

Resumo

O polihidroxibutirato (PHB) é um polímero sintetizado por microorganismos sob deficiência de nutrientes e tem como principal característica a biodegradabilidade. Os vidros bioativos são vidros de sistemas especiais, como o $\text{SiO}_2\text{-MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$. Um compósito vidro bioativo/PHB tem por finalidade auxiliar na reparação e regeneração ósseas. Este compósito pode oferecer suporte através do PHB para o crescimento ósseo mantendo a funcionalidade do órgão lesado, enquanto a bioatividade do vidro auxilia a neoformação óssea. O vidro bioativo produzido no presente trabalho é denominado VH30 e pertence ao sistema $\text{SiO}_2\text{-MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$. Os compósitos foram produzidos em duas composições: 30Bio/70PHB e 40Bio/60PHB. O vidro foi caracterizado quanto ao tamanho e área superficial das partículas através de Coulter Counter e B.E.T., respectivamente, quanto a sua estrutura por Difração de Raios-X (DRX) e submetido a estudos *in vitro* em solução acelular que simula o plasma sanguíneo com e sem albumina (SBFA e SBF-K9, respectivamente). O vidro teve sua morfologia observada em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) acoplado e Microscopia de Força Atômica (MFA). O PHB foi caracterizado através de DRX e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Os compósitos produzidos foram submetidos a ensaios de microdureza Vickers e caracterizados por DRX. Os compósitos foram também submetidos a ensaios *in vitro* em SBF e observados através de MEV-EDS. As soluções de SBF nas quais foram mergulhados os compósitos foram analisadas por Espectroscopia de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP) para avaliar as trocas iônicas da solução e do compósito. Os resultados dos ensaios *in vitro* do vidro bioativo indicam bioatividade quando imerso SBFA ao formar uma camada de Ca-P, porém quando o mesmo foi imerso em SBF a camada de Ca-P se formou e se destacou, indicando uma influência da albumina na adesão desta camada. Os resultados dos ensaios de microdureza dos compósitos indicaram valores de $24,291 \pm 8,76$ HV e $25,273 \pm 10,82$ HV para os compósitos Bio40/60PHB e Bio30/70PHB, respectivamente. Os resultados dos ensaios *in vitro* em SBF dos compósitos sugerem uma bioatividade em ambos. Porém, a formação da camada de Ca-P foi mais rápida para o compósito 30Bio/70PHB do que para o Bio40/60PHB. A formação da camada de Ca-P nos compósitos aconteceu por deposição de íons Ca e P provenientes da solução, de acordo com os resultados de ICP.

Palavras-chave: Vidro bioativo, Polihidroxibutirato, Compósitos, Bioatividade

Abstract

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a polymer synthesized by microorganism under nitrogen deficiency and has as main characteristic the biodegradability. Bioactive glasses belong to special systems as $\text{SiO}_2\text{-MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$. A composite bioactive glass/PHB has as main aim to help bone reparation and regeneration. This composite can offers support to bone growth (PHB) maintaining the function of the damaged organ while the bioactivity is provided by glass helping the formation of new bone. The glass produced in the present work is named VH30 and belongs to the system $\text{SiO}_2\text{-MgO-CaO-P}_2\text{O}_5$. These composites were produced in two compositions: 30Bio/70PHB with 30% of reinforcement and 40Bio/60PHB with 40% of reinforcement. Bioactive glass had the size and superficial area of the particles characterized by Coulter Counter and B.E.T, respectively; and its phases characterized by X-Ray Diffraction (XRD). Bioactive glass was submitted to *in vitro* test in Simulated Body Fluid with and without albumin (SBFA and SBF, respectively) and had its morphology observed via Scanning Electron Microscopy (SEM) with Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) coupled and by Atomic Force Microscopy (AFM). The PHB was characterized by XRD and Differential Scanning Calorimetry (DSC). Composites produced had the microhardness Vickers measured and were characterized by XRD. These composites were also undertook to *in vitro* studies with SBF and observed by SEM-EDS. The SBF solutions that soaked the composites were analyzed by Inductively Coupled Plasma (ICP) to evaluate the ionic changes. *In vitro* results of VH30 when it was immersed in SBFA suggest a bioactivity presented a Ca-P layer formation; however when it was immersed in SBF the Ca-P layer was also formed and detached. These results indicating an albumin influence in the layer adhesion. Microhardness results of composites indicated values of $24,291 \pm 8,76$ HV and $25,273 \pm 10,82$ HV to the composites Bio40/60PHB and Bio30/70PHB, respectively. *In vitro* results of composites, when immersed in SBF, suggests that both present bioactivity. Nevertheless, the formation of Ca-P layer was faster to composite 30Bio/70PHB than Bio40/60PHB. The formation of Ca-P layer on composites occurs by deposition of Ca and P ions from solution, according to ICP results.

Keywords: Bioactive glass, polyhydroxybutyrate, composites, bioactivity

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

O primeiro relato de um implante não orgânico enxertado em osso humano, endosteal aloplástico (material inorgânico), data de 600 d.C. Este implante era de uma mandíbula encontrada em 1931 em Honduras; na qual haviam três fragmentos de concha do mar no lugar dos incisivos inferiores. Ring [1] afirma que após investigações radiográficas concluiu-se que, devido à osteointegração entre o implante e o osso, os implantes haviam sido implantados em paciente vivo. A Figura 1 apresenta uma imagem desta mandíbula. Hoje os enxertos aloplásticos são extensivamente estudados [2-4]



Figura 1 – Mandíbula com três pedaços de conchas do mar implantadas; este é o primeiro exemplo de um implante endosteal aloplástico realizado com êxito [1].

Durante muitos anos outros materiais foram utilizados como biomateriais, por exemplo, a madeira. No entanto, no ano de 1937, o polimetilmetacrilato (PMMA), um polímero, foi introduzido na odontologia. Com o uso deste material sintético deu-se início a uma nova era de biomateriais, abrindo o leque de alternativas de tratamento. O termo biomateriais foi utilizado, de fato, pela primeira vez somente na década de 60 e no fim desta aconteceu o primeiro simpósio de biomateriais [5].

O desenvolvimento dos biomateriais está vinculado às mudanças nos conceitos e aplicações destes no decorrer dos anos. No princípio, os órgãos e membros eram simplesmente extirpados. Atualmente, após o desenvolvimento dos transplantes, enxertos e implantes, a substituição tecidual é o tratamento de eleição. A regeneração

tecidual vem ganhando espaço como alternativa de tratamento com o desenvolvimento da engenharia de tecidos e dos materiais bioativos. Em um futuro próximo, o tratamento de diversas afecções será realizado através da regeneração tecidual.

Os biomateriais tem tido diversas aplicações como: biosensores, implantes, liberação controlada de drogas, lentes intraoculares, etc... A cada ano são desenvolvidos novos biomateriais com o intuito de oferecer outras opções de tratamento para diversas enfermidades. Porém, devido à mudança no conceito de desenvolvimento de biomateriais a grande maioria dos novos materiais é voltada para regeneração tecidual. A engenharia de tecidos tem mostrado grandes avanços na criação de tecidos retirados do próprio paciente, os quais são cultivados em meios específicos e em seguida são novamente reimplantados auxiliando a reparação tecidual. Os materiais bioativos são aqueles que, quando implantados, têm a capacidade de induzir a formação de tecido sadio em locais onde a reparação natural seria impraticável ou dificultada, portanto são classificados como materiais para regeneração tecidual.

No que se refere ao material utilizado, os biomateriais podem ser divididos basicamente em biometais, biopolímeros, biocerâmicas, biovidros e biocompósitos [6]. Os biometais englobam os implantes de titânio, aço inoxidável, ligas de cobalto, dentre outros menos utilizados. Estes metais têm aplicações nas áreas de ortopedia e odontologia. Os biopolímeros têm diversas aplicações nas diversas especialidades médicas e podem ser classificados como polímeros sintéticos ou naturais e degradáveis ou estáveis. As biocerâmicas têm aplicações como enxertos ósseos ou recobrimentos de implantes metálicos. Os biovidros têm as mesmas aplicações das biocerâmicas. E, finalmente, os biocompósitos unem dois ou mais materiais, anteriormente citados, para modificar as propriedades dos mesmos e possibilitar uma maior diversificação na sua aplicação.

Um aspecto de enorme importância para os biomateriais é a sua biocompatibilidade, tanto dos materiais como de seus produtos quando são reabsorvíveis. A biocompatibilidade é a capacidade do material apresentar uma resposta apropriada quando aplicado, não causando, por exemplo, reação inflamatória crônica, reação de corpo estranho ou mesmo toxicidade [5]. Os parâmetros que definem a biocompatibilidade são difíceis de serem estabelecidos, pois estão ligados a fatores

subjetivos como a idade do paciente, estado de saúde, local de implante, imunidade, etc. A resposta do organismo também depende das características do próprio material, tais como composição, natureza, rugosidade e morfologia [7]. Essas características são controladas no design e na síntese do material.

O desenvolvimento dos biomateriais envolve profissionais de diversas áreas da ciência. Portanto, a multidisciplinaridade é uma necessidade no desenvolvimento de novos biomateriais. A Figura 2 mostra esta interação profissional no desenvolvimento de novos biomateriais ou aperfeiçoamento dos já existentes.

O presente trabalho está inserido em algumas das etapas do desenvolvimento dos biomateriais, como a síntese e testes (mecânicos e *in vitro*). O principal objetivo do trabalho foi desenvolver um compósito biodegradável e bioativo, utilizando um vidro como reforço e um polímero como matriz, para auxiliar a regeneração óssea através da formação de uma camada estável de Ca-P em sua superfície, concomitante com sua degradação. Um objetivo secundário deste trabalho foi obter este vidro que deveria apresentar bioatividade para ser utilizado como enxerto ósseo.

