida e simultaneamente substituída pelo tecido ósseo. O material osteocondutor não é capaz de estimular a neoformação óssea. Os materiais osteocondutores mais comuns são os aloplásticos e os heterógenos; osteoindutor, este processo envolve a formação de novo osso a partir das células osteoprogenitoras do leito receptor, derivadas das células mesenquimais indiferenciadas, que se diferenciam sob influência de um ou mais agentes indutores. Os materiais homogêneos e os autógenos são os agentes osteoindutores mais usados. Nos dias atuais tem sido questionada a função osteoindutora da maioria dos substitutos ósseos; osteogênico, a osteogênese é o processo pelo qual células ósseas vivas são enxertadas em um leito receptor e permanecem com a capacidade de formação de novo tecido ósseo; osteopromotor, é caracterizado pelo uso de meios físicos (membranas ou barreiras) que promovem o isolamento anatômico de um local, permitindo a seleção e proliferação de um grupo de células, predominantemente osteoblastos, a partir do leito receptor e simultaneamente impedem a ação de fatores concorrentes inibitórios ao processo de regeneração. Nesta técnica cria-se um espaço biológico entre a membrana e o defeito ósseo. A regeneração óssea guiada é a técnica que usa a osteopromoção como princípio biológico (Carvalho et al, 2004).

Quanto a sua origem pode ser: autógeno, obtido do próprio paciente, quer seja de sítios doadores intra ou extrabucais; aloenxerto ou enxertos homogêneos: obtidos em banco de osso humano, os quais são submetidos a um processo de congelamento e desidratação (FDBA) ou desmineralização, congelamento e desidratação (DFDBA); xenoenxerto ou enxertos heterogêneos recebem o mesmo

processo de tratamento dos aloenxertos, porém provém de doadores de outra espécie, como exemplo osso de origem bovina; aloplásticos são dispositivos de origem sintética utilizados para implantação no tecido vivo, como as biocerâmicas, compósitos (polímeros/hidroxiapatita), trifosfato de cálcio e os vidros bioativos. Esses materiais sintéticos são denominados como materiais de implante (Carvalho et al, 2004).

Idealmente os materiais de implante aloplásticos devem apresentar as seguintes características: ser biocompatível com os tecidos do hospedeiro (não-tóxico, não-alergênico, não-carcinogênico e não-inflamatório); estimular a indução óssea; ser reabsorvido à proporção que for sendo substituído por osso; ser radiopaco; ser esterilizável, sem afetar suas características; ser de fácil obtenção; ter custo acessível; ser estável com relação à temperatura e à umidade; ter porosidade, para permitir a condução óssea dentro e ao redor dos grânulos; ter propriedades físicas semelhantes às dos tecidos circundantes (Novaes Júnior et al., 2002).

Portanto os biocompósitos desenvolvidos nesse trabalho deverão preencher os critérios de um biomaterial ideal, tendo assim uma indicação de uso como preenchedores de defeitos ósseos, especialmente os da cavidade oral, que podem ser resultantes de tumores, doença periodontal, perda dentária, lesões periapicais, dentre outras.

Os biomateriais quanto à composição e arranjos atômicos podem ser metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos.

2.2.1 – METAIS E LIGAS

A maioria dos sistemas existentes de implantes dentários dos Estados Unidos é até hoje, preparada com metais ou ligas. Várias organizações estabeleceram normas para a padronização dos materiais de implante. A ASTM (American Society for Testing and Materials) através do ISO (International Standardization Organization) – ISO TC 106, ISO TR 10541 forneceu a base para tais padrões. Os implantes não-metálicos mais utilizados são os óxidos, o carbono ou os materiais de grafite similares aos óxidos (Misch, 2000).

Desde 1900, metais têm sido usados em clínicas ortopédicas. Titânio, aço inoxidável, Cr-Co, e ligas de titânio são exemplos de materiais que são comumente usados em sítios que receberão carga. Os principais grupos de materiais

implantáveis na Odontologia são o titânio e as suas ligas, as ligas de cromo-cobalto, o aço austenítico de Fe-Cr-Ni-Mo, o tântalo, as ligas de nióbio e zircônio, os metais preciosos, as cerâmicas e os materiais poliméricos (Misch, 2000).

Níquel e titânio (Ni-Ti ou nitinol) é uma liga de titânio com base termo elástica com a composição de 50% de níquel e 50% de titânio que apresenta propriedade como forma de efeito memória. Segundo Jafari et al., 2008, a forma de efeito memória é uma propriedade de materiais metálicos que demonstra habilidade para voltar à forma ou tamanho previamente definido quando submetidos a um processamento térmico apropriado. O níquel e o titânio apresentam ainda outras propriedades como superelasticidade, radiopacidade e biocompatibilidade. Assim, Ni-Ti torna-se uma liga bastante indicada para aplicações médicas como: implantes ortopédicos, agulhas, fio guia, fio ortodôntico, material de substituição óssea e instrumentos endoscópicos para colocação de *stents* e filtros.

Num estudo realizado por Dinca et al (2006) sobre citotoxicidade dos metais de alta pureza Ni-Ti, foram utilizados filmes finos de nitinol preparados pela técnica de deposição com laser pulsado. Os testes de compatibilidade celular foram realizados através de ensaios *in vitro* com cultura de células de microrganismos como levedura (*Saccaromyces cerevisiae*) e bactéria (*Escherichia coli*) para determinar o potencial tóxico dos filmes finos para as células. Foi observada a adesão dos microrganismos na superfície do nitinol além de analisada a formação e a quantificação do biofilme (comunidade microbiana associada a uma superfície dura). Os resultados mostraram não reatividade detectada em cultura celular aos filmes NiTi em comparação com um controle negativo. Com os resultados desses estudos e com dados semelhantes publicados na literatura, esses pesquisadores concluíram que a liga NiTi pode ser vista de forma atrativa para implante biológico seguro e portanto com aplicações clínicas promissoras.

A biocompatibilidade dos implantes fabricados de NiTi depende de uma camada de óxido de titânio resistente a corrosão para evitar o efeito tóxico e alérgico do níquel. O tratamento de oxidação de NiTi em presença de ar numa temperatura próxima de 500°C produz uma camada de óxido, protetora, lisa, de níquel livre que favorece a boa biocompatibilidade dos implantes de nitinol (Firstov et al, 2002).

Apesar das excelentes propriedades da liga NiTi como a conhecida superelasticidade, outras ligas como do sistema Fe-Cr-Ni e do sistema Cr-Co-Mo também apresentam boas propriedades mecânicas como ductilidade e excelente

elasticidade. Entretanto, tem sido relatado o desprendimento de diversos íons metálicos para os tecidos ao redor dos implantes, sendo atribuído ao processo de corrosão (Okazaki e Gotoh, 2008).

A composição da solução (usada em substituição aos líquidos teciduais) tem influência no desprendimento metálico, mas é, na maioria dos casos, o pH desta solução que reflete a quantidade de metais desprendidos. O forte efeito do pH foi mostrado pela diminuição na quantidade de desprendimento de Fe e Ni do aço inoxidável à proporção que o pH aumenta. Para as ligas de Co-Cr-Mo-Ni-Fe, a quantidade do Cr desprendida foi gradualmente aumentada com a diminuição do pH. A quantidade de Ni desprendida também aumenta gradualmente com o aumento do pH e o desprendimento do Co foi altamente afetado pelo pH. As quantidades de Ni e Ti desprendida da liga Ni-Ti foi marcadamente aumentada com a diminuição do pH ($\text{pH} \leq 4$), mas insignificante com o pH na razão de 4.0 para 7.5. Uma série de experimentos provou a excelente resistência à corrosão da liga Ni-Ti, reforçando assim o interesse em sua utilização na área biomédica (Okazaki e Gotoh, 2008).

A liga de titânio utilizada com mais frequência é Ti-Al-V, que na condição forjada essa liga é cerca de 6 vezes mais forte do que o osso compacto e, portanto, oferece mais oportunidades de desenhos com seções mais finas. O módulo de elasticidade da liga é ligeiramente maior do que o do titânio e, cerca de 5 a 6 vezes maior do que de um osso compacto. Tanto a liga (Ti/Al/V) quanto o titânio puro possuem na superfície o óxido de titânio. De um modo geral, tanto o titânio como as ligas de titânio apresentam interfaces descritas como “osseointegradas” (conexão direta entre o osso e o material implantado) ao implante, em humanos (Misch, 2000). Algumas das propriedades mecânicas dos metais e das suas ligas mais utilizadas nos implantes cirúrgicos estão na Tabela 6.

A liga à base do sistema Cr-Co-Mo é freqüentemente utilizada em condição metalúrgica de pré-fundida ou fundida/recozida. Isto permite a confecção de implante com desenhos personalizados, como os de estrutura subperiosteal. O cobalto fornece a fase matriz às propriedades básicas; as fases secundárias a base de cobalto, cromo, molibdênio, níquel e carbono oferecem resistência 4 vezes maior que a do osso compacto e resistência à abrasão da superfície. O cromo fornece a resistência à corrosão por formar o óxido na superfície; enquanto o molibdênio fornece resistência e tolerância à corrosão no volume (Misch, 2000).

Tabela 6 – Propriedades mecânicas dos metais e das ligas utilizadas nos implantes cirúrgicos (Murugan, 2005)

| Biometal | Módulo Elástico (GPa) | Resistência à tração (MPa) | Resistência à Compressão (MPa) | Dureza (Vickers Kg/mm) | Resistência à fadiga(MPa) |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| <i>Titânio(T)</i> | 110 | 300-740 | 550 | 120-220 | 240 |
| <i>Liga Ti-6Al-4V</i> | 120 | 860-1140 | 860 | 310 | 280-600 |
| <i>Aço inoxidável</i> | 190 | 500-950 | 600 | 130-180 | 260-280 |
| <i>Liga Co-Cr</i> | 210 | 665-1277 | 655 | 300-400 | 200-300 |

Muitos outros metais e ligas foram utilizados no preparo dos dispositivos de implantes dentários. As aplicações clínicas de determinadas ligas nos sistemas cirúrgicos dentários e ortopédicos foram muito positivas, considerando-se em especial o aumento da resistência. Entretanto, a busca por melhor integração do implante estimula pesquisa de outros materiais que possam até mesmo como revestimento do implante interferir de forma positiva na relação implante-tecido. Desenvolveu-se então o revestimento das superfícies metálicas, com cocção ou espargimento plasmático, além de outras técnicas, com as cerâmicas de CaPO_4 . Outros biomateriais, como cerâmicas bioativas e polímeros foram introduzidos como substitutos ósseos (Misch, 2000).

2.2.2 – CERÂMICAS

A maioria das cerâmicas consiste em compostos que são formados entre elementos metálicos e elementos não-metálicos. As cerâmicas são compostas por pelo menos dois elementos e, com freqüência mais do que isso, sendo assim as suas estruturas cristalinas são em geral mais complexas do que as dos metais. A ligação interatômica desses materiais varia desde exclusivamente iônica até totalmente covalente, apesar de muitas cerâmicas mostrarem uma combinação desses dois tipos de ligação. Os materiais cerâmicos cuja ligação interatômica é predominantemente iônica, as estruturas cristalinas podem ser consideradas compostas por íons. Os íons metálicos, ou cátions estão carregados positivamente,

pois eles doaram seus elétrons de valência para os íons de elementos não-metálicos, ou ânions, estes carregados negativamente (Callister, 2000).

2.2.2.1 – CERÂMICAS BIOINERTES

As cerâmicas foram introduzidas para fins ortopédicos durante os anos 1960. Elas têm alta resistência compressiva e dureza, além de serem também biocompatível e algumas bioativas. Na Tabela 7 estão relacionadas algumas propriedades mecânicas de cerâmicas implantáveis (Murugan, 2005).

As cerâmicas, sob o ponto de vista biológico, podem ser consideradas inertes. Estas são as cerâmicas de óxidos metálicos tais como: óxido de alumínio, de titânio e de zircônio; que foram utilizadas para os implantes com forma radicular, os implantes endósseos com forma de placa e nos implantes dentários retidos por pinos (Misch, 2000).

Tabela 7 – Propriedades Técnicas de Algumas Cerâmicas Utilizadas como Biomateriais (Murugan, 2005)

| Biocerâmicas | Módulo de Elasticidade (GPa) | Resistência Máxima à flexão (MPa) | Resistência à tração (GPa) | Resistência à compressão (GPa) | Dureza (HV) |
|-----------------------------|-------------------------------------|--|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| <i>Alumina</i> | 390 | 390 | 0.31 | 3.9 | 2000 |
| <i>Zircônia^a</i> | 205 | 1300 | 0.42 | 3 | 1150 |
| <i>Hidroxiapatita</i> | 80-110 | 37 | 0.05 | 0.4-0.9 | 600 |

Zircônia^a parcialmente estabilizada.

2.2.2.2 – CERÂMICAS BIOATIVAS

As cerâmicas conhecidas como bioativas são aquelas à base de fosfatos de cálcio (CaPO_4), bastante utilizadas em cirurgias ósseas reconstitutivas, inclui uma ampla variedade de tipos de implante. De um modo geral, essas biocerâmicas têm resistência, dureza e módulos de elasticidade inferiores às de formas quimicamente inertes, citadas previamente (Misch, 2000). Estas cerâmicas apresentam uma série de vantagens e desvantagens conforme citadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Vantagens e Desvantagens da Cerâmica de Fosfato de Cálcio (CFC) (Misch, 2000)

| Vantagens | Desvantagens |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • A química imita o tecido biológico normal (C, P, O, H). • Excelente biocompatibilidade. • Conexão entre a CFC e os tecidos moles e duros. • Condutibilidade térmica e elétrica Mínimas. • Módulos de elasticidade mais próximos do osso do que muitos outros materiais implantáveis. • Cor semelhante à dos tecidos duros. • Pesquisa extensa. | <ul style="list-style-type: none"> • Características químicas e estruturais variáveis (associadas à tecnologia e à química). • Resistências: mecânica, elástica e de cisalhamento, baixas sob ação da fadiga. • Baixa adaptação entre o revestimento e o substrato. • Solubilidade variável. • Estabilidade mecânica variável do revestimento, em condições de suporte de carga. • Uso excessivo. |

A cerâmica hidroxiapatita representa uma classe de material considerado duro, mas possui a característica fratura frágil. A resistência à fratura da hidroxiapatita é referida como $1.0 \text{ MPa m}^{1/2}$, que é muito baixa quando comparada a do osso natural cortical que é entre $2\text{-}12 \text{ MPa m}^{1/2}$ (Murugan, 2005).

Dentre essas cerâmicas, a hidroxiapatita é até os tempos atuais um dos biomateriais de muito interesse nas pesquisas, em função das características que apresenta. A Tabela 9 relaciona a abreviação, a fórmula química e a razão Ca/P para alguns compostos cerâmicos comparados a hidroxiapatita.

Tabela 9 – Abreviações de compostos de CaP, com fórmula química correspondente e razão Ca/P (Fernandes e Laranjeira, 2000; Habraken et al., 2007)

| Nome | Abreviação | Fórmula Química | Razão Ca/P |
|--|------------|--|------------|
| <i>Hidroxiapatita</i> | HAp | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ | 1.67 |
| <i>Hidroxiapatita Carbonatada</i> | CHA | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$ | 1.67 |
| <i>Fluorapatita</i> | FHA | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ | 1.67 |
| <i>α-Fosfato tricálcio – Whitloquita</i> | α-TCP | $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 1.50 |
| <i>β-Fosfato tricálcio – Whitloquita</i> | β-TCP | $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ | 1.50 |
| <i>Fosfato de octacálcio</i> | OCP | $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 1.33 |
| <i>Fosfato de cálcio amorfo</i> | ACP | $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ | 1.55 |

Colocada na vanguarda dos biomateriais, considerada eficaz e renomada, está a hidroxiapatita, que é um sal de fosfato de cálcio com uma organização cristalina bastante complexa. Esse sal tem um papel importante no processo de cicatrização do tecido ósseo, principalmente aquele com Ca/P na razão de 1.5-1.7, que quando sinterizado numa temperatura de 1300⁰C terá estrutura da apatita. A hidroxiapatita de cálcio [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] tem como constituintes principais Ca/P na razão 1.67 (DE Groot, 1980). A Figura 2 mostra a distribuição espacial num arranjo em forma hexagonal.

A hidroxiapatita possui uma alta solubilidade nos líquidos fisiológicos, não estimula resposta imunológica e, poderá ser ou não reabsorvida pelo organismo (dependendo da forma estrutural utilizada). Entretanto, quando usada pura em implantes apresenta uma alta taxa de migração, ou seja, as partículas não permanecem no local implantado (Gabrielli, 2001). Portanto esse material apresenta como desvantagem, a perda de estabilidade e, alteração da anatomia do implante, justificando a busca de um biomaterial compósito que possa superar esse inconveniente.

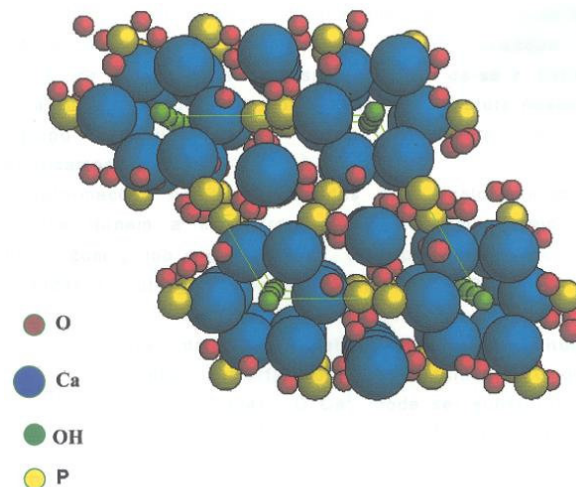


Figura 2 – Representação da estrutura cristalina hexagonal da hidroxiapatita (Mavropoulos, 1999).

O conteúdo mineral da hidroxiapatita, representado na Tabela 10, é semelhante ao do osso natural. A hidroxiapatita tem sido vista por possibilitar formação óssea quando colocada dentro de um defeito ósseo, surgindo uma ponte óssea estável na fenda entre o receptor e a hidroxiapatita, podendo ocorrer ligações diretamente com a hidroxiapatita implantada. A força de associação entre o osso e a hidroxiapatita indica que existe uma ligação direta entre eles, mais comumente via

uma modificação fisiológica e recristalização da superfície cristalina da HAP (Yamasaki, 1996).

Tabela 10 – Composição mineral do osso e da hidroxiapatita (Moreira, 2000)

| COMPOSIÇÃO QUÍMICA | OSSO | HIDROXIAPATITA |
|---------------------------|-------------|-----------------------|
| <i>Cálcio</i> | 37,0% | 39,03% |
| <i>Fósforo</i> | 16,0% | 18,7% |
| <i>Carbonato</i> | 4,0% | 2,0% |
| <i>Magnésio</i> | 0,4% | 0,14% |
| <i>Sódio</i> | 0,6% | 0,12% |
| <i>Potássio</i> | 0,05% | <0,05% |
| <i>Elementos Traço</i> | 0,05% | 0,02% |

Existem variadas fontes de origem das HAP_(s), podemos citar a forma sintética, produzida em um processo de temperatura elevada e as apatitas naturais derivadas de corais e, osso bovino. Também são várias as formas e tamanhos de apresentação das HAP_(s), particuladas ou em bloco, densas ou porosas, que vão exercer influência na velocidade de reabsorção e até mesmo na não reabsorção pelo organismo. A porosidade tem sido avaliada em diversos trabalhos, alguns avaliaram a influência exercida sob a reabsorção, *in vivo*.

As cerâmicas naturais derivadas de corais são feitas por conversão do carbonato de cálcio da estrutura do esqueleto de corais do mar formadores dos recifes em pura hidroxiapatita por reação de mudança química hidrotermal (Ukumura, 1991).

A produção de poros na fabricação da cerâmica visa o crescimento celular dentro deles. Uma das técnicas utilizadas para promover a formação de poros é através da mistura do pó de fosfato de cálcio com naftalina moída, formando partículas de 100-500 µm de diâmetro, sendo a porcentagem de porosidade regulada pela variação da proporção relativa da naftalina e fosfato de cálcio. Essa mistura é compactada por uma forma de vara dentro de uma máquina de teste Reichle, aquecida em um forno Glober a 400^oC por 4 h para elevar e remover a naftalina e, assim produzir um material poroso. Esse material será então sinterizado por 8h a 1100^oC. O produto final terá cálcio e fosfato numa razão molar de 1.6 e é composto principalmente por hidroxiapatita como foi mostrado por difração de Rx (Chueng, 1989).

Outra forma de se produzir cerâmicas com uma estrutura macroporosa é através de um pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e posterior sinterização. O tamanho dos poros poderá variar entre 150-250 μm (Klein, 1987).

Eggl e Schenk (1987) testaram hidroxiapatita e cerâmica fosfato tricálcio com o mesmo volume de porosidade mas, com diferente razão do tamanho do poro em coelhos por seis meses. A razão da substituição do implante (para fosfato tricálcio) e o crescimento ósseo (para fosfato tricálcio e hidróxiapatita) foram dependentes do tamanho do poro. O implante com a menor razão de tamanho de poro de 50-100 μm mostrou uma razão de degradação e crescimento ósseo significativamente maior do que o implante com a razão do tamanho do poro maior –200-400 μm .

Guillemin et al. (1992) compararam o comportamento quanto a reabsorção e aposição óssea, de dois corais, Porites e Acropora, após implantação durante 1 e 2 meses em ossos longos de carneiro e porco. Esses materiais são idênticos em composição (CaCO_3), mas diferentes em volume ($49 \pm 2\%$, $12 \pm 4\%$, respectivamente) e tamanho médio (250 – 500 μm) de porosidade. Diferentes resultados foram obtidos com porcos quando comparado com ovelha. As diferenças encontradas entre os dois modelos animais indicam que a reabsorção do coral bem como a razão de aposição óssea não pode ser precisamente determinada em tecido humano mineralizado sem um melhor entendimento dos parâmetros que governam a atividade das células ósseas em diferentes espécies, especialmente quando essas células estão em contato com materiais calcáreos estranhos. Tais estudos, concluíram que Porites, exibindo o volume de porosidade grande, foi reabsorvido mais rápido e mais completamente substituído que Acropora. Esses achados mostram que o coral usado em cirurgia será escolhido de acordo com a natureza da operação: a mais rápida reabsorção de Porites permitirá uma formação óssea mais rápida e maior, mas supõe-se uma fraqueza pela prematuridade do sítio implantado. Em contraste, a mais lenta reabsorção de Acropora deve permitir uma precoce estabilização óssea, mas necessitará de um tempo mais longo para a completa reabsorção.

Um estudo *in vivo*, realizado em ratos, utilizando associação de carbonato de cálcio a hidroxiapatita, verificou sua degradação total após três meses no defeito ósseo, sendo necessário, portanto, que a formação óssea aconteça em um tempo anterior a esse, para que o enxerto seja satisfatório. Também se observou que o carbonato de cálcio mantém o cálcio elevado na interface com o novo osso, o que

induziu o pensamento de que esse biomaterial deve ser incluído na categoria de material bioativo (Ohgushi et al., 1992).

Vários componentes de regeneração óssea são bem ricos nos grupos carboxilato e ou sulfato. Condroitin sulfato, o maior componente da glicoproteína do osso, é especialmente rico em ambos os grupos e é bem representado na substância intercelular do osso (Walker e Katz, 1983). Como proteínas têm muitos grupos carboxilatos expostos também, deve ser esperado que condroitin sulfato ligue especialmente forte o mineral carbonato e aquela proteína na proporção da concentração do seu grupo carboxilato exposto. O segundo possível modo de adesão entre o osso e a calcita envolve a fase inorgânica do osso. Foi observado que quando calcita é colocada dentro da solução contendo íon fosfato, um crescimento de hidroxiapatita pode formar nessa superfície. Essas investigações concluíram também que isso ocorre no pH na razão de 6.8-8.3 e $1 \times 10^{-4} \text{M}$ de fosfato total. Nessas condições, o crescimento ocorre epitaxialmente como hidroxiapatita cristalina (Walker e Katz, 1983).

Entre os biomateriais temos também a cerâmica bioativa composta por apatita, wolastonita contendo cerâmica vítrea que é bastante utilizada clinicamente. Ela forma uma ligação química com o osso através de uma camada de apatita num pequeno intervalo de tempo, além de manter uma alta resistência mecânica por um longo tempo, mesmo submetida à determinada carga. Cerâmicas bioativas de vários tamanhos e formas (bloco, granular e formas densa e porosa) são produzidas em escala para utilizações médicas. Cerâmicas bioativas em blocos são usadas freqüentemente para substituição vertebral, reconstrução de crista íliaca e preenchimento de cavidades após excisão de tumores ósseos. As formas granulares são usadas com freqüência para preencher pequenos espaços ao redor de um bloco ou defeitos irregulares na superfície óssea, tais como encontrados numa revisão cirúrgica de perda asséptica de prótese do quadril (Ikeda, 1999). Também ambas as formas podem ser usadas na cavidade oral associada a implante dentário, em perdas ósseas devido a doenças periodontais e em preenchimento de alvéolo após extração dentária.

Num estudo comparativo entre a cerâmica vítrea bioativa e a cerâmica vítrea não bioativa concluíram que a condição essencial para a cerâmica vítrea ligar-se ao osso é a formação da camada de apatita na superfície do material avaliado no meio ambiente corpóreo, mas não é indispensável conter apatita dentro desse material. A

bioatividade do vidro e da cerâmica vítrea pode ser avaliada *in vitro*, pelo exame da formação da camada de apatita na superfície do material, no fluido corpóreo simulado. As características da composição e estrutura da superfície da apatita são similares aquelas da apatita do osso natural, então é esperado que ligações químicas fortes se formem entre a superfície do implante de apatita e a apatita do osso quando eles estão em contato direto um com o outro (Kokubo et al., 1990).

Outro estudo comparativo foi feito com o implante da matriz óssea desmineralizada associada ou não ao sulfato de cálcio. Os autores concluíram que esse implante pode resultar em significativo aumento de regeneração do osso alveolar e do cimento em modelo pré-clínico. Essa regeneração observada pareceu não relacionada com atividade biológica residente na matriz óssea desmineralizada, mas sim com o espaço proporcionado pelo implante, como pode possibilitar outros substitutos ósseos e derivados (Kim et al., 1998).

“Healos” é um material de enxerto ósseo desenvolvido nos moldes da cópia da forma e composição do osso autógeno. É uma matriz colágena mineralizada feita com os mesmos componentes que constitui os dois elementos primários não celulares do osso natural: colágeno tipo I e hidroxiapatita. A matriz “Healos” é feita por cobertura uniforme do colágeno tipo I com hidroxiapatita microcristalina, seguindo a fabricação do colágeno mineralizado dentro da célula fechada, uma matriz como esponja com uma média contínua de tamanho de poro de 50 a 150 microns. “Healos” promove formação óssea por prover um arcabouço direto onde ocorre à formação óssea e, é o único que é totalmente substituído por osso como parte do processo de cicatrização natural. Ambos estudos, pré-clínico e clínico tem mostrado que “Healos” combinado com medula óssea autógena é comparável ao enxerto autógeno em promoção bem sucedida de formação e fusão óssea. O mecanismo de ação de “Healos” é conhecido pelas características de seus componentes. Considerável desempenho biológico e biocompatibilidade da hidroxiapatita e colágeno foram avaliados e desde então ambos têm sido usados por décadas em dispositivos médicos aprovados para uso em humanos. Seu uso difundido em geral como: enxerto ósseo, cobertura protética para preenchimento em junta, reconstrução maxilofacial e, tratamento de defeitos periodontais tem proporcionado anos de uso humano sem nenhuma evidência de toxicidade do material ou incompatibilidade (Poser, 2001).

Estudos *in vitro* têm confirmado a biocompatibilidade da hidroxiapatita e, demonstrado a influência do fosfato de cálcio na adesão e função celular. Uma larga cadeia de tipos celulares, incluindo osteoblastos formadores de osso, osteoclastos da reabsorção óssea, células da medula óssea e fibroblastos, pode aderir a hidroxiapatita devido ela ter avidade natural por proteínas que sustentam adesão celular. Cheung e Haak, 1991concluíram que hidroxiapatita não é citotóxica. Células de crescimento na hidroxiapatita remanescente viável, prolifera e mantém o potencial de diferenciação integral, como evidenciado pela habilidade dos osteoclastos para metabolizar hiddroxiapatita de uma maneira funcionalmente idêntica ao osso (Okumura et al., 1991).

Teste *in vitro* (Cheung e Haak, 1991) foi feito com cerâmica fosfato de cálcio, por ser um material largamente usado como implante dentário e ortopédico. Foram escolhidos células ósseas, condrócitos e fibroblastos periosteais como culturas testes. Além da viabilidade celular, também foi monitorado o efeito do material teste na resposta hormonal e na síntese de proteína pelas células ósseas. Os resultados foram avaliados por microscopia ótica e varredura, sendo também feita análise estatística. Ao exame no microscópio de varredura foi revelado que as superfícies dos discos cerâmicos vistos apresentavam células ligadas, multiplicadas e, formação de cobertura tecidual na superfície; células foram também estendidas da superfície para dentro do interior dos poros da cerâmica.

Ainda nos dias atuais, a busca é constante por um substituto ósseo que preencha todas as necessidades, no entanto, apesar das inúmeras pesquisas o material ideal ainda está por vir. Cerâmica hidroxiapatita com poros mostra superioridade se comparadas as sem poros não só na atividade dos osteoblastos como também na formação óssea progressiva, quando avaliados *in vivo*. Também a atividade da fosfatase alcalina e produção de osteocalcina foram aumentadas quando na presença da hidroxiapatita porosa, *in vitro* (Okamoto et al., 2006). Entretanto esse fato observado ocorre devido à presença de células da medula óssea associadas à hidroxiapatita, o que confere a característica de osteogênese (Okumura et al., 1991).

As cerâmicas porosas têm sido utilizadas como arcabouços para células da medula óssea e, vem desempenhando um bom papel pelas suas características. Ainda assim, contínua a busca de materiais com melhor desempenho como, por exemplo, ser osteoindutor. Apesar da biocompatibilidade e bioatividade das

cerâmicas fosfato de cálcio, além das suas variadas taxas de reabsorção (De Groot, 1980) elas possuem também a desvantagem de ser um material com relativa fragilidade, limitando a sua aplicabilidade a locais que não necessitem suportar carga. Ainda como desvantagem pode ser citada a migração das partículas do local implantado antes do crescimento do novo tecido (Galego et al., 2000).

As hidroxiapatitas naturais originadas de corais são reabsorvidas e substituídas progressivamente por novo osso (Guillemin et al., 1989), sendo um bom material osteocondutor, mas apresenta como desvantagem, além das comuns das apatitas, produção limitada.

A cerâmica vítrea bioativa (cerâmica vítrea A-W contendo apatita cristalina e wollastonita em uma matriz vítrea $MgO-CaO-SiO_2$) forma uma camada rica em Ca-P em sua superfície quando imersa em fluido corporal simulado (SBF), mostrando sua biotividade e provável força de união com o osso *in vitro* (Kokubo et al., 1990), o que estimula seu uso como substituto ósseo, apesar das limitações semelhantes as cerâmicas a base de fosfato de cálcio.

2.2.3 – POLÍMEROS

O polímero polimetilmetacrilato (PMMA) foi o primeiro polímero sintético usado na prática clínica em 1937. Desde então numerosos polímeros são desenvolvidos e usados numa variedade de aplicações médicas e ortopédicas. Eles podem ser classificados em dois tipos distintos: (1) polímeros biodegradáveis (ex: colágeno, gelatina, ácido polilático (PLA), ácido polilático-co-glicólico (PLGA), poli(3-hidroxiбутирато) (PHB), etc.); (2) polímeros não biodegradáveis (ex: polietileno (PE), politereftalato (PET), polimetilmetacrilato (PMMA), etc) (Murugan, 2005). Na Tabela 11 estão relacionadas algumas propriedades mecânicas de polímeros biodegradáveis e não biodegradáveis utilizados até o momento.

Polihidroxiálcanoato (PHA) é um termo geral utilizado para poliésteres produzidos por polimerização por condensação de ácidos hidroxi-alifáticos saturados. Entretanto esse termo não é muito comum porque vários produtos que tem como origem um PHA não usam essa terminologia, mas sim a cognata. Podemos citar como exemplo produtos cuja composição é à base de ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL) e seus copolímeros. Os PLA, PGA e PCL são materiais de conhecida biodegradabilidade, biocompatibilidade

e livres de toxicidade. A necessidade constante de materiais biodegradável tem estimulado o desenvolvimento de sistemas de liberação de droga, engenharia tecidual e medicina regenerativa. Podemos citar alguns tipos de formulação desses PHAs como mono-fibras, fibras torcidas, filmes, tecidos, esponjas e partículas injetáveis que foram desenvolvidas para atender as necessidades. O PHA teve seu primeiro uso prático na área médica e, em 1966 Kulkarni relatou o uso de material de PLA como prótese óssea em cirurgia da cavidade oral (Ueda e Tabata, 2003).