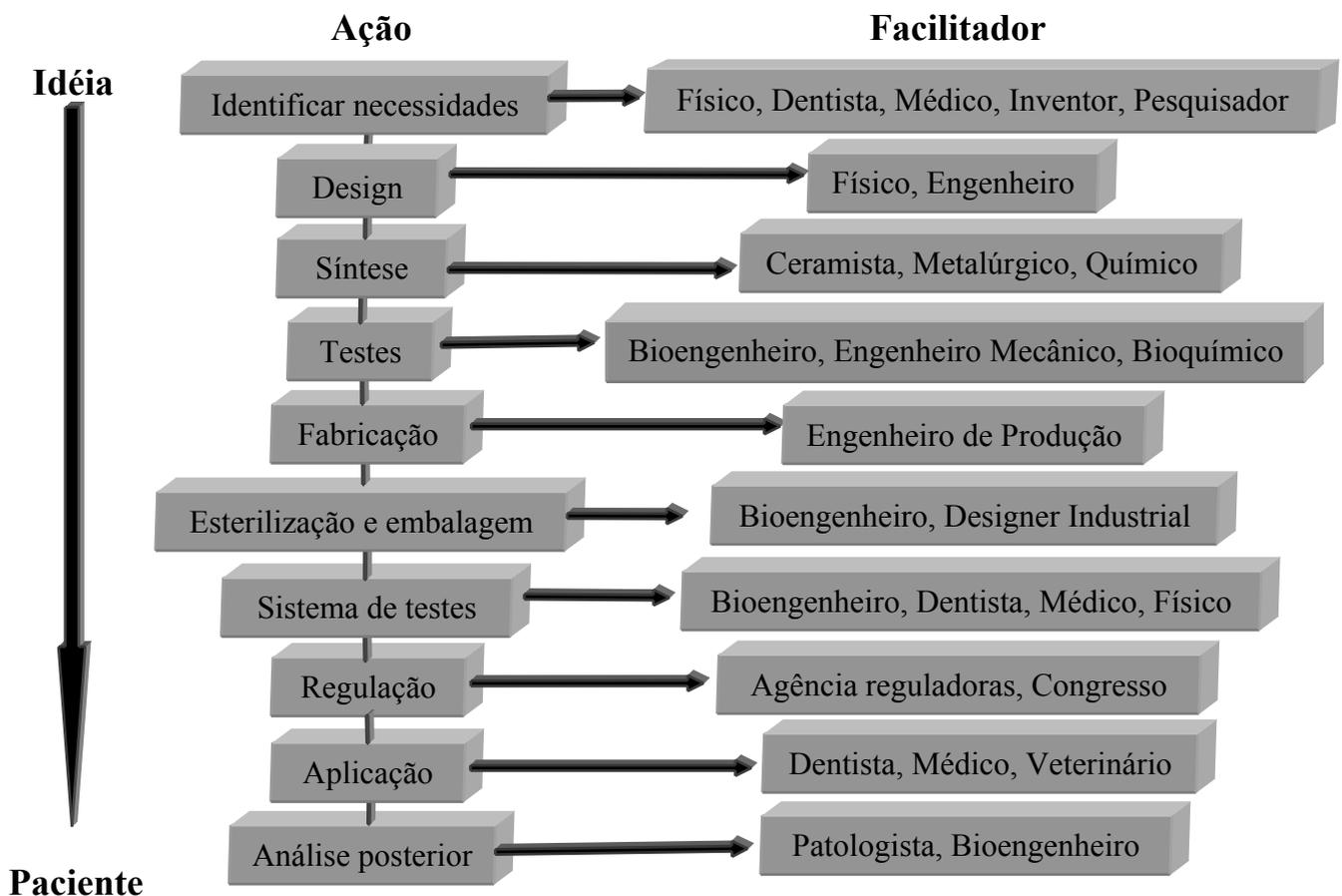


Figura 2: Fluxograma de desenvolvimento dos biomateriais [5].

CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOCERÂMICAS E VIDROS BIOATIVOS

O Homem descobriu as cerâmicas há milhares de anos, ao verificar que o barro colocado no fogo se transformava em uma massa bastante dura e rígida. As cerâmicas podem ser definidas como compostos de elementos metálicos e não-metálicos, por exemplo, Al_2O_3 , MgO , TiO_2 , que são materiais cerâmicos simples [8].

Nos últimos quarenta anos foram desenvolvidas novas cerâmicas que podem ser utilizadas para auxiliar na reparação de tecidos corporais lesados. Estas novas cerâmicas são também chamadas de biocerâmicas. As biocerâmicas têm diversas composições e fases diferentes. As biocerâmicas mais utilizadas são as apatitas (estrutura policristalina) e os vidros (amorfo). Há também algumas estruturas amorfas parcialmente cristalizadas que são conhecidas como vitro cerâmicas, como por exemplo a apatita/wollastonita. As funções das biocerâmicas estão relacionadas às fases presentes nos materiais.

A alumina e a zircônia são cerâmicas com uso limitado como biomaterial. Estas cerâmicas têm a propriedade de serem inertes, portanto quando implantadas há uma formação de tecido fibroso sobre o implante [9]. O uso mais comum destas cerâmicas é cabeça artificial do fêmur em articulações coxo-femorais. A alumina também pode ser utilizada como recobrimento de algumas próteses onde não se necessita de osteointegração. As duas diferem em suas propriedades mecânicas, pois a zircônia apresenta propriedades superiores às da alumina [10].

O grupo de cerâmicas conhecidas como apatitas apresenta estruturas similares, mas não necessariamente as mesmas composições. O composto hidroxicarbonato de apatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{HCO}_4]$ é o principal componente da porção mineral do osso humano. Outras fases da apatita também estão presentes, como hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ e em menor quantidade a fluoroapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$. A hidroxiapatita (HA) é comumente sintetizada e utilizada como biomaterial, bem como o fosfato de cálcio o qual dá origem a própria HA. A hidroxiapatita e o fosfato de cálcio podem ter propriedades de bioatividade e bom comportamento mecânico. Os principais usos destas

cerâmicas são: reparo de defeitos ósseos em odontologia e ortopedia, preenchimento de cavidades patológicas, traumáticas ou cirúrgicas, reconstrução maxilo-facial, recobrimento de implantes de titânio e bioreatores [11].

Os vidros são considerados cerâmicas por alguns autores [8,9] apesar de apresentar estrutura amorfa. Isso se deve ao caráter cerâmico dos constituintes dos vidros. O primeiro vidro utilizado como biomaterial foi desenvolvido por Hench em 1969 [12]. O biovidro foi o primeiro biomaterial a apresentar bioatividade [13]. O conceito de bioatividade e suas etapas serão discutidos no item 2.4.

2.1.1 Composições Químicas dos Vidros Bioativos

Hench foi o pioneiro na produção de biovidros, culminando com o que hoje é o conhecido Bioglass[®] [11]. Variações na composição química do biovidro foram realizados posteriormente. A Tabela 1 apresenta algumas destas variações de concentrações dos componentes. Entre eles se destaca o biovidro 45S5 por ter sido o primeiro vidro bioativo utilizado e que o primeiro comercializado sob o nome de Bioglass[®]

Quando o CaO substitui o MgO ou o Na₂O substitui o K₂O na composição química do biovidro há uma diferença muito pequena no comportamento adesivo do osso ao biovidro, quando estes são usados como recobrimento de implantes.

Gomez-Vega et al [14] produziram vidros de sistemas multicomponentes que envolvem os compostos SiO₂, Na₂O, K₂O, CaO, MgO e P₂O₅. Estes biovidros têm um coeficiente de expansão térmica (CET) próximo ao do metal, sendo que o CET do biovidro é igual a $15,1 \times 10^{-6} (\text{°C})^{-1}$ e o da liga de titânio Ti-6Al-4V é igual a $9,6 \times 10^{-6} (\text{°C})^{-1}$. Isto permite que os biovidros possam ser usados para esmaltar ou fazer recobrimentos das ligas de titânio sem se destacar da base.

Peitl et al [15] demonstraram que, no sistema SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅, a quantidade de P₂O₅ influencia positivamente na formação de hidroxicarbonato de apatita (HCA), ou seja, na concentração de 6% de P₂O₅ a formação ocorreu mais rápido (8 h) que na composição sem P₂O₅ (35 h) cujas concentrações eram de 50,3% de SiO₂, 18,5% de

Na₂O, e 31,3% de CaO. Porém, ao analisar a bioatividade das cerâmicas vítreas deste sistema, encontraram-se valores similares ao Bioglass[®].

Tabela 1 - Composições de biovidros (% vol) [11].

Designação	SiO ₂	Na ₂ O	CaO	CaF ₂	P ₂ O ₅	B ₂ O ₃	Al ₂ O ₃
45S5.4F	46,1	24,4	16,2	10,8	2,6	-	-
45S5	46,1	24,4	24,1	-	2,6	-	-
#1(S63.5P6)	65,7	15,0	15,5	-	2,6	0,4	0,6
#9(S53P4)	53,9	22,6	21,8	-	1,7	-	-
#10(S45P7)	46,6	24,1	24,4	-	3,0	1,8	-
52S4.6	52,1	21,5	23,8	-	2,6	-	-
55S4.3	55,1	20,1	22,2	-	2,6	-	-
60S3.8	60,1	17,7	19,6	-	2,6	-	-
42SF	42,1	26,3	17,4	11,6	2,6	-	-
46SF	46,1	24,4	16,1	10,8	2,6	-	-
49SF	49,1	23,0	15,2	10,1	2,6	-	-
52SF	52,1	21,5	14,3	9,5	2,6	-	-
55SF	55,1	20,1	13,3	8,9	2,6	-	-
60SF	60,1	17,7	11,7	7,8	2,6	-	-
49S(gg)	50,0	-	46,0	-	4,0	-	-
54S(gg)	55,0	-	41,0	-	4,0	-	-
58S(gg)	60,0	-	36,0	-	4,0	-	-
63S(gg)	65,0	-	31,0	-	4,0	-	-
68S(gg)	70,0	-	26,0	-	4,0	-	-
72S(gg)	75,0	-	21,0	-	4,0	-	-
77S(gg)	80,0	-	16,0	-	4,0	-	-
86S(gg)	90,0	-	6,0	-	4,0	-	-

(gg) = gel-glass

Leonelli et al [14] propuseram novas composições ao introduzir CeO₂ no sistema SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅. Os autores acreditavam que o acréscimo de CeO₂ traria propriedades bacteriostáticas ao biovidro. Foi observado que a formação de vidros de fosfo-silicatos só ocorre até uma composição química de 13,5% de CeO₂. Foi observado

também que pequenas quantidades de CeO_2 (até 1,5%) não interferem significativamente na capacidade de formação de hidroxiapatita na superfície do biovidro. Porém, em maiores quantidades a formação de apatita é impedida, tanto pela durabilidade do vidro (que é aumentada pelo CeO_2 devido reatividade ser afetada negativamente), como pela habilidade do cério de interagir com o fosfato.

Oliveira et al [17] avaliaram a influência da proporção entre CaO/MgO na estrutura de separação de fases de vidros do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-MgO-P}_2\text{O}_5$. Os autores concluíram que o MgO atua como modificador do vidro e não somente como substituto do CaO na estrutura. E a substituição do CaO pelo MgO , que são modificadores do vidro, aumenta a porcentagem de fase amorfa no vidro.

A técnica de Plasma Spray é a utilizada para deposição de biovidros sobre implantes. O sistema $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ é o mais comumente empregado e foi utilizado por Łączka et al [18] que produziu os vidros através da técnica de sol-gel. Schrooten e Helsen [19] utilizaram uma variação do sistema ($\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5\text{-CaF}_2$) porém para vitro cerâmicas. Em ambos os trabalhos, os autores produziram materiais com alta bioatividade. No entanto, a liberação de cálcio das vitro cerâmicas foi mais difícil do que nos vidros amorfos.

Algumas das composições citadas anteriormente também fornecem vitro cerâmicas, assim chamadas devido à porcentagem de material desvitrificado ou cristalinizado presente, como acontecem nas fases apatita e wollastonita. A quantidade de fase cristalina presente nestes materiais é o que define se o material é vidro ou vitro cerâmicas. Os vidros são totalmente amorfos e as vitro cerâmicas possuem uma fase cristalina em quantidade variável. As vitro cerâmicas apresentam propriedades biológicas muito semelhantes aos vidros, porém as propriedades mecânicas são ligeiramente superiores, devido à presença da fase cristalina.

De acordo com Strnad [20], a composição química conveniente para o vidro residual em vitro cerâmicas pode ser encontrada e controlada baseada nos cálculos do parâmetro estrutural Y , que corresponde ao número médio de oxigênios ligantes por poliedro na rede do vidro. Estes parâmetros encontrados são úteis para descrever as

composições dos biovidros e suas estruturas. Estes parâmetros podem ser calculados a partir das composições molares dos vidros através da Equação I:

$$Y = 2Z - 2R \quad (I),$$

onde Z é o número médio de todos os tipos de oxigênios e R é a razão do número total de oxigênios pelo número total de cátions formadores de vidro. O número de Y varia de 4, para o vidro de sílica, a 3 para o $\text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{SiO}_2$ e a 2 para $\text{CaO} \cdot \text{Na}_2\text{O} \cdot 2\text{SiO}_2$. Vidros com Y menor do que 2 são os chamados vidros invertidos. Quando os vidros têm Y iguais é dito que são estruturalmente similares.

Strnad [20] afirma que existe uma correlação entre o parâmetro Y e as propriedades dos vidros (viscosidade, propriedades químicas, elétricas e mecânicas etc), pois para cada valor de Y existe uma estrutura cristalina, como pode ser observado na Figura 3.

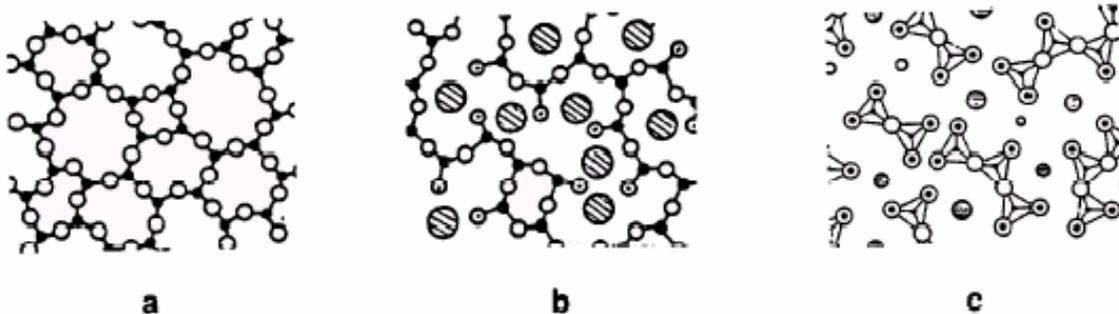


Figura 3: Projeções bidimensionais de estruturas dos vidros. (a) vidro de sílica $Y=4$; (b) vidro de silicato $2<Y<4$; (c) vidro invertido $Y<2$. ● Si, ⊙ O^{\ominus} , ○ O^{\ominus} , ◐ Na e Ca. [18].

2.1.2 Aplicações dos Vidros Bioativos

Inicialmente, o Bioglass[®] foi utilizado como reconstrutor de ossículos do ouvido médio. Isto permitiu a audição de pessoas que não tinham continuidade do sistema de condução do som dentro do ouvido [11]. Kokubo [21] demonstrou que devido a uma maior adesão ao osso e ao tecido conjuntivo, o Bioglass[®] apresentou a bioatividade superior quando comparados com antigos substitutos, tais como polímeros e metais.

Camargo et al [22] e Trondson et al [23] demonstraram que o biovidro pode ser utilizado em cirurgia oral como preenchimento do alvéolo dentário após extrações, acelerando o processo de cura com o mínimo de perda de estrutura adjacente. Kinnunen

et al [24] em seu relato clínico mostraram o uso do biovidro em cirurgia e traumatologia maxilo-facial aplicando-o como suporte no caso de fraturas cominutivas, como por exemplo, reconstrução de assoalho de órbita.

O biovidro pode ser usado em periodontia para reconstrução de defeitos ósseos verticais provocados pela doença periodontal. Allan et al [25-26] demonstraram que o biovidro também apresenta efeito antibacteriano. Este fato aumenta a possibilidade de sucesso no tratamento da doença periodontal quando o biovidro é empregado como enxerto. O biovidro pode ser utilizado em associação com osso autógeno para levantamento de seio maxilar ou como preenchimento de cavidades ocasionadas por lesões como cistos e tumores [27]. Os biovidros também são largamente empregados como recobrimento de implantes o que aumenta a osteointegração deste ao osso [28 29].

No presente trabalho foi utilizado um vidro do sistema $\text{SiO}_2\text{-}3\text{CaO.P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$. O diagrama de fases ternário apresentado na Figura 4 indica as principais composições de vidros e cerâmicas do sistema. A parte em cinza escuro do diagrama de fases representa as composições de vidros que podem ser obtidos no sistema. Supõe-se que a parte em cinza claro representa alguns vidros os quais são teoricamente bioativos.

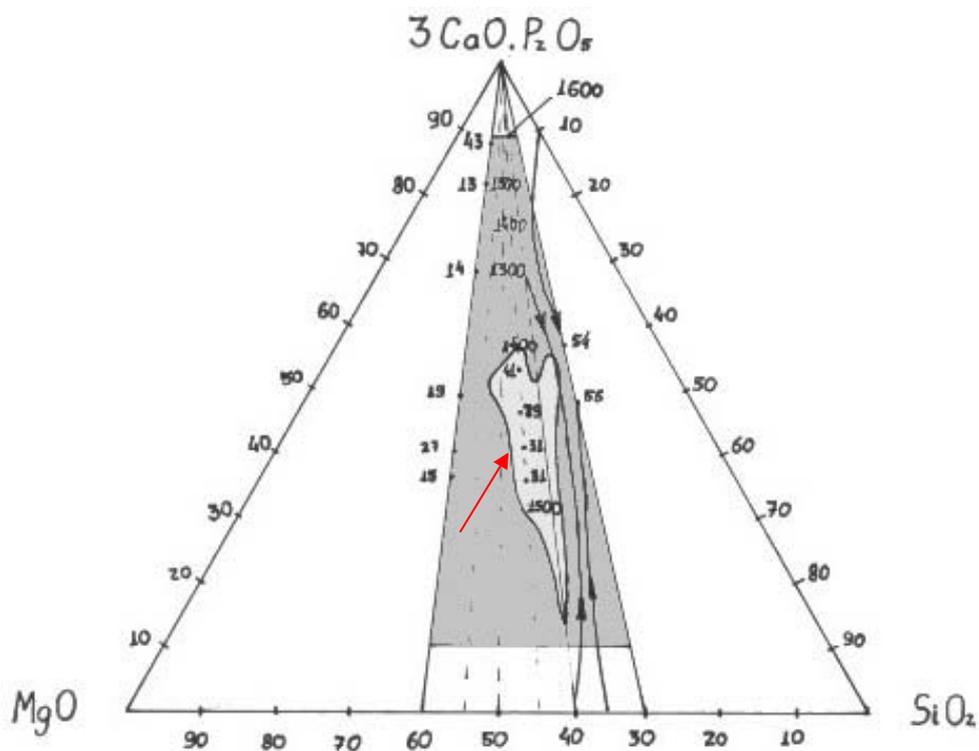


Figura 4: Diagrama de fases dos vidros do sistema $\text{SiO}_2\text{-}3\text{CaO.P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$.

2.2 POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

Os polímeros têm sido utilizados como biomateriais desde meados do século XX. Os biopolímeros mais estudados são bioestáveis devido às suas aplicações que vão de válvulas cardíacas a restaurações dentárias. Todavia, alguns polímeros apresentam a propriedade de biodegradação. Esta propriedade é aplicada principalmente no desenvolvimento de engenharia de tecidos e regenerações teciduais. A biodegradação destes polímeros pode ser controlada, o que é benéfico para auxiliar a regeneração do organismo, pois enquanto este se regenera o polímero atua como um arcabouço para o crescimento celular. Neste mesmo tempo podem-se aproveitar as propriedades mecânicas destes polímeros para dar suporte ao organismo na função perdida pelo tecido ou órgão [30].

Os polihidroxialcanoatos (PHA) pertencem a um grupo de polímeros com mais de 100 diferentes estruturas monoméricas. As diferenças entre os monômeros podem ser as distâncias entre os grupos radicais ou entre os ésteres na cadeia. Todas as variações fornecem propriedades mecânicas diferentes. Os PHAs são sempre biodegradáveis, mas a taxa de degradação varia com as propriedades dos polímeros [31,32].