Tabela 11 – Propriedades mecânicas de polímeros (Murugan, 2005; Godbole, 2003; Ramakrishna, 2001)

| Polímeros | Módulo Elástico (GPa) | Resistência à tração (MPa) |
|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| Biodegradáveis | | |
| Poli(L-ácido lático) | 2,7 | 50 |
| Poli(D,L-ácido lático) | 1,9 | 29 |
| Poli(caprolactano) | 0,4 | 16 |
| Poli(β -hidroxibutirato) | 1,7 | 18,29 |
| Não biodegradáveis | | |
| Polietileno (PE) | 0,88 | 35 |
| Poliuretano (PU) | 0,02 | 35 |
| Politetrafluoretileno (PTFE) | 0,5 | 27,5 |
| Polimetilmetacrilato (PMMA) | 2,55 | 59 |
| Poli (tereftalato de etileno) (PET) | 2,85 | 61 |

Os maiores fatores que devem ser considerados na aplicação clínica de um material biodegradável são: a toxicidade dos produtos degradados, a razão da biodegradação e, a resistência física e mecânica dos materiais. Essas são algumas exigências para cada uso específico. Podemos citar como exemplo, a matriz para o sistema de distribuição de droga (DDS) que necessita da interação com as drogas e o ótimo perfil de liberação da droga incorporada. No caso das suturas cirúrgicas e arcabouços para engenharia de tecido, as necessidades serão de força física para manter a estrutura, a compatibilidade com caracteres físicos e tecidos receptores e, a degradabilidade coordenada com o reparo tecidual. Um dos mais importantes pontos no desenvolvimento dos dispositivos biodegradáveis permanece sendo coordenar a sustentação do reparo tecidual e a retenção de drogas terapêuticas com o perfil de biodegradação dos materiais (Ueda e Tabata, 2003).

A hidrólise do ácido poli-lático (PLA) e ácido poli-glicólico (PGA) são seguras no corpo hospedeiro, porque são moléculas metabólicas comuns encontradas nos sistemas vivos incluindo o humano. PGA é o material mais comumente usado em aplicações clínicas, principalmente para suturas. Atualmente considera-se que o PLA passará a ser mais usado por ele apresentar uma menor biodegradação e mais fácil processabilidade do que o PGA. Devido a biodegradação do PGA ser rápida, a reação inflamatória provocada pelos produtos degradados criará problemas para o reparo tecidual quando uma quantidade maior for implantada. Além disso, é mais difícil produzir microesferas de PGA para distribuição lenta de drogas, porque PGA só pode ser dissolvido em solventes incomuns. PCL tem sido predominantemente considerado para sistemas de distribuição de droga, porque o PCL está sempre no estado borrachóide em temperatura ambiente, por isso apresenta uma excepcional baixa temperatura de transição vítrea (T_g) de $-62\text{ }^\circ\text{C}$ e uma baixa temperatura de fusão (T_m) de $57\text{ }^\circ\text{C}$, sua degradação é muito lenta in vivo e tem a propensão para formar blendas compatíveis em larga razão com outros polímeros. PCL já tem sido usado em processos clínicos como dispositivo contraceptivo implantado por um ano (Ueda e Tabata, 2003).

Considerando a fácil produção dos biomateriais com características reproduzíveis e desejadas (controle de biodegradabilidade e compatibilidade com células, tecidos e drogas), co-polímeros ou blendas de PLA, PGA, PCL, ou outros materiais são freqüentemente usados em sistemas de distribuição de droga e tecido de engenharia. Existem alguns derivados naturais dos PHAs, tal como o poli(3-hidroxi-butirato) (PHB), que não tem sido largamente aplicado na área médica por causa de sua baixa degradação no corpo humano (Ueda e Tabata, 2003). Dispositivos de PHA são hidrolisados por PHB depolimerase extracelular, as quais são secretadas por várias espécies de microorganismos, observado in vitro (Tsuge et al., 2004).

A biodegradação desses polímeros, os PHAs, pode realizar-se pela mudança do comprimento da cadeia polimérica e distância entre os grupos ésteres. Diferentes polímeros desse grupo são formulados, variando de um material forte e quebradiço (poli(3-hidroxi-butirato)) a uma estrutura mais flexível (poli(3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato)(poli(3HB-co-3HV)) e poli(3-hidroxi-butirato-co-hidroxi-hexanoato) poli(3HB-co-HHx) (Habraken et al., 2007).

Polímeros de base biológica incluem vários polímeros produzidos a partir de recursos naturais renováveis e CO₂, seus derivados e, suas blendas e compósitos. Recursos naturais fósseis são limitados, já recursos naturais renovável são sustentáveis.

Um polímero de base biológica é o poli(3-hidroxi-butarato) (PHB) que é produzido a partir de recursos naturais renováveis tais como glicose e óleos vegetais por uma grande variedade de microrganismos. O PHB tem atraído muita atenção por ser um termoplástico biodegradável no meio ambiente e possuir biocompatibilidade o que abre um importante espaço para aplicações médicas (Tsuge et al., 2004).

Para ampliar escolhas e em função da diversidade das propriedades dos polímeros, tem-se aumentado a busca por outros polímeros naturais tais como colágeno, ácido hialurônico e quitosana. Quitina que é o precursor da quitosana, é um dos mais abundantes polímeros naturais.

Atualmente quitosana tem sido alvo de muito interesse para aplicações médicas e farmacêuticas. A explicação para todo esse grande interesse está em suas atraentes propriedades intrínsecas. Quitosana é conhecida pela sua biocompatibilidade, tendo diversas aplicações na área médica, dentre elas podemos citar aplicação tópica ocular, implantação ou injeção. Também a quitosana é metabolizada por algumas enzimas humanas, as lisoenzimas, sendo assim considerada biodegradável. Além disso, tem sido publicado que a quitosana tem um grande poder de penetração na junção epitelial fechada forte. Devido ao pH fisiológico positivo, quitosana é também um bioadesivo, que aumenta a retenção no sítio aplicado. Ela além de promover cicatrização de feridas, tem também ação bacteriostática. Além dessas propriedades, ela é abundante na natureza, tem uma produção de baixo custo e é interessante ecologicamente. A quitosana é usada como componente de hidrogéis, para aplicações médica e farmacêutica (Berger et al., 2004).

2.2.3.1 – POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (PHB)

A *Ralstonia eutropha* H16 é uma das bactérias capazes de mobilizar o PHB anteriormente acumulado e usar os produtos da degradação por uma ou duas divisões celulares, mesmo na ausência de uma fonte exógena de carbono. Muito pouco PHB será mobilizado se a síntese protéica não for possível devido à ausência

da fonte de nitrogênio, indicando que a mobilização do PHB é feita no consumo de energia celular. Também essa conclusão é reforçada pela observação de que agentes que rompem ligações, isto é, inibidores de força motora protéica, tais como carbonil cianido *m*-clorofenilhidrazona, aumentam a razão de mobilização do PHB. Na ausência do PHB (tensão PHB 4), a bactéria morre rapidamente, se faltar também o carbono (Handrick et al., 2000).

Estudo da cristalinidade dos poliésteres P(β HB-co- β HV), por difratograma de raio-X, mostrou que eles são materiais semicristalinos, tendo apenas a presença de uma fase cristalina em toda a composição. Isso nos mostra que esses copolímeros apresentam isodimorfismo, que significa que copolímeros com diferentes relações de monômeros cristalizam de uma maneira semelhante, ou seja, diferentes tipos de unidades de monômeros têm aproximadamente a mesma forma, o mesmo volume e a mesma conformação (Galego et al., 1999). A Figura 3 mostra a estrutura molecular da unidade repetitiva, monômero, do PHB.

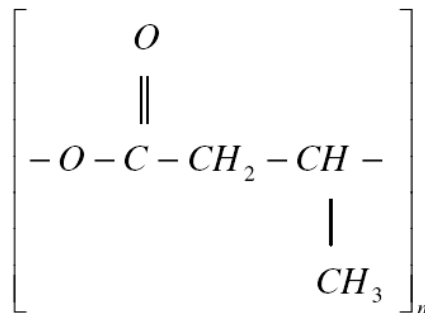


Figura 3 – Estrutura molecular da unidade repetitiva do homopolímero PHB (Padermshoke et al., 2005).

Polímeros cristalinos são capazes de cristalizar entre a temperatura de transição vítrea (T_g) e a temperatura no ponto principal de fusão (T_m). De acordo com a divergência no estado inicial, o processo de cristalização pode ser classificado dentro de duas categorias. Uma é chamada de cristalização de fusão, que significa que o estado inicial é o estado fundido e a amostra do polímero parou na temperatura maior que a primeira T_m . A outra é chamada cristalização a frio, que significa que o estado inicial é o estado amorfo e a amostra do polímero deve parar na temperatura menor que a primeira T_g . Em geral, polímeros cristalinos são capazes de cristalizar ou a partir da fusão ou do estado amorfo (Qiu et al., 2003).

A técnica de DMA é útil para determinar, além das principais relaxações como a transição vítrea, fusão e cristalização, também as relaxações secundárias referentes à fase amorfa. Essas relaxações secundárias são resultantes de

movimentos moleculares mais localizados, de menor magnitude, pois abaixo da T_g a mobilidade das cadeias é reduzida. Elas são classificadas, a partir da T_g , em ordem alfabética na seqüência em que ocorrem como: β , γ , δ , etc. que é classificada como transição α^2 (Cassu e Felisberti, 2005).

Estrutura alternada de lamelas cristalinas finas e delgadas camadas amorfas constituem a microestrutura básica de polímeros. O tamanho e a forma dessas estruturas estão diretamente relacionados com dois fatores: estrutura molecular (peso molecular, grau de ramificação, comprimento e distribuição da cadeia lateral) e história térmica (razão de resfriamento, temperatura de cristalização, temperatura de fusão, etc) (Luo et al., 2002).

O comportamento da degradação enzimática dos cristais lamelares de PHA por algumas PHB depolimerases tem sido estudado empregando a microscopia de força atômica na superfície de filmes finos de PHA cristalizados fundidos. A Microscopia de Força Atômica (AFM) é uma ferramenta importante para observar a mudança morfológica dos cristais lamelares durante o processo de degradação enzimática, em tempo real, em um ambiente aquoso. Numa observação de imagens de um filme fino de um copolímero (hidroxibutirato (HB)/hidroxihexanoato (HHX) na formulação P(3HB-co-5 mol% 3 HHX) foram vistos antes da degradação enzimática, dois tipos de cristais na superfície do filme consistindo de cristais lamelares de 8 – 10 nm de espessura e cristais de superfície finos de 4 – 5 nm de espessura. Após a adição de enzima dentro da solução de armazenamento, mudanças morfológicas da superfície do filme durante degradação enzimática foram diretamente observadas na solução armazenada fosfatada com enzima. No estágio inicial da degradação enzimática, camadas finas na superfície de 4 – 5 nm de espessura formadas à temperatura ambiente foram completamente erodidas pela enzima e, os cristais lamelares mais densos (8 – 10 nm de espessura) permaneceram quase sem alteração, o que sugere que cristais mais finos são preferencialmente hidrolisados por PHB depolimerases. Como a espessura lamelar permaneceu quase a mesma pelo processo de degradação enzimática, isso sugeriu que os cristais lamelares foram hidrolisados ao longo dos eixos cristalográficos a. Esses resultados indicam que a degradação enzimática ocorre predominantemente na borda e região final dos cristais e posteriormente na superfície da cadeia dobrável (Tsuge et al., 2004).

Em alguns casos, cristais lamelares em filmes finos de PHA foram também erodidos na parte média dos cristais ao longo de eixo cristalográfico b, formando

assim pequenas fendas. Dessas fendas, a degradação enzimática acontecia ao longo do eixo a. Esses resultados sugeriram que cristais lamelares são compostos de regiões de forte empacotamento de cadeia e regiões com empacotamento de cadeia menos ordenado e que aquelas regiões defeituosas ao longo de ambas as direções do cristal, longitudinal (eixo-a) e lateral (eixo-b) são preferencialmente erodidas por PHB depolimerases. Sendo assim, acredita-se que o processo de degradação enzimática consiste de dois arranjos: um é a degradação ao longo do eixo a, resultando na formação morfológica de cristais quebrados com intervalos de 30 – 80 nm e, outro com hidrólises ao longo do eixo b criando algumas fendas, das quais a degradação seguinte continua ao longo do eixo a (Tsuge et al., 2004).

Degradação enzimática de maneira semelhante ao longo dos eixos cristalográficos a tem sido visto em superfície de filmes finos de outros PHAs como: poli[(R)-3HB-co-(R)-3-hidroxicaprolato] e poli[(R)-3HB-co-6-hidroxihexanoato] (Tsuge et al., 2004).

Testes *in vitro* têm mostrado que o PHB é biocompatível a várias linhas celulares como osteoblastos, célula epitelial e condrócitos ovino. As últimas pesquisas têm avaliado a biocompatibilidade do PHB sendo utilizado como arcabouço para cultura de células e também estão voltadas para o esforço em melhorar as propriedades mecânicas do PHB fazendo blendas dele com outros polímeros. O PHB tem como restrição sua aplicação em reparo de cartilagem, pois suas propriedades mecânicas são inferiores às requeridas pela cartilagem pelo papel que ela desempenha no corpo humano. Filmes feitos de PHB e PHBHHx blenda mostrou aumentar a biocompatibilidade se comparada com o PHB sozinho, quando avaliado o crescimento dos fibroblastos de rato da linha celular L929 nesses filmes. Também arcabouços de PHBHHx/PHB contendo 60% em peso PHBHHx provou biocompatibilidade suportando o crescimento e função fisiológica de condrócitos (Zhao et al., 2003).

Embora existam algumas controvérsias sobre a biodegradabilidade do PHB ou PHA no corpo, existe uma segura evidência da degradação do PHB *in vivo*. Recentes pesquisas relataram que um tampão temporário utilizado dentro do intestino num defeito na víscera de um rato Wistar, resistiu por um longo período de tempo as secreções intestinais, quando então foi degradado integralmente após 26 semanas. O resultado dessa pesquisa vem sugerir também uma relação entre a degradação do PHB *in vivo* e as enzimas pancreáticas (Zhao et al., 2003).

2.2.3.2 – QUITOSANA (Q)

A quitina foi aparentemente usada pela primeira vez por Bradconnot em 1811 e, é o segundo biopolímero mais abundante na terra, logo após a celulose. Quitina é um $\beta(1\rightarrow4)$ ligado ao glicano, mas é composto de 2- aceto-amido-2-dioxi- β -D-glicose (N-acetilglicosamina) (Shahidi, 1999).

Quitosana é o nome usado para a forma de baixo acetil substituto de quitina e é composto primariamente de glicosamina, 2-amino-2- dioxi- β -D-glicose, conhecida como (1 \rightarrow 4)-2-amino-2-dioxi-(D-glicose) (Shahidi, 1999). A quitosana é um amino polissacarídeo (poli 1,4 D-glicosamina) que pode ter diversas aplicações como materiais; é uma forma desacetilada parcial da quitina que é um polímero de estrutura primária encontrado no exoesqueleto de artrópode. Normalmente as formulações de quitosana comerciais avaliadas apresentam graus de disacetilação variando de 50 a 90%. A Quitosana, que possui a estrutura química mostrada na Figura 4, é um polissacarídido cristalino que normalmente é insolúvel em solução aquosa com pH acima de 7. Entretanto, se diluir em solução ácida (pH < 6), os grupamentos amino livres são protonados e a molécula torna-se solúvel. A quitina e a quitosana são heteropolímeros (Madihally e Matthew, 1999).

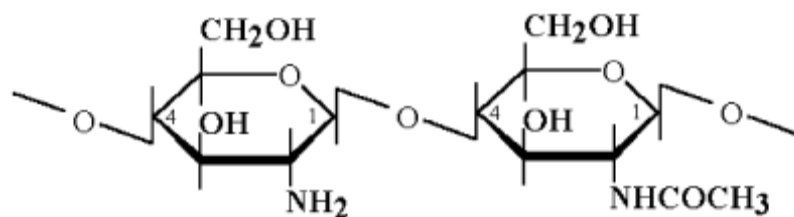


Figura 4 – Estrutura molecular da quitosana (Madihally e Matthew, 1999).

Atualmente a maioria dos polímeros é sintético, o que lhes confere biocompatibilidade e biodegradabilidade muito mais limitada que os polímeros naturais como celulose, quitina, quitosana e seus derivados. Tanto quitina como quitosana são recomendados para o uso porque possuem excelentes propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, propriedades de adsorção, dentre outras. A quitina é altamente hidrofóbica e, insolúvel em água e muitos solventes orgânicos. Quando quimicamente modificadas as estruturas da

quitina e quitosana tornam-se solúveis em solventes orgânicos em geral (Kumar e Majeti, 2000).

Um número significativo de pesquisas entre 1988 e 1998 foi feito para avaliar a resposta dos tecidos aos implantes à base de quitosana. Em geral, tem sido encontrado que o material provoca uma reação mínima de corpo estranho, sendo considerado um material biocompatível. A degradação desse implante tem mostrado ser comumente por hidrólise mediada por lisoenzima, sendo a taxa de degradação inversamente proporcional ao grau de cristalinidade. A cristalinidade de materiais da família quitina-quitosana exibiu um nível mínimo para intermediário de desacetilação da quitina e a quitosana completamente desacetilada mostrou um maior nível de cristalinidade. Acredita-se que a baixa taxa de degradação do implante de quitosana totalmente desacetilada é devido à inabilidade da enzima hidrolítica em penetrar na microestrutura cristalina. Essa questão tem sido contornada pela derivação da molécula em vários tipos de cadeias laterais. Tais tratamentos alteram o empacotamento de cadeia e aumentam a porção amorfa, assim permitindo mais rápida degradação. Eles também vão afetar ao mesmo tempo, ambas as propriedades: mecânica e solubilidade (Madihally e Matthew, 1999).

A quitina tem sido conhecida por formar arranjo microfibrilar em organismos vivos. Essas fibrilas são normalmente embebidas em uma matriz protéica e apresentam diâmetros de 2.5 a 2.8 nm. Para se obter a quitina tecida ou fibras de quitosana, o polímero bruto deve ser devidamente redissolvido após a remoção de material estranho como proteína e carbonato de cálcio, que reveste as microfibrilas (Kumar e Majeti, 2000).

Quitosana e alguns de seus complexos entre outras utilizações têm sido estudados para ser usada em várias aplicações médicas, dentre elas, como sistema distribuidor de drogas, em ferimento de tecidos, implante para preenchimento de espaço e arcabouços em tecidos (Madihally e Matthew, 1999).

O material ideal para preenchimento de defeitos ósseos periodontais deve ser um material altamente osteocondutivo, como exemplo o cimento fosfato de cálcio dentro de uma matriz elastomérica reabsorvível, não rígida. A matriz elastomérica provê uma conformação que permite um pequeno movimento dentário, sem deslocar ou fraturar o implante. Este material pode ser útil onde movimento não pode ser completamente eliminado e ao mesmo tempo deseja-se deposição de um novo osso, o que é verificado no caso dos defeitos periodontais. A quitosana e seus

derivados, pelas características citadas, parecem apresentar os requisitos necessários para ser essa matriz elastomérica (Takagi et al., 2003).

2.2.4 – BIOCAMPÓSITOS POLÍMERO/CERÂMICA

A engenharia tecidual direciona a substituição de tecidos por cultura celular numa matriz tridimensional de polímero sintético. Essa matriz contribuirá para a regeneração óssea, por criar e manter canais que facilitam a migração, proliferação e diferenciação de células progenitoras. Os principais requisitos que devem ser preenchidos pelas matrizes poliméricas são: criar um espaço com tamanho e forma próprios para o desenvolvimento do tecido, possibilitar que as células dos tecidos vizinhos migrem para dentro dele, além de idealmente em sua superfície, proporcionar ancoragem para as células, o que garantirá sobrevivência para a maioria delas (Ge et al., 2004).

Portanto, essas matrizes, também chamados arcabouços têm como objetivo permitir e favorecer a proliferação de células coletadas e cultivadas. São elas que promovem a obtenção do aspecto tridimensional do tecido ou órgão que se deseja reconstituir. Tanto podem ser de origem natural, como sintéticos. Os naturais podem simular o ambiente celular, no entanto os sintéticos, dentre eles os polímeros, apresentam a vantagem de controlarem melhor certas propriedades dos materiais, como a absorção.

O arcabouço ideal deve ser de estrutura: tridimensional, ter um número elevado de poros, sendo interconectados (Habraken et al., 2007); biocompatível com a sua taxa de absorção; portador de uma superfície apropriada para adesão, proliferação e diferenciação celular; possuidor de propriedades mecânicas semelhantes as do sítio receptor. Matrizes poliméricas têm sido pesquisadas e consideradas promissoras para essa utilização.

Em estudos anteriores os arcabouços (scaffolds) feitos pela Engenharia de Tecidos eram preparados apenas com materiais cerâmico, nos dias atuais a maioria das pesquisas em andamento relaciona os arcabouços polímero/cerâmico. Estudos anteriores demonstraram que arcabouços de materiais cerâmicos podem constituir um apropriado material de implante para tecido ósseo de engenharia, pois se pode introduzir micro e macro porosidade, assim, eles podem formar um arcabouço apropriado para células e servir como um veículo distribuidor de drogas

osteointutivas. Entretanto, existem alguns problemas difíceis de solucionar com o arcabouço unicamente cerâmico, que são baixa degradabilidade do material e pobre propriedade mecânica, como baixa resistência à fratura. Na Tabela 12 estão relacionados alguns polímeros utilizados em associação a cerâmica como biomateriais implantáveis. A adição de polímero biodegradável visa aumentar a degradabilidade do compósito e alterar suas propriedades físico/mecânica reduzindo a fragilidade. Pode ainda, se o arcabouço for utilizado para distribuição de drogas, ser alterado o perfil de distribuição das drogas por existir uma grande razão de diferentes polímeros que podem ser selecionados, que apresentam taxa e mecanismos de degradação diferentes (Habraken et al., 2007).

Tabela 12 – Relação dos polímeros usados em compósitos com cerâmicas até o momento (Habraken et al., 2007)

| Grupo | Polímeros |
|--|--|
| <i>Ácido polilático/ poliglicólico</i> | Ácido polilático (PLA, PLLA, PDLLA), ácido poliglicólico (PGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli-e-caprolactona (PCL). Colágeno, gelatina, fibrina, caseína, peptídeos. |
| <i>Proteínas Carboidratos</i> | Quitina, quitosana, celulose, hidroximetilpropilcelulose (HPMC), amilopectina. |
| <i>Outros polímeros</i> | Poli(propileno fumarato) (PPF), policarbonato, polialcanoatos, poli(1,8-octanodiol-citrato) (POC), poli(etileno glicol) (PEG), poli(etileno imina) (PEI), poli(etileno óxido) (PEO), polipropileno (PP), nilon, aramida, poli(alilamine hidróclorido) (PAH). |

2.2.4.1 – BIOCAMPÓSITO PHB/HAP

Devido o osso humano ser comparável a um compósito natural que combina propriedades orgânicas e inorgânicas, um biomaterial compósito sintético desejável deve ser um material híbrido que combine a força e a dureza de um componente inorgânico com a flexibilidade, menor dureza e a capacidade de reabsorção de um outro componente, o orgânico (Russias et al., 2006).

Trabalhos do grupo de pesquisa “Polímeros a partir de Recursos Renováveis” têm formulado compósitos PHB/HAP utilizando uma metodologia de “aquecimento sob pressão” sendo a temperatura de pressão selecionada por caracterização térmica de 5°C acima do ponto de fusão (175°C) do PHB. A instabilidade térmica do

PHB a temperaturas próximas à temperatura de fusão deve ser considerada como um fator importante na preservação das propriedades mecânicas da matriz, evitando aquecimentos acima da temperatura final (T_f) ou períodos longos de aquecimento a temperaturas próximas (Galego et al., 1999).

Para serem usados em compósitos com hidroxiapatita (HAP) alguns polímeros, ou seja, alguns polihidroxiácidoalcanoatos, como poli(3-hidroxiбутирато) (PHB) e copolímeros poli(hidroxiбутирато-co-hidroxiуалерато) (P(HB-co-HV)), foram caracterizados por diferentes técnicas (GPC, DSC, DMA, FTIR, DRX). Os resultados mostraram que esses polímeros são materiais semicristalinos e apresentam alto peso molecular. O compósito P(HB-co-8%HV)/HA (30%v/v) tem uma força mecânica à compressão de 62MPa. O osso denso tem uma força mecânica à compressão de 137.8 MPa e osso esponjoso 41.4 MPa. (Galego et al., 2000). Portanto, os autores concluíram que esse módulo está na mesma ordem de diversos ossos humanos e constitui um resultado promissor para uso nas inúmeras necessidades de preenchimentos ósseos.

Num estudo *in vitro* Russias et al., 2006, observaram que o compósito PLA/HAP com HAP na proporção de 80% volume em massa apresenta propriedades mecânicas semelhantes às do osso humano. Quando imerso em HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) em torno de 20 dias, o módulo de elasticidade diminuiu gradualmente para todos os casos (8–17%), sendo a redução mais pronunciada para a amostra com o conteúdo de cerâmica maior. Nesse caso foram avaliados apenas compósitos com 70 – 85% de massa de HAP, pois eles foram considerados promissores devido os valores altos de módulo elástico inicial apresentado (7 – 11 GPa). Entretanto nesse trabalho, o conteúdo de cerâmica usado (acima de 70% de massa) é um tanto maior que aquele visto caracteristicamente no osso humano (60 – 70% de massa). Considerando que o módulo de Young da HAP pura e PLA são de 80 – 175 GPa e 4 – 5 GPa, os autores esperavam que cargas de HAP na ordem de 10 – 40% de massa fossem suficientes para alcançar o módulo requerido para o osso cortical humano. Então, eles concluíram que provavelmente a maior porcentagem de carga necessária foi devido ao fato do compósito ter alguma porosidade inerente, além da HAP usada não ser completamente livre de defeitos.

2.2.4.2 – BIOCAMPÓSITO Q/HAP

Os biomateriais utilizados para formação de arcabouços servem para suportar, reforçar e em alguns casos organizar o tecido regenerado. Eles têm por objetivo combinar propriedades físicas viáveis que imitem as dos tecidos a serem substituídos, sendo ao mesmo tempo inerte biologicamente (uma característica dos biomateriais da primeira geração, desenvolvidos entre os anos 60 e 70). Além disso, possuem a característica da segunda geração, que é a capacidade de produzir respostas bioativas, acrescentando ainda a capacidade de estimular respostas moleculares específicas. Sendo assim, os arcabouços podem ser designados para controlar a liberação de fatores de crescimento que induzem a diferenciação celular (Madhally e Matthew, 1999).

Matrizes ativadas por genes e a incorporação de plasmídeos de DNA que codificam fatores de crescimento em matrizes poliméricas fornecem uma liberação controlada de fatores de crescimento, *in vivo*, resultando em regeneração tecidual reproduzível. Como exemplo, é possível citar o arcabouço sintético a base de quitosana, arcabouços naturais de colágeno e osso xenógeno. Os arcabouços podem ser necessários para desprender substância bioativa numa razão controlada ou para diretamente influenciar o comportamento das células incorporadas ou em crescimento (Madhally e Matthew, 1999).

Para satisfazer a essas variadas funções a microestrutura do arcabouço deve ser porosa, com a porosidade característica existente para a aplicação específica. Aspectos quimicamente desejáveis do arcabouço podem incluir interação específica, ou imitação, dos componentes extracelulares da matriz, fatores de crescimento, ou receptores de superfície em células. A microestrutura do sistema polimérico abrange uma variedade de formas desde hidrogéis, estruturas porosas a matrizes fibrosas, permitindo que crescentes números de polímeros sintéticos e naturais sejam utilizados como arcabouço tecidual (Madhally e Matthew, 1999).

O compósito HAP-Quitina parece ser um material de preenchimento ósseo promissor, sendo capaz de atender a um requisito importante, o de criar uma armação estrutural passível de estimular a regeneração óssea. Pesquisa realizada com o compósito HA/quitina revelou que ela não é citotóxica, não induzindo a nenhuma resposta inflamatória aguda em modelo animal. Além disso, o implante do compósito HA-quitina mostrou ser capaz de promover calcificação e ser degradado

in vivo, levando a crer que esse compósito poderá ser útil como preenchimento ósseo temporário (Ge et al., 2004).

Dentre os biopolímeros cuja base é carboidrato, a quitosana é freqüentemente aplicada junto com cimento de CaP (fosfato de cálcio) ou partículas de CaP devido a sua biodegradabilidade ser por enzima lítica e por apresentar uma boa correspondência ao osso natural com respeito as propriedades mecânicas. Com relação ao cimento de CaP, quitosana pode melhorar os propriedades física/mecânica bem como influenciar a posição do cimento, embora a força de compressão da cerâmica seja superior a da quitosana. Também a quitosana pode ser acrescentada ao cimento de CaP como auxiliar para tornar o cimento mais injetável sem modificação significativa na posição da reação. Portanto, biopolímeros como quitosana, gelatina e colágeno são freqüentemente introduzidos no cimento fosfato de cálcio para aumentar as propriedades de injeção e coesão do cimento *in vivo*. Às vezes esses polímeros são aplicados para reforçar mecanicamente o cimento, resultando na compacta microestrutura que é formada após a mistura de materiais orgânico-inorgânico (Habraken et al., 2007).

Ainda pode ser formulado um compósito em uma construção oposta de partículas cerâmicas com uma quitosana porosa, ou melhor, partículas cerâmicas podem também ser adicionadas a um transportador polimérico para melhorar ou introduzir propriedades osteogênicas. Arcabouços constituídos de uma cerâmica em um transportador polilático, proteína ou carboidrato, todos mostram uma taxa de degradação maior que da cerâmica pura. As taxas de degradação são influenciadas pela variação da massa molar ou densidade de ligações cruzadas do polímero. A força de compressão desse arcabouço é menos que 100% do compósito cerâmico, em compensação esses materiais com base polimérica não são tão quebradiços (Habraken et al., 2007).

2.2.4.3 – PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS BIOCOMPÓSITOS

De uma maneira geral pode-se considerar um compósito como sendo qualquer material multifásico que exiba uma proporção significativa das propriedades de ambas as fases que o constituem, de tal modo que possa obter-se uma melhor combinação de propriedades. De acordo com esse princípio da ação combinada, são criadas melhores combinações de propriedades através de uma união

adequada de dois ou mais materiais distintos. Assim são feitos intercâmbios de propriedades para muitos materiais compósitos (Callister, 2000).

A Figura 5 mostra a evolução através de algumas décadas dos biomateriais que tem sido desenvolvidos e utilizados com sucesso substituindo tecidos humanos. Materiais de fase única nem sempre suprem todas as propriedades necessárias a um substituto ósseo, estando muito distante das características desejáveis, que seriam nesse caso aquelas semelhantes às próprias do osso autógeno. Sendo assim, um substituto ósseo desejável deve ser equivalente ao próprio osso integrando todos os fatores associados como osteocondução, osteoindução e osteogenicidade. Isso pode ser conseguido com o uso de um compósito que pode ainda ser definido como uma combinação heterogênea de dois ou mais materiais, diferindo em morfologia ou composição em uma microescala, em outras palavras um microcompósito. Usando um material compósito é possível modificar propriedades mecânicas tais como resistência e módulo do compósito, aproximando-as do osso natural com a ajuda de fases de substituição secundárias. Por exemplo, compósitos HA/polímero têm um módulo elástico próximo ao do osso podendo ser mecanicamente melhor conformados que constituintes monolíticos (Murugan, 2005).

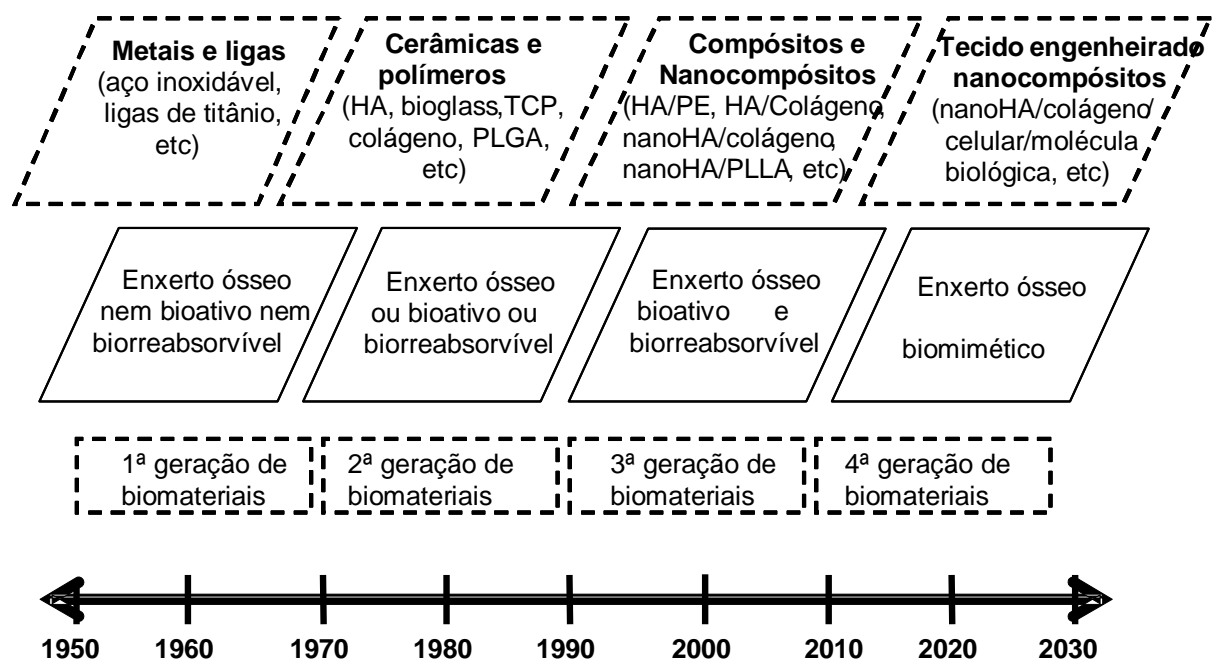


Figura 5 – Evolução dos biomateriais utilizados como substitutos ósseos (Murugan, 2005).

Na Figura 6 está representado um típico relacionamento de tensão-deformação de diferentes biomateriais utilizados em ortopedia em comparação com o osso natural. De acordo com as leis de Wolf, se um material de implante mais forte é colocado dentro do osso, esse osso receberá uma tensão mecânica reduzida gerando gradualmente uma reabsorção óssea. Esse fenômeno é conhecido como proteção de tensão (stress-shielding). Tem sido reconhecido que a combinação da força do implante com a do tecido hospedeiro, limita o efeito de proteção de tensão. Entretanto, uma ligação interfacial insuficiente entre implante metálico e tecido hospedeiro, tem resultado numa osteointegração limitada (interferindo, portanto na proteção de tensão). Com o objetivo de aumentar a ligação com o tecido, tem sido freqüentemente utilizado e com sucesso, ligas de titânio coberto com HA em cirurgias ortopédicas (Murugan, 2005).

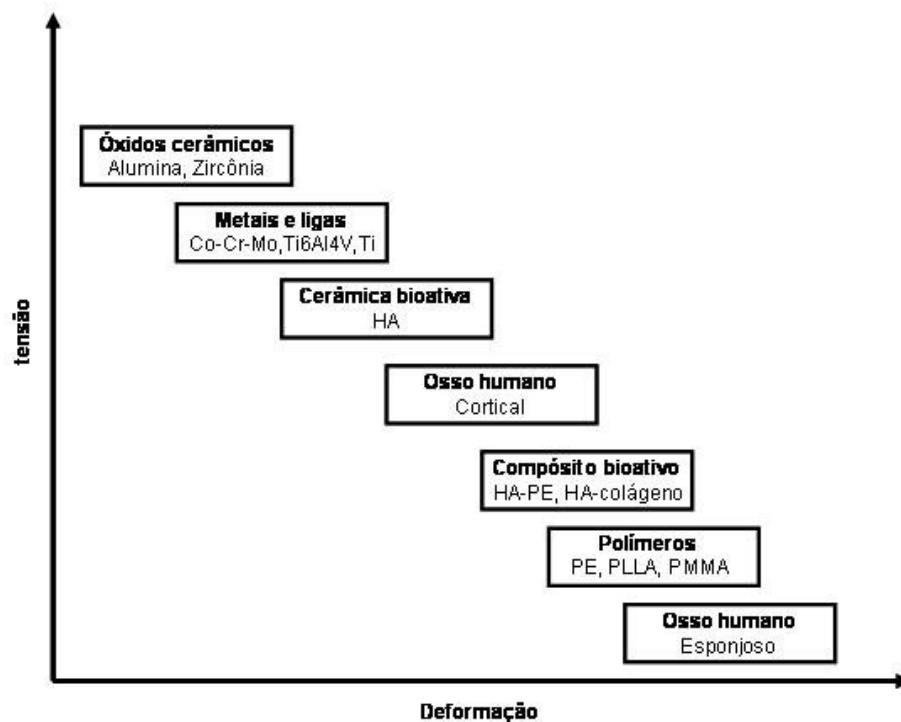


Figura 6 – Um característico relacionamento de tensão-deformação de uma variedade de implantes ósseo (Murugan, 2005).

O primeiro compósito usado foi um gesso armado de endurecimento rápido em ortopedia clínica como um imobilizador externo, ou seja, uma bandagem, no tratamento de fratura óssea por Mathijsen em 1852, seguido por Dreesman em 1892. Na Tabela 13, foram destacados alguns materiais compósitos, utilizados nas diversas regiões do corpo humano como implantes ósseos. Já há cerca de umas

duas décadas, a grande atenção está voltada para enxerto compósito bioativo que consiste de uma cerâmica bioativa preenchendo uma matriz polimérica. Também tem sido utilizado a HA, em granulação de micro e nano escala, associada a polímeros sintéticos e naturais na forma de compósito adequados para uso como enxerto ósseo e como dispensador de droga em osso (Murugan, 2005).

Tabela 13 – Implantes celular/acelular usados em tratamento clínico ósseo (Murugan, 2005)

| Uso clínico | Biomateriais acelular | Biomateriais celular |
|-------------------------------|--|--|
| Defeito do osso de crânio | Vidro bioativo, alumina, HA, HA-colágeno. | Osso autógeno, osso alógeno, DBM. |
| Reconstrução maxilofacial | HA, vidro bioativo, alumina, zircônia, HA-PE, bioglass-PE, PTFE carbono. | Osso autógeno, osso alógeno |
| Aumento do rebordo alveolar | HA, TCP, bioglass, alumina, HA-PLA, HA-colágeno, HA-PLGA. | Osso autógeno, osso alógeno, compósito ósseo autógeno-HÁ |
| Defeitos periodontais | HA, TCP, vidro bioativo, HA-PLA, HA-PLGA, HA-colágeno. | Osso autógeno, osso alógeno, DBM |
| Preenchimento de espaço ósseo | HA, TCP, biocoral, sulfato de cálcio, PMMA, HA-colágeno, compósito vidro bioativo-cerâmica. | Osso autógeno, enxerto ósseo (espécie semelhante) desmineralizado, enxerto ósseo (espécie animal) desmineralizado, osteoblasto derivado-paciente com matriz HÁ |
| Cirurgia coluna | HA, vidro bioativo, HA-colágeno, PET-silicone, bioglass-PU. | Osso autógeno, DBM, tecido-engenheirado HA, compósito HA-BMA. |
| Prótese ortopédica | Alumina, zircônia, aço inoxidável, Ti, Ti-6Al-4V, Co-Cr-Mo-Ni, A-W cerâmica vítrea, HA-PE, HA-colágeno, biometal coberto-vidro bioativo, biometal coberto-HA, fibras carbono-PE. | Célula osteogênica em HA densa-coberta com vidro bioativo com superfície porosa. |

Entretanto, a maioria dos microcompósitos é processada por ancoragem das partículas cerâmicas dentro da matriz polimérica, o que torna bastante difícil obter um compósito homogêneo ou uniforme. Além disso, a maioria da HA usada nesse processo possui cristais grandes contrastando com a apatita do osso natural, talvez isso possa aumentar o tempo de remodelamento dentro do tecido ósseo implantado. Também alguns dos compósitos apresentam propriedades mecânicas muito pobres, provavelmente devido à falta de uma ligação interfacial forte entre os seus constituintes. Existe uma chance de melhorar a osteointegração por redução do tamanho do grânulo do agente de reforço ou por ativação da nucleação da apatita ultrafina crescida dentro da matriz. Isso pode levar ao aumento da resistência mecânica e da osteointegração com a melhora da afinidade biológica e bioquímica com o osso receptor. Deve também ser esperado que uma elevada resistência à fratura seja conduzida pelo controle da dimensão da ligação interfacial entre seus constituintes. Nos últimos anos, com o avanço da nanociência e da nanotecnologia, nanocompósitos têm despertado muito interesse e tem sido verificado seu benefício em vários aspectos como implante ósseo podendo ser superior a microcompósitos (Murugan, 2005).

2.3 – INTERFACE TECIDO/IMPLANTE

Um dos requisitos importantes dos biomateriais é não ser tóxico aos tecidos vivos, ou seja, biocompatível. Um dos testes de biocompatibilidade que pode ser realizado *in vivo* é através da implantação dos materiais dentro de vários tecidos de animais. Posteriormente os animais são sacrificados e, o implante e os tecidos ao seu redor são examinados. Quatro características importantes deverão ser observadas: (1) se o material é tóxico, o tecido ao redor morre; (2) se o material não é tóxico, mas biodegradável, o tecido ao redor ou uma cápsula fibrosa pode substituí-lo; (3) se o material não é tóxico e inativo biologicamente, uma cápsula de tecido fibroso forma ao redor deste; (4) se o material não é tóxico e biologicamente ativo, forma uma ligação interfacial entre o material e o tecido ao seu redor (Cheung, 1989).

Para testar a ativação de processos biológicos existem muitos tipos de ensaios, porém se comparados com os testes de citotoxicidade eles necessitam de um maior período de tempo para avaliar a reação dos tecidos aos materiais. Os

testes utilizados para testar a ativação de processos biológicos estão dentro das áreas de 1) inflamação, 2) reação imune, 3) mutagêneses. A escolha do método dependerá do objetivo do estudo. Testes de citotoxicidade avaliam apenas efeitos ocorridos nas células nas primeiras 12 a 24 horas após exposição à substância “tóxica”. As células do hospedeiro ou se recuperam ou morrem devido à injúria química sofrida. Entretanto, muitas reações biológicas *in vivo* não são apenas citotóxicas e se propagam além de 24 horas, como exemplo a reação imune e inflamatória (Hanks et al, 1996).

A importância de se avaliar a biocompatibilidade do material implantado está no fato de estar na dependência dela para que ocorra a incorporação ou a rejeição de tal material. A biocompatibilidade é geralmente avaliada através do sistema de cultura de células, exames experimentais, histológicos e patológicos da região peri-implantar e, resposta trombogênica. A complexidade dessas respostas do hospedeiro resulta de uma série de processos envolvendo muitos mecanismos interdependentes devido às interações entre o material e o tecido. São essas interações que controlam o desempenho final de um material em um meio ambiente biológico (Hutmacher, 1996).

A diminuição do número de células ou o aumento do desprendimento de lactato desidrogenase e/ou enzimas lisossomiais por células expostas ao material teste comparado com cultura de células controle, são usados como marcadores para toxicidade. Como desvantagem desse teste, podemos destacar o uso de células não características do sítio receptor do implante. Sendo assim, o material teste pode ter um baixo nível de toxicidade, o qual pode não ser suficiente para matar células ou aumentar desprendimento de enzima, mas pode inibir funções normais das células (Chueng, 1989). Para neutralizar essa desvantagem, o ideal é que sejam usadas células características do sítio receptor nos testes *in vitro*.

Apesar da tecnologia e existência de materiais bem sucedidos, ainda temos poucos estudos sobre a compatibilidade biomecânica e física dos materiais de implante com o osso ao seu redor, o que limita a vida do implante em muitos casos. Inicialmente os materiais de implante pesquisados eram voltados para materiais fortes e desenvolvidos para aplicações tradicionais em engenharia, tais como: aço inoxidável, cromo-cobalto ou liga de titânio e cerâmicas mais recentes, como a alumina ou zircônia. Esses materiais não eram apenas fortes, mas principalmente mais forte que o osso que iria substituir. Sendo assim, o osso vivo era o receptor no

ambiente biológico e o implante que era mais forte que o osso e suportava uma carga de maior proporção, protegia os tecidos ao seu redor das tensões normais, promovendo osteoporose. O resultado era a reabsorção do tecido ao redor e o implante seria perdido em algum tempo, necessitando de outro tempo cirúrgico para remover o implante e o tecido ósseo necrótico ao redor. Embora esse material fosse biocompatível, ele era diferente do osso natural, ele não poderia reparar-se ou adaptar-se a condições de mudança fisiológica e nem poderia ser totalmente reabsorvido. Atualmente, polímeros de ácido lático e ácido glicólico são usados como suportes biodegradáveis em aplicações ortopédicas, entretanto por possuir propriedades mecânicas limitadas, seu uso é restrito a alguns casos que não receberá carga (Russias et al., 2006).

No campo de materiais bioestável, como dispositivos e próteses implantadas permanentemente, a primeira meta é minimizar e ajustar interações entre material e tecido. A interação do material e do meio ambiente vivo deve ser estável e aceitável para terapias longas. Em contrapartida, para materiais biodegradáveis e biorreabsorvíveis a situação é oposta, porque sofrerá a degradação por produtos, que são capazes de interagir fortemente com sistemas vivos (Hutmacher et al., 1996).

Para um material ser bioativo *in vivo*, ele deve ter a habilidade de induzir a formação de uma camada de apatita carbonatada (HCA), como mostrado na Figura 5(a), semelhante ao osso, ativa biologicamente em sua superfície *in vitro*. Um material chamado de bioativo por ser degradável no corpo humano, deve também ser degradado num ambiente corpóreo simulado. Num estudo da avaliação *in vitro* do compósito de poli(3-hidroxibutirato) reforçado com hidroxiapatita, foi demonstrado que a camada de apatita ativa biologicamente é formada dentro de um período de tempo curto no compósito PHB/HA, após sua imersão num fluido corpóreo simulado (SBF), demonstrando alta bioatividade do compósito. Essas camadas semelhantes ao osso apresentam partículas minerais compostas de pequenos cristalitos, semelhantes a cristais formados em outros biomateriais, como mostrados na Figura 5 (b). A bioatividade e propriedades mecânicas do compósito podem ser modificadas pela variação da porcentagem do volume da hidroxiapatita no compósito (Ni e Wang, 2002).



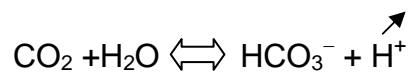
Figura 7 – Fotografia de microscopia eletrônica de varredura (a) mostram a camada de apatita e (b) sua microestrutura (Ni e Wang, 2002).

A característica marcante da interface tecido/hidroxiapatita é a camada eletro-densa que está algumas vezes em continuidade com a lâmina limitante do osso. Já que a presença de uma lâmina limitante é considerada ser um sinal de uma temporária ou até mesmo uma parada final do metabolismo ósseo, a forte camada eletro-densa tem um importante papel na interação apatita/osso. Cálcio e fósforo foram encontrados em várias proporções, nessa camada em animais e, isso sugere a presença de outros ânions, como por exemplo, carbonato. A presença do sal de fosfato de cálcio na camada eletro-densa sugere a continuidade entre os cristais de hidroxiapatita da cerâmica e aqueles do osso, o que tem sido freqüentemente demonstrado. Essa continuidade deve explicar a firme interação entre a cerâmica hidroxiapatita e o osso. A força dessa ligação na interface foi ilustrada pela presença de partículas cerâmicas contidas no tecido macroporoso do sítio fraturado. Além disso, o fato da linha de fratura correr quase sempre igualmente através da cerâmica, do tecido macroporoso ou ao longo da interface também indica uma força de ligação na interface com o osso comparável a aquela encontrada na cerâmica ou no osso humano. O fato da camada eletro-densa não está sempre presente na interface indica um estado variável de atividade na superfície da cerâmica. Visto que a presença de células multinucleadas e macrófagos na interface nunca coincidem com a presença da camada eletro-densa e, essas células parecem estar relacionadas com a degradação da hidroxiapatita, então é concebível que os sítios que não apresentam essa camada identificada podem estar passando pelo processo de biodegradação. Isso significaria que sítios de reação tecidual localizados são importantes para a biodegradação (Van Blitterswijk et al., 1990).

As propriedades de integração da cerâmica hidroxiapatita são determinadas não só pelas características da interface determinada pelo tecido e material, mas também pelo crescimento de tecido dentro dos poros (Van Blitterswijk et al., 1990).

A incorporação do tecido implantado e sua substituição por posterior tecido ósseo é precedida por uma reabsorção óssea que ocorre na área imediatamente vizinha ao material implantado. Essa fase foi evidenciada por neovascularização e presença de células gigantes, osteoclastos e macrófagos (Garraway, 1998).

Outro pesquisador relacionou a presença e a atividade de reabsorção do osteoclasto com a arquitetura do seu citoesqueleto no qual os microfilamentos de F-actina são mantidos alongados na complexa zona clara (Sazaki, 1993). Chétail e Fournié, 1969, demonstraram o papel chave da anidrase carbonica, uma enzima presente em osteoclastos e que é conhecida por catalisar a seguinte reação reversível:



Essa reação explicaria a destruição de material carbonatado implantado em animais. Estudos preliminares têm comparado quantitativamente as razões de reabsorção do material e aposição óssea após implantação dentro do tecido ósseo. Holmes e colaboradores, 1987, mostraram evidência de não biodegradação da hidroxiapatita ainda após 48 meses.

Um estudo *in vivo* demonstrou que a reação tecidual aos implantes de carbonato de cálcio (CC) e hidroxiapatita (HAP) é diferente. Muitas células gigantes multinucleadas estavam presentes no implante de carbonato de cálcio, sendo vistas fagocitando a superfície no poro do implante. Na presença de células medulares (células medulares de rato associadas a alguns implantes de carbonato de cálcio) na terceira semana após implantação, a formação óssea começa a aparecer com a atividade fagocitária nas mesmas áreas. Em contraste, HAP implantada apresentava poucas células gigantes na região dos poros e não mostrava óbvia fagocitose. Não foi observada formação de tecido fibroso entre o osso e os poros das superfícies dos implantes. Apenas foram encontradas diferenças nas interfaces dos implantes, pois a do osso/HAP se mostrava lisa, enquanto a do osso/CC encontrava-se irregular, provavelmente devido à atividade fagocitária das células gigantes (Ohgushi et al., 1992).

Achados histológicos indicaram que a formação óssea nos implantes de CC e HAP ocorreu na região da superfície do poro avançando na direção do centro do poro. Então, idêntica dinâmica de formação óssea foi vista em ambos os implantes. Sendo assim, a resposta de formação óssea ao CC é comparável aquela da bem conhecida hidroxiapatita bioativa (HAP). Foram observadas diferenças em relação à biodegradabilidade, visto que o CC é totalmente degradado, com ou sem células medulares, enquanto que a HAP é parcialmente degradável, talvez necessitando de muito mais tempo para que isso ocorra. Como o ideal substituto ósseo é o material que pode ser totalmente substituído por novo osso, o biodegradável CC combinado com células da medula óssea é um candidato a substituto ósseo ideal (Ohgushi et al., 1992).

Um estudo, *in vivo*, avaliou o tempo que deve ser esperado para constatar a integração do material implantado ao tecido receptor. Nesse estudo os ratos implantados com wollastonita contendo cerâmica vítrea (A-WGC) granular foram sacrificados com 2, 4, 10 e 16 semanas após implantação. Com duas semanas de implantação o índice de afinidade (a porcentagem do osso na interface material-tecido) com grânulos densos menores foi bem mais evidente que com os grânulos densos maiores, mas essa diferença foi gradualmente diminuindo e após dez semanas de implantação foi alcançado o platô, independente do tamanho dos grânulos. Nesse estudo também foi avaliado a influência do tamanho dos poros da A-WGC quando implantada e foi mostrado por avaliação com microscopia eletrônica de varredura que o processo de formação óssea foi semelhante para os grânulos densos, mas não se observou formação óssea no material implantado com poros menores que 50 μm (Ikeda et al., 1999).

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – CERÂMICA UTILIZADA NA FORMULAÇÃO DOS BIOCAMPÓSITOS

3.1.1 – HIDROXIAPATITA (HAP)

Hidroxiapatita sintética (Galego et al., 2000)

Relação Ca/P – 1.64

Densidade – 2,87 g/cm³

Diâmetro de partícula – 10-100µm

Hidroxiapatita natural (GenOx Inorg.)

Lote - 017839 (cód. 939.25)

Osso bovino desproteínizado - liofilizado - medular e cortical

Forma de bloco – dimensões = 27.46 x 16,80 x 10,77mm

Adquirida da Baumer S.A., de Mogi Mirim, São Paulo.

Uso comparativo no ensaio de flexão e ensaio biológico.

3.2 – POLÍMEROS UTILIZADOS NA FORMULAÇÃO DOS BIOCAMPÓSITOS

3.2.1 – POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (PHB)

O PHB utilizado foi doado pela PHB industrial, na forma de pelletes com massa molar média viscosimétrica de 887.000 g/mol. Foi purificado e empregado o procedimento de recristalização em metanol (Vetec, P.A.).

3.2.2 – QUITOSANA (Q)

Esse copolímero natural biodegradável é proveniente da modificação da quitina, é um polissacarídeo presente no exoesqueleto de uma variedade de animais marinhos, insetos e fungos. Foi utilizado como recebido da Aldrich, apresentando um grau de desacetilação entre 75 e 85%, com temperatura de fusão (T_m) em 116°C, tendo como temperatura de degradação determinada por termogravimetria (TG) 300°C.

3.3 – BIOMATERIAIS COMPÓSITOS

Devem ser constituídos por materiais que não causem quaisquer danos ao organismo, apresentando as propriedades de biocompatibilidade ou não citotoxicidade, bioinércia e ou biodegradabilidade dependendo do objetivo do seu uso. Sendo assim, foram desenvolvidos materiais compósitos cuja matriz polimérica tem a característica de ser biorreabsorvível e a cerâmica utilizada como reforço ser bioativa, isto é, interage com o tecido receptor formando uma camada carbonatada que reforça a união.

Com o objetivo de avaliar a formulação que apresente propriedades mecânicas e respostas biológicas mais adequadas ao uso em ossos de seres vivos, foram preparadas formulações contendo quantidades diferentes (70, 50 e 30 % em massa) da fase polimérica em relação à fase cerâmica e os corpos de prova destinados aos ensaios mecânicos, térmicos, observações morfológicas e testes *in vitro*.

3.3.1 – BIOMATERIAIS COMPÓSITOS UTILIZANDO COMO FASE POLIMÉRICA PHB E QUITOSANA

3.3.1.1 – METODOLOGIA DE FORMULAÇÃO DOS BIOMATERIAIS COMPOSITOS PHB/HAP E CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

O PHB foi purificado, por um processo no qual primeiro foi dissolvido em clorofórmio (1g/100 ml) em um balão sob refluxo e posteriormente esta solução foi gotejada em metanol (50 ml/300 ml). Em seguida, o material ficou em repouso por 24 horas, sendo feito após isso a centrifugação desta solução, resultando na precipitação do PHB. O PHB, depois de purificado, foi novamente dissolvido em clorofórmio (1g/100 ml) num béquer, sendo mantido em agitação constante sobre um agitador magnético. Nesta solução, em agitação, foram dispersas partículas de HAP e mantida na capela sob exaustão até a eliminação quase total do clorofórmio. Para a etapa final da evaporação foi utilizada uma estufa a vácuo, a uma temperatura constante de 60°C por um período de 6h. Feita a evaporação do solvente, foi retirado o compósito do béquer e homogeneizada a granulometria das partículas de HAP impregnadas na fase polimérica.

Para a preparação dos corpos de prova dos biocompósitos PHB/HAP foi utilizada uma massa do compósito PHB/HAP previamente determinada para confecção dos corpos de prova. O material compósito foi colocado no interior da cavidade central retangular de um molde metálico redondo, com uma distribuição homogênea. Sobre este material foi posicionado o êmbolo também metálico e, todo o conjunto revestido por um anel cerâmico térmico, foi levado a uma prensa hidráulica com sistema de aquecimento. O molde metálico foi aquecido (150°C) com o auxílio de um sistema de aquecimento controlado em forma de anel, na própria prensa hidráulica. Atingida a temperatura determinada, foi aplicada uma pressão de 1 T sobre o êmbolo do molde e a temperatura desligada. Esperou-se que o molde sofresse o resfriamento natural até 80°C, sendo feita então a ejeção do corpo de prova.

A temperatura de preparo do compósito por pressão e aquecimento foi observada para evitar a degradação do polímero cuja temperatura de fusão é 170°C (Galego et al., 2000), assim foi selecionada a temperatura garantindo a não degradação do polímero.

O molde foi expressamente construído para a confecção destes corpos de prova em colaboração com o Setor de Materiais Superduros/LAMAV.

3.3.1.2 – METODOLOGIA DE FORMULAÇÃO DOS BIOCOMPOSITOS Q/HAP E CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

Foram pesadas quantidades pré-determinadas de hidroxiapatita e quitosana, sob a forma de pó, para produzir materiais compósitos nas variadas formulações, 70, 50 e 30% em massa. Foi realizada a mistura simples das massas previamente pesadas da hidroxiapatita e da quitosana utilizando-se um agitador magnético por 5 min. para cada mistura, visando melhor homogeneização do compósito.

Cada composição gerou cinco corpos de prova para os ensaios mecânicos, biológicos e análises da região de fratura (resultante do teste de flexão) por microscopia de varredura.

Para a confecção dos corpos de prova dos biocompósitos de Q/HAP foi empregada a mesma metodologia de obtenção dos corpos de prova PHB/HAP, ou seja, moldagem por compressão.

3.4 – OBTENÇÃO DAS CÉLULAS PARA TESTES DE CITOTOXICIDADE DOS COMPÓSITOS *IN VITRO*

3.4.1 – CULTURA CELULAR

3.4.1.1 – CULTURA DOS FIBROBLASTOS MURINOS L929

As células foram obtidas a partir da linhagem celular permanente dos fibroblastos de murinos L929 (American Tissue and Cell Collection, ATCC, USA) armazenadas em nitrogênio líquido, que foram previamente descongeladas e expandidas numa garrafa com meio DMEM-F12 completo (DMEM-F12, 10% SFB, 2mM de L-glutamina, 50 mkg/ml gentamicina). Após a formação da monocamada, foi feita a tripsinação (1ml de Tripsina 0,05% e EDTA 0,05% em PBS) e, acrescentado 3 ml de DMEM, para neutralizar a tripsina. As células foram coletadas e quantificadas na Câmara de Neubauer após sua coloração por 1 min pelo corante das células mortas - trypan-blue. No preparo para a contagem celular, foi misturado 50 µl do meio coletado com células e 50 µl do corante trypan-blue (0,02% em PBS). Foi feita a contagem das células vivas (não coradas) nos 4 quadrantes da câmara, usando o microscópio ótico invertido (Nikon EL WD 0.3/0 D75) e a concentração celular determinada. Após a contagem foi feita a diluição necessária para obter uma concentração de 3×10^5 cel/ml, e as células foram plaqueadas na placa de 24 poços, 300 µl/poço. Após a formação da monocamada, aproximadamente 3 horas, foi adicionado um compósito a cada poço, sendo reservados alguns como controles. As células foram mantidas em meio completo numa estufa a 37 °C com CO₂ a 5%, durante o tempo do experimento.

3.4.1.2 – OBTENÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA DOS OSTEÓBLASTOS MURINOS

A medula foi removida do fêmur e tíbias dos camundongos C57BI/6 sacrificados, através da lavagem intra-óssea pelo meio comercial DMEM-F12 (Dulbeco's Modified Eagle Medium). O fluido obtido da lavagem intra-óssea foi centrifugado a 1500 rpm por 5 min e, os adipócitos e tecidos gordurosos contidos no sobrenadante foi cuidadosamente removido. O pelet obtido continha células estromais e hematopoiéticas da medula óssea. Essas células foram resuspendidas

em meio DMEM-F12 com 10% de soro fetal bovino (SFB) para o volume de 20 ml e cultivadas em frascos de 75cm² por 18 h a 37°C para eliminar as células aderentes, os fibroblastos e macrófagos diferenciados. Após incubação, sobrenadante da cultura com as células não aderentes foi coletado e centrifugado a 1500 rpm por 5 min. As células (todas precursoras hematopoéticas incluindo células tronco mesenquimais) foram resuspendidas em meio de cultura de osteoblastos, quantificadas utilizando a câmara de Neubauer e plaqueadas em frascos de 75cm² para obter uma densidade de 5×10^5 céls/ml. O meio de cultura de osteoblastos compreende de: DMEM- F12 suplementado com 10% de SFB; 2mM de L-glutamina; 50µg/ml de L-ácido ascórbico-2-fosfato sesquimagnésio (sal); 10mM/ml de sal de β-glicerofosfato dissódio; 10 mM/l de dexametasona solúvel em água e 100IU/ml de penicilina contendo 100µg/ml de estreptomicina (Ge et al., 2004). As culturas foram cultivadas em uma incubadora a 37°C com 5% de CO₂ durante 10 a 14 dias para permitir a diferenciação dos precursores em osteoblastos. A troca do meio foi realizada apenas no 7º dia através da substituição de metade do meio de cultura pelo meio fresco. O meio coletado para a substituição foi centrifugado e as células do pelet foram resuspendidas em uma alíquota do meio fresco e, devolvidas para a cultura. Após 14 dias do cultivo, 80% da confluência da camada das células aderentes (osteoblastos diferenciados) foi conseguida e a camada de células foi tratada com solução tripsina- EDTA (1ml de Tripsina 0,05% e EDTA 0,05% em PBS) para coleta das células diferenciadas.

Os osteoblastos obtidos foram quantificados, plaqueados e tratados como está descrito no item 3.4.1.1 para fibroblastos L929.

Também foi realizado o tratamento desses osteoblastos para serem examinados por microscopia de fluorescência, após formação da monocamada foi feita a fixação com 3% de formaldeído em PBS por 20 min e permeabilizados pelo tratamento por 0,5% Triton X-100 em PBS por 10 min. Depois foram corados pelo faloidina-TRITC, 0,1 mKg/ml, por 30 min a 37°C, para visualizar actina e examinados por microscopia de fluorescência.

3.4.1.3 – CULTURA CELULAR DOS MACRÓFAGOS MURINOS DA LINHAGEM RAW2647

As células foram obtidas a partir da linhagem celular permanente dos macrófagos murinos RAW 264.7 (ATCC TIB-71; *American Type Culture Collection, Manassas, VA*) armazenadas em nitrogênio líquido, que foram previamente descongeladas e expandidas numa garrafa com meio DMEM-F12 completo (DMEM-F12, 10% SFB, 2mM de L-glutamina, 50 mkg/ml gentamicina). As células foram coletadas, coradas por trypan-blue e quantificadas na Câmara de Neubauer como foi descrito no item anterior. Após a contagem, as células foram plaqueadas (3×10^5 cel/ ml) na placa de 24 poços, 300 µl/poço. Após a formação da monocamada, foi adicionado um composto a cada poço, sendo reservados alguns como controles. As células foram mantidas em meio completo numa estufa a 37 °C com CO₂ a 5%, durante 3 dias. O sobrenadante da cultura foi coletado e congelado a – 20°C para posterior quantificação da citocina inflamatória dos macrófagos – fator de necrose tumoral alfa- TNF- α - através do bioensaio L929.

3.5 – CARACTERIZAÇÃO DOS BIOMATERIAIS COMPÓSITOS

3.5.1 – AVALIAÇÃO MECÂNICA, TÉRMICA E ESTRUTURAL

3.5.1.1 – ENSAIOS MECÂNICOS

Para avaliar as propriedades mecânicas dos compósitos PHB/HAP e PHB/Q foram realizados ensaios utilizando um equipamento Instron, modelo 5582, e um analisador dinâmico-mecânico. Os ensaios foram realizados dentro das normas utilizadas para materiais poliméricos, pois os compósitos citados possuem matriz polimérica.

I – Resistência à flexão

Este teste possibilitou a determinação da resistência à flexão no ponto de escoamento, na ruptura e o módulo de flexão. Os corpos de prova são compósitos que possuem matrizes de quitosana ou poli(3-hidroxibutirato), reforçadas por

partículas cerâmicas de HAP nas variadas proporções de massa 30%, 50% e 70% respectivamente. Foi avaliada a influência da variação da porcentagem de massa da cerâmica nas propriedades mecânicas do compósito.

Os testes de resistência à flexão obedeceram à norma ASTM D-790, foram realizados numa Máquina Universal Instron modelo 5582 e foi do tipo flexão em três pontos. Portanto um ensaio padrão de flexão em três pontos foi realizado utilizando um vão de 30 mm, usado para a fratura do espécime, a uma velocidade de 0.5mm/min numa máquina de teste Instron.