O polímero mais simples e mais comum dos PHA é o poli(3-hidroxi-3-butirato)(PHB) [33,34]. O poli(3-hidroxi-3-butirato) é o mais utilizado, porém pode apresentar porcentagens variáveis do copolímero hidroxivalerato formando o poli(3-hidroxi-3-butirato-co-3-hidroxi-3-valerato) ou PHBV. A porcentagem de hidroxivalerato é variável, entre 0 e 50%. O PHB é um poliéster termoplástico duro e quebradiço, com propriedades físicas comparáveis ao polipropileno, este apresenta ponto de fusão, grau de cristalinidade e temperatura de transição vítrea semelhantes [35]. Este polímero apresenta baixa toxicidade [36] e compatibilidade com tecidos e sangue [37]. A fórmula estrutural do PHB pode ser observada na Figura 5.

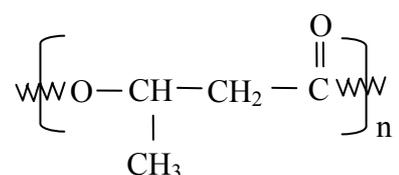


Figura 5: Fórmula estrutural do PHB

Para que os polímeros possam ser utilizados como biomateriais biodegradáveis alguns requisitos devem ser obedecidos como: a biocompatibilidade, a facilidade de controle da degradação, a não toxicidade dos produtos da degradação e a facilidade de excreção destes produtos. O PHB tem a vantagem de apresentar todos estes requisitos, podendo, portanto, ser um biomaterial com aplicações práticas em odontologia e medicina, tanto na forma pura como na forma de compósito com cerâmicas [38].

O PHB é um poliéster termoplástico com propriedades mecânicas comparáveis a outros poliésteres como os poli-lactatos. Este polímero é produzido por bactérias sob deficiência de nutrientes [39]. De acordo com Merrick et al [40], Nurbas e Kutsal [41], Qi [42] algumas das espécies de bactéria capazes de produzir o PHB são: *Bacillus megaterium*, *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas oleovorans*, *Rhodococcus sp.*, *Caulobacter crescentus*, *Escherichia coli*.

De acordo com Nurbas e Kutsal [41] a produção do PHB pode ser através de um processo biosintético que resulta em um polímero puro livre de resíduos. O método biosintético tem sido estudado através de métodos enzimológicos, sendo que muitas enzimas foram utilizadas para isolar diferentes tipos de bactérias. Reddy et al [43] afirmam que o processo biosintético para produção do PHB consiste em 3 reações enzimáticas catalisadas por 3 diferentes enzimas. A primeira reação consiste na condensação de duas moléculas de acetil coenzima A (acetil-Coa) se transformando em acetoacetil-CoA por β -cetoacilCoA tiolase (codificado por *phbA*). A segunda reação é a redução do acetoacetil-CoA em (r)-3-hidroxi-butiril-CoA pelo acetoacetil-CoA redutase NADPH-dependente (codificado por *phbB*). Por último, os monômeros (r)-3-hidroxi-butiril-CoA são polimerizados em PHB pelo P(3HB) polimerase, codificado por *phbC*. As etapas do processo biosintético de produção do PHB pode ser observado no fluxograma apresentado na Figura 6.

As fontes de carbono podem variar de acordo com a espécie de bactéria. Liebergessel et al [44] utilizaram gluconato, propionato e octanoato como fonte de carbono para produzir o PHB através da bactéria *Alcaligenes eutrophus*. Mirtha et al [45] utilizaram a bactéria *B. megaterium* com uma fonte de carbono proveniente da glicose para obter o polímero, porém com rendimento mais baixo. Liebergessel et al [44] quando empregaram a bactéria *Pseudomonas oleovorans* e glucanoato e octanoato

obtiveram o PHB com um rendimento superior às bactérias citadas anteriormente. Zhang et al [46] também obtiveram alto rendimento na produção de PHB, porém utilizando a bactéria *Klebsiella aerogenes recombinats*. A porcentagem de copolímeros hidroxivalerato (HV) também é dependente da fonte de carbono. Nurbas e Kutsal [41] empregaram o CO₂ como fonte de carbono para bactérias *Alcaligenes Eutrophus*, neste caso a porcentagem variou de 0 a 47 mol em porcentagem de unidades de HV. A produção biosintética por controle de fermentação é economicamente mais viável do que a produção sintética do polímero.

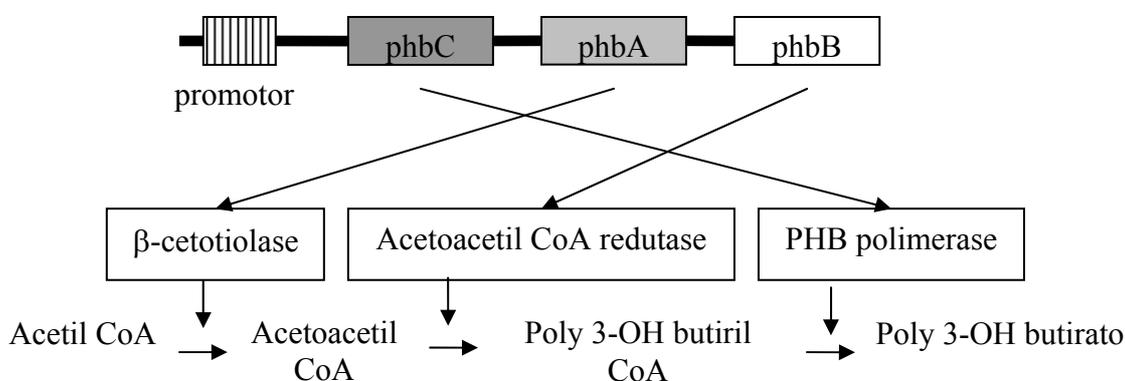


Figura 6: Processo biosintético do PHB por ações sucessivas de enzimas.

A degradação do PHB e do copolímero HV é dada inicialmente por hidrólise em ambiente onde estão presentes enzimas extracelulares de microorganismos, transformando o polímero em oligômeros. Estes são finalmente transformados em dióxido de carbono e água por enzimas intracelulares [41].

No trabalho de Merrick et al [40] os autores estudaram o comportamento de degradação de algumas formas de PHB. No trabalho foram utilizados sistemas de depolimerazes intracelulares de *Rhodospirillum rubrum* e depolimerazes extracelulares de *Pseudomonas lemoignei*. As bactérias *R. rubrum* foram escolhidas pois são usadas para análise in vitro da degradação de PHB proveniente de *Bacillus megaterium*. Uma das conclusões dos autores é que de fato há diferença entre a degradação do PHB em diferentes tipos de enzimas, especialmente entre as intra e extracelulares.

Freier et al [34] afirmam que a degradação do PHB in vitro a 37°C em uma solução tampão apresenta perda de massa após 180 dias, mas o decréscimo de peso molecular se inicia após 80 dias. Neste período há uma permeabilização da água na estrutura do polímero. A hidrólise ocorre em duas etapas: quebra das cadeias amorfas e cristalinas da matriz polimérica, o que leva ao decréscimo do peso molecular e perda de massa, o que ocorre quando o peso molecular atinge o valor de 13.000. Neste trabalho os autores concluíram que o PHB tem uma meia vida de 1 ano a 37°C, porém é acelerado quando o PHB é adicionado de poli(L-lactato) (PLLA). Este longo período é viável quando o material é utilizado para regeneração tecidual e deve ser mantido por muito tempo em função auxiliando mais eficazmente esta.

2.3 COMPÓSITOS

Bonfield et al [47] foram os primeiros a utilizarem compósitos cerâmica/polímero como biomaterial. Os autores utilizaram hidroxiapatita como carga em uma matriz de polietileno. A hidroxiapatita foi empregada como material bioativo e o polietileno como material de suporte apenas. Os autores obtiveram um compósito bioativo estável quando imerso em uma solução que simula o plasma sanguíneo.

As cerâmicas e os vidros apresentam um típico módulo de elasticidade alto e uma baixa resistência à fratura apesar da excelente resistência à compressão [48]. Em relação ao osso as biocerâmicas e biovidros não têm um bom comportamento mecânico. Portanto, para resolver este problema, o ideal é a confecção de compósitos nos quais as propriedades mecânicas se aproximem das do osso [49]. A principal aplicação destes compósitos é onde ocorre muita tensão de deformação, o que leva à fratura da cerâmica por esta não apresentar deformação plástica, assim os polímeros ficam responsáveis por suportar tais tensões.

Os primeiros compósitos desenvolvidos para aplicação como auxiliares na regeneração óssea envolviam compósitos bioestáveis. Uma mudança na ênfase do desenvolvimento de novos biomateriais direcionou a atenção dos materiais que permaneciam completamente estáveis quando implantados para os materiais que alteravam suas propriedades ou degradavam em resposta ao ambiente celular ou extracelular. Os compósitos biodegradáveis têm a vantagem de permitir a neoformação

tecidual à medida que é degradado [50,51]. A remoção destes materiais não é necessária ao contrário dos materiais bioestáveis, o que elimina a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica.

Roether et al [52] afirmam que a biodegradabilidade e bioatividade, quando combinadas, otimizam o uso de tecidos sintéticos de suporte. Os compósitos que apresentam estas propriedades permitem a criação de suportes bioreabsorvíveis e bioativos, com adaptação física e com propriedades mecânicas satisfatórias. Além de poderem ser aplicados em situações em que a taxa de reabsorção do polímero (que promove suporte para o crescimento de células) seja compensada pela formação de novos tecidos, que é estimulada pelo biovidro.

Wang [38] afirma que as propriedades biológicas, químicas e mecânicas dos compósitos biomédicos podem ser afetadas por alguns fatores como: tamanho, forma e distribuição do reforço; propriedades e porcentagem de volume do reforço; bioatividade do reforço ou da matriz; propriedades da matriz (peso molecular, tamanho de grão, etc.); e interface matriz-reforço. A arquitetura do compósito também é importante. O controle destes fatores fornece as características desejadas para cada aplicação.