Os oito corpos de prova foram submetidos ao ensaio de flexão em uma sala climatizada a uma temperatura de 25°C. Para os cálculos de resistência à flexão e módulo de flexão foram utilizadas as seguintes equações respectivamente:

$$\sigma = \frac{3FL}{2bh^2} \quad (1)$$

$$E = \frac{L^3 F}{4bh^3} \quad (2)$$

Onde:

- σ – resistência à flexão, (MPa);
- E – módulo de flexão, (GPa);
- F – é a carga suportada pelo material;
- b – largura do corpo de prova;
- h – espessura do corpo de prova;
- L – distância entre os dois apoios inferiores;

II – ANÁLISE DINÂMICO-MECÂNICA (DMA)

As propriedades dinâmico-mecânicas foram avaliadas nas matrizes poliméricas e nas três formulações existentes dos compósitos, usando a técnica de análise dinâmico-mecânica em um DMA multifreqüência 2980 TA Instruments. Os testes de DMA foram feitos em uma faixa de temperatura de -140 a 210 °C com taxa de aquecimento médio de 3°C/min, em uma freqüência de 1HZ, utilizando uma garra de flexão de três pontos (“single cantilever”).

Através dos testes dinâmicos foram determinadas três propriedades: módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e a tangente de perda ($\tan\delta$). Onde o

módulo de armazenamento determina a capacidade que o material possui de armazenar energia mecânica e resistir à deformação, portanto quanto maior o E' mais duro será o material. O módulo de perda é diretamente proporcional ao calor dissipado, como por exemplo, para o movimento de longos segmentos da cadeia principal ou a relaxação de segmentos laterais em torno de ligações químicas. A tangente de delta expressa a capacidade de um material em converter energia mecânica, ou seja, é a razão entre a energia dissipada e a energia potencial máxima armazenada ($\tan\delta = E''/E'$). Esta relação é muito útil na caracterização de materiais poliméricos (Ni e Wang, 2002).

A análise dinâmico-mecânica (DMA) tem como um dos principais objetivos relacionar as propriedades macroscópicas, tais como as propriedades mecânicas, às relaxações moleculares associadas a mudanças conformacionais e a deformações microscópicas geradas a partir de rearranjos moleculares (Cassu e Felisberti, 2005).

Uma das aplicações mais comuns da técnica de DMA é na determinação da temperatura vítrea (T_g) de materiais permitindo, ainda a determinação de transições secundárias, que estão relacionadas à relaxação de grupos, ou parte de grupos, laterais da cadeia polimérica e também, da temperatura de fusão de cristais (T_m) de polímeros parcialmente cristalinos (Medieta-Taboada e Sobral, 2008).

Teoricamente em um polímero amorfo, a temperatura onde ocorre o pico na curva da $\tan\delta$ está associada ao fenômeno da α -relaxação, normalmente visível em testes de varredura da temperatura em DMA e, que corresponde efetivamente à transição vítrea. Na prática a T_g pode ser calculada como sendo a temperatura onde se inicia a inflexão em E' , normalmente chamada de temperatura de “onset”; como o ponto onde ocorre a inflexão em E' , conhecida como “midpoint”; e mesmo como a temperatura onde termina esta inflexão, ou seja, o “end-point”, podendo também ser calculada como a temperatura onde ocorre o pico da $\tan\delta$ ou o pico na curva do módulo de perda (Medieta-Taboada e Sobral, 2008).

3.5.1.2 – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

As análises térmicas pela técnica de termogravimetria, utilizando um sistema de análise termogravimétrica SDT 2960 – TA instruments, existente na Unidade de Caracterização Térmica (SEPOL) foram realizadas para avaliar as possíveis mudanças na estabilidade térmica e correlacioná-las com a interação “matriz” – HAP

e ainda determinar a composição efetiva do compósito, ou seja, a realmente existente no sistema Polímero-HAP. Nessa técnica com o aumento da temperatura vai ocorrendo a perda de peso da matriz polimérica podendo assim, ser calculada a porcentagem de massa de HAP restante para cada compósito. As análises foram realizadas em placas de platina com massa entre 7-10 miligramas de amostra, na faixa de 25 – 1100°C, com uma taxa de aquecimento de 10⁰C/min e um fluxo de ar de 100 mL/min.

3.5.1.3 – CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A Calorimetria Exploratória Diferencial avaliou a influência da hidroxiapatita sobre a cristalinidade dos polímeros utilizados como matriz. Para a análise foi utilizado o sistema DSC 2910 – TA instruments, com alimentação controlada de nitrogênio líquido (LNCA), disponível na Unidade de Caracterização Térmica (SEPOL). A calibração da temperatura do DSC foi feita com índio. Para a análise as massas das amostras foram de aproximadamente 10 mg e colocadas em placa de alumínio hermeticamente fechadas. Foi analisada a faixa de -60 até 180°C a uma taxa de aquecimento de 10⁰C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio (20 mL.min⁻¹).

3.5.1.4 – DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

As análises foram realizadas a partir de amostras particuladas obtidas dos corpos de prova utilizados nos ensaios mecânicos, ou seja, dos polímeros quitosana e poli(3-hidroxibutirato), dos biocompósitos PHB/HAP (54/46), Q/HAP (50/50) e das misturas PHB/HAP e Q/HAP nestas mesmas proporções em massa. Foram utilizadas para determinar a porcentagem de cristalinidade das fases poliméricas e a influência da hidroxiapatita sobre suas cristalinidades. A análise da amostra foi realizada com um difratômetro marca Shimadzu, modelo XRD 7000. Os dados de difração foram coletados de 5° a 40° (2 θ), sendo utilizado com os seguintes parâmetros de medida: tensão de 40 kV, corrente no filamento de 30 mA, foi usada radiação de cobre, com velocidade de varredura de 1°/min.

3.5.1.5 – MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV)

Foi feita a avaliação da microestrutura da superfície de fratura dos corpos de prova que foram submetidos ao teste de flexão, sendo também observada a interfase da HAP com o polímero. Cada amostra foi previamente fixada a um porta-amostra por uma fita adesiva de carbono, desidratada abaixo do ponto crítico com CO₂ e metalizada numa câmara a vácuo (Sputter Coating Unit) com uma fina camada de ouro (cerca de 20nm de espessura). Essa metalização é realizada sobre o corpo de prova com o objetivo de facilitar a penetração do feixe de elétrons na amostra, quando examinada no MEV, pois a amostra é composta por um material não condutor. A amostra foi examinada num microscópio eletrônico de varredura ZEISS DSM numa tensão de trabalho de 25KV, corrente de 0,81 µA.

3.5.2 – AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE BIOLÓGICA DOS COMPÓSITOS OBTIDOS

Para avaliar a biocompatibilidade dos biomateriais formulados foram realizados os testes *in vitro*: teste de citotoxicidade e teste de indução de inflamação.

(A) PREPARO DOS COMPÓSITOS PARA TESTES *in vitro*

Os corpos de prova das variadas proporções dos compósitos citadas anteriormente e dos respectivos polímeros sem mistura foram padronizados na forma retangular medindo (35,7mm de comprimento, 10mm de largura e 2mm de espessura). Destas composições variadas e dos polímeros sem mistura foi selecionado um corpo de prova preparado com o procedimento descrito nos itens 3.3.1.1 e 3.3.1.2, sendo dividido em 9 partes de proporções semelhantes (5mm de comprimento por 5mm de largura).

Depois de divididos, os corpos de prova foram esterilizados em autoclave, 121°C por 30 min e, posteriormente destinados aos testes biológicos.

Em todos os testes foi mantido como controle, poços com células em meio de cultura, com troca a cada cinco dias, sem a presença do compósito que foi testado.

Todas as propriedades avaliadas foram também comparadas com o osso bovino desproteínizado.

3.5.2.1 – TESTE DE CITOTOXICIDADE

As culturas dos fibroblastos L929 e osteoblastos murinos foram plaqueadas como descrito nos itens 3.4.1.1 e 3.4.1.2. Os compósitos após tratamento foram colocados para cada poço contendo cultura celular com pinça estéril. As culturas foram incubadas por 24h e 72h a 37^oC sem troca do meio de cultura. A viabilidade celular foi avaliada pelos dois métodos: de coloração das células mortas por necrose pelo corante tripan- blue; e de coloração das células por mistura dos fluorocromos - laranja-acridina e brometo etídio que permite diferenciar células vivas, apoptóticas e necróticas de acordo com resultados de coloração de DNA e marcas morfológicas típicas (Martin e Lenardo, 1998).

A coloração e quantificação das células pelo corante trypan-blue foram realizadas como foi descrito no item 3.4.1.1.

O ensaio de coloração com laranja de acridina e brometo de etídio foi realizado para avaliar o tipo de morte celular após 1, 3 e 7 dias do cultivo. As células nos poços contendo as matrizes poliméricas sem mistura, os compósitos PHB/HAP, Q/HAP, o osso deproteinizado e, os poços controle foram coradas com uma mistura (10% do volume do poço) de laranja de acridina (100 µg/ml) (Sigma) e brometo de etídio (100 µg/ml) (Sigma). As células coradas foram analisadas utilizando microscópio de fluorescência invertido (Nikon TS 100) com aumento de 400x com filtro banda tripla (Nikon).

Foram adotados os padrões convencionais em relação à morfologia das células, observadas por microscopia de fluorescência e avaliados 100 fibroblastos em três campos diferentes de cada amostra. A porcentagem de cada subpopulação celular (células vivas, apoptóticas e necróticas) em relação ao total foi calculada.

□ Células vivas apresentaram a morfologia do núcleo intacto, DNA corado por laranja de acridina (cor do núcleo - verde).

□ Células apoptóticas:

a) Apoptose primária→ condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, DNA corado por laranja de acridina (cor verde), que reflete a membrana plasmática intacta e não permeável ao brometo de etídio.

b) Necrose secundária→ condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, DNA corado por brometo de etídio (cor vermelha), que demonstra a permeabilização necrótica da membrana plasmática que permite a entrada do brometo de etídio.

- Células necróticas → as células coradas por brometo de etídio, morfologia de núcleo não alterada.

3.5.2.2 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DO COMPÓSITO DE INDUZIR PRODUÇÃO DA CITOCINA INFLAMATÓRIA, FATOR DE NECROSE TUMORAL, POR MACRÓFAGOS

Foi avaliada a presença, no meio de cultura das células cultivadas com o compósito, das substâncias capazes de induzir nos macrófagos produção da citocina pró-inflamatória, fator de necrose tumoral alpha – TNF – α .

Os macrófagos murinos da linhagem celular RAW264.7 foram plaqueados e tratados como foi descrito no item 3.4.1.3. Os sobrenadantes obtidos foram quantificados em teste do TNF – α através do bioensaio L929.

3.5.2.2.1 – TESTE DA QUANTIFICAÇÃO DO TNF – α

a) Bioensaio de fibroblastos L929

Os fibroblastos da linhagem L929 são sensíveis para TNF- α . Na presença de um inibidor de transcrição – actinomicina D, TNF – α provoca lise destas células. As células L929 foram tripsinizadas com solução de tripsina 0,025% e EDTA 0,2% em PBS e plaqueadas na concentração $2,5 \times 10^5$ células/ml de meio DMEM-F12 contendo 10% de SFB e 20 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina (100 $\mu\text{l/poço}$), em placas de cultura com 96 poços (Corning). Após a incubação das placas a 37°C por 24 horas, o meio de cultura foi substituído pelo meio completo (SFB 10%) acrescido de actinomicina D, 3 $\mu\text{g/ml}$ (SIGMA). A curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas de TNF- α recombinante a partir de 2000 pg/ml com diluições subseqüentes na base 2 até 9 pg/ml. Após nova incubação por 24 h a 37 °C, a viabilidade celular foi determinada pela técnica de MTT com volume final de 100 μl . No final foi acrescentado, por poço, 2 μl dos sobrenadantes das culturas dos macrófagos. A viabilidade celular foi avaliada através da técnica de MTT.

b) Teste de MTT

As células foram incubadas à 37°C durante 1 hora com 0,5 mg/ml da solução do corante MTT (“3’-[4,5-dimetiltiazol-2yl] 2,5-difeniltetrazoliobromido”). Esta droga, nas células vivas, é convertida em cristais azuis insolúveis (formazana) pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial. Para dissolver os cristais, foi adicionado às células sem o sobrenadante 0,04M de HCL/isopropanol. A densidade óptica foi medida em leitor de ELISA (Dynatech MR5000) com filtro de teste 570nm e filtro de referência de 630nm.

3.5.2.3 – AVALIAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DAS CÉLULAS COM O COMPÓSITO

a) Crescimento celular nos compósitos

Para o crescimento celular na superfície dos compósitos, foram selecionados dois corpos de prova, um PHB/HAP (74/26) e Q/HAP (79/21). Na superfície de cada um foi depositado, duas vezes, 30 µl de fibroblastos murinos L929 (concentração de 1.4×10^5 cels/ml) com um intervalo de 20 min e incubados à 37°C com 5% de CO₂ por 3 h e, logo após foi completado o meio para cada poço (300 µl/poço). O meio foi trocado a cada 3 dias. Após 14 dias, os compósitos com as células aderidas foram lavados em PBS e imersas em solução de 2% de formalina com 2,5% de glutaraldeído(Sigma). As amostras foram processadas para serem avaliadas no MEV.

b) Preparo das amostras para o MEV

Para preparar esses compósitos com células aderidas para avaliação no MEV, foi realizada a secagem em ponto crítico (SPC). Os compósitos foram pré-fixados com 2.5% de glutaraldeído e 2% de formaldeído entre 4-10°C por 2-3 h, lavados com solução de cacodilato (pH 7.23, 300 mOsm/l), pós fixado em ósmio (OsO₄ 1%) em tampão cacodilato 0.1 M por 30min. Após desidratação com álcool em concentração crescente, a SPC foi realizada usando uma câmara em um CPD 30 com CO₂ como o fluido intermediário. A câmara foi fechada, resfriada a 0°C e CO₂ líquido foi colocado para preencher seu interior. A temperatura foi mantida entre

0°C e 10°C por 15 min, após isso o CO₂ da câmara foi drenado. A câmara vazia foi reabastecida imediatamente com CO₂ e drenada novamente após 1/2 h. Esse processo de esvaziamento e preenchimento com CO₂ foi repetido por duas vezes. A câmara foi aquecida para 42°C em 7 min e mantida a essa temperatura por 4 min. A pressão foi posteriormente reduzida para uma razão em torno de 50 psi por 1/2 min, para dar as amostras o ponto crítico de secagem. Posteriormente as amostras foram cobertas com uma fina camada de ouro e foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura.

3.5.2.4 – ESTATÍSTICA

Os testes *in vitro* foram repetidos três vezes. Os resultados demonstram a média e desvio padrão de cada parâmetro avaliado. Diferenças estatisticamente significante referente aos valores médios dos grupos experimentais em comparação com o grupo de controle foram analisadas pelo método *two-way* ANOVA e *post test* Bonferroni ($p < 0.05$), sendo estes executados com auxílio do programa Graph Pad Prism version 4.00 para o Windows, Graph Pad Software, San Diego, Califórnia, USA.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – BIOMATERIAIS COMPÓSITOS PHB/HAP

4.1.1 – COMPOSIÇÃO E HOMOGENEIDADE DAS FORMULAÇÕES

Os biomateriais PHB/HAP obtidos foram formulados com características típicas de um material compósito, tais como o controle do volume das frações e da distribuição geral e local da fase inorgânica, possibilitando assim variar as propriedades mecânicas e desenho do implante em função das necessidades do sítio receptor. Como podem ser observadas na Figura 8 e Tabela 14, as formulações foram preparadas em um percentual que apresenta uma discreta diferença em relação ao percentual teórico.

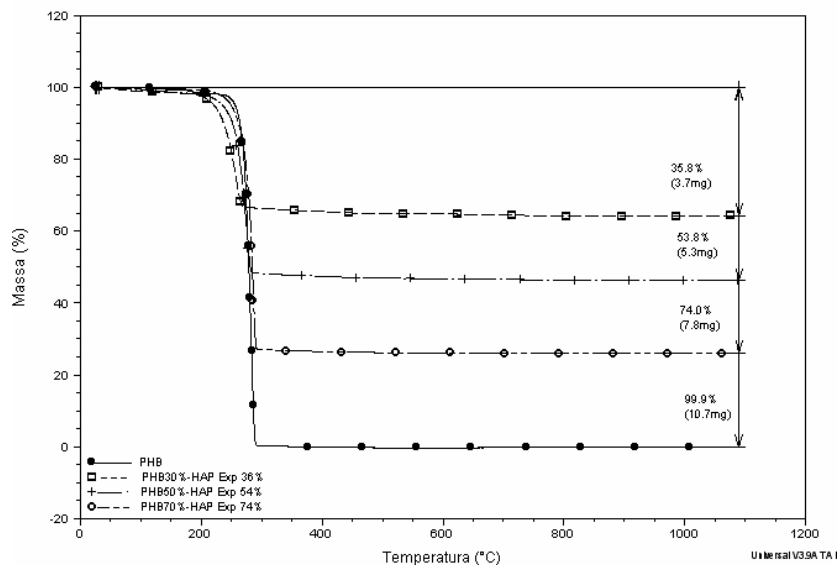


Figura 8 – Gráfico da perda de massa, do PHB e dos compostos PHB/X%HAP.

Todas as formulações apresentam uma maior porcentagem em relação à fase matriz de PHB, o que parece estar relacionado à metodologia de preparo dos compostos na qual a fase HAP está dispersa na fase orgânica. Eventualmente uma porção da fase inorgânica não foi encapsulada pela fase polimérica o que pode ter originado a perda de fase dispersa e justificar os resultados termogravimétricos.

Tabela 14 – Composição das formulações dos biomateriais compósitos PHB/X%HAP

| Massa de PHB (g) | Massa de HAP (g) | PHB teórico (% m/m) | PHB _{TGA} (% m/m) |
|------------------|------------------|---------------------|----------------------------|
| 1,4g | 0,6g | 70 | 74 |
| 1g | 1g | 50 | 54 |
| 0,6g | 1,4g | 30 | 36 |

Dados publicados sobre a composição do osso, onde a porcentagem referida foi de ~60% de HAP (Moreira, 2000; Murugan, 2005) direcionaram a escolha nesse trabalho de uma porcentagem que se aproximasse da do osso natural contendo 64% de HAP.

O estudo da homogeneidade dos compósitos foi realizado por termogravimetria para o compósito de mesma porcentagem de biocerâmica (PHB/26%HAP). A análise termogravimétrica mostrada na Figura 9 (a) mostra que há pouca diferença mássica da fase matriz quando foi feita a análise de duas regiões diferentes do mesmo corpo de prova. Na Figura 9 (b) é observada uma diferença pouco significativa entre pontos diferentes (1 e 2) do mesmo corpo de prova analisado, o que evidencia a homogeneidade do compósito. A distribuição homogênea da HAP na matriz foi favorecida pelo procedimento de mistura dos componentes no qual as partículas de HAP são recobertas ou encapsuladas pela fase polimérica a partir da solução de PHB em clorofórmio.

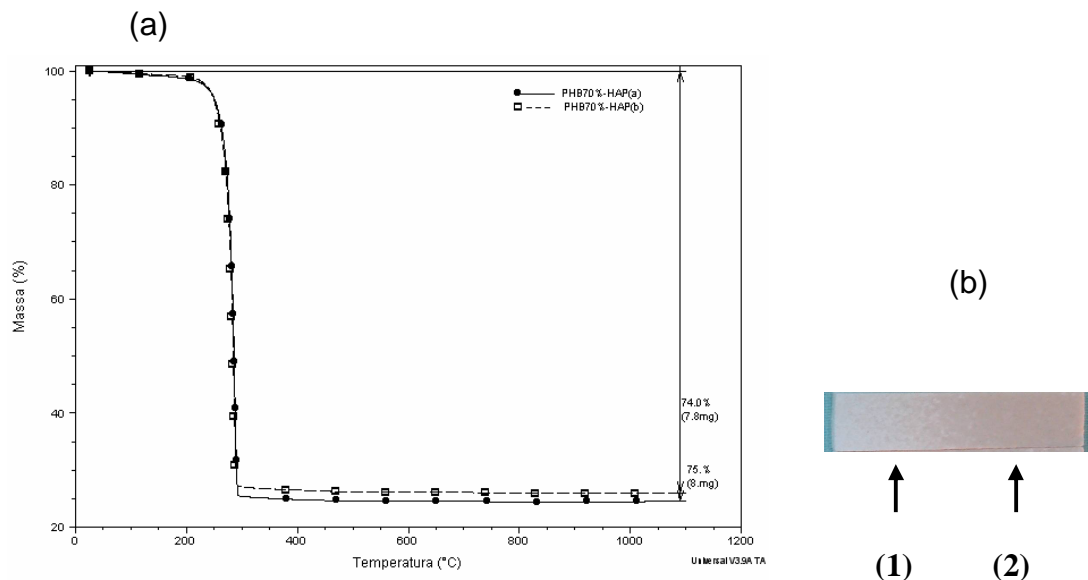


Figura 9 – Gráfico da perda de massa em relação à temperatura, do compósito PHB/HAP (74/26), em duas regiões do corpo de prova.

A distribuição homogênea é um pré-requisito para a utilização deste biomaterial como material de implante, pois no ambiente biológico as partículas de HAP bem distribuídas no compósito proporcionarão uma ancoragem uniforme na união com os tecidos circundantes, na medida em que a matriz polimérica sofre a degradação.

4.1.2 – ESTABILIDADE TÉRMICA

O comportamento térmico do polímero e a influência da adição da hidroxiapatita na temperatura de degradação dos materiais compósitos foram analisados através do perfil de degradação. Pode ser observado na Figura 10 que a degradação do PHB ocorre em um único estágio de degradação com intervalo de reação relativamente pequeno associado a uma rápida perda de massa. Isso ocorre porque o PHB é um polímero que não sofre despolimerização, processo que gera elevado número de monômero nos produtos de degradação e diminuição lenta na massa molar do polímero.

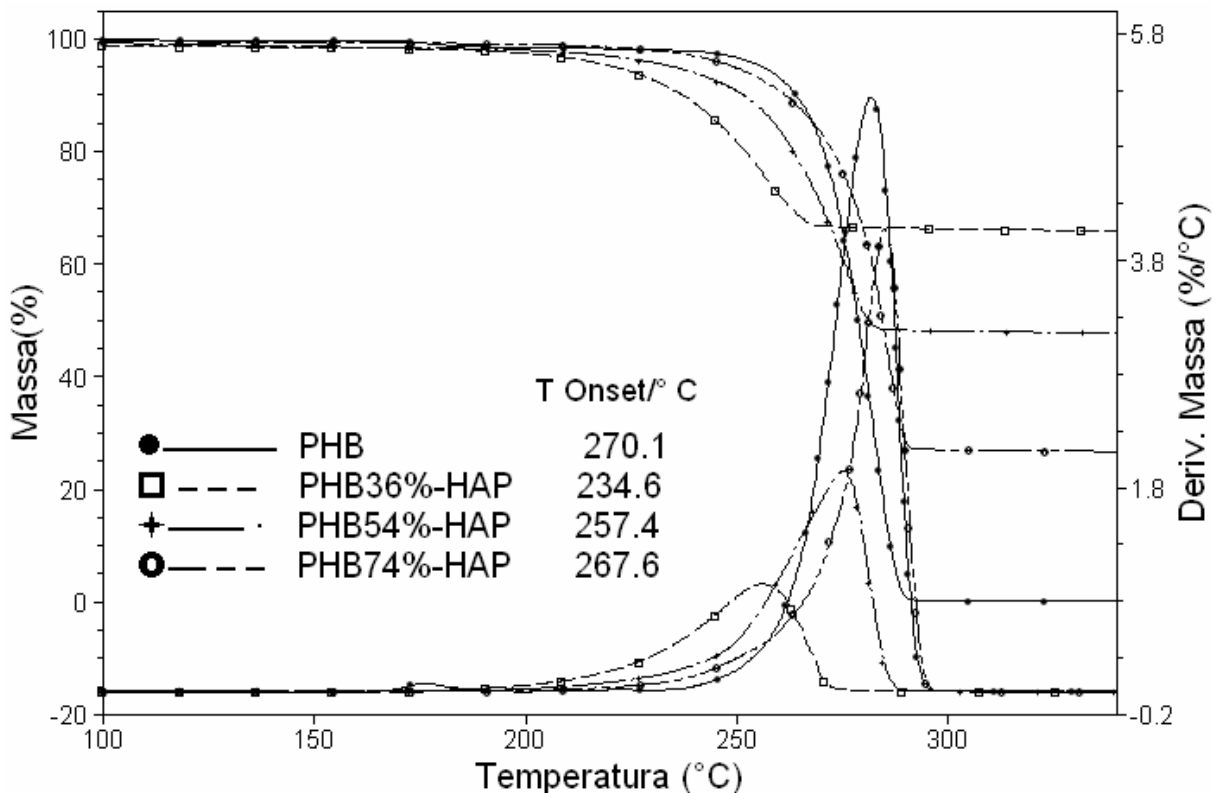


Figura 10 – Gráfico da perda de massa (TGA) e da derivada da perda de massa (DTG) do PHB e dos compósitos PHB/X%HAP.

O processo de degradação térmica da matriz PHB, como mostrado na Figura 10, ocorre aparentemente em um único estágio, tendo início em $270^{\circ}\text{C} - T_{\text{on set}}$. Houve uma redução da $T_{\text{on set}}$ no processo de degradação, resultante da interação entre as fases, o que propicia a melhor estabilidade da matriz. A temperatura “on set” de degradação registrada para o compósito com a maior proporção de HAP (64%) é 234°C , portanto uma queda de 36°C em relação ao PHB. Essa redução da temperatura de degradação dos biocompósitos formulados é significativa e pode ser considerado um resultado positivo porque por um lado a redução da $T_{\text{on set}}$ não representa uma limitação para o uso como biomaterial e por outro a interação entre as fases pode vir a favorecer o processo de integração do biomaterial. Uma boa integração do biomaterial estimula uma melhor resposta biológica do sítio receptor.

A redução da temperatura inicial (“onset”) de decomposição em comparação com a do PHB, evidencia a existência de interação entre a fase inorgânica e o PHB. Também a redução da $T_{\text{on set}}$ no processo de decomposição dos compósitos foi diretamente proporcional ao aumento da concentração de carga (HAP). Comportamento anteriormente observado por Chen e Wang, 2002, para os compósitos dos copolímeros P3(HB-HV) e a HAP e fosfato tricálcio.

É conhecido que a via da degradação térmica para o PHB segue uma rota que envolve uma reação de cisão randômica da cadeia do grupo éster, formando fragmentos com estruturas carboxílicas e insaturados (Kopinke et al., 1996).

A região ou intervalo de reação é representada pela diferença entre T_f (T_{offset}) e T_i (T_{onset}) e, quanto menor for esse intervalo, mais simples e mais rápido é o processo de degradação do material (Mothé e Azevedo, 2002).

4.1.3 – PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS BIOMATERIAIS COMPOSITOS PHB/HAP

Foram realizados dois tipos de testes complementares para determinar as propriedades dos compósitos: estáticos e dinâmicos. As propriedades mecânicas relacionadas a testes estáticos foram adquiridas pelo ensaio de flexão, são elas o módulo elástico em flexão, a tensão máxima em flexão (σ_{max}) e a taxa de deformação. As propriedades mecânicas adquiridas de testes dinâmicos foram o módulo de armazenamento (E'), o módulo de perda (E'') e a tangente de delta ou de perda ($\tan\delta$).

O ensaio de flexão foi realizado para obter informações sobre as propriedades mecânicas de deformação, tensão máxima em flexão (σ) e módulo elástico em flexão do PHB e dos compósitos formulados com HAP em diferentes proporções de matriz e fase dispersa. Também foi analisada a interação entre as fases e a influencia desta nas propriedades mecânicas da matriz polimérica.

A menor resistência à fratura foi observada para o compósito com 64% de hidroxiapatita, aproximadamente 14,16 MPa como pode ser visto na Tabela 15 e Figura 11, o que é justificado pela propriedade frágil das cerâmicas e a relativa mudança de função da fase PHB que passou a ter uma função de colagem para essas partículas. Porém, a resistência desse compósito foi superior a alguns materiais comerciais como: Calcibon, 4 – 7 MPa, Pro-osteon, 2-4 MPa, Chronos, 7,5 MPa, (Habraken et al., 2007). A maior porcentagem de deformação foi encontrada no compósito com maior porcentagem polimérica (74% PHB) conferindo ao material uma ductilidade relativa, o que era esperado considerando a boa distribuição das partículas de HAP na matriz polimérica. Também esse formulado por apresentar uma menor porcentagem de hidroxiapatita obteve a resistência à fratura semelhante a do polímero, mostrando ser dos compósitos o mais resistente à fratura, 24,77 MPa, tendo o módulo elástico superior ao da matriz polimérica.

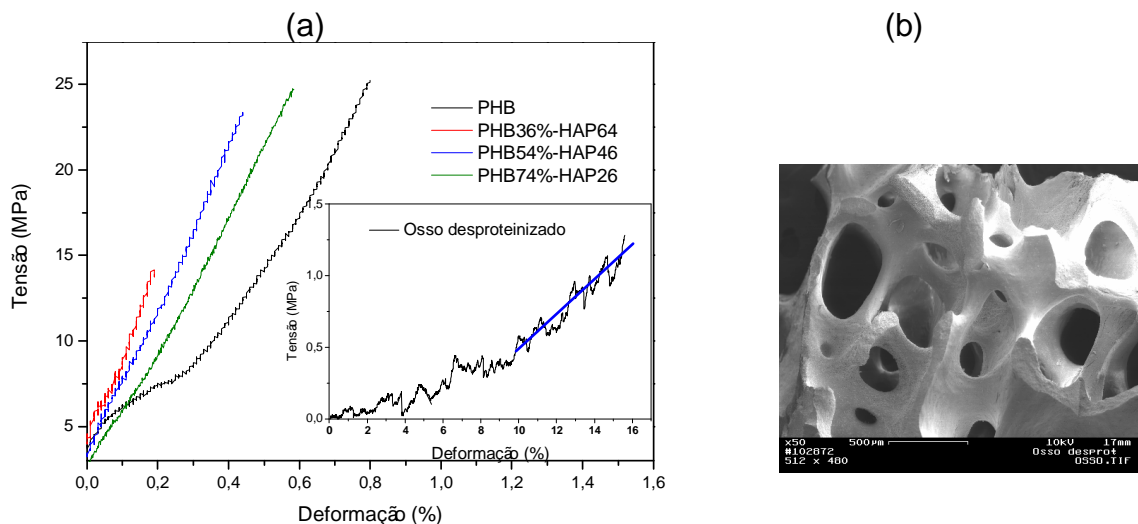


Figura 11 – (a) Gráfico de tensão X deformação plotado para o PHB, os compósitos PHB/X%HAP e para o osso desproteínizado. (b) Micrografia eletrônica do osso desproteínizado (50X).

Como pode ser observado na Figura 11, quando comparamos os biocompósitos formulados nesse trabalho com a matriz óssea comercializada (osso bovino desproteínizado), constata-se que o compósito nas proporções de 54 e 74% de PHB em massa apresenta baixa taxa de deformação e alta resistência à fratura. Essas características podem estar relacionadas com a melhor distribuição das partículas de HAP na fase polimérica, verificadas na proporção 54% e no predomínio das características da matriz também verificadas na fotomicrografia para a proporção 74%, promovendo uma melhor distribuição das tensões e permitindo a melhor atuação de reforço das partículas de HAP nessas proporções do compósito. Essas observações podem ser verificadas também através de fotomicrografias mostradas na Figura 17. Portanto estas proporções dos compósitos podem ser indicadas para áreas onde seja necessário aumentar a resistência mecânica do local, mas que não fique sujeita a impacto direto (por exemplo, alvéolo dentário, tumor intra-ósseo, defeito periodontal de três paredes ou crateras ósseas), enquanto a matriz comercializada tem o seu uso limitado a uma área com baixa exigência de resistência.

Na Tabela 15 estão relacionados dados mecânicos do PHB e dos respectivos compósitos com HAP. Os valores referidos confirmam os comentários realizados em relação à Figura 11 na qual se destaca o efeito da incorporação das partículas de HAP ao PHB que proporcionou o desenvolvimento de um compósito mais duro que o polímero, o que foi relatado anteriormente por Ni e Wang, 2002, numa avaliação *in vitro* do compósito poli(3-hidroxibutirato) reforçado com hidroxiapatita. O compósito possui um módulo elástico superior ao do polímero.

Tabela 15 – Resultados obtidos a partir do teste mecânico de flexão

| Corpo de prova (% em massa) | σ máxima (MPa) | Deformação máxima (%) | Módulo Elástico (GPa) |
|--|---|----------------------------------|----------------------------------|
| PHB | 25,25 | 0,8 | 3,0 |
| PHB/HAP(74/26) | 24,77 | 0,58 | 3,9 |
| PHB/HAP(54/46) | 23,38 | 0,44 | 4,5 |
| PHB/HAP(36/64) | 14,16 | 0,19 | 5,8 |
| Osso desproteínizado (GenOx Inorg.) | 1,28 | 15,60 | 0,011 |

Analisando os resultados obtidos no teste de flexão mostrado na Figura 11 e os dados relacionados na Tabela 15, pode-se notar que a adição do reforço modificou o comportamento mecânico do compósito quando comparado ao do polímero, variando de acordo com o percentual de carga acrescentado. Portanto sob o ponto de vista mecânico o PHB 74% reúne as melhores propriedades obtidas pelo ensaio mecânico de flexão.

De acordo com pesquisas anteriores foram relacionados alguns dados mecânicos para polímeros, dentre eles o poli (L-ácido láctico) com o módulo elástico 2,7 GPa, resistência máxima 50 MPa; o poli (β -hidroxibutirato) com o módulo elástico 2.5 GPa e resistência máxima 36 MPa (Murugan, 2005), ainda também citados materiais cerâmicos como β -fosfato tricálcio com resistência máxima 7,5 MPa e HAP bovina com resistência 2.5-16MPa (Habraken et al., 2007) portanto as propriedades mecânicas dos compósitos estão comparáveis ou superiores as apresentadas por outros materiais utilizados individualmente o que justifica a busca de melhores propriedades em materiais compósitos.

Réplicas dos corpos de prova usados para os ensaios anteriores foram analisados por Análise Dinâmico-Mecânica (DMA).

Na Figura 12 observa-se que o módulo de armazenamento (E') diminuiu com o aumento da temperatura para todos os compósitos. Também pode ser visto que o aumento do E' foi maior com o aumento de carga biocerâmica de 26 e 46% de HAP o que é um comportamento clássico de compósitos particulados onde a hidroxiapatita está exercendo o efeito reforçador na matriz.

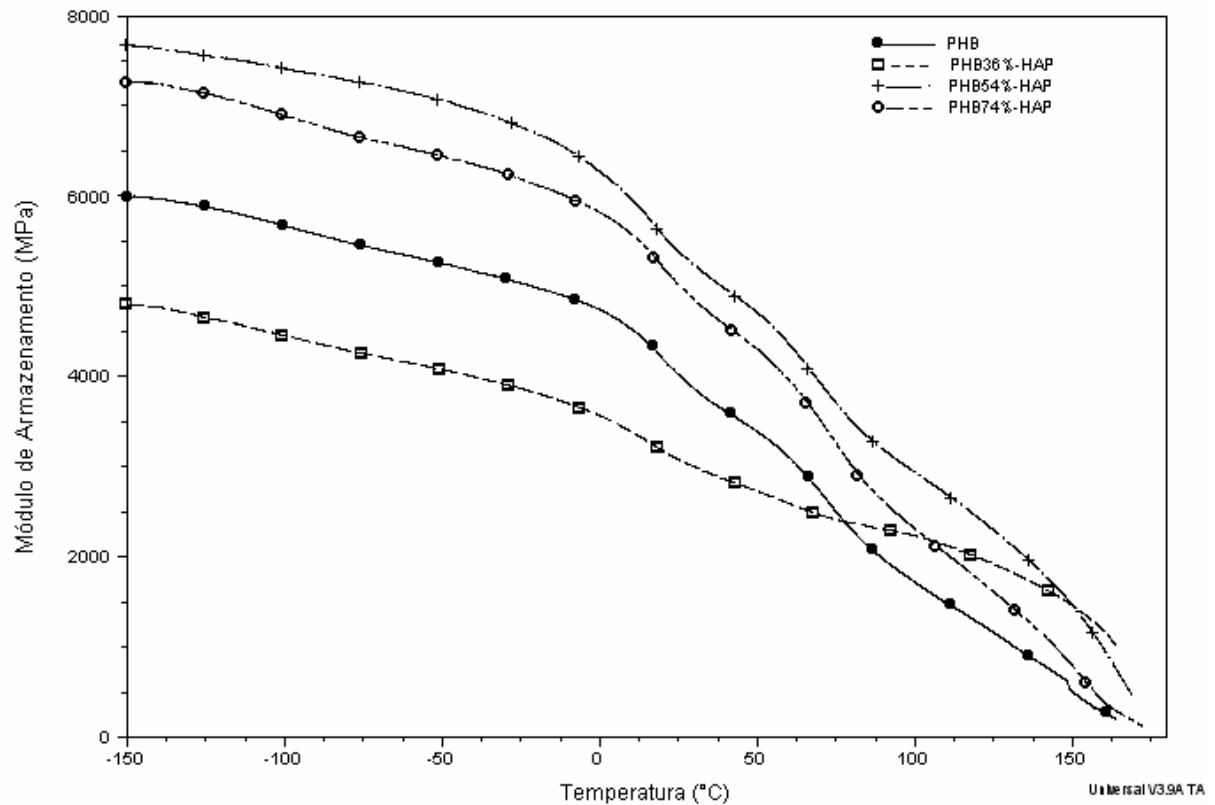


Figura 12 – Gráfico da variação do módulo de armazenamento com a temperatura, do PHB e dos compostos PHB/X%HAP.

Na concentração onde a fase de HAP representa 64% do compósito o polímero deixa de exercer sua característica de matriz, passando a atuar apenas como um material de colagem das partículas de HAP o que justifica a queda do E' em relação à matriz. Ainda pode ser observada que a redução do E' com o aumento da temperatura foi menos acentuada para este compósito com 64% de HAP, deixando parecer que a fase inorgânica (HAP) se tornou o principal modulador do comportamento mecânico do material. Para as outras composições (26-46%) HAP o efeito de transição vítrea experimentada pela matriz entre 0-20°C é mais definido.

A curva de amortecimento apresentou um máximo entre 0 e 50°C como pode ser observado na Figura 13, tal comportamento é relativo a transição vítrea da fase PHB. A temperatura do pico da $\tan\delta$, que define a T_g da matriz polimérica praticamente não apresentou variação para os compostos existentes de 26 e 46% de HAP em relação ao do PHB. Apenas no compósito com 64% de HAP, se observa uma maior T_g , indicando provavelmente a restrição de movimentos segmentares da cadeia molecular do PHB originado pela presença da HAP. A intensidade dos sinais associados foi aumentada para os compostos com maiores concentrações de HAP, possivelmente em função da maior quantidade de energia que pode ser dissipada na

interface polímero-cerâmica pela existência de uma ligação mecânica interfacial, também observada por Chen e Wang (2002).

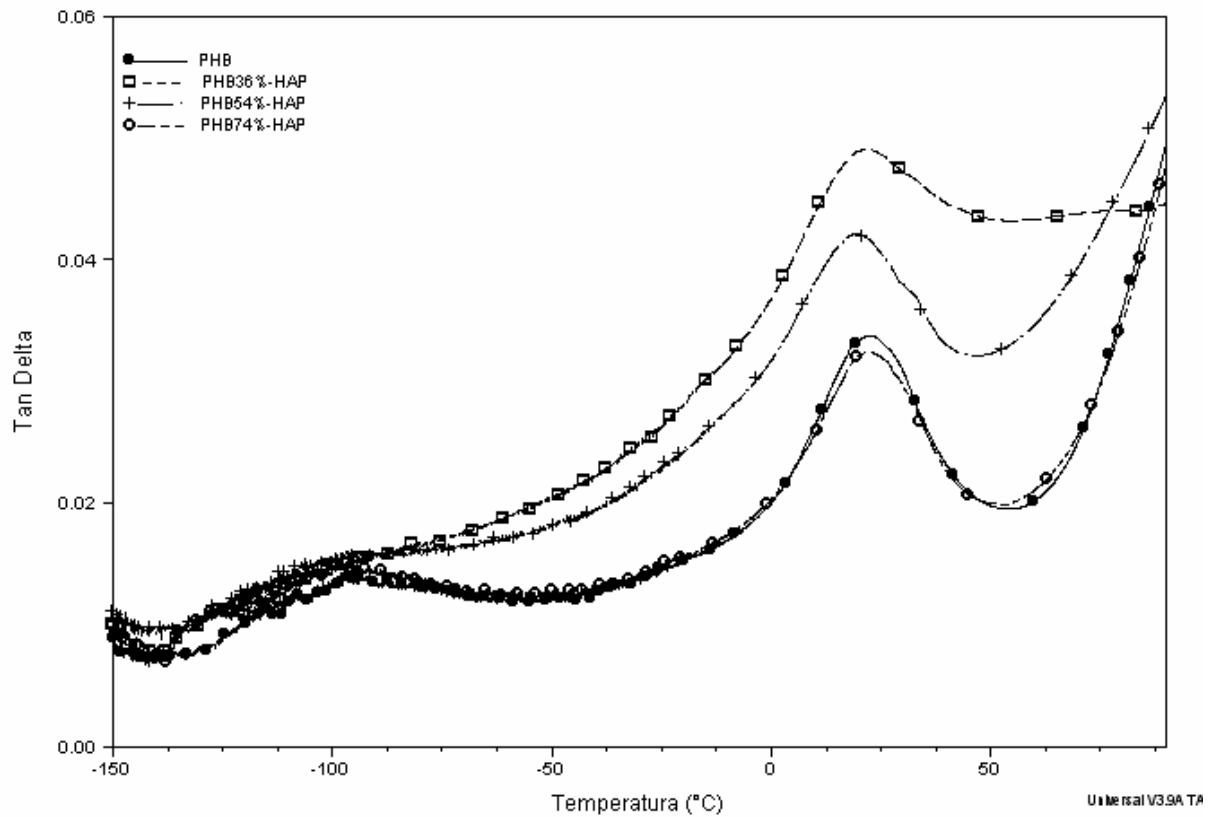


Figura 13 – Gráfico da variação da tangente de delta com a temperatura, do PHB e dos compósitos PHB/X%HAP.

A Figura 14 apresenta a dependência do módulo de perda (E'') do PHB e dos compósitos em função da temperatura. No intervalo de temperatura de -125 a -65°C podem ser observados sinais mais definidos que no gráfico de amortecimento que indicam a existência de relaxações secundárias no PHB.

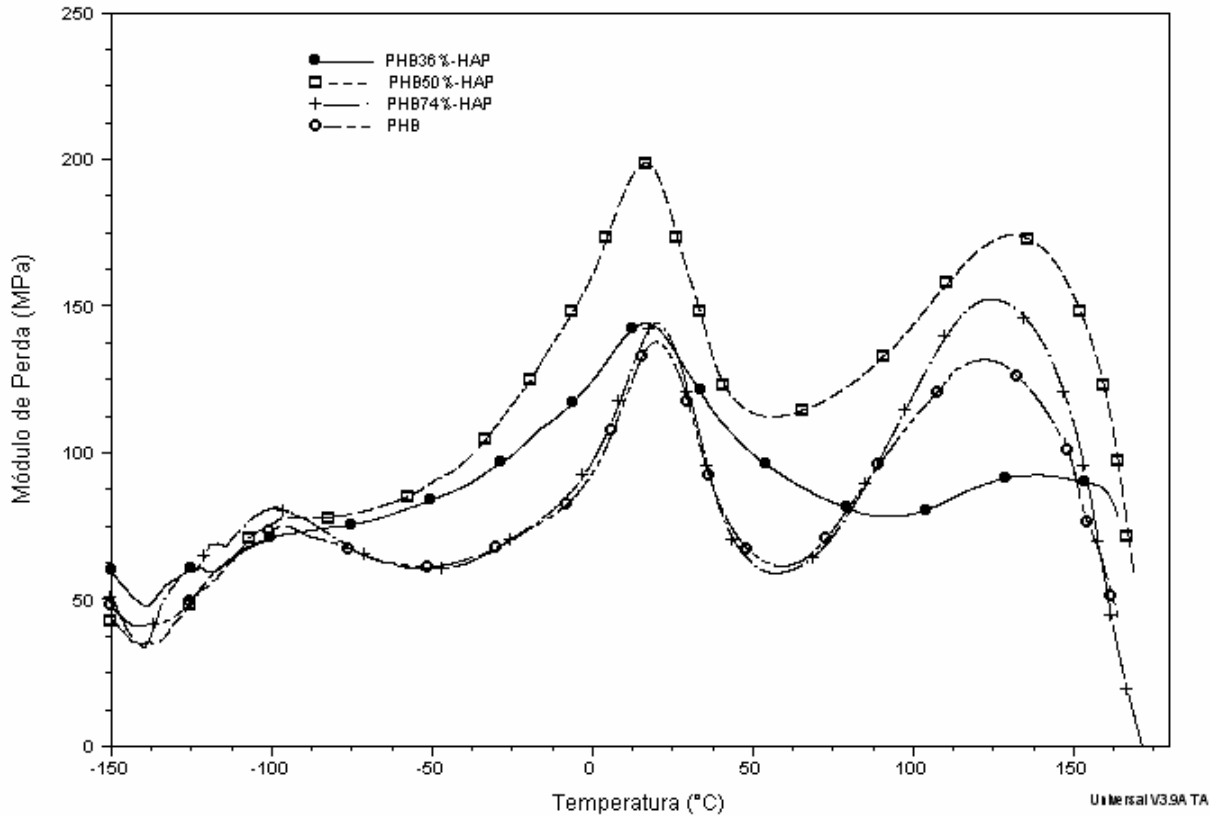


Figura 14 – Gráfico da variação do módulo de perda com a temperatura, do PHB e dos compostos PHB/X%HAP.

Os compostos com maiores proporções de HAP apresentam picos menos definidos em função provavelmente da redução dos movimentos do grupo lateral pelo efeito das partículas de HAP. Nas temperaturas entre 0 e 50°C, referentes a transição vítrea dos compostos, a área associada a esta transição foi maior para os compostos na proporção do aumento da HAP, provavelmente em função do atrito aumentado nas interfaces gerando uma maior perda de energia. À temperatura próxima a 170°C, quando ocorre a fusão dos cristais da matriz, o composto com a maior proporção de HAP e pequena proporção de matriz apresentou um comportamento que parece estar associado à perda de função da matriz e aumento do atrito da interface, perdendo as características referentes à interação polímero-cerâmica.

A mudança no ambiente de um determinado grupo quando há, por exemplo, adição de diferentes porcentagens de carga, se reflete no perfil ou na área sob a curva do módulo de perda com a temperatura (Cassu e Felisberti, 2005).

4.1.4 – GRAU DE CRISTALINIDADE DOS BIOMATERIAIS COMPÓSITOS

4.1.4.1 – CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC)

Para avaliar a influência da hidroxiapatita sobre a cristalinidade do poli(3-hidroxiбутirato) foi realizada a análise por DSC do composto PHB/HAP (54/46 %m/m) e do PHB utilizado na formulação desse. Determinou-se através da Figura 15, que o calor de fusão (ΔH_f) para PHB/HAP (54/46) foi de aproximadamente 48,6 J/g, portanto o calor de fusão relativo a 1g da fase PHB seria de 90 J/g. Quando analisado o calor de fusão do PHB puro através da Figura 15 obteve-se uma ΔH_f de 99,5 J/g. Se comparado com a fase PHB no composto observa-se que houve uma redução no grau de cristalinidade. A redução observada na cristalinidade do PHB quando formulado o biocomposto, foi analisada e quantificada com o auxílio da difração de raios-X.

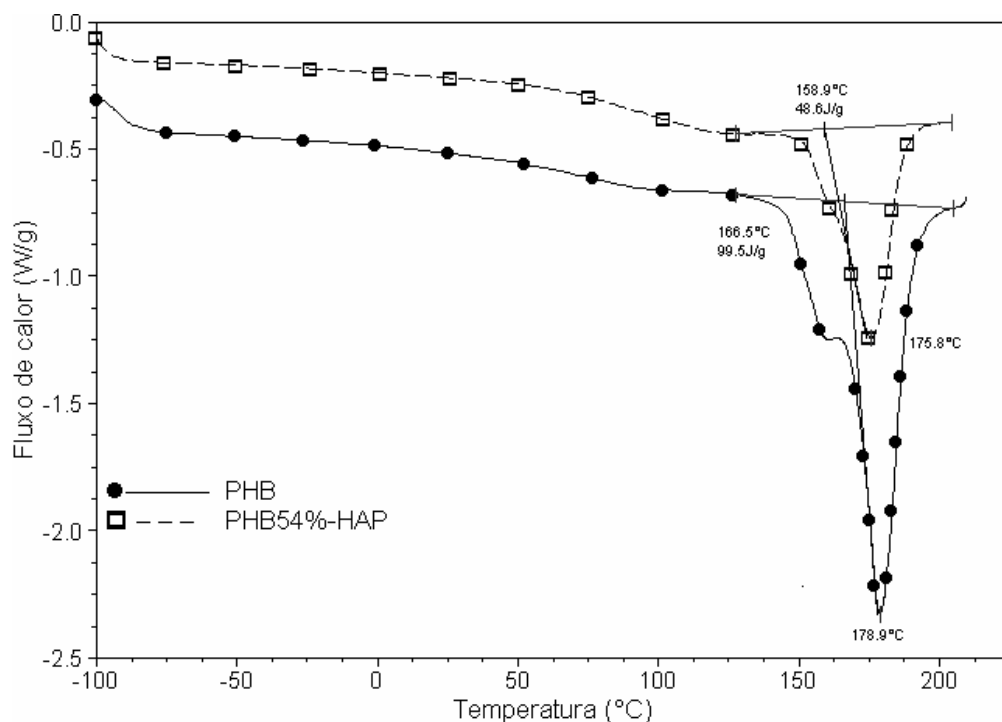


Figura 15 – Gráfico de calorimetria diferencial exploratória para o PHB e do composto PHB/HAP (54/46 %m/m)

4.1.4.2 – DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

Na Figura 16 são apresentados os difratogramas para o corpo de prova de PHB individual, biocompósito PHB/HAP (54/46 %m/m) e para uma maistura entre pós de PHB e HAP na mesma proporção do biocompósito processado. Os dados da porcentagem de cristalinidade obtidos a partir dos difratogramas de DRX são relacionadas na Tabela 16. Pode-se observar que existe uma menor porcentagem de cristalinidade para o PHB presente no compósito PHB/HAP (54/46 %m/m).

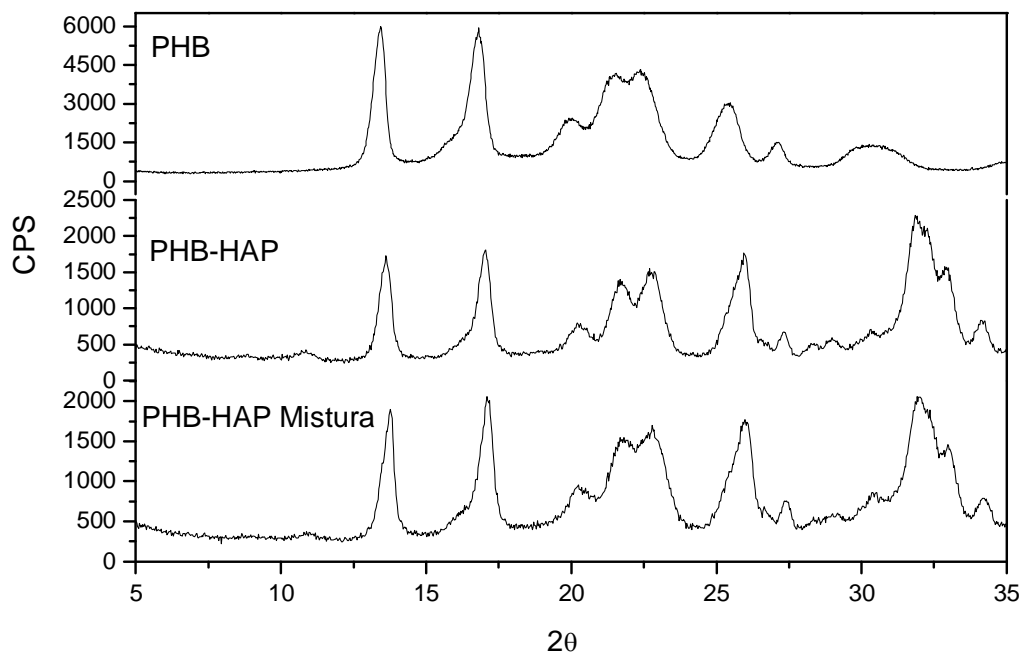


Figura 16 – Gráfico de difração de Raios-X, do PHB, do compósito PHB/HAP (54/46 % m/m) e da mistura PHB/HAP (54/46 %m/m).

Tabela 16 – Dados referentes à porcentagem de cristalinidade determinada através da análise das amostras por difração de Raios-X

| Amostras | Porcentagem de cristalinidade (%) |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| PHB | 54,2 |
| PHB/HAP (54/46) – compósito | 41,8 |
| PHB/HAP (54/46) – mistura | 43,8 |

Considerando possíveis efeitos da distribuição da fase do PHB no compósito, que possam vir a influenciar na determinação da porcentagem de cristalinidade, foi

incluída uma análise comparativa utilizando-se uma mistura grosseira de PHB e HAP nas mesmas proporções destes componentes existentes no compósito formulado.

Os resultados relacionados Tabela 16 confirmam a existência de uma redução de cristalinidade para o PHB como observado na análise calorimétrica (DSC), provavelmente como consequência da interação entre as fases presente nos compósitos.

4.1.5 – CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS BIOMATERIAIS COMPÓSITOS

Complementando a análise realizada das propriedades mecânicas foram avaliadas por MEV as micropartículas da HAP utilizadas na formulação dos compósitos e as regiões da fratura dos compósitos dos corpos de prova após o ensaio de flexão. Na Figura 17 são mostradas as micrografias dos compósitos de PHB/HAP..

As partículas de HAP que foram utilizadas na formulação dos compósitos deste trabalho (Figura 17-a) apresentaram uma distribuição na matriz relativamente ampla, com tamanhos menores que 100 μs . Pode ser observada a necessidade de ser utilizado o processo de homogeneização das partículas, pois elas tendem a se agrupar sob condições normais de armazenamento, o que atrapalhará a distribuição homogênea das partículas no processo de formulação dos biocompósitos (Figura 17-b).

A matriz polimérica (Figura 17-c) é homogênea e densa. Observa-se para os compósitos com 26 e 46% HAP boa dispersão da biocerâmica destacando que a formulação com 46% HAP tem um nível de compactação e segregação levemente maior que para 26%. Neste se observa uma relativa alta porosidade. Esses resultados justificam o valor maior para o módulo de armazenamento e módulo elástico do compósito com 46% de HAP. Evidências de difração de Raios-X (DRX) podem justificar o surgimento desta porosidade pela cristalinidade sustentada pela HAP, o que não acontece quando as fases estão em porcentagens comparáveis. Para o compósito com maior porcentagem de HAP a porosidade parece dever-se a fatores diferentes como a falta de fase polimérica entre algumas partículas. A presença de poros e a aparente falta de fase polimérica entre as partículas de HAP podem estar refletindo na redução do módulo de armazenamento em relação ao do PHB e no valor do módulo elástico que teve valor próximo ao da matriz.

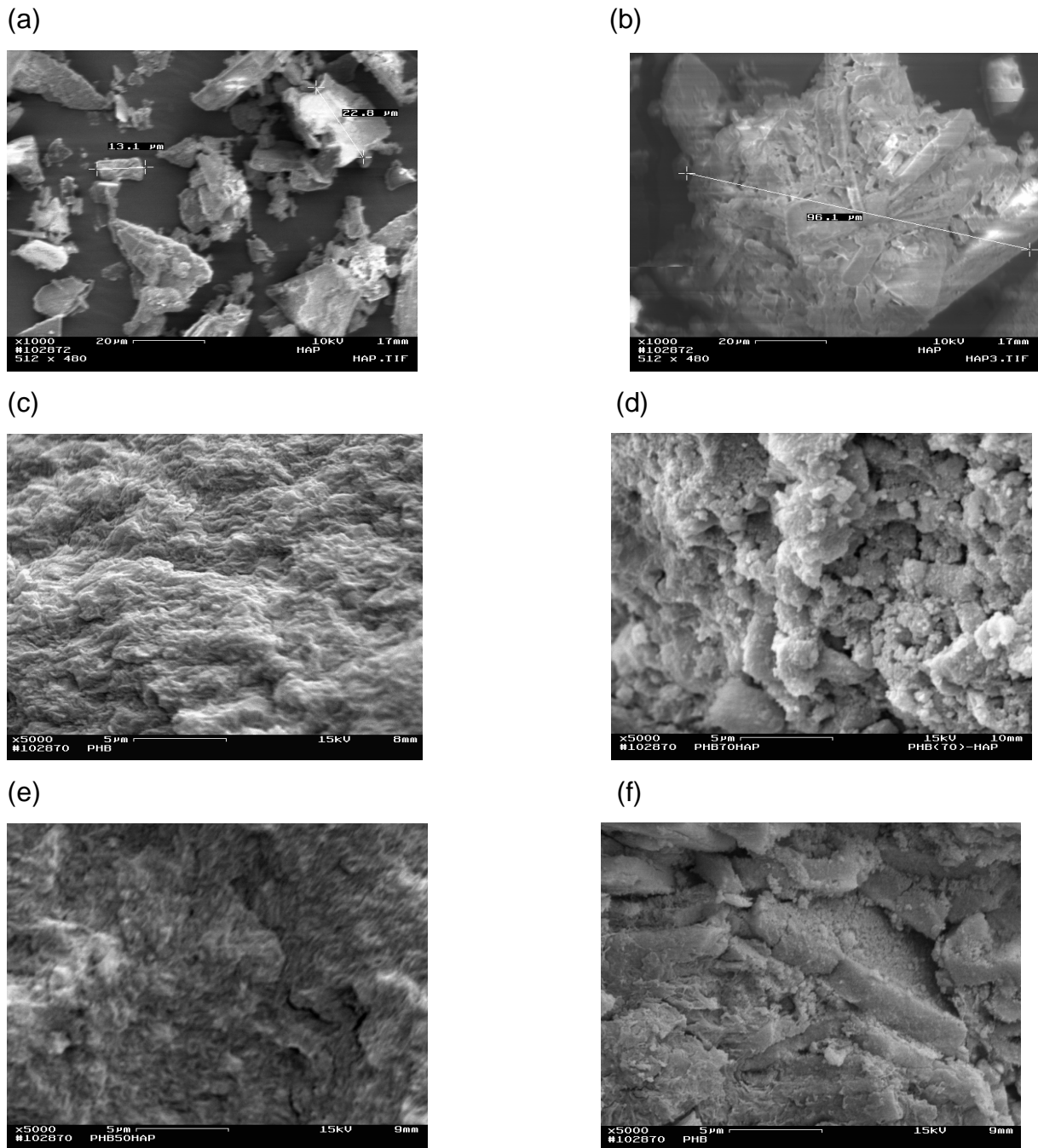


Figura 17 – Micrografia eletrônica das micropartículas de HAP utilizadas na formulação dos compósitos: (a, b) HAP, (1000X) e da região da fratura dos compósitos nos corpos de prova: (c) PHB, (d) PHB/HAP (74/26), (e) PHB/HAP (54/46), (f) PHB/HAP (36/64); (5000X).

Segundo Russias et al., 2006 todo compósito tem alguma porosidade inerente, ou seja, até mesmo a composição considerada densa tem em torno de 7 a 8% de porosidade. A presença de poros em um material para preenchimento ósseo é importante para abrigar células formadoras de osso enquanto o tecido ósseo está sendo renovado. Também foi relatado na literatura, Wang 2005, que partículas de HAP expostas favorecem a formação do contato dos osteoblastos, estimulando o

crescimento dessas células. O autor também relata que a superfície com uma rugosidade apropriada mostra uma melhor biocompatibilidade.

Baseado nestes conhecimentos e analisando as imagens do MEV dos compósitos verificamos que o compósito formulado que apresentou melhor distribuição de porosidade e as partículas de HAP mais expostas (Figura 17-d) foi o PHB/HAP (74/26), portanto esse deve ser o compósito mais indicado para preenchimentos ósseos visando principalmente uma melhor resposta celular para sua integração.

A região da fratura do compósito PHB/HAP (54/46) parece ter alcançado uma melhor distribuição da fase dispersa (reforço – HAP) na fase matriz (PHB), refletindo maior homogeneidade dentre os compósitos que pode ser em função do equilíbrio entre cristalinidade da matriz e proporção de partículas. Foi o compósito que apresentou maior módulo de armazenamento na análise de DMA (Figura 12) e maior módulo elástico (Tabela 15) que pode ser justificado pela homogeneidade da matriz verificada pela análise do MEV (Figura 17-e). Observamos também alguns poucos poros distribuídos na superfície da fratura do corpo de prova.

Uma boa dispersão da carga inorgânica proporciona benefícios que se refletem na melhora das propriedades mecânicas do material compósito e na bioincorporação após degradação da sua matriz (Chen et al., 2007).

A região da fratura do compósito PHB/HAP (36/64), com a maior carga cerâmica é mais irregular, refletindo que essa proporção de partícula de HAP alterou a homogeneidade da matriz, podendo ser observado ângulos agudos e concavidades que evidenciam a perda da homogeneidade da matriz.

4.2 – BIOMATERIAIS COMPOSITOS Q/HAP

4.2.1 – COMPOSIÇÃO E HOMOGENEIDADE DAS FORMULAÇÕES

As curvas de análise termogravimétrica (TGA) mostradas na Figura 18 mostram a composição efetiva para os compósitos formulados. No compósito formado pela mistura das partículas de Q/HAP não foi possível a dissolução da Q, pois um dos solventes da Q, o ácido acético, pode alterar a estrutura da HAP, então foi realizada a mistura dos sólidos, seguindo as proporções desejada.

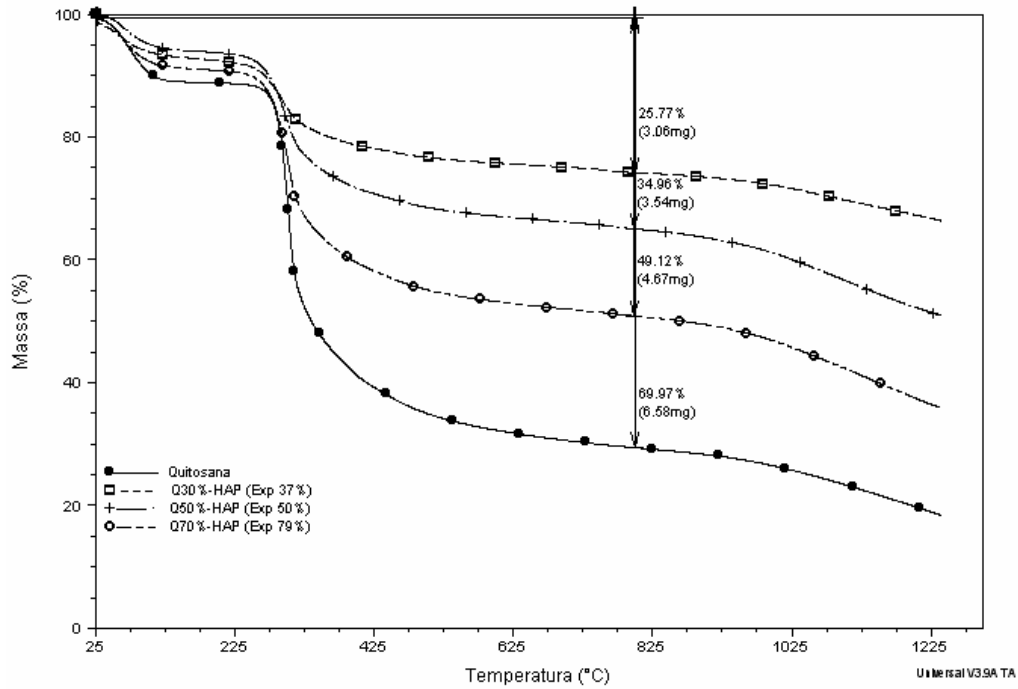


Figura 18 – Gráfico da perda de massa, da Q e dos compósitos Q/X%HAP.

Esta técnica foi usada para avaliar a variação de massa da fase polimérica num aquecimento programado dos compósitos Q/HAP, utilizado para determinar a porcentagem efetiva da fase polimérica nos compósitos.

Na Tabela 17 é apresentada a composição efetiva dos compósitos determinando a partir das análises de TGA. Pela análise quantitativa a porcentagem de massa efetiva dos compósitos com proporções de 30 e 70% em massa de HAP foi relativamente diferente da teórica. Por ter sido utilizado o processo da mistura de sólidos e, as partículas de HAP serem micrométricas, talvez com mais facilidade algumas delas tenham ultrapassado os limites do molde antes de serem encapsuladas pela quitosana justificando a perda.