Ainda de acordo com Wang [38], as características morfológicas do reforço são muito importantes para determinar as propriedades mecânicas do compósito. Os reforços bioativos podem apresentar partículas de forma esférica, irregular, paralelas e chatas ou acicular, Figura 7. Nos vidros as partículas têm formas irregulares com ângulos vivos como pode ser observado na Figura 7-c. Para remoção destes ângulos é necessária uma moagem adicional, o que aumenta também a área de contato das partículas.

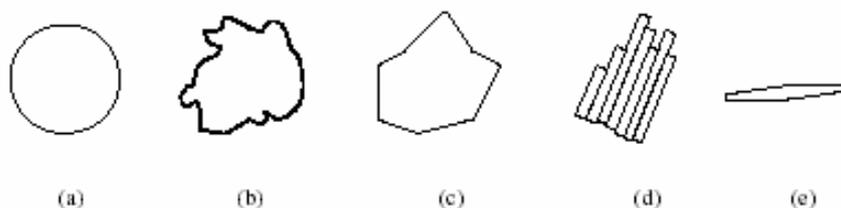


Figura 7: Forma das partículas biocerâmicas usadas em biomateriais.

Outro fator importante em relação às partículas é a distribuição destas no compósito. As distribuições podem ser em estado condensado, estado intermediário e estado disperso. A distribuição ideal é a de estado disperso, pois é a qual permite evitar os pontos de iniciação de fraturas e a propagação destas sob estresse mecânico mais eficazmente. A distribuição das partículas pode estar relacionada ao tamanho destas. Wang [38] classifica este tipo de distribuição em monomodal ou bimodal. A distribuição monomodal apresenta tamanho uniforme de partículas, já a distribuição bimodal apresenta dois tamanhos de partículas diferentes. Anusavice [53] cita a distribuição híbrida, onde os tamanhos de partículas são variáveis. A pior distribuição é a monomodal, pois permite espaços sem partículas no compósito, e a melhor é a híbrida, pois elimina estes espaços. A distribuição híbrida, assim como a distribuição em estado disperso, têm as mesmas funções.

A porcentagem em volume de reforço tem um valor mínimo, no qual o compósito apresenta bioatividade. Para compósitos de hidroxiapatita o volume crítico é de 20% e acredita-se que para os outros reforços bioativos a porcentagem necessária também esteja próxima a este valor [38]. As porcentagens de reforço podem variar de 0 a 40 %. As porcentagens maiores apresentam maiores valores de dureza e módulo de Young [50,51]. Os compósitos com porcentagens de reforço entre 30 e 40% apresentam melhores comportamentos bioativos, pois valores superiores a 40% diminuem a taxa de degradação dos polímeros no compósito, o que leva a menor exposição do reforço que é um dos fatores responsáveis pela bioatividade [37, 54].

2.4 BIOATIVIDADE

A bioatividade é definida como: “um material que provoca uma resposta biológica específica na interface do material que resulta na formação de uma adesão entre os tecidos e o material”. Os materiais que podem então ser classificados como bioativos são: vidros bioativos, vitro cerâmicas, hidroxiapatita sintética, compósitos cerâmica-polímeros. O tempo para adesão, força de adesão, mecanismos de adesão, espessura da zona de adesão e forças mecânicas variam de material para material. Uma característica comum dos implantes bioativos é a formação de uma camada de hidroxicarbonato de apatita (HCA) na superfície. A HCA é equivalente, em composição

e estrutura, à fase mineral do osso. A interface entre o implante bioativo e o osso é próximo do que ocorre naturalmente entre ossos, tendões e ligamentos [11].

Os vidros bioativos podem apresentar adesão ao osso e/ou ao tecido mole. Os vidros bioativos que apresentam composições de até 53% de SiO_2 têm adesão ao osso e ao tecido mole. A porcentagem de SiO_2 entre 53% e 60% resulta em adesão apenas ao osso e em concentrações acima de 60% não há adesão. Isso se dá pela quantidade de grupos fosfatos ativos na forma Ca-P, pois quanto maior a quantidade de Ca e P formados na superfície maior a adesão [15]. De acordo com Hench [55], os materiais bioativos são agrupados em duas classes: Classe A - osteoprodutora - e Classe B - osteocondutora. Os materiais da classe A são aqueles que aderem ao tecido duro e mole, já os da classe B são os que aderem somente em osso. A Figura 8 é um diagrama de fases, onde a concentração de P_2O_5 foi mantida constante em 6% [56]. A formação de HCA na superfície é mais rápida na concentração 45% de SiO_2 do que na concentração de 53% de SiO_2 [57].

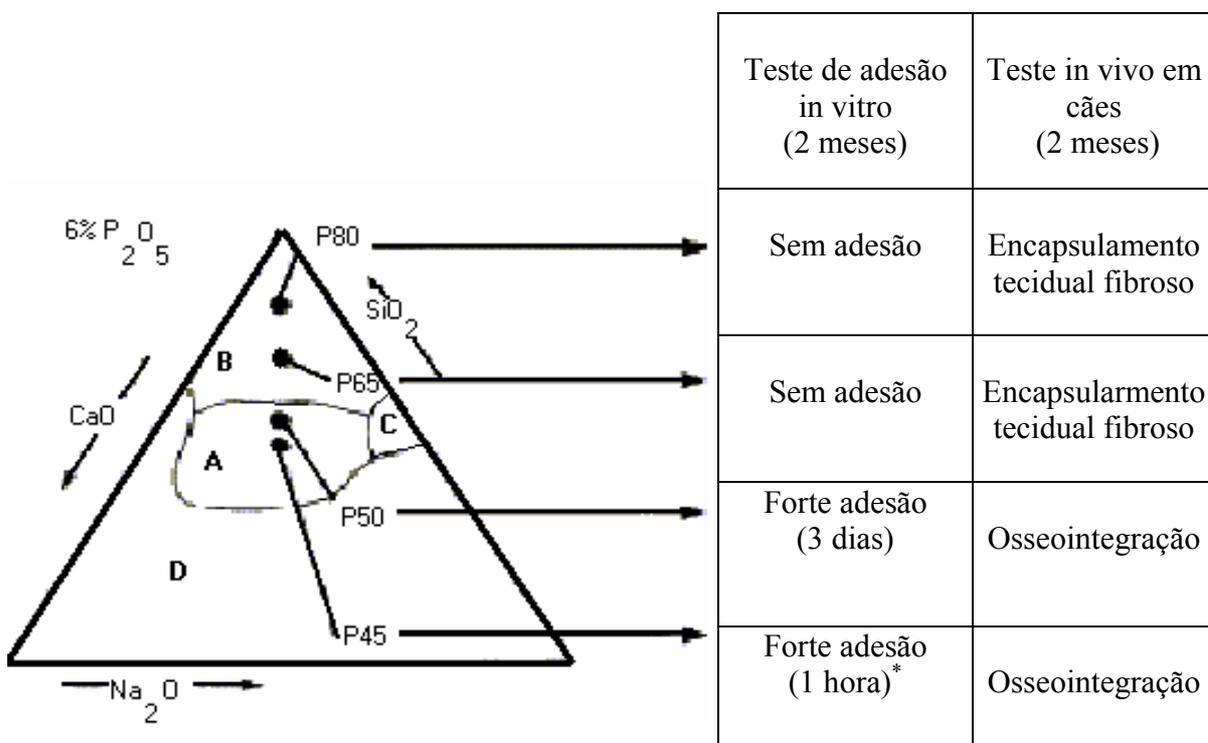


Figura 8: Diagrama de fases da bioatividade do biovidro onde se demonstra o efeito da composição na bioatividade. Região A = Bioativo; região B = bioinerte; região C = dissolução; região D = não formação de vidro [56]

Se o valor do parâmetro de Strnad for calculado pela equação II,

$$Y = 8 - 2R \quad (\text{II}),$$

onde R também é razão do número total de oxigênios pelo número total de cátions formadores de vidro, pode-se estabelecer uma relação entre o parâmetro e a bioatividade do vidro. Se $Y \geq 3$ não há bioatividade, se $Y < 3$ há bioatividade e o valor ideal para bioatividade é se $Y = 2$. Porém estes valores somente são válidos quando não estão presentes alguns compostos como o Al_2O_3 [58].

Os testes in vitro podem ser realizados através de imersão das amostras em soluções que simulam o plasma sanguíneo. Kokubo et al [58] desenvolveram uma solução que tem a composição química e pH próximo às concentrações do plasma sanguíneo. Esta solução é denominada de *Simulated Body Fluid* (SBF-K9). Após o desenvolvimento desta solução, foi possível aproximar as condições de bioatividade do organismo in vitro e, portanto, diminuir a necessidade de sacrifício de cobaias. As concentrações do SBF-K9 podem ser comparadas às concentrações do plasma sanguíneo através da Tabela 2.

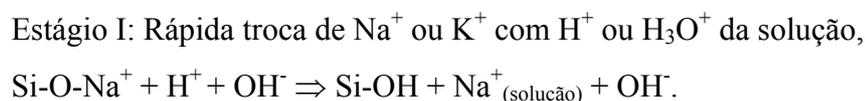
Tabela 2: Concentrações de íons (mM) no plasma e no SBF-K9 [59].

	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	HPO_4^-	SO_4^{2-}
Plasma	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	148,8	4,2	1,0	0,5

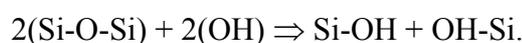
De acordo com Oliveira et al [13] os resultados conhecidos para os biovidro e cerâmicas vítreas geralmente sugerem que a precipitação da camada superficial rica em Ca e P é induzida pela presença de SiO_2 . Kokubo [59] também afirma que os íons silicato promovem um sítio favorável para nucleação da apatita na superfície. A formação de uma camada de hidrogel de sílica através de troca de íons cálcio por íons H_3O^+ do SBF acontece antes de formar a apatita e o hidrogel de sílica induz a nucleação da apatita. Uma vez formados os núcleos de apatita, estes crescem consumindo o cálcio e fósforo do SBF. O efeito catalítico da sílica hidratada é provado pela observação do gel de sílica pura produzido na técnica de sol-gel.