Tabela 17 – Composição das formulações dos biomateriais compósitos Q/X%HAP

| Massa de Q (g) | Massa de HAP (g) | Q teórica (% m/m) | Q _{TGA} (% m/m) |
|----------------|------------------|-------------------|--------------------------|
| 1,4g | 0,6g | 70 | 79 |
| 1g | 1g | 50 | 50 |
| 0,6g | 1,4g | 30 | 37 |

A análise da degradação térmica da quitosana e compósitos (Figura 18) pode ser observada através da curva termogravimétrica, que mostra que o processo ocorre em dois estágios. A hidroxiapatita teve uma pequena interferência no processo de degradação da matriz, modificando o intervalo da reação quando comparado ao da quitosana sem mistura.

4.2.2 – ESTABILIDADE TÉRMICA

A degradação ocorre aparentemente em dois estágios, como pode ser visto na curva da Derivada da Perda de Massa (DTG) na Figura 19.

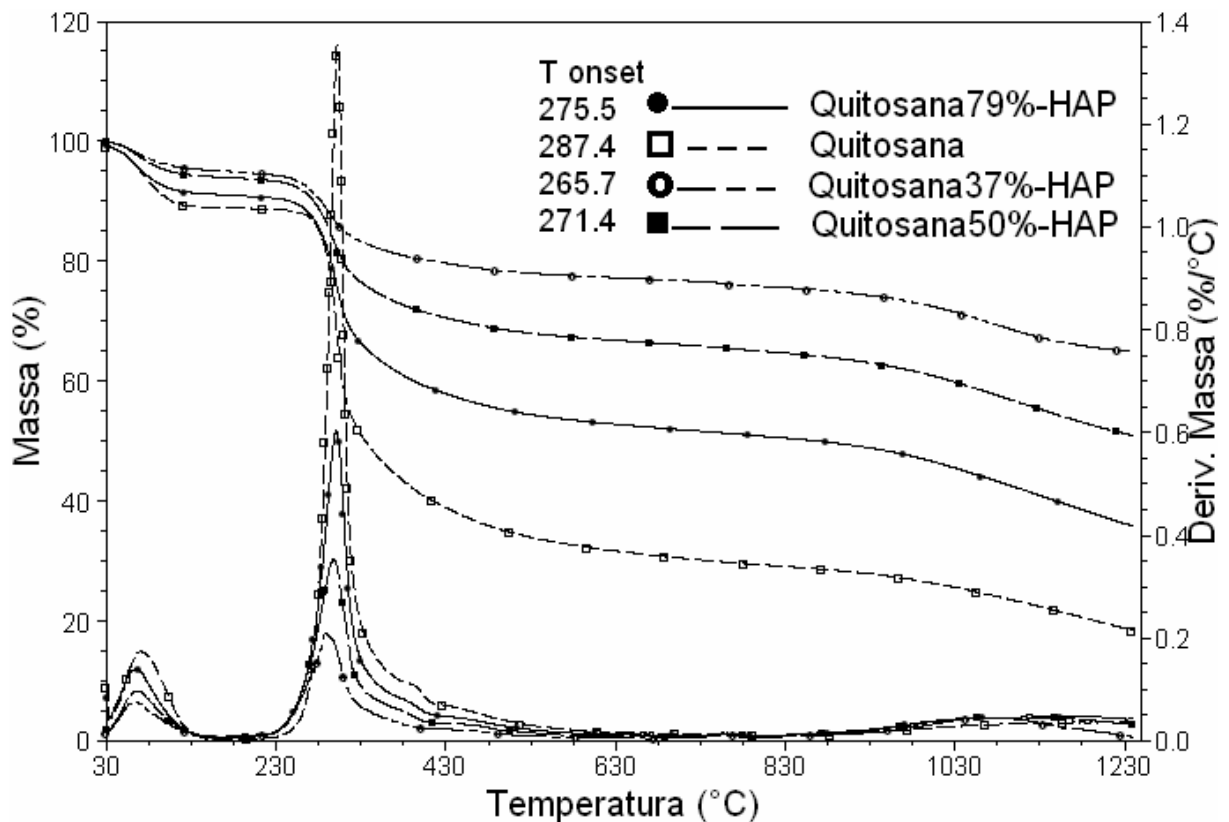


Figura 19 – Gráfico da perda de massa (TG) e da derivada da perda de massa (DTG), da Q e dos compósitos Q/X%HAP.

O primeiro estágio (da temperatura ambiente até 75°C) com perda de peso atribuído a perda de água adsorvida e estrutural contida nos materiais. O segundo estágio que registra a temperatura “onset” em 287°C, corresponde à decomposição térmica da quitosana, vaporização e eliminação de produtos voláteis.

Como referido na literatura a pirólise de um polissacarídeo começa pelo rompimento randômico de uma ligação glicosídica, seguida por uma decomposição posterior formando ácido acético, ácido butírico e uma série de ácidos gordurosos inferiores predominando C2, C3 e C6 (Neto et al., 2005).

A temperatura de degradação térmica dos compósitos foi ligeiramente reduzida, com o aumento da porcentagem de HAP, quando comparada a da Quitosana. Portanto, houve uma redução da T “onset” no processo de degradação, interferindo na estabilidade da quitosana e isto evidencia a interação das fases. Foi observado que a redução foi proporcional ao aumento da proporção de HAP sendo registrada T “onset” de 265°C para o compósito com 37% de Q (maior porcentagem de HAP dos compósitos). Como já referido a interação entre as fases é importante sob o ponto de vista biológico no sentido de favorecer a integração ao sítio receptor.

4.2.3 - PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS BIOMATERIAIS COMPÓSITOS Q/HAP

O comportamento mecânico da quitosana (Figura 20) e dos biocompósitos indica que a quitosana apresentou uma região da curva de deformação correspondente à deformação elástica e outra a plástica (Tabela 18), apresentando 3,9% de deformação total e resistência máxima à fratura de 9,26 MPa, após preparo por prensagem das partículas, em moldagem por compressão.

Existe relatado na literatura valor de resistência máxima à fratura para a quitosana de 6.88 MPa (Petri et al., 2007) que é um valor próximo do apresentado nesse trabalho.

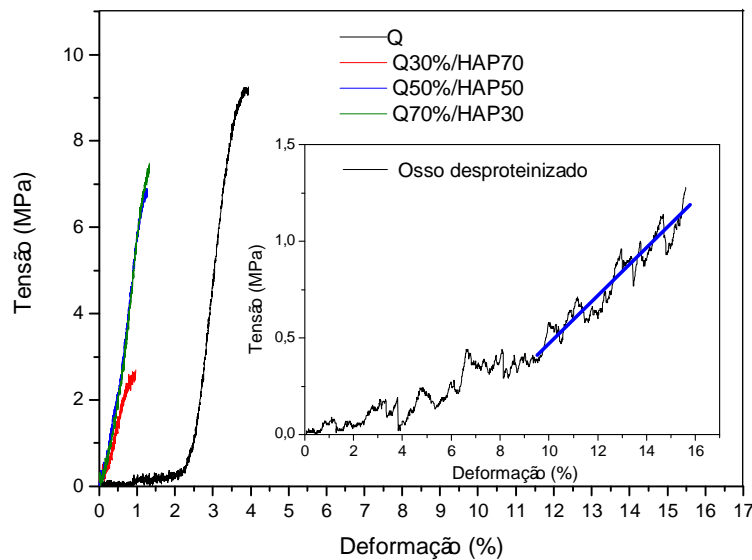


Figura 20 – Gráfico de tensão X deformação plotado para a Q, os compósitos Q/X%HAP e para o osso desproteínizado.

Nos compósitos a biocerâmica restringe o movimento da matriz próximo a cada partícula e conseqüentemente também reduz a deformação dos compósitos. Todos os compósitos apresentaram deformação e resistência à tensão menor que a da matriz, sendo o compósito com concentração de HAP 63% o que apresentou menor resistência e menor módulo, quando comparado a matriz polimérica. Isso pode ser justificado (da mesma forma que para o PHB) pela grande quantidade de partícula da HAP em relação à quitosana, impossibilitando esta de exercer seu papel de matriz, funcionando apenas como um adesivo entre as fases, o que pode ter gerado uma interface menos resistentes, originando um compósito frágil nessa proporção.

Na Tabela 18 são relacionados os dados mecânicos que caracterizam os materiais compósitos, tais como resistência máxima, taxa de deformação e módulo elástico da quitosana, dos compósitos Q/HAP (37, 50 e 79% em massa de Q). Estes resultados podem ser comparados com os obtidos para o osso desproteínizado relacionados na Tabela 15. Pode-se verificar que o módulo elástico foi menor que o da matriz para os compósitos com 50 e 63% de HAP, entretanto o compósito com 21% de HAP apresentou o maior módulo elástico e maior módulo de armazenamento como pode ser visto na Figura 21. Tal comportamento pode ser devido à melhor distribuição das partículas na menor proporção de HAP (Figura 26-b), gerando a melhor distribuição das tensões, o que possibilitou funcionar o efeito

reforço dessa carga, reduzindo os movimentos da fase matriz e refletindo fisicamente na maior dureza do material, quando comparado a quitosana. Também pelos dados mostrados pode ser verificado que o compósito apresentou redução da resistência à fratura em relação à quitosana.

O osso apresentou uma taxa de deformação bastante elevada comparada aos outros compósitos e matriz polimérica, esse comportamento não caracteriza um material frágil. Esse fato poderia ser justificado pela natureza extremamente porosa do osso esponjoso (estrutura interna) que no momento de teste permitiu que o apoio da máquina que exerce compressão penetrasse no interior do bloco ósseo, antes que este sofresse fratura.

Tabela 18 – Resultados obtidos a partir do teste mecânico de flexão

| Corpo de prova (% em massa) | σ máxima (MPa) | Deformação máxima (%) | Módulo Elástico (GPa) |
|--|---|----------------------------------|----------------------------------|
| Q | 9,26 | 3,9 | 0,8 |
| Q/HAP (79/21) | 7,48 | 1,3 | 0,86 |
| Q/HAP (50/50) | 6,90 | 1,2 | 0,71 |
| Q/HAP (37/63) | 2,69 | 0,9 | 0,41 |

Talvez se for utilizado o método de preparo dos corpos de prova por extrusão possa proporcionar uma melhor interação entre as fases sólidas, melhorando as propriedades mecânicas desses compósitos. Neste processo o material é previamente fundido e sob a forma de um fluido viscoso é forçado dentro do molde através de um orifício, sendo esse segmento extrudado, solidificado posteriormente adquirindo a forma do molde (Callister, 2000).

Tonhi e Plepis (2002) estudaram o comportamento mecânico de colágeno, quitosana e blendas, através das curvas representativas de tensão-deformação obtidas de ensaios de tração mecânica. Observaram que as curvas exibem comportamentos semelhantes e podem ser classificadas em três regiões distintas: 1) a região inicial é linear e corresponde a fase elástica; 2) a região curva, consecutiva à linear, corresponde à deformação plástica uniforme, sendo que o material não sofre estrangulamento e 3) região plástica não uniforme, marcada pelo estrangulamento da amostra. Nesta região a deformação também varia linearmente com a tensão. Essas observações foram compatíveis com as deste trabalho.

Réplica dos corpos de prova preparados pelo método de moldagem por compressão utilizando um processo similar ao utilizado para confecção do compósito PHB/HAP, foram caracterizados por Análise Dinâmico-Mecânica (DMA).

Na Figura 21 pode ser vista a curva do módulo de armazenamento da quitosana e dos compósitos nas proporções variadas, no intervalo de temperatura de -150 a 200°C .

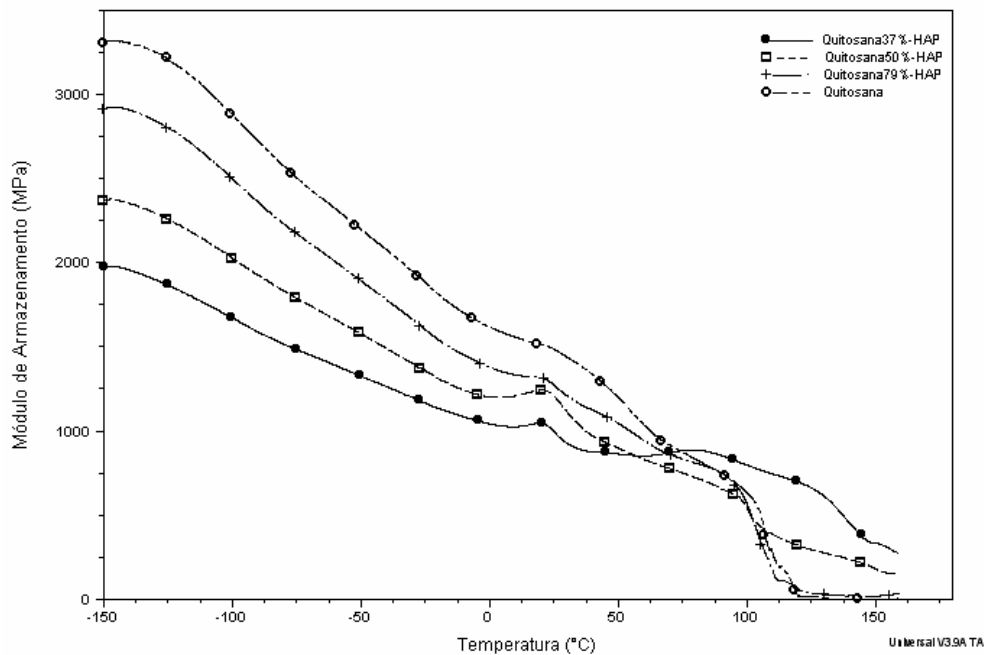


Figura 21 – Gráfico da variação do módulo de armazenamento com a temperatura, da quitosana e compósitos Q/X%HAP.

O módulo de armazenamento reduziu com o aumento da temperatura, para todos os compósitos avaliados, sendo mais acentuado para o que contém a maior proporção de HAP. A inclinação da curva do E' vai sofrendo uma redução na inclinação tendendo a ficar mais reta, à proporção que aumenta a porcentagem de HAP, devido ao efeito reforço que a HAP exerce na matriz. Na temperatura entre 0 e 40°C o incremento da HAP no compósito parece induzir a cristalização da fase polimérica originando as curvas desalinhas, que para as maiores proporções de HAP são mais acentuadas.

Nas temperaturas bem inferiores, entre -125 a -75°C são observadas mudanças na curva do E'' relacionadas com as β relaxações, como pode ser observada na Figura 22, nesta faixa de temperatura a HAP influencia o comportamento dinâmico-mecânico da quitosana, aumentando o calor dissipado. A seguir, numa faixa entre -40 e 0°C observa-se uma queda no módulo de peda que

provavelmente esta associado à interação da matriz quitosana com a fase dispersa de HAP, sendo mais acentuado para as maiores proporções de HAP. Essa modificação pode ser explicada pelo fato do atrito gerado na interface das fases aumentar a liberação do calor. Na temperatura de 50 a 110°C está evidenciada a área sob o pico que representa a α relaxação onde é determinada T_g . Nesse pode ser observado que a HAP acrescentada aos compósitos proporcionou redução da curva do E'' , que é reconhecido ser devido a reorganização estrutural do empacotamento das moléculas de quitosana.

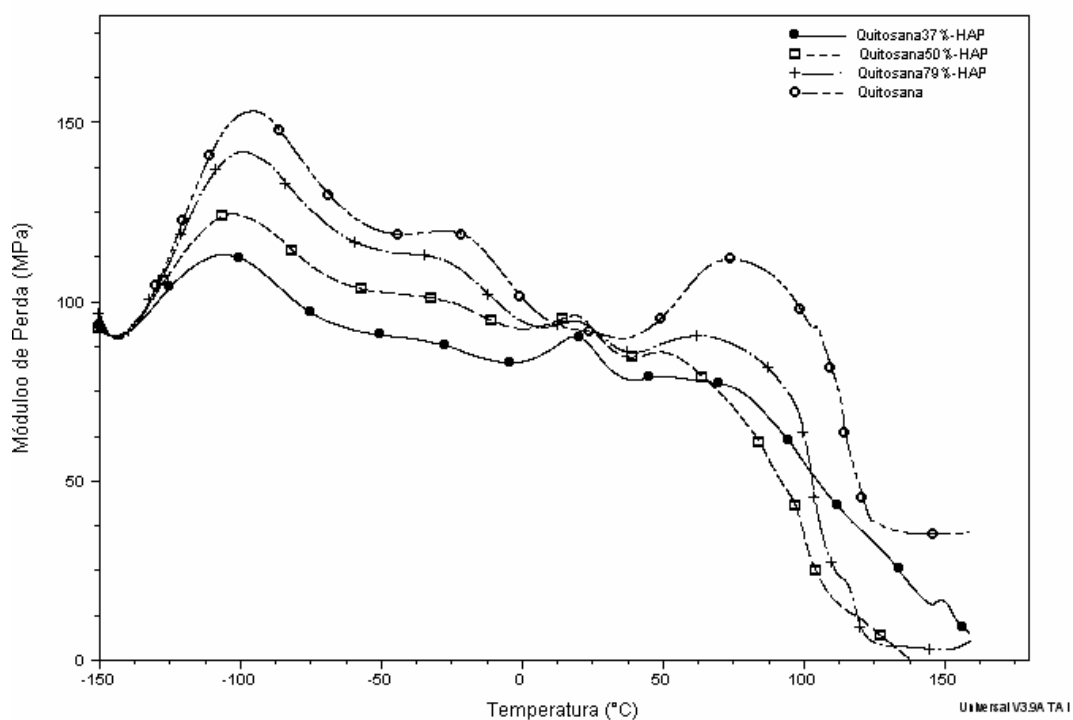


Figura 22 – Gráfico da variação do módulo de perda com a temperatura, da quitosana e compósitos Q/X%HAP.

A quitosana teve o comportamento semelhante ao relatado por Mucha e Pawlak (2005) em análises térmicas de quitosana por DMA. Os autores relataram que a quitosana 78% desacetilada tem a temperatura ($T_{g1} = -21^{\circ}\text{C}$) reduzida com o aumento da desacetilação, o que significa um número aumentado de substituição do grupo amido presente na cadeia de quitina por um grupo amino menor e com mais mobilidade. São reconhecidas como β relaxações, associadas com o movimento dos grupos laterais da quitosana. Aquecimento em torno de 200°C tem causado degradação.

A curva da $\tan\delta$ para a quitosana e os compósitos nas diversas proporções está representada na Figura 23. Pela análise da $\tan\delta$, foi observada a presença do pico, em 137° , que está relacionado à α -relaxação para a T_g da quitosana. Pode ser observada a mudança da intensidade do pico da temperatura de T_g nos compósitos sendo mais acentuado para as maiores proporções de HAP, o que mostra uma marcada redução dos movimentos dos segmentos de cadeia da quitosana em função da presença das partículas de HAP.

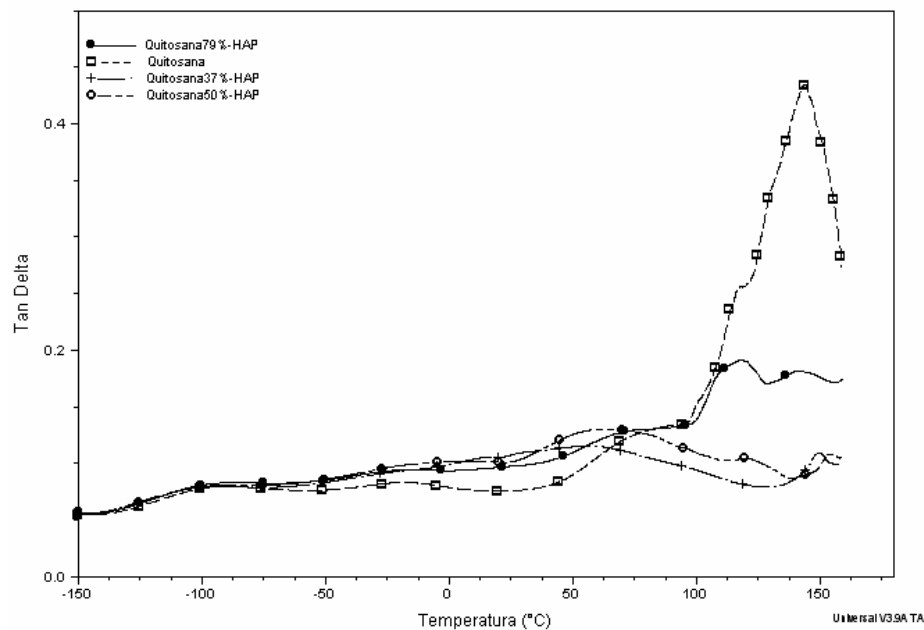


Figura 23 – Gráfico da variação da tangente de delta com a temperatura, da quitosana e compósitos Q/X%HAP.

Segundo Mucha e Pawlak (2005) em temperaturas altas a mobilidade da cadeia de quitosana aumenta também por causa da fraca interação intermolecular devido à dissociação das ligações de hidrogênio.

4.2.4 – GRAU DE CRISTALINIDADE DOS BIOMATERIAIS COMPÓSITOS

4.2.4.1 – CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC)

Para avaliar a influência da hidroxiapatita sobre a cristalinidade da quitosana, como analisado no biocompósito PHB/HAP, foram realizadas as análises por calorimetria diferencial exploratória do compósito Q/HAP (50/50 %m/m) e da quitosana.

Foi observado através da Figura 24 que o calor de fusão (ΔH_f) para o compósito Q/HAP (50/50) foi de 238,2 J/g, no qual apenas 50% da fase correspondem a quitosana, sendo assim o calor de fusão equivalente a 1g de quitosana seria 476,4 J/g. Comparado ao valor encontrado experimentalmente (Figura 24) para a quitosana, que foi de 491 J/g (ΔH_f), observou-se que esse valor foi superior ao da quitosana no compósito. Portanto, esse resultado indica uma redução da cristalinidade na fase polimérica, provavelmente induzido no compósito pela fase HAP.

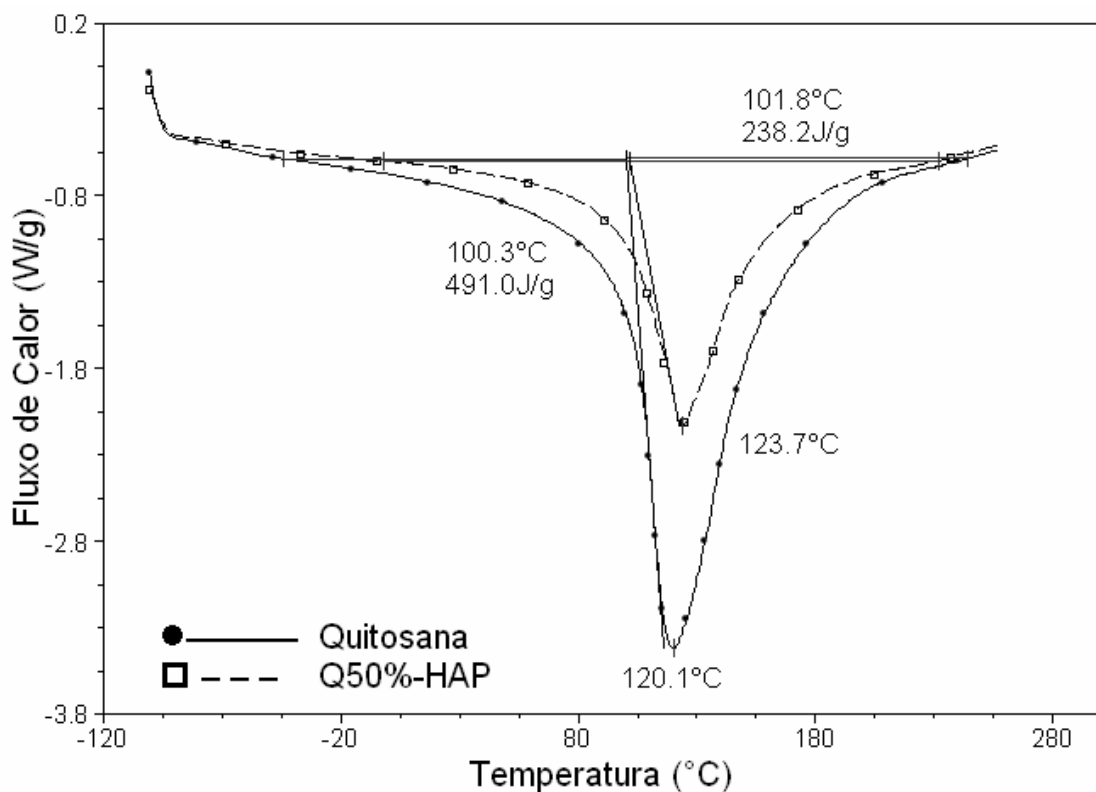


Figura 24 – Gráfico de calorimetria diferencial exploratória em função da temperatura, da quitosana e do compósito Q/HAP (50/50 %m/m).

4.2.4.2- DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)

A determinação da porcentagem de cristalinidade por DRX foi feita através dos difratogramas mostrados na Figura 25 e são relacionados na Tabela 19. Pode-se observar a presença de menor porcentagem de cristalinidade da fase polimérica presente no compósito Q/HAP (50/50 %m/m).

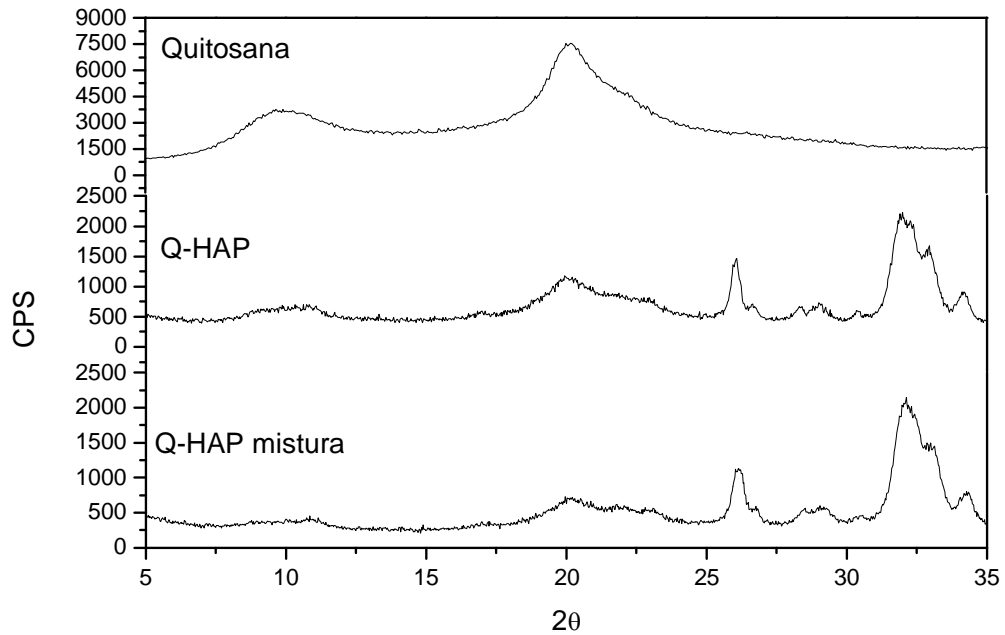


Figura 25 – Gráfico de difração de Raios-X, da Q, do compósito Q/HAP (50/50 %m/m) e da mistura Q/HAP (50/50 %m/m).

Tabela 19 – Dados referentes à porcentagem de cristalinidade determinada através da análise das amostras por difração de Raios-X.

| Amostras | Porcentagem de cristalinidade (%) |
|---------------------------|--|
| Q | 36,6 |
| Q/HAP (50/50) – compósito | 23,7 |
| Q/HAP (50/50) – mistura | 26,7 |

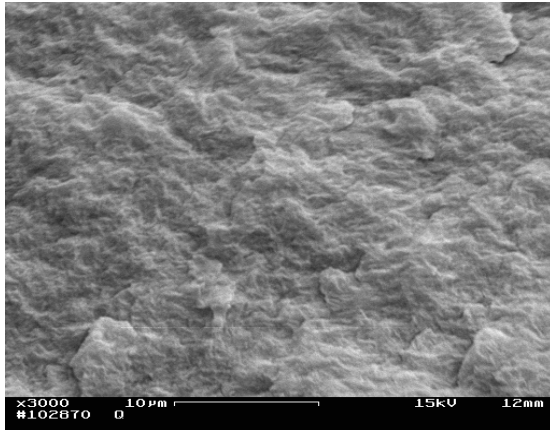
Considerando possíveis efeitos da distribuição da fase quitosana no compósito, que possam vir a influenciar na determinação da porcentagem de cristalinidade, foi incluída uma análise comparativa utilizando-se uma mistura grosseira de Q e HAP nas mesmas proporções existentes desses componentes no compósito, de forma similar a realizada com o compósito PHB/HAP.

Observou-se que existiu uma redução de cristalinidade no compósito, resultado que em conjunto com o encontrado na análise por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) evidenciou a existência de uma interação entre as fases presente nos compósitos.

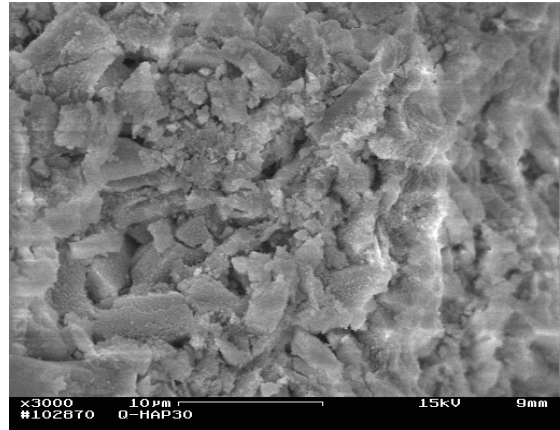
4.2.6 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS BIOMATERIAIS COMPÓSITOS Q/HAP

As micrografias das superfícies dos corpos de prova fraturados no teste mecânico que estão expostas na Figura 26 mostram a microestrutura da matriz polimérica, comparada à microestrutura e distribuição de fases dos compósitos nas variadas proporções.

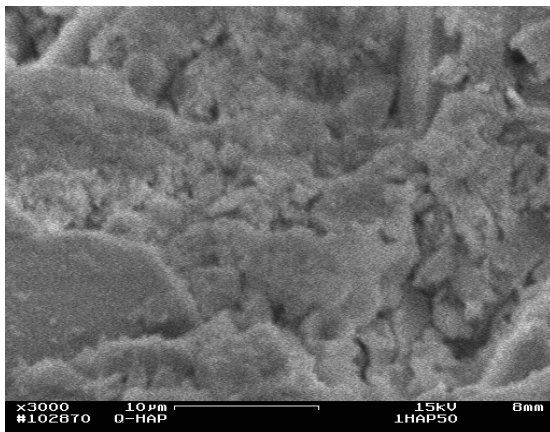
(a)



(b)



(c)



(d)

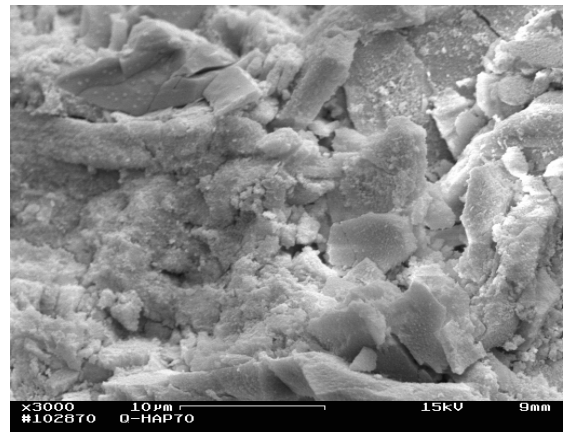


Figura 26 – Micrografia eletrônica da região da fratura dos corpos de prova de (a) Q, (b) Q/HAP (79/21), (c) Q/HAP (50/50), (d) Q/HAP (37/63); (3000X).

A matriz polimérica apresenta uma superfície de fratura mais homogênea, que é claramente modificada com a introdução da HAP. A alteração da superfície de fratura foi observada com o aumento da proporção de HAP. O compósito cuja quantidade da matriz foi maior, 79% de Q, mostrou uma superfície mais homogênea com uma distribuição de partículas de forma mais regular, não tendo destaque da HAP, esse fato explica o módulo elástico maior que foi apresentado por esse

compósito no teste mecânico (Tabela 18). O compósito com 63% de HAP teve uma superfície mais irregular, com pontos de HAP evidenciados e distribuídos irregularmente, comprometendo as propriedades mecânicas. Como já mencionado do ponto de vista biológico a exposição de HAP é importante. As características da matriz foram observadas em todos os formulados, mostrando que houve integração.

4.3 – RESPOSTA CELULAR AOS BIOMATERIAIS COMPÓSITOS PHB/HAP E Q/HAP – TESTES BIOLÓGICOS

4.3.1- TESTES DE CITOTOXICIDADE

Todo material que tem por finalidade ser utilizado em ser vivo deve como regra de segurança, não ser tóxico e ser biocompatível. Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade de novos biomateriais e a atividade celular na presença destes biomateriais (PHB sem mistura e seus compósitos com HAP nas proporções variadas) em comparação com osso desproteínizado (um produto natural comercializado que não é tóxico) foi realizado um experimento biológico *in vitro* (teste de contato direto), cujo resultado do teste representativo está na Figura 27.

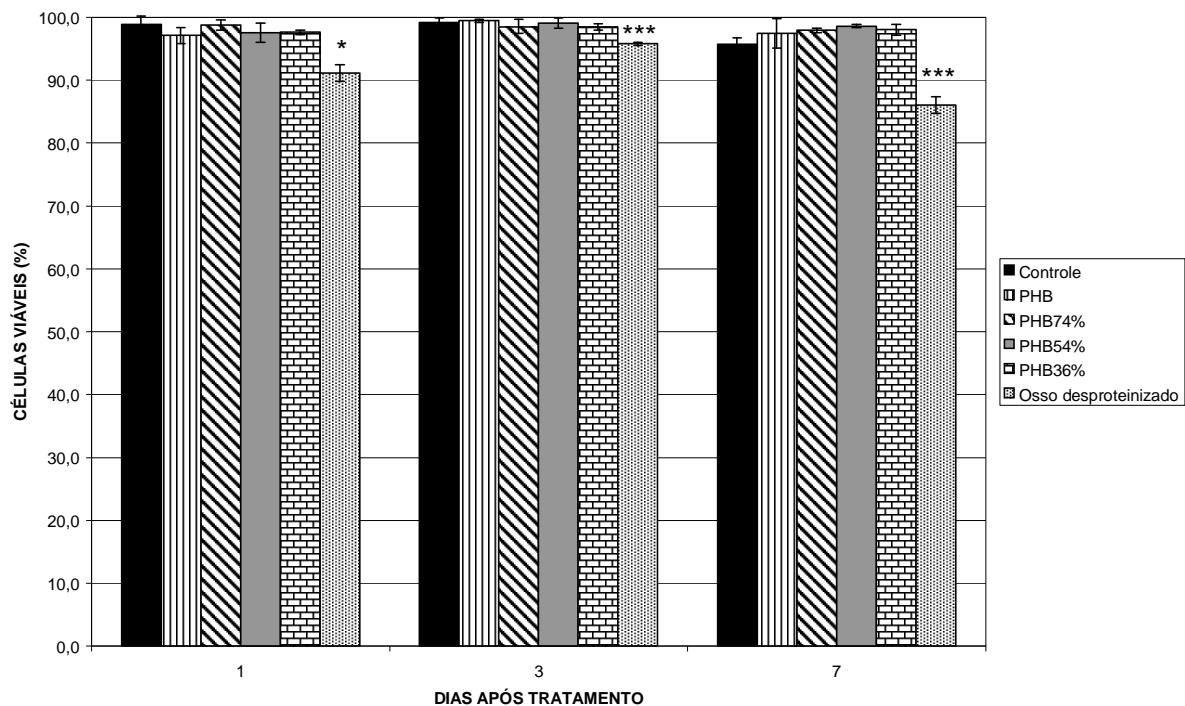


Figura 27 – Estudo da viabilidade celular (fibroblastos L929) em contato direto com PHB, compósitos PHB/X%HAP e osso desproteínizado. Representativo de 3 experimentos independentes sendo * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

O primeiro teste foi feito utilizando os fibroblastos murinos da linhagem celular L929 que foram cultivados na presença dos materiais no período de 7 dias, e a viabilidade das células e tipo da morte celular foram avaliados após 1, 3 e 7 dias do cultivo. Os fibroblastos foram plaqueados um dia antes do teste e formaram uma monocamada das células alongadas, bem aderidos no fundo dos poços de placa, apresentando a morfologia típica dos fibroblastos. Os resultados demonstram que o cultivo das células na presença dos novos biomateriais não alterou significativamente a viabilidade celular. Não se observou mudança significativa no comportamento celular quanto à morfologia nem quanto à multiplicação e expansão celular quando em contato direto com as diferentes proporções dos compósitos utilizados e o polímero sem mistura.

Ensaio desenvolvido como os dos testes para o PHB citados anteriormente foram realizados. Obteve-se resultado semelhante para a quitosana e seus compósitos em comparação com o osso desproteínizado, mostrando a biocompatibilidade também destes materiais testados conforme mostrado no teste representativo na Figura 28.

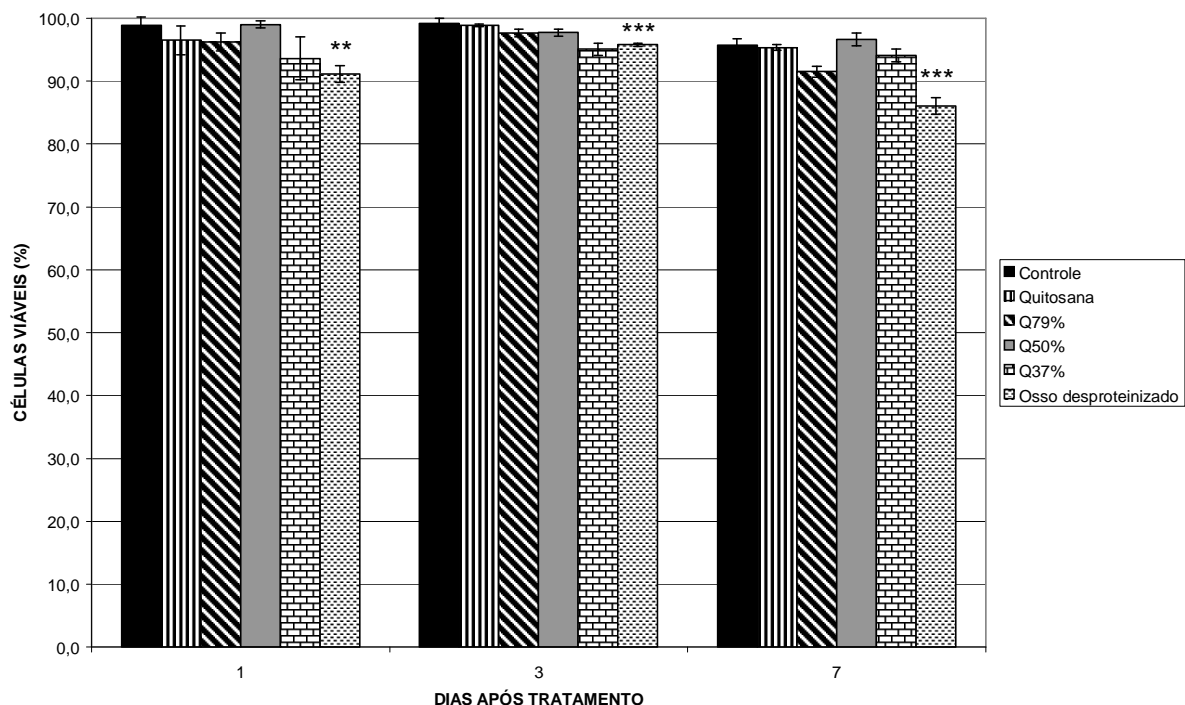


Figura 28 – Estudo da viabilidade celular (fibroblastos L929) em contato direto com Q, compósitos Q/X%HAP e osso desproteínizado. Representativo de 3 experimentos independentes sendo ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Inesperadamente, foi observada uma pequena, mas significativa, redução da viabilidade de células após sete dias em contato direto com o osso desproteínizado, um material natural que foi utilizado como produto não tóxico (controle negativo). O osso comercializado utilizado no nosso estudo apresentou um aspecto não estável quando foi embutido na cultura celular: após um inchamento inicial devido contato com o meio líquido, o bloco do osso começou fragmentar-se posteriormente. Não sabemos se foi alguma alteração no produto que poderia aumentar a toxicidade deste para as células.

A análise do tipo da morte celular após uma coloração das células pelos fluorocromos para revelar as marcas morfológicas típicas para células em apoptose e necrose (como está descrito nos Materiais e Métodos) demonstrou que a redução da viabilidade observada foi associada com a morte das células principalmente por necrose (Figura 29). O número das células necróticas aumentou até 11% nas culturas cultivadas na presença do osso por 7 dias, demonstrando uma certa toxicidade do produto apesar de não ser alta. Nenhum outro biomaterial testado foi citotóxico. O número das células necróticas (Figura 29) e apoptóticas (Figura 30) não foi maior do que 6% em todas as culturas incluindo o do controle (células cultivadas sem biomateriais).

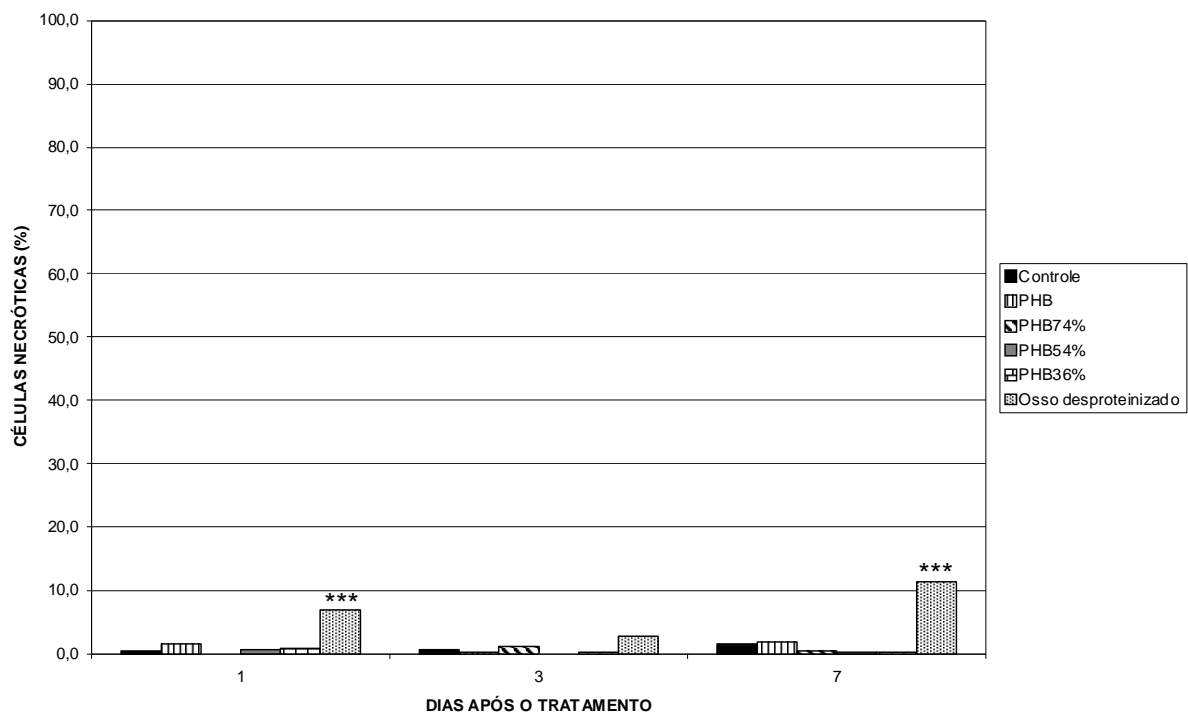


Figura 29 – Número das células necróticas (%) nas culturas dos fibroblastos L929 cultivadas na presença de PHB, compósitos PHB/X%HAP e osso desproteínizado. Representativo de 3 experimentos independentes sendo *** $p < 0,001$.

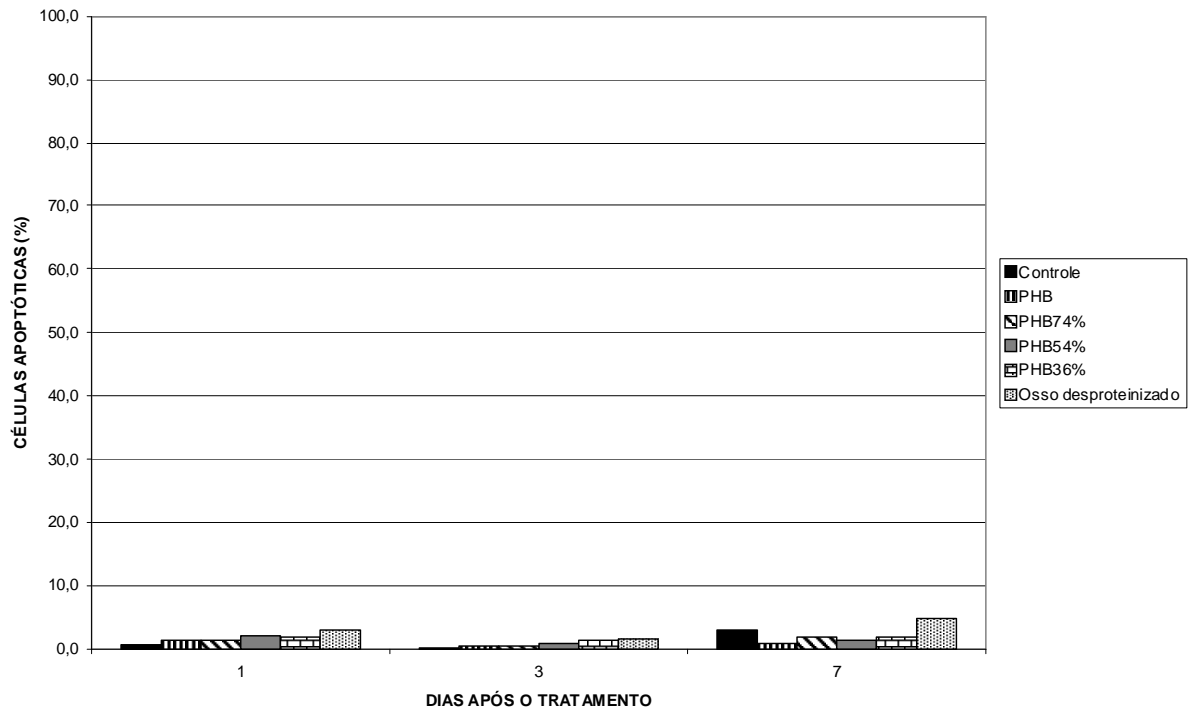


Figura 30 – Número das células apoptóticas (%) nas culturas dos fibroblastos L929 cultivadas na presença de PHB, compósitos PHB/X%HAP e osso desproteínizado. Representativo de 3 experimentos independentes.

Os resultados obtidos para a quitosana e compósitos na análise do tipo de morte celular, mostrou que o número de células necróticas e apoptóticas foi inferior a 6% em todas as culturas incluindo o do controle apresentados nas Figuras 31 e 32.

Dentre os ensaios para registrar a morte celular tem o ensaio de apoptose, morte celular programada, que pode ocorrer no final da vida de uma célula como um processo natural biológico ou como resposta a injúria celular sub-letal devido a uma substância tóxica. A apoptose é diferente de necrose tanto na mudança bioquímica como na morfológica e refere-se a um processo de suicídio celular ativo e organizado, regulado geneticamente, que termina pela fragmentação celular aos corpos apoptóticos sem alteração da integridade de membrana plasmática. Quando a morte ocorre por necrose (outro tipo da morte celular), isto geralmente significa que o material testado foi bastante agressivo, gerando imediatamente ao contato a injúria celular que leva a permeabilidade citoplasmática, desorganização celular e perda da sua integridade. A morte por apoptose é “silenciosa” e não provoca inflamação no organismo, pois corpos apoptóticos são fagocitados pelas células vizinhas rapidamente. A morte necrótica leva ao extravasamento do conteúdo celular e pode provocar a inflamação. Diferenciação do tipo da morte celular nos testes da citotoxicidade é importante, pois pode demonstrar o nível de agressividade do material

quando é tóxico para objetos biológicos. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que nenhum dos novos materiais são citotóxicos quando aplicado para uma cultura das células da linhagem celular dos fibroblastos L929.

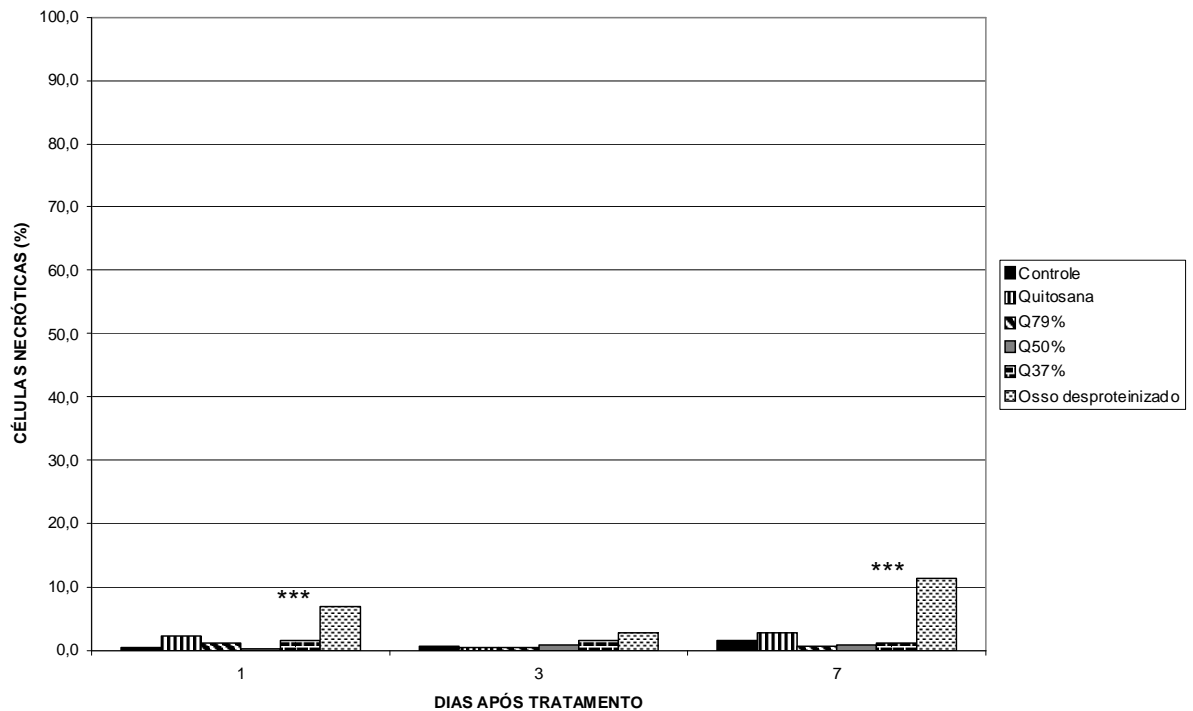


Figura 31 – Número das células necróticas (%) nas culturas dos fibroblastos L929 cultivadas na presença de Q, compósitos Q/X%HAP e osso desproteínizado. Representativo de 3 experimentos independentes sendo *** $p < 0,001$.

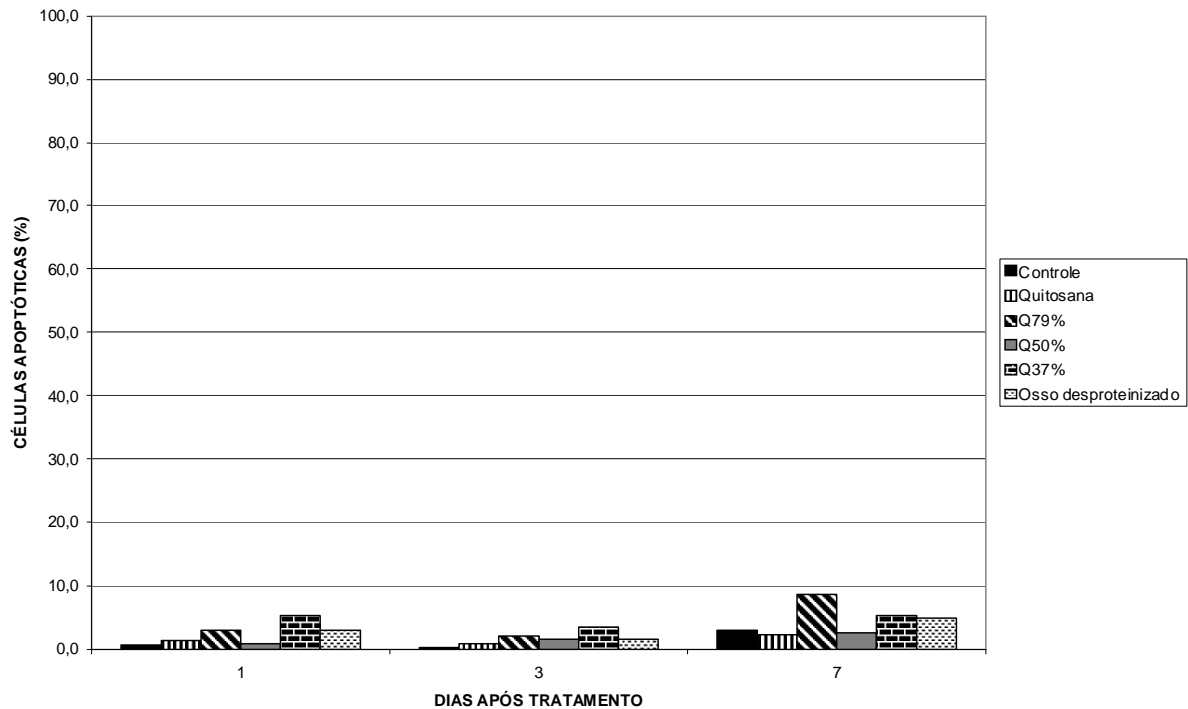


Figura 32 – Número das células apoptóticas (%) nas culturas dos fibroblastos L929 cultivadas na presença de Q, compósitos Q/X%HAP e osso desproteínizado. Representativo de 3 experimentos independentes.

Apesar de linhagens celulares permanentes serem largamente utilizados para testes de citotoxicidade, a natureza cancerígena destas, que leva a desorganização dos mecanismos de controle da proliferação e morte celular (apoptose), pode aumentar a sua resistência aos fatores pró-apoptóticos e aos produtos citotóxicos. Por esta razão, os testes de citotoxicidade que utilizam as linhagens celulares devem ser acrescentados pelos testes baseados no uso das células primárias, de preferência das células da mesma natureza que podem ficar em contato com o material em teste *in vivo*.

Devido ao fato de nossos materiais estarem indicados para preenchimento ósseo, precisamos testar a sua compatibilidade com as células do osso, como, por exemplo, os osteoblastos, as células principais do matriz óssea.

Os osteoblastos murinos foram obtidos através de diferenciação das células de medula óssea (que contém as células tronco mesenquimais entre outras) aos osteoblastos na presença dos fatores de diferenciação correspondentes de acordo com o protocolo estabelecido (Ge et al., 2004). A monocamada das células obtidas após diferenciação durante 14 dias apresentou a morfologia típica para este tipo celular: morfologia poligonal, alongada, com várias filopodias - extensões citoplasmáticas (Figura 33). As células diferenciadas foram cultivadas na presença de biomaterias da mesma maneira como células L929.

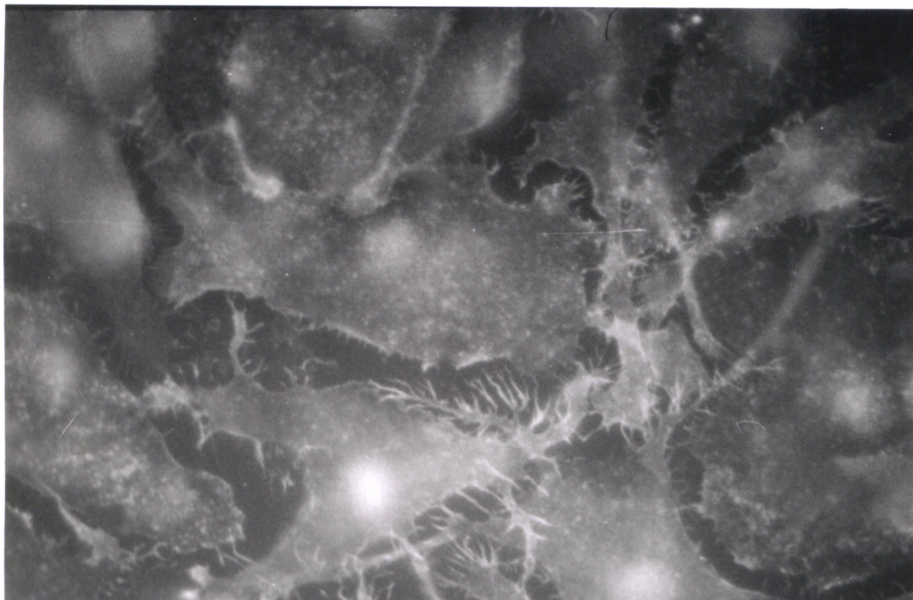


Figura 33 – Micrografia de fluorescência de osteoblastos diferenciados da medula óssea de camundongos C57Bl/6 (200X).

Na Figura 34 está representada a viabilidade de osteoblastos na presença do PHB, PHB/HAP (74/26) e controle. Pode ser observado que a resposta celular aos compósitos foi semelhante à encontrada com as células de linhagem permanente (fibroblastos L929), sendo assim confirmada a biocompatibilidade dos compósitos avaliados. Os osteoblastos de controle (cultivados sem biomateriais) apresentaram uma pequena queda na sua viabilidade provavelmente porque para os experimentos as células foram cultivadas no meio de cultivo sem fatores de diferenciação. Entretanto, a presença de nenhum composto alterou a viabilidade celular em comparação com as células controle.

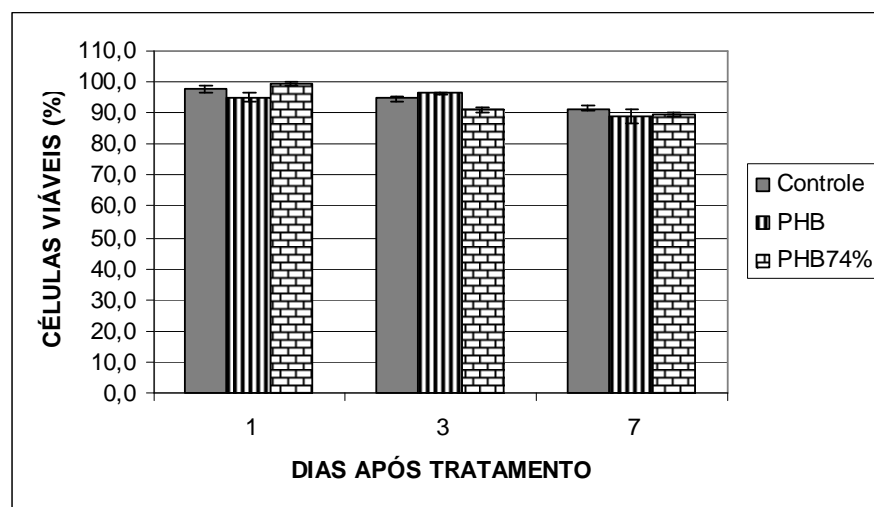


Figura 34 – Estudo da viabilidade celular (osteoblastos - células primárias) em contato direto com o PHB e o compósito PHB/HAP (74/26 %m/m).

A quitosana e compósitos foram também testados quanto à compatibilidade com as células primárias (osteoblastos) e na Figura 35 está representada a viabilidade destas células na presença da Q/HAP (79/21) e controle. Os resultados mostraram que os osteoblastos tiveram resposta aos compósitos semelhante à encontrada para as células de linhagem permanente (fibroblastos L929) confirmando que este material não é tóxico.

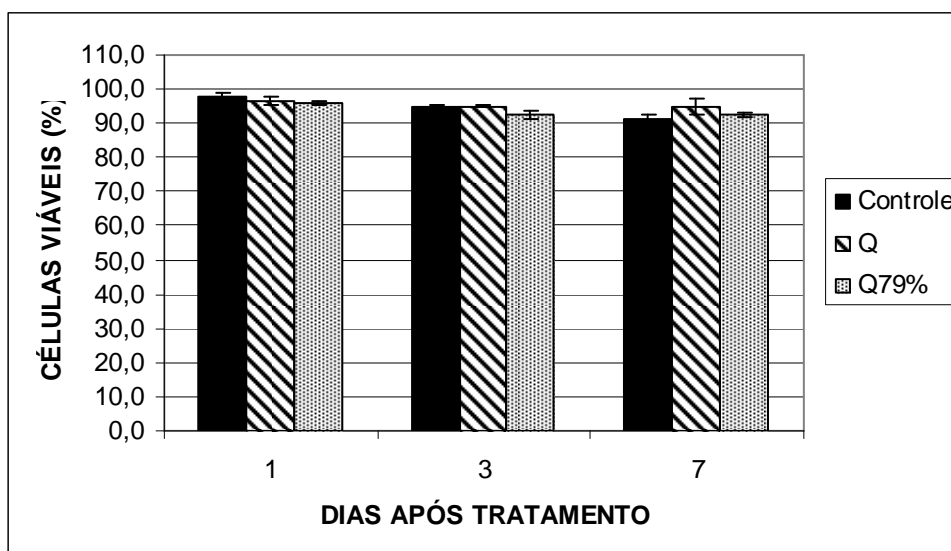


Figura 35 – Estudo da viabilidade celular (osteoblastos - células primárias) em contato direto com a Q e o compósito Q/HAP (79/21 %m/m).

Foi considerado por Chueng (1989) que um material testado pode apresentar um baixo nível de toxicidade, o qual pode não ser suficiente para matar células ou aumentar desprendimento de enzimas, mas pode inibir funções normais das células (por exemplo, as suas propriedades de proliferação e diferenciação). Para testar estas propriedades das células – precursoras dos osteoblastos *in vitro*, foi realizado um experimento de diferenciação de medula óssea aos osteoblastos na presença dos biomateriais. Os compósitos foram introduzidos na cultura celular no 3º dia de diferenciação de medula óssea durante a troca do meio de cultura para uma nova alíquota do meio fresco contendo todos os fatores de diferenciação necessários (Materiais e Métodos). Foi avaliada a capacidade das células de medula óssea de formar a monocamada (controle de proliferação / expansão celular) e apresentar marcas típicas morfológicas dos osteoblastos (controle de diferenciação celular) durante 7 dias de cultivo. Os resultados demonstram que nenhum dos compósitos testados alterou estas propriedades celulares. As monocamadas dos osteoblastos formadas na presença ou ausência dos compósitos não tinham diferença, e a viabilidade das células foi mantida após passagem da cultura às outras garrafas (o procedimento inclui a coleta das células após tratamento pela solução tripsina-EDTA).

Os ensaios realizados utilizando corantes como a solução de fluorocromos laranja de acridina/brometo de etídio seguido de contagem celular com o microscópio de fluorescência invertido são métodos de ensaio qualitativo e

quantitativo que fornece a resposta biológica das células a um corpo estranho. Yang et al., 2006 em um estudo utilizando um material compósito com uma fase bioativa (Bioglass 45S5) incorporada em uma matriz polimérica (poly (DL-ácido lático)) semelhante a matriz polimérica utilizada no presente trabalho, observou por microscopia de fluorescência que células da medula óssea humana fixaram-se e expandiram-se em estruturas desse material compósito utilizadas como arcabouço com evidência de rápida expansão das células. Esta observação está de acordo com a verificada no presente estudo.

4.3.2 – AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES PRÓ-INFLAMATÓRIAS DOS COMPÓSITOS

Visando aprofundar avaliação de biocompatibilidade dos biomateriais, nesse trabalho utilizamos mais um ensaio para avaliar a influência dos compósitos testados na resposta inflamatória dos macrófagos, que são as células da resposta imune inata capazes de produzir o TNF- α , uma citocina pró-inflamatória. Este teste é importante, visando à intenção de uso dos compósitos testados para preenchimento ósseo. Caso a ativação dos macrófagos aconteça por algum material estranho para o organismo pode ser induzida a produção das citocinas por estas células, tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) que estão relacionados com reabsorção óssea, formação de granuloma e outras atividades biológicas relacionadas com inflamação (Hanks et al., 1996).

Para testar a resposta dos macrófagos aos nossos biomateriais, os blocos dos compósitos foram introduzidos e incubados nas culturas das células da linhagem celular dos macrófagos de murinos RAW 264.7.