Peitl et al [15] explicam detalhadamente a bioatividade em cerâmicas vítreas do sistema $\text{SiO}_2 - \text{Na}_2\text{O} - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$. A formação da camada de HCA na superfície de materiais bioativos acontece através de reações que ocorrem no material em cinco

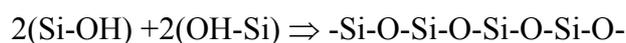
estágios. Estes estágios são mais rápidos para os maiores níveis de bioatividade. A Figura 9 é um diagrama onde estão demonstradas as reações dos estágios I a V. Estas reações que acontecem na superfície dos vidros bioativos também estão resumidas abaixo:



Estágio II: Perda da sílica solúvel na forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$ para a solução que é o resultado da quebra das ligações Si-O-Si e formação de Si-OH (silanóis) na interface vidro solução:



Estágio III: Condensação e repolimerização da camada rica em SiO_2 na superfície que é esgotada em álcalis e cátions de alcalinos:



Estágio IV: Migração de grupos Ca^{2+} e PO_4^{3-} para a superfície através da camada rica em SiO_2 formando um filme rico em $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ em cima da camada rica em SiO_2 , seguido do crescimento de um filme amorfo rico em $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ pela incorporação de cálcio solúvel e fosfato da solução.

Estágio V: Cristalização do filme amorfo de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ pela incorporação de OH^- , CO_3^{2-} da solução para formar uma camada mista de hidroxicarbonato de apatita.

Strnad [20] afirma que a camada de gel de fosfato de cálcio citada é inicialmente amorfa e gradualmente (1 –6 semanas) muda para uma camada policristalina de apatita. Após a cristalização a camada também incorpora componentes orgânicos, como o colágeno, por exemplo.

A camada bioativa apresenta diferentes taxas de adesão do osso aos implantes bioativos. Isto depende da composição química, fase vítrea, solubilidade etc. do enxerto. A adesão dos vidros bioativos da Classe A é obtida pela liberação de Si na forma de

ácido silícico devido à troca de íons e dissolução, o que rapidamente promove a formação da camada de sílica-gel que acelera a precipitação de fosfato de cálcio amorfo que, por sua vez, cristaliza rapidamente a HCA (1 – 10 horas em SBF-K9). Os biovidros da Classe B têm baixa ou nenhuma troca de íons e/ou dissolução e somente *forma HCA* acima de 100 horas em testes *in vitro* [55].

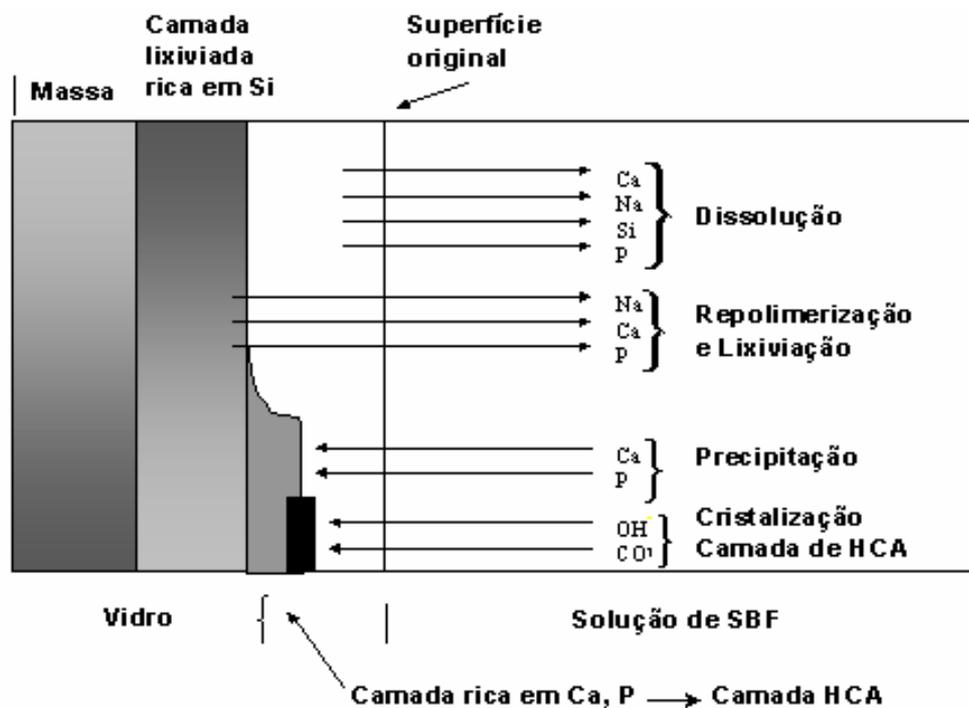


Figura 9: Diagrama dos estágios (I – V) das reações na superfície no vidro bioativo, formando uma dupla camada, uma rica em SiO_2 e outra em Ca-P [15].

2.5 ADSORÇÃO DE PROTEÍNAS

O plasma humano possui diversos tipos de proteínas. As proteínas extracelulares são as mais abundantes neste meio. Estas proteínas se resumem em fibrinogênio, imunoglobulinas e albumina. As primeiras são responsáveis pela coagulação do sangue e atuam em conjunto com outras substâncias. As imunoglobulinas são responsáveis pela defesa do organismo junto com os anticorpos. A albumina tem as funções de manter a pressão colóido-osmótica no plasma e carrear partículas insolúveis. A albumina é a proteína extracelular mais abundante no corpo humano, representando cerca de 58% do total de proteínas circulantes a uma concentração de 3 a 4,8 g.dL⁻¹[60,61]. Portanto, a

albumina é a proteína extracelular que terá maior contato com os implantes. A albumina, aparentemente, é a principal proteína envolvida na adsorção de vidro bioativos e é a primeira a circundar corpos estranhos, quando estes estão em contato com o sangue [62].

A adsorção da albumina deve apresentar um valor ótimo. Se a adsorção for muito intensa a proteína pode inibir a formação da camada rica em Ca-P, afetando a propriedade de bioatividade do vidro. Quando uma única proteína está numa solução e em contato com o substrato a taxa de adsorção depende do transporte da proteína para o substrato [63]. Geralmente, os vidros apresentam uma correlação entre o potencial-Z e adesão de albumina. O potencial-Z é uma função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. Isto ocorre porque quando materiais macroscópicos ou particulados entram em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície. Os vidros bioativos apresentam um valor do potencial-Z inferior aos vidros comuns, portanto quanto menor o valor do potencial-Z mais bioativo é o vidro. A correlação entre o potencial-Z dos vidros e a adesão específica é muito influenciada pelo pH da solução. Valores menores de pH levam a uma maior adsorção de albumina [64]. Por outro lado, o pH deve ser mantido em um intervalo de $7,2 < \text{pH} < 7,4$ que é importante para adesão e estabilização da camada de Ca-P sobre o vidro bioativo.

Os vidros bioativos apresentam cargas elétricas negativas nas suas superfícies. Isto é explicado pela rápida dissolução superficial de íons alcalinos do vidro que são imediatamente compensados por íons transportados na direção oposta. Esta perda de íons positivos deixa espaços não saturados e negativos na superfície. O equilíbrio entre as forças de atração elétrica vindas do corpo do vidro e o líquido circundante acontece com acúmulo de íons alcalinos positivos e prótons na superfície do vidro e na rede molecular. Esta neutralidade é temporária, pois a superfície acaba por ficar positiva devido a um acúmulo excessivo de íons positivos circundantes. A albumina tem cargas negativas e pode precipitar formando um novo recobrimento eletronegativo. A adesão eletrostática da albumina depende da concentração de grupos funcionais nesta e também é dependente das cargas adsorvidas na superfície do vidro, na maioria H^+ [62].

A albumina depois de adsorvida na superfície do vidro bioativo será usada como ponte entre os íons Ca^{2+} e PO_4^{-3} auxiliando na formação da camada de Ca-P. Esta conexão estabiliza a camada de Ca-P.

No presente trabalho foi utilizado somente a albumina como representante das proteínas extracelulares, porque em ensaios *in vitro*, a presença de diferentes proteínas na solução pode alterar o comportamento das mesmas, especialmente quanto à adesão em próteses. Isto pode ocorrer devido à interação entre as proteínas que competem por sítios de ligação. Além dos fatores citados anteriormente, como a concentração desta no sangue [64].

2.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE ALGUMAS TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

2.6.1 Difração de Raios-X

A Difração de Raios-X (DRX) é um método prático e eficiente para determinar a estrutura de compostos cristalinos. A incidência de um feixe raios-X sobre uma amostra pode causar uma interferência, construtiva ou destrutiva, caso os espaçamentos interplanares desta forem da mesma magnitude das ondas dos raios-X. O feixe de raios-X pode ser espalhado por um arranjo paralelo de planos interatômicos que possuem o mesmo índice de Miller (h,k,l) separados por uma mesma distância interplanar d_{hkl} . Se os feixes de raios-X, paralelos e em fase, incidirem nestes planos em um ângulo θ e satisfizerem a Lei de Bragg, equação III, pode-se relacionar o comprimento de onda dos raios-X e o espaço interatômico ao ângulo do feixe difratado e através das fichas JCPDS identificar o composto.

$$n\lambda = d_{hkl} \sin \theta \quad (\text{III}),$$

onde n é a ordem de reflexão (considerando um onda monocromática $n = 1$), λ é o comprimento de onda e $\sin \theta$ (ângulo entre o feixe e o plano) não excede a unidade.

Um difratômetro é um equipamento usado para determinar os ângulos onde ocorre a difração de uma amostra. A Figura 10 apresenta um desenho esquemático de

um goniômetro com a fonte de Raios-X e a amostra no centro. O aparelho consiste de uma fonte T de raios-X do qual partem feixes que incidem sobre uma amostra S, fixa em um eixo O, em diversos ângulos. Os feixes difratados são detectados por um contador C. A fonte, a amostra e o contador estão no mesmo plano [65,66].

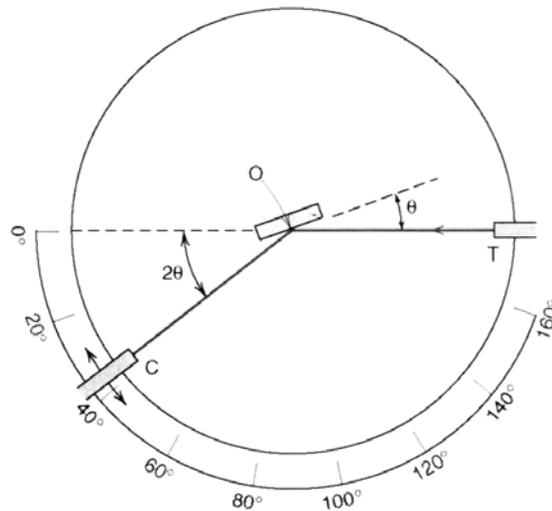


Figura 10: Diagrama esquemático de um difratômetro de Raios-X.