Nas Figuras 36 e 37 estão representados os ensaios da resposta inflamatória dos macrófagos, com produção de TNF- α estimulado pelos materiais testados: PHB, PHB/HAP (74/26), Q, Q/HAP (79/21), osso desproteínizado. Para o controle positivo da resposta pró-inflamatória dos macrófagos, as células foram tratadas pelos interferon-gama, IFN- γ , e lipopolissacarídeo de Salmonella, LPS. As células (fibroblastos) não tratadas foram utilizadas para controle negativo. Após incubação de 24h, os sobrenadantes da cultura celular (meio de cultivo) foram coletados e congelados a -20°C até realização do teste para medir a concentração do TNF- α produzido e secretado pelos macrófagos. Para quantificar TNF- α através da sua

atividade biológica, utilizamos o bioensaio das células L929 que são muito sensíveis ao TNF- α na presença de actinomicina D, um inibidor de transcrição. Na presença do TNF- α as células L929 morrem por necrose. Os resultados demonstraram que após 24 h de incubação dos fibroblastos L929 com sobrenadantes da cultura dos macrófagos, a viabilidade destas células foi preservada o que significa ausência do TNF- α no meio de cultura das células incubadas na presença dos biomateriais. Paralelamente as células L929 foram cultivadas com TNF- α recombinante de murino em diferentes concentrações para estabelecer a curva padrão de TNF- α . Os resultados apresentados nas Figuras 36 e 37 demonstram que a concentração do TNF- α na maioria dos sobrenadantes testados foi inferior a 12 pg/ml (igual ao controle negativo), já os macrófagos tratados com o sobrenadante dos fibroblastos previamente expostos a LPS+IFN- γ (controle positivo) produziram cerca de 1100 pg/ml da citocina.

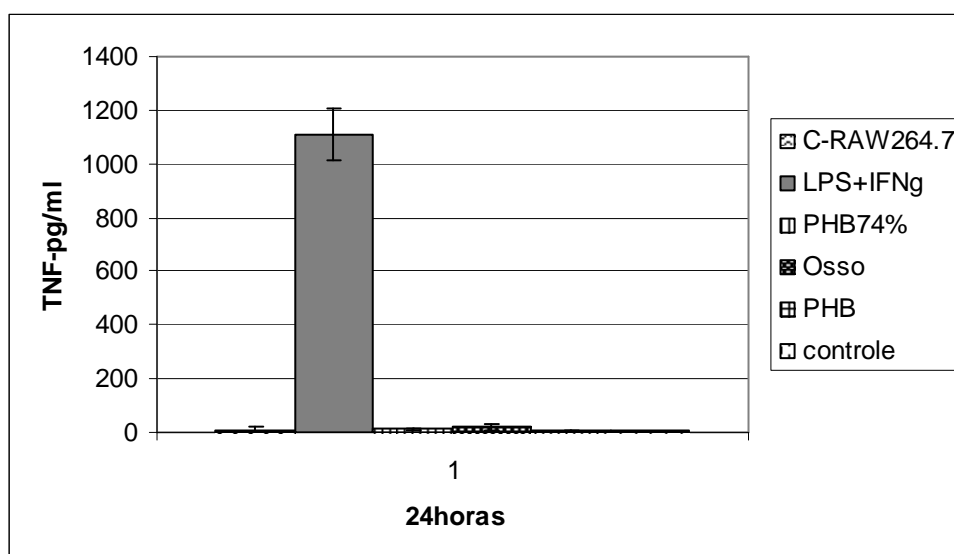


Figura 36 – Ensaio de citotoxicidade (fibroblastos L929) pela presença de TNF- α desprendidos por macrófagos estimulados por PHB, compósito PHB/HAP (74/26 %m/m) e osso desproteínizado.

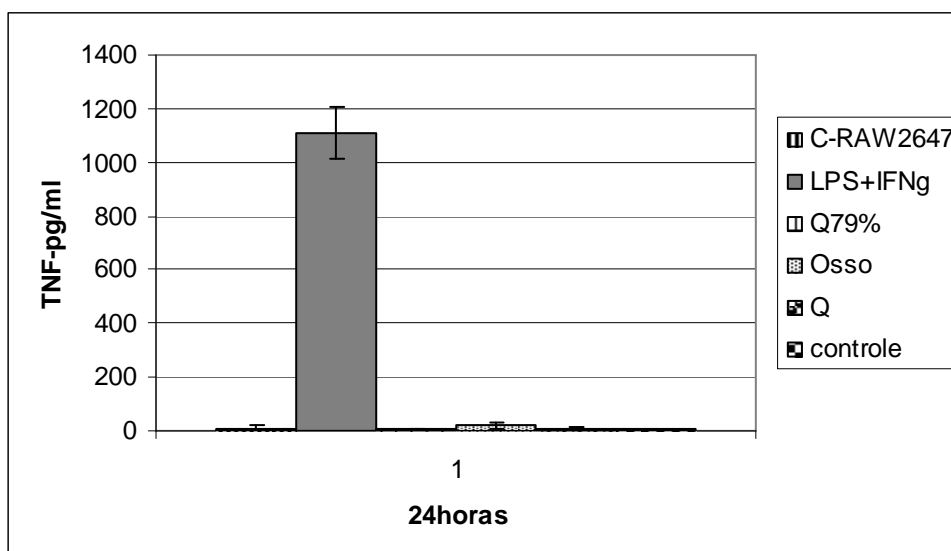


Figura 37 – Ensaio de citotoxicidade (fibroblastos L929) pela presença de TNF- α desprendidos por macrófagos estimulados por Q, compósito Q/HAP (79/21 %m/m) e osso desproteínizado.

4.3.3 – AVALIAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DAS CÉLULAS COM O PHB/HAP (74/26)

Visando avaliar não apenas a biocompatibilidade, mas também a capacidade de fixação e expansão das células na superfície do compósito foi realizado o crescimento celular na superfície do compósito PHB/HAP (74/26 %m/m) como descrito anteriormente e o material preparado para a análise no microscópio de varredura. Após 14 dias foi verificado que a superfície do compósito PHB/HAP (74/26) permitiu além da fixação a expansão de fibroblastos L929, sendo possível visualizar por fotomicrografia (Figura 38 a-b). Isto demonstra além da biocompatibilidade do compósito que o material permitiu que as células realizassem suas funções fisiológicas de aderência e expansão.

Associando a característica de possibilitar o desenvolvimento de células na superfície, o PHB/HAP torna-se um material interessante para ser utilizado como arcabouço em tecido ósseo engenheirado. Pois, segundo Ge et al. (2004) o material de escolha deve fornecer características como um sítio de ancoragem para células e possuir estabilidade mecânica, este trabalho mostrou que esses compósitos são possuidores dessas características.

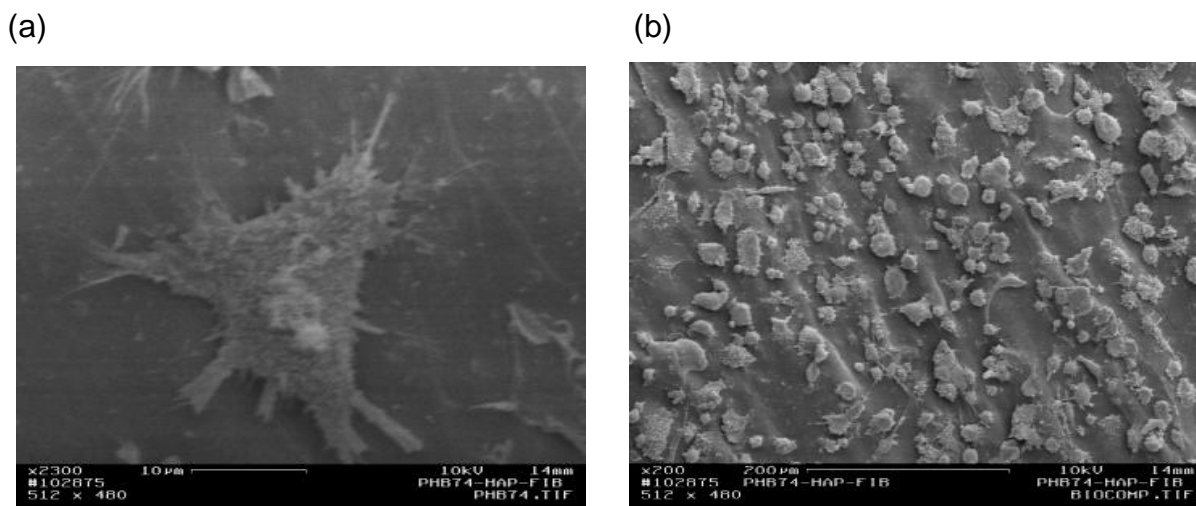


Figura 38 – Micrografia eletrônica de fibroblastos L929 (a) em expansão, 2300X, (b) formando monocamada, 200X; sobre o compósito PHB/HAP (74/26 %m/m).

A combinação dos testes realizados permitiu concluir que o PHB, a Quitosana e seus compósitos nas diversas proporções não apresentam citotoxicidade ou ação pró-inflamatória, mostrando na análise quantitativa uma porcentagem de células viáveis (fibroblastos L929 e osteoblastos primários) em até sete dias de experimento acima de 90% e nenhuma indução da síntese de TNF- α por macrófagos. A viabilidade celular na presença dos nossos materiais foi superior ao osso desproteinizado, material que já está sendo utilizado em determinadas indicações clínicas.

Os testes de citotoxicidade dos materiais são de simples execução e causam menos complicação que modelos animais. Alguns pesquisadores como Ge et al., 2004 relacionaram os testes de cultura como ponto de partida para estabelecer que os materiais não sejam citotóxicos. Em experimentos futuros pretendemos avaliar esses materiais em testes *in vivo* também.

A combinação dos testes escolhidos para este estudo permite avaliar diferentes aspectos de biocompatibilidade dos materiais artificiais: a citotoxicidade, o efeito dos compósitos na fisiologia celular (diferenciação e proliferação) e capacidade de estimular os macrófagos (efeito pró-inflamatório). Todos os testes são rápidos e de fácil execução, não exigem os reagentes caros ou equipamentos sofisticados e podem ser utilizados em qualquer laboratório que pratica cultivo celular.

4.4 – AVALIAÇÕES COMPARATIVAS

4.4.1 – ENTRE OS MATERIAIS FORMULADOS (PHB/HAP e Q/HAP) PARA FUTURO USO COMO SUBSTITUTOS ÓSSEOS

Os compósitos formulados com PHB exibiram propriedades mecânicas como: módulo de elasticidade em flexão, taxa de deformação e resistência máxima a fratura superiores em relação aos formulados com quitosana.

Ainda os formulados com PHB apresentaram propriedades referentes ao comportamento dinâmico-mecânico, como o módulo de armazenamento, valores superiores refletindo uma característica de maior dureza quando comparados aos formulados com a quitosana.

Quanto à microestrutura os formulados com PHB, em especial o que possui 74% de PHB, apresentou maior exposição de HAP e maior quantidade de porosidade nas regiões de fratura quando comparado aos da quitosana. Porém, o formulado de Q/HAP (37/63) também mostrou exposição de partículas de HAP na superfície da fratura. As características da superfície são importantes para fixação e crescimento celular. A exposição das partículas de HAP estimula as atividades dos osteoblastos e a presença de poros serve como abrigo para as células estimulando o processo de nova formação óssea.

Os formulados com PHB apesar de apresentarem resistência à fratura reduzida em relação à própria matriz superaram essa propriedade mecânica se comparada a HAP, mesmo quando utilizada na menor proporção, 30%. Também superou a resistência à fratura se comparada a do osso natural.

Os formulados com quitosana também melhoraram a resistência à fratura comparada à HAP apenas, em relação à quitosana sem mistura essa propriedade foi reduzida e não alcançaram a taxa de resistência do osso natural.

4.4.2 – ENTRE OS MATERIAIS FORMULADOS (PHB/HAP e Q/HAP) E MATERIAIS INDUSTRIALIZADOS UTILIZADOS COMO SUBSTITUTOS ÓSSEOS

Todos os dois compósitos apresentaram maior resistência à fratura e maior módulo elástico em flexão quando comparados ao osso desproteínizado industrializado analisado nesse trabalho.

A taxa de deformação apresentada pelo osso desproteinizado foi bastante superior aos dois compósitos formulados.

Quando os materiais formulados nesse trabalho são comparados a outros comerciais como triosite (60% HA, 40% α -TCP), biosorb (β -TCP), bioglass (24,5% Na₂O, 24,5% CaO, 45% SiO₂, 6% P₂O₅) pode ser visto que a resistência máxima à fratura é superior aos já comercializados. Além disso, os materiais formulados apresentam biocompatibilidade, comparável aos já comercializados.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

- Para os bicompostos de PHB/HAP foi possível concluir que o que possui maior fração de matriz, PHB/HAP (74/26), apresenta maior porcentagem de deformação, permitindo seu uso em situações onde a exigência de maior flexibilidade seja requerida.
- Ainda para os biocompostos PHB/HAP, o que possui maior porcentagem de carga (HAP), com o módulo elástico 5,8 GPa, atenderá melhor a exigência de maior resistência, quando utilizados como preenchimento ósseo.
- A incorporação das partículas de HAP nos biocompostos com PHB mostrou como resultado propriedades mecânicas melhores comparadas à matriz, verificado para a composição PHB/HAP (54/46 %m/m) pelo aumento do módulo de armazenamento para 5430 MPa à 25°C e do módulo elástico para 4,5 GPa.
- Os biocompostos com a matriz polimérica de PHB e partículas de HAP apresentaram temperatura de máxima taxa de degradação térmica superior quando comparada à matriz sem carga, confirmando a interação das fases.
- A distribuição das partículas de HAP nos compostos com matriz de PHB, verificada por microscopia eletrônica de varredura, na região de fratura, indicou que a maior homogeneidade foi alcançada para o biocomposto PHB/HAP (54/46 %m/m).
- Através do ensaio de DMA, o biocomposto PHB/HAP (54/46) apresentou módulo de armazenamento de 5430 MPa à 25°C, maior que o observado para o PHB puro. Este resultado mostrou que as partículas bem distribuídas exerceram um efeito reforço na matriz possibilitando assim a obtenção de um material mais rígido.
- Nos biocompostos formulados, PHB/HAP e Q/HAP, nas distintas composições, pode ser observado que a adição de HAP reduziu a porcentagem de deformação e a resistência máxima à fratura em relação à matriz, sendo ainda assim comparáveis e mesmo superiores a alguns biomateriais disponíveis comercialmente, como Vitoss, Pro-Osteon, Triosite, dentre outros.
- A adição da HAP aos biocompostos com matriz polimérica quitosana e ou poli(3-hidroxi-butirato), reduziu levemente a temperatura de degradação da

quitosana e do poli(3-hidroxi-butirato) o que pode ser um indício de boa interação entre as fases.

- Os biocompósitos formulados, PHB/HAP e Q/HAP, nas distintas composições, não apresentaram citotoxicidade, mostraram uma alta viabilidade celular, não desenvolveram resposta inflamatória, permitindo inclusive – PHB/HAP (74/26 %m/m) – a fixação e expansão de células em sua superfície, sendo considerados biocompatíveis.
- Foi observada por microscopia ótica, com luz visível e fluorescência, uma boa integração das células com os biomateriais testados PHB/X%HAP e Q/X%HAP. Uma provável migração de células nos biocompósitos com quitosana pode ser observada, pois estes biocompósitos são transparentes sob a luz visível do microscópio.

SUGESTÕES E RECOMENDAÇÕES

- Introduzir de forma controlada e uniforme porosidade nos biocompósitos, devido à importância desse fator para a reconstituição do tecido ósseo.
- Avaliar a capacidade de migração e crescimento celular nos biocompósitos formulados através de testes in vivo, para complementar os resultados in vitro já obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American society for testing and materials. ASTM D790 - *Standard Test Methods for Flexural Properties of Unreinforced and Reinforced Plastics and Electrical Insulating Materials*. Philadelphia.

Bell, W.H. *Resorption characteristics of bone and bone substitutes*. O.S.,O.M & O.P.(Research projet D-161), 1964, vol.17 (5).

Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Gurny, R. *Struture and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004, (Review), vol. 57. p. 35-52.

Callister, W. D. *Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma Introdução*. 5. ed. Rio de Janeiro. LTC S. A., 2000. Cap.13, p. 265-290.

Carvalho, P.S.P., Bassi, A.P.F., Pereira, L.A.V.D. *Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais*. Implant News, 2004, vol.1 (3).

Cassu, S.N., Felisberti, M. I. *Comportamento dinâmico-mecânico e relaxações em polímeros e blendas poliméricas*. Química Nova, (Artigo de revisão), 2005, vol. 28 (4), p. 255-263.

Chen, D.Z., Tang, C.Y., Chan, K.C., Tsui, C.P., Yu, P.H.F., Leung, M.C.P., Uskokovic, P.S. *Dynamic mechanical properties and in vitro bioactivity of PHBHV/HA nanocomposite*. Composites Science and Technology, 2007, vol.67, p. 1617-1626.

Chen, L.J., Wang, M. *Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer*. Biomaterials, 2002, vol. 23, p. 2631-2639.

Chétail, M., Fournié, J. *Shell-boring mechanism of the Gastropod Purpura (Thais) lapillus: A physiological demonstration of the role of carbonic anhydrase in dissolution of CaCO₃*, Am Zoologist, 1969, vol. 9, p.983-990.

Chlopek, J., Rossol, P., Morawska-Chochol, A. *Durability of polymet-ceramics composite implants determined in creep tests. Composites Science and Technology.* 2006, vol. 66, p.1615-1622.

Chueng, H.S., Haak, M.H. *Growth of osteoblasts on porous calcium phosphate ceramic: na in vitro model for biocompatibility study.* *Biomaterials*, 1989, vol. 10 (1), p. 63-67.

De Groot, K. *Bioceramics consisting of calcium phosphate salts.* *Biomaterials*, 1980, vol. 1, p. 47-12.

Dinca, V.S., Soare, S., Barbalat, A., Dinu, D.Z., Moldovan, A., Stoica, I., Vassu, T., Purice, A., Scarisoareanu, N., Birjega, R., Craciun, V., De Stefano, V.F., Dinescu, M. *Nickel-titanium alloy: cytotoxicity evaluation on microorganism culture.* *Applied Surface Science* , 2006, vol. 252, p. 4619-4624.

Eggli, P.S., Mueller, W. and Schenk, R.K. *The role of pore size on bone ingrowth and implant substitution in hydroxy-apatite and tricalcium phosphate ceramics: a histologic and morphometric study in rabbits,*"in *Biomaterials and Clinical Applications*, A. Pizzoferrato, P.G. Marchetti, A. Ravagioli, and A.J. C. Lee (Eds.), Elsevier, New York, 1987, p. 53-56.

Evans, E. J. *Toxicity of hydroxyapatite in vitro: The effect of particle size.* *Biomaterials*, 1991, vol.12 (6), p. 574-576.

Fernandes, G.F. Laranjeira, M. C. M. *Calcium phosphate biomaterials from marine algae. Hydrothermal synthesis and characterisation.* *Química Nova*, 2000, vol. 23.

Firstov, G.S., Vitchev, R.G., Kumar, H., Blanplain, B., Van Humbeeck, J. *Surface oxidation of NiTi shape memory alloy.* *Biomaterials*, 2002, vol. 23, p. 4863-4871.

Gabrielli, M.A.C., Júnior, E.M., Góissis, G., Okamoto, T., Gabrielli, M.F.R., Vieira, E.H. *Hydroxylapatite implants with or without collagen in the zygomatic arch of rats. Histological study.* *Braz Dent J*, 2002, 12(1): 9-15 ISSN 0103-6440.

Galego, N.; Rozsa, C., Sánchez, R., Fung, J., Vázquez, A., Tomás, J. S. *Characterization and application of poly(β -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials*. Polymer testing, 2000, vol.19, p. 485-492.

Garraway, R., Young, W.G., Daley, T., Harbrow, D., Bartold, P. M. *An assessment of the osteoinductive potencial of commercial demineralized freeze-dried bone in the murine thigh muscle implantation model*. J. Periodontal, 1998, vol. 69, p. 1325-1336.

Gartiner, L.P., HIATT, J.L. *Cartilagem e osso*. In: —. Tratado de histologia em cores. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap.7, p. 105-126.

Ge, Z., Baguenard, S., Lim, L. Y., Wee, A., Khor, E. *Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes*. Biomaterials, 2004, vol. 25, p. 1049-1058.

Godbole, S., Gote, S., Latkar, M., Chakrabarti, T. *Preparation and characterization of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate-starch blend films*. Bioresource Technology, 2002, vol. 86, p. 33-37.

Guillemin, G., Meunier, A., Dallant, P., Christel, P. *Comparison of coral resorption with two natural corals of different porosities*. Journal of biomedical materials research, 1989, vol. 23, p. 765-779.

Habraken, W.J.E.M., Wolke, J.G.C., Jansen, J.A. *Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug for drug delivery in tissue engineering*. Advanced Drug Delivery Reviws, 2007, vol. 59, p. 234-248.

Handrick, R., Reinhardt, S., Jendrossek, D. *Mobilization of Poly(3-Hydroxybutyrate) in Ralstonia eutropha*. Journal of Bacteriology, 2000, vol. 182, p. 5916-5918.

Hanks, C.T.; Wataha, J.C.; Sun, Z.: *In vitro models of biocompatibility: A review*. Dent Mater, 1996, vol. 12, p. 186-193.

Holmes, R.E.; Bucholz, R.W. and Mooney, V. *Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in diaphyseal defects: a histomorphometric study*. J. Orthop. Res., 1987, vol. 5, p. 114-121.

Hutmacher, D., Hurzeler, M. B., Schliephake, H. *A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications*. The international Journal of Oral & Maxillofacial Implants, 1996, vol.11 (5), p. 667-678.

Ikeda, N., Kawanabe, K., Makamura, T. *Quantitative comparison of osteoconduction of porous, dense A–W glass–ceramic and hydroxyapatite granules (effects of granule and pore sizes)*. Biomaterials, 1999, vol. 20, p. 1087-1095.

Jafari, J., Zebarjad, S.M., Sajadi, S.A. *Effect of pre-strain on microstructure of Ni-Ti orthodontic archwires*. Materials Science and Engineering A, 2008, vol. 473, p. 42-48.

Junior, P.E.S, Oréfice, R.L. *Compósitos bioativos obtidos a partir da inserção de vidro bioativo em matriz de poli(metacrilato de metila)*. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 2001, vol. 11 (3), p. 109-115.

Junqueira, L.C., Carneiro, J. *Histologia Básica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999. Cap.8, p. 111-128.

Kim, C. K., Kim, H. Y., Chai, J. K., Cho, K. S., Moon, I. S., Choi, S. H., Sottosanti, J. S., Wikesjo, M. E. *Effect of a calcium sulfate implant with calcium sulfate barrier on periodontal healing in 3-wall intrabony defects in dogs*. J Periodontol, 1998, vol 69, p. 982-988.

Kittur, F. S., Harish, K., Udaya Sankar, K., Tharamathan, R. N. *Characterization of chitin, chitosan and their carboxymetil derivatives by differential scanning calorimetry*. Carbohydrate polymers, 2002, vol. 49, p. 185-193.

Klein, C.P.A.T., Patka, P., den Hollander, W. *Macroporous calcium phosphate bioceramics in dog femora: a histological study of interface and biodegradation*. Biomaterials, 1989, vol. 10, p. 59-62.

KoKubo, T., Ito, S., Huang, Z. T., Hayashi, T., Sakka, S. *Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W*. Journal of biomedical materials research, 1990, vol. 24, p. 331-343.

Kopinke, F.D., Remmler, M., Mackenzie, K. *Thermal decomposition of biodegradable polyesters – I: Poly(β -hydroxybutyric acid)*. Polymer Degradation and Stability, 1996, vol. 52, p. 25-38.

Kumar, R., Majeti, N.V. *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive & Functional Polymers (Review article), 2000, vol. 46, p. 1-27.

Liu, C., Bai, R. *Preparation of chitosan/cellulose acetate blend hollow fibers for adsorptive performance*. Journal of Membrane Science, 2005. vol. 267, p. 68-77.

Luo, S., Grubb, D. T., Netravali, A.N. *The effect of molecular weight on the lamellar structure, thermal and mechanical properties of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerates)*. Polymer, 2002, vol. 43, p. 4159-4166.

Madihally, S. V., Matthew, H. W. T. *Porous chitosan scaffolds for tissue engineering*. Biomaterials, 1999, vol. 20, p. 1133-1142.

Martin, D., Leonardo, M. *Morphological, biochemical and flow cytometric assays os apoptosis*. In: Janssen K, editor. Current Protocols in Immunology. New York: John Wiley&Sons Inc., 1998, p. 3172-3.176.

Mavropoulos, Elena. *A hidroxiapatita como absorvedor de metais*. [Mestrado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 1999. 105 p.

Mendieta-Taboada, O., Carvalho, R. A., Sobral, P. J. A. *Análise dinâmico-mecânica: aplicações em filmes comestíveis*. Química Nova, (Artigo de revisão), 2008, vol. 31, p. 384-393.

Misch, C. E. *Aumento do osso para a inserção do implante: soluções para o enxerto ósseo*. In: —. *Implantes dentários contemporâneos*. 2. ed. São Paulo: Santos, 2000. Cap. 29, p. 451-467.

Moreira, M. F. *Formulação e caracterização de biomateriais compósitos a partir de polímeros biodegradáveis para implantes ósseos*. Monografia apresentada na Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2000, 67p.

Mothé, C.G., Azevedo, A. D. *Análise térmica de materiais*. São Paulo: editora, 2002 302p.

Mucha, M., Pawlak, A. *Thermal analysis of chitosan and its blends*. Termochimica Acta, 2005, vol. 427, p. 69-76.

Murugan, R., Ramakrishna, S. *Development of nanocomposites for bone grafting*. Composites Science and Technology (Review article), 2005, vol. 65, p. 2385-2406.

Neto, C. G. T.; Giacometti, J. A.; Ferreira, F. C.; Fonseca, J. L. C.; Pereira, M. R. *Thermal analysis of chitosan based networks*. Carbohydrate Polymers, 2005, vol. 62, p. 97-103.

Newman, M.G., Takei, H.H., Carranza, F.A. *Periodontia Clínica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. Cap. 2, p. 31-50.

Ni, J., Wang, M. *In vitro evaluation of hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composite*. Materials Science and Engineering, 2002, vol. 20, p. 101-109.

Novaes Júnior, A. B.; Taba Júnior, M.; Pontes, C.C. *Recurso e soluções em implantes: biomateriais em regeneração*. In: Congresso Internacional de Odontologia de São Paulo, 20., 2002, São Paulo, SP. Odontologia, arte, ciência e técnica:

periodontia, cirurgia, Cirurgia para implantes. São Paulo: Artes Médicas, 2002, v. 5, cap. 25,p.447-466.

Ohgushi, H., Okumura, M., Yoshikawa, T., Inoue, K., Senpuku, N., Tamai, S. *Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite*. Journal of biomedical materials research, 1992, vol. 26, p 885-895.

Okamoto, M., Dohi, Y., Ohgushi, H., Shimaika, H., Yonemasu, K., Hosoi, H. *Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on in vitro and in vivo bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells*. J Mater Sci: Mater Med, 2006, vol. 17, p. 327-336.

Okazaki, Y., Gotoh, E., Tamai, S. *Metal release from stainless steel, Co-Cr-Mo-Ni-Fe and Ni-Ti alloys in vascular implants*. Corrosion Science, 2008, vol. 50(12), p. 3429-3438.

Okumura, M., Ohgushi, H., Tamai, S. *Bonding osteogenesis in coralline hydroxyapatite combined with bone marrow cells*. Biomaterials, 1991, vol. 12 (4), p. 411-416.

Orefo, R.O.C., Triffitt, J.T. *In vitro and in vivo methods to determine the interactions of osteogenic cells with biomaterials*. Journal of Materials Science: Material in Medicine, 1999, vol. 10, p. 607-611.

Padermshocke, A., Katsumoto, Y., Sato, H., Ekgasit, H., Noda, I., Ozaki, Y. *Melting behavior of poly(3-hydroxybutyrate) investigated by two-dimensional infrared correlation spectroscopy*. Spectrochimica Acta Part A, 2005, vol. 61, p.541-550.

Patra, A.K., DePaolo, J.M., D'Souza, K.S., De Tolla, D., Meenaghham, M.A. *Os guias para a análise e o planejamento dos implantes dentários*. Impl.Dent.(ed.em port.), 2000, vol. 5, p. 500-563.

Petri, D.F.S., Donegá, J., Benassi, A.M., Bocangel, J.A.J.S. *Preliminary study on chitosan modified glass ionomer restoratives*. Dental Materials, 2007, Vol. 23, p. 1004-1010.

Poser, J. W. *The importance & characteristics of matrices in the treatment of bone defects*. Folia Traumatologica Lovaniensia, 2001.

Qui, Z., Ikehara, T., Nishi, T. *Crystallization behavior os biodegradable poly(ethylene succinate) from the amorphous sate*. Polymer, 2003, vol. 44, p. 5429-5437.

Ramakrishna, S., Mayer, J., Wintermantel, E., Leong, K.W. *Biomedical applications of polymer-composite materials: a review*. Composites Science and Technology, 2001, vol. 61, p. 1189-1224.

Rigsby, D.F., Bidez, M.W., Misch, C.E. *Reações do osso às cargas mecânicas*. In: Misch, C.E. *Implantes dentários contemporâneos*. 2.ed. São Paulo: Santos, 2000. cap. 22, p. 317-343.

Roberts, W.E., Garetto, L.P. *Fisiologia e metabolismo ósseos*. In: Misch, C.E. *Implantes dentários contemporâneos*. 2.ed. São Paulo: Santos, 2000. cap.17, p. 225-237.

Russias, J., Saiz, E., Nalla, R.K., Gryn, K., Ritchie, R.O., Tomsia, A.P. *Fabrication and mechanical proprerties of PLA/HA composites: A study in vitro degradation*. Materials Science and Engineering C, 2006, vol. 26, p. 1289-1295.

Sánchez, R.J., Schripsema, J., Silva, L.F.S., Taciro, M.K., Pradella, J.G.C., Gomes, J.G.C. *Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHA_{mc1}) produced by Pseudomonas putida IPT 046 from renewable sources*. European Polymer Journal, 2003, vol. 69, p. 1385-1394.

Sasaki, T., Debari, K., Udagawa, N. *Cytochalasin D reduces osteoclastic bone resorption by inhibiting development of ruffled border- clear zone complex*. Calcif tissue int, 1993, vol. 53, p. 217-221.

Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y-J. *Food applications of chitin and chitosans*. Food Science & Technology (Review article), 1999, vol. 10, p. 37-51.

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

Takagi, S., Chow, L. C., Hirayama, S., Eichmiller. *Properties of elastomeric calcium phosphate cement – chitosan composites*. Dental Materials, 2003, vol. 19, p. 797-804.

Todescan, F. F., Bechelli, A., Romanelli, H., *Implantodontia Contemporânea: Cirurgia e Prótese*. São Paulo: Artes Médicas, 2005, cap. 21, p. 467-495.

Tonhi, E., Plepis, A. M. G. *Obtenção e caracterização de blendas colágeno-chitosana*. Química Nova, 2002, vol. 25, p. 943-948.

Tsuge, T., Kikkawa, Y., Doi, Y. *Microbial synthesis and enzymatic degradation of renewable poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyhexanoate]*. Science and Technology of Advanced Materials, 2004, vol. 5, p. 449-453.

Ueda, H., Tabata, Y. *Polyhydroxyalkanoate derivatives in current clinical applications and trials*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2003, vol. 55, p. 501-518.

Van Blitterswijk, C.A., Koerten, H.K., de Groot, K. *The biocompatibility of hydroxyapatite ceramic: A study of retrieved human middle ear implants*. Journal of Biomedical Materials Research, 1990, vol. 24, p. 433-453.

Vilela, A. L. M. <<http://www.afh.bio.br>>. Acesso em 13 de julho de 2007.

Walker, M. M., Katz, L. *Evaluation of bonding of bone to inorganic crystal surfaces*. Bulletin of the hospital for joint diseases Orthopaedic Institute, 1983, vol. XLIII (2).

Wang, Y-W., Wu, Q., Chen, J., Chen, G-Q. *Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of hydroxyapatite and poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone reconstruction*. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, p. 899-904.

WanJun, T., Cunxin, W., Donghua, C. *Kinetic Studies on the pyrolysis of chitin and chitosan*. *Polymer Degradation and Stability*, 2005, vol. 87, p. 389-394.

Yamasaki, H., Sakai, H. *Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs*. *Biomaterials*, 1992, vol.13 (5), p. 308-312.

Yang, B.X., Webb, D., Blaker, J., Boccaccini, A. R., Maquet, V., Cooper, C., Oreffo, R.O.C. *Evaluation of human bone marrow stromal cell growth on biodegradable polymer/Bioglass® composites*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2006, vol.342, p.1098-1107.

Zhao, K., Deng, Y., Chen, A.C., Chen, G. *Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility*. *Biomaterials*, 2003, vol. 24, p. 1041-1045.