2.6.2 Análise da Distribuição Granulométrica

A análise granulométrica pode ser realizada através do método Coulter Counter. Um desenho esquemático deste equipamento é apresentado na Figura 11. Este equipamento consiste de um reservatório, onde está presente um líquido com as partículas a serem analisadas; neste reservatório há um pequeno tubo parcialmente mergulhado. Na parte inferior do tubo há um pequeno orifício de diâmetro conhecido. Um diferencial de pressão entre o interior e o exterior do tubo é criado, gerando um fluxo que obriga as partículas a passarem pelo orifício. No interior e no exterior do tubo estão mergulhados eletrodos de platina, que geram uma corrente elétrica que sofre uma maior ou menor alteração dependendo do tamanho de partículas que passam pelo orifício. Os orifícios dos tubos do Coulter Counter conseguem determinar partículas cujo diâmetro varia 2% a 40% do diâmetro do orifício, podendo medir partículas de no mínimo $0,7 \mu\text{m}$. Para analisar a granulometria com uma gama maior de diâmetros, são utilizados ao menos dois orifícios cujas amplitudes de determinação de diâmetros se sobreponham parcialmente. Por conseguinte, os resultados das duas séries são

matematicamente combinados para se obter a distribuição granulométrica completa da fração fina do pó [67].

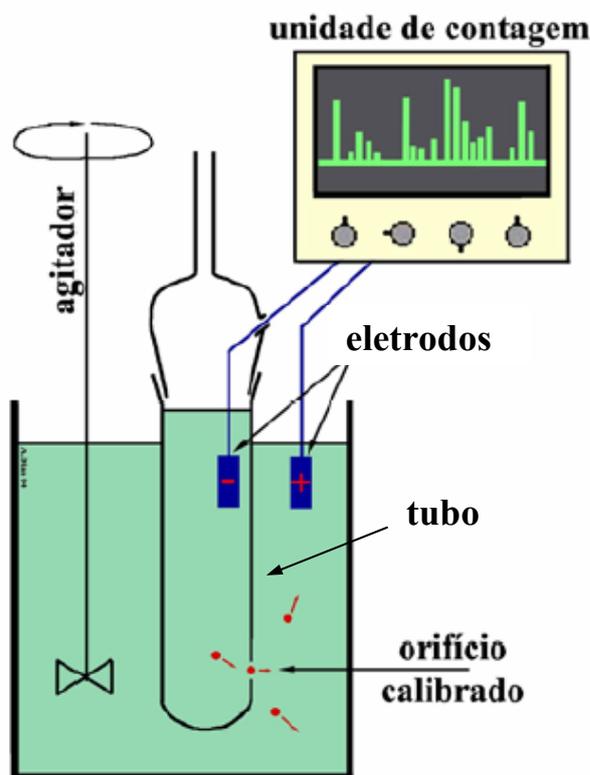


Figura 11: Esquema de funcionamento do Coulter Counter.

2.6.3 Análise da Área Superficial

A área superficial de pó pode ser calculada pelo volume de gás adsorvido na superfície do sólido. A área a ser medida, inclui toda a superfície acessível ao gás interna e externamente. Em geral, os sólidos adsorvem gases fracamente devido à presença somente das forças de Van der Waals. Para que os gases sejam suficientemente adsorvidos no sólido a fim de mensurar sua área superficial, os sólidos devem ser resfriados – normalmente até o ponto de ebulição dos gases. O nitrogênio é o gás mais freqüentemente usado e as partículas são resfriadas em nitrogênio líquido a -200°C . A adsorção é contínua até que a quantidade de N_2 adsorvida esteja em equilíbrio com a concentração da fase gasosa. Esta quantidade é próxima da necessária para cobrir toda a superfície usando uma pequena amostra [68]. Este método foi desenvolvido por Burnaeur, Emmet e Teller, portanto é conhecido por B.E.T.

2.6.4 Calorimetria Exploratória Diferencial

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) analisa as variações das fases da amostra através de diferenças no fluxo de calor na substância e em uma referência em função da temperatura. O equipamento para análise de DSC consiste em um fluxo de calor que passa pela amostra e pela referência através de um disco de Constantan termoelétrico. A amostra e a referência ficam dispostas em painéis de alumínio separadas e dispostas sobre plataformas que ficam sobre o disco de Constantan. O calor é transferido das painéis de alumínio para a amostra e para a referência. O fluxo diferencial de calor na amostra e na referência é monitorado por termopares localizados na área de junção da plataforma de Constantan e do disco de Chromel[®] conectados na parte inferior da plataforma. O fluxo diferencial de calor entre as duas painéis é diretamente proporcional à diferença de saída das duas junções dos termopares. A temperatura do termopar é medida através da junção Chromel/Alumel sob o disco da amostra. A Figura 12 ilustra um esquema de uma célula de DSC de fluxo de calor [65].

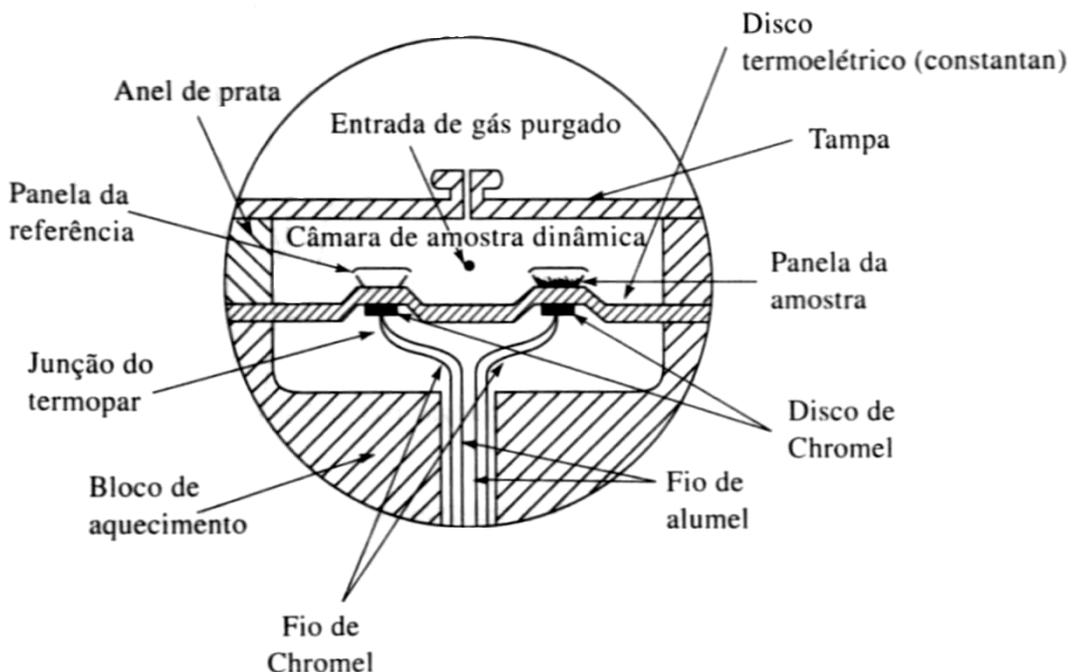


Figura 12: Esquema de uma célula de DSC de fluxo de calor.

2.6.5 Microdureza Vickers

A microdureza Vickers é realizada forçando um penetrador de diamante com geometria piramidal, contra a superfície da amostra. As cargas variam de 1 a 1000 g. A impressão resultante é observada através de Microscópio Ótico e os diâmetros do losango são medidos. As medidas são convertidas para um número índice de dureza através da equação IV,

$$HV = 1,854 P/d^2 \quad (IV),$$

onde P é a carga e d é o diagonal do losango [66].

2.6.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

O funcionamento do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) consiste basicamente de uma varredura de uma superfície sólida com um padrão de rastreamento através de um feixe de elétrons energéticos. Quando o feixe atinge a superfície da amostra, diversos sinais são produzidos por elétrons espalhados, secundários e Auger, fótons de fluorescência de raios-X e fótons de várias energias. Os elétrons secundários e retroespalhados são coletados e mostrados à mesma taxa de varredura sobre um tubo de raios catódicos [65].

A Figura 13 ilustra um esquema de um MEV ao qual também está acoplado um Espectrômetro de Energia Dispersiva ou *Energy Dispersive Spectroscopy* (EDS). O EDS acoplado ao MEV captura a energia dispersa pela amostra na forma de raios-X e analisa a composição das amostras. O mecanismo do MEV consiste, resumidamente, de um canhão de elétrons que emite feixes de intensidades diferentes. Os elétrons passam por lentes condensadoras, que são responsáveis pela intensidade do feixe de elétrons que chega à lente objetiva. Esta é responsável pelo tamanho do feixe que incide na amostra. A varredura é feita por dois pares de bobinas eletromagnéticas que estão dentro da lente objetiva. Cada par varre numa direção x ou y. Os sinais que vão para as bobinas são os mesmos sinais utilizados para dirigir a varredura horizontal e vertical do tubo de raios catódicos (CRT). A imagem mostrada é produzida usando-se a saída de um detector para controlar a intensidade do ponto no TRC. A amostra e o seu suporte estão localizados em uma câmara a vácuo. O suporte pode se movimentar nas direções x, y e z, além de girar ao redor destes eixos, podendo ser observados quase todos os ângulos

das amostras. As amostras somente são observadas quando conduzem eletricidade, devido ao fluxo livre de elétrons para terra que minimiza os artefatos associados ao acúmulo de carga. Portanto, as amostras não condutoras devem ser recobertas com um filme fino, mais comumente feito de ouro ou carbono [66].

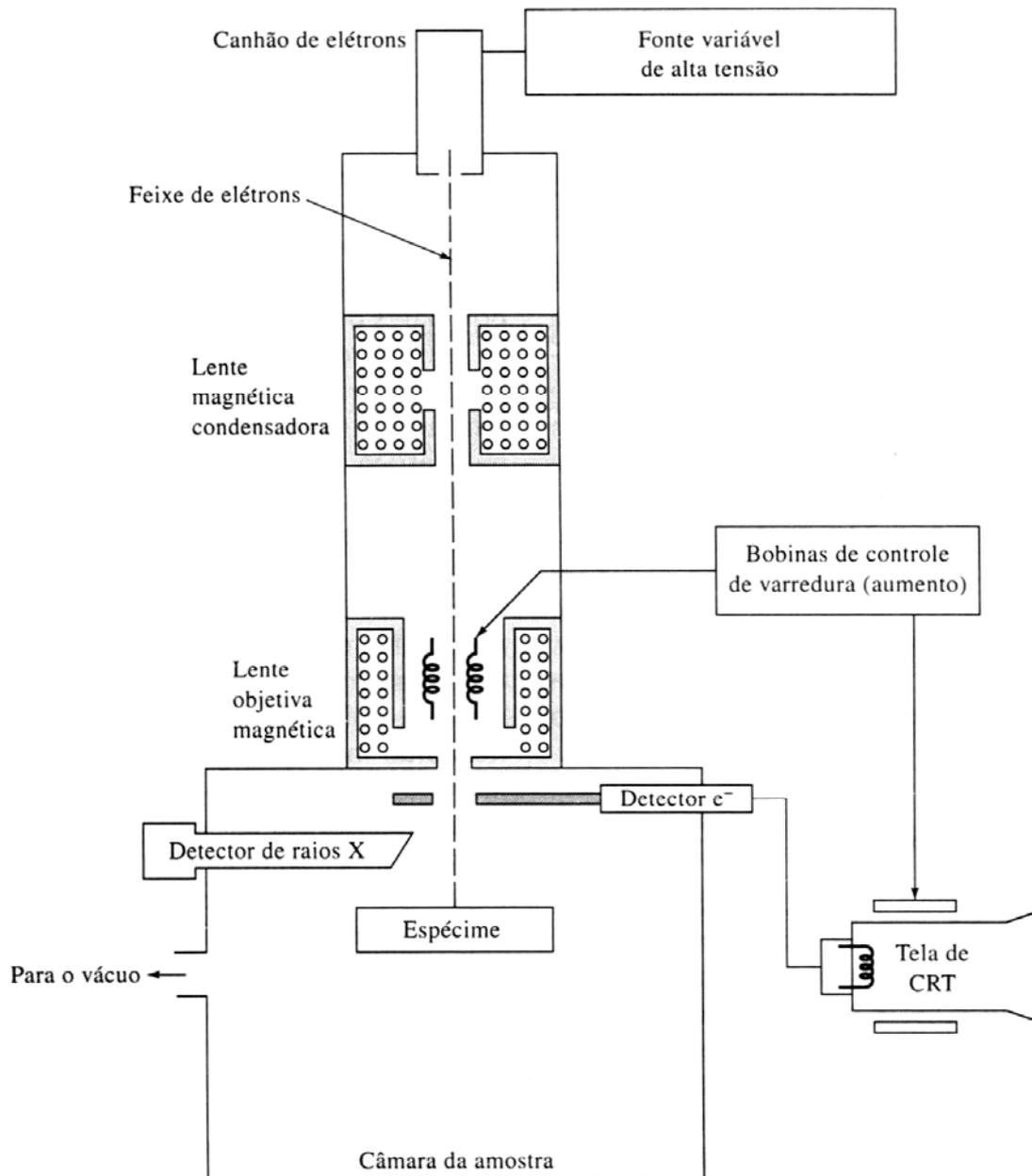


Figura 13: Esquema de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

2.6.7 Microscopia de Força Atômica

O Microscópio de Força Atômica (MFA) pertence à família dos Microscópios de Sonda que são os únicos microscópios que fornecem imagens tridimensionais em escala nanométrica. O MFA gera imagens através de movimentos sistemáticos de uma alavanca flexível na qual está fixada uma sonda triangular de 2 μm de comprimento. Na extremidade da sonda há uma ponta de silício, óxido de silício (SiO_2), nitreto de silício (Si_3N_4) ou carbono. Esta ponta mapeia a superfície da amostra em meio gasoso ou líquido, podendo, portanto, ser utilizado para caracterização *in situ*. A movimentação da ponta, ou às vezes da amostra, é conseguida com um tubo piezoelétrico. As forças de atração ou repulsão da superfície defletem a sonda, e esta deflexão é medida através da incidência de um feixe de laser que incide na ponta da sonda e reflete em um fotodiodo segmentado. Este pode medir as mudanças na incidência do laser, em ordens menores que 1 nm nas direções x, y e z. A saída do fotodiodo controla a força de aplicação da ponta, mantendo-a constante [69]. A Figura 14 mostra um esquema do funcionamento de um Microscópio de Força Atômica.

As imagens são obtidas pelos modos contato e não contato. No modo contato, a ponta se aproxima da superfície e é pressionada contra esta causando uma curvatura da sonda. Uma subdivisão do modo contato é o modo dinâmico que se divide em modo oscilatório, modo detecção de fase, modo modulação de força. No modo oscilatório a ponta da sonda toca a amostra de forma descontínua a uma frequência de ≈ 25 kHz; este é o modo dinâmico mais comum. Os modos detecção de fase e modulação de força seguem o mesmo princípio do modo oscilatório, mas podem medir a amplitude e a mudança de fases, respectivamente. Finalmente, no modo não-contato a ponta da sonda não toca a amostra e somente segue a topografia da amostra. Os modos dinâmicos permitem obter imagens de superfície frágeis, como células e proteínas, assim como o modo não-contato. A resolução das imagens no modo contato são superiores devido aos tipos de forças medida, que são forças de adesão e de cisalhamento. No modo não-contato são medidas as forças de Van der Waals, eletrostática e magnética. Nos modos modulação de força e detecção de fases são medidas as diferenças de propriedades visco-elásticas [69].

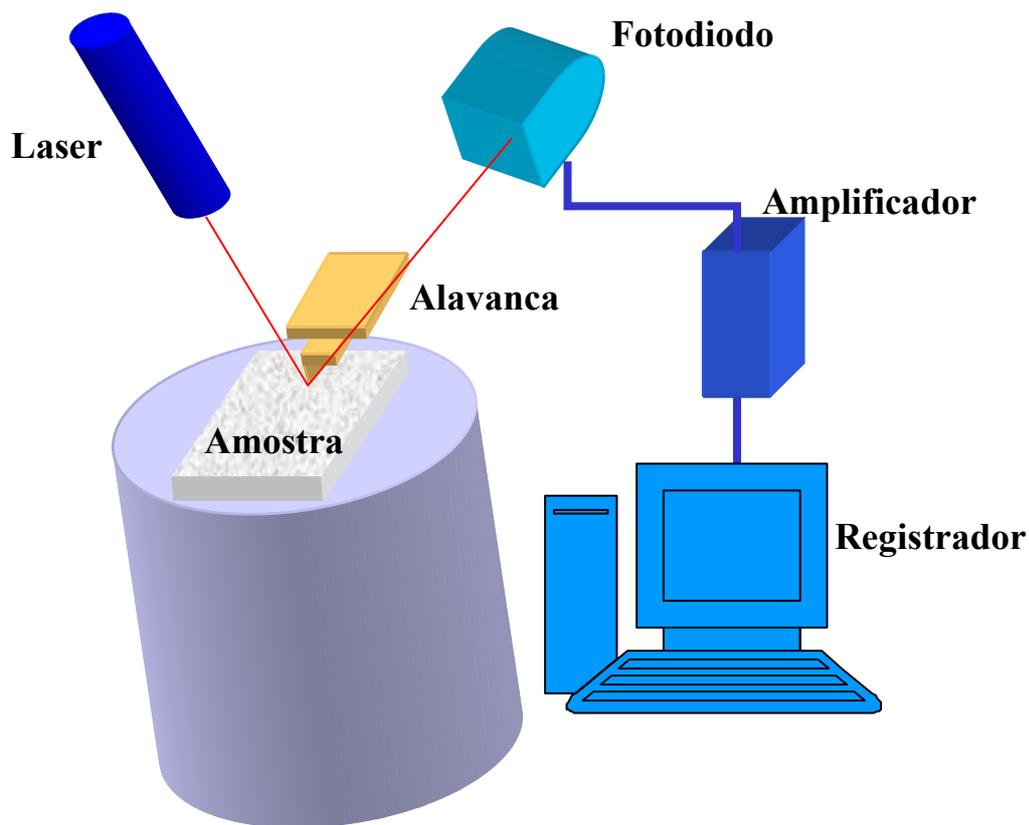


Figura 14: Esquema de um Microscópio de Força Atômica.

2.6.8 Espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado

A espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP) é uma das mais importantes técnicas para análise elementar devido aos baixos limites de detecção, alto grau de seletividade e à razoável precisão e exatidão. A parte mais importante do equipamento é a interface que acopla a tocha de plasma, que opera a pressão atmosférica, mas o espectrômetro de massa deve ser operado a pressões menores que 10^{-4} torr. A junção é obtida com um acoplador de interfaces de bombeamento diferencial o qual se resume a um cone de amostragem, que é um cone de níquel resfriado através de água com um pequeno orifício ($<1,0$ mm) em seu centro. O plasma gasoso quente é transferido através do orifício para uma região de pressão em torno de 1 torr, através de uma bomba mecânica, sofrendo, então, uma expansão e conseqüente resfriamento. Uma parte do gás passa para um outro cone através de um pequeno

orifício denominado *sRimmer* e depois para uma câmara com pressão de 10^{-4} torr. Nesta câmara, os íons positivos são separados dos elétrons e das espécies moleculares por um potencial negativo, acelerados e focalizados por uma lente magnética de íons seguindo então para o orifício de entrada de um analisador de massa quadripolar. A Figura 15 apresenta um esquema do sistema de um equipamento de ICP. Os limites de detecção dos elementos variam de 0,1 a 10 ppb e é capaz de detectar 90% dos elementos da tabela periódica. Os desvios-padrão relativos vão de 2 a 4% [65].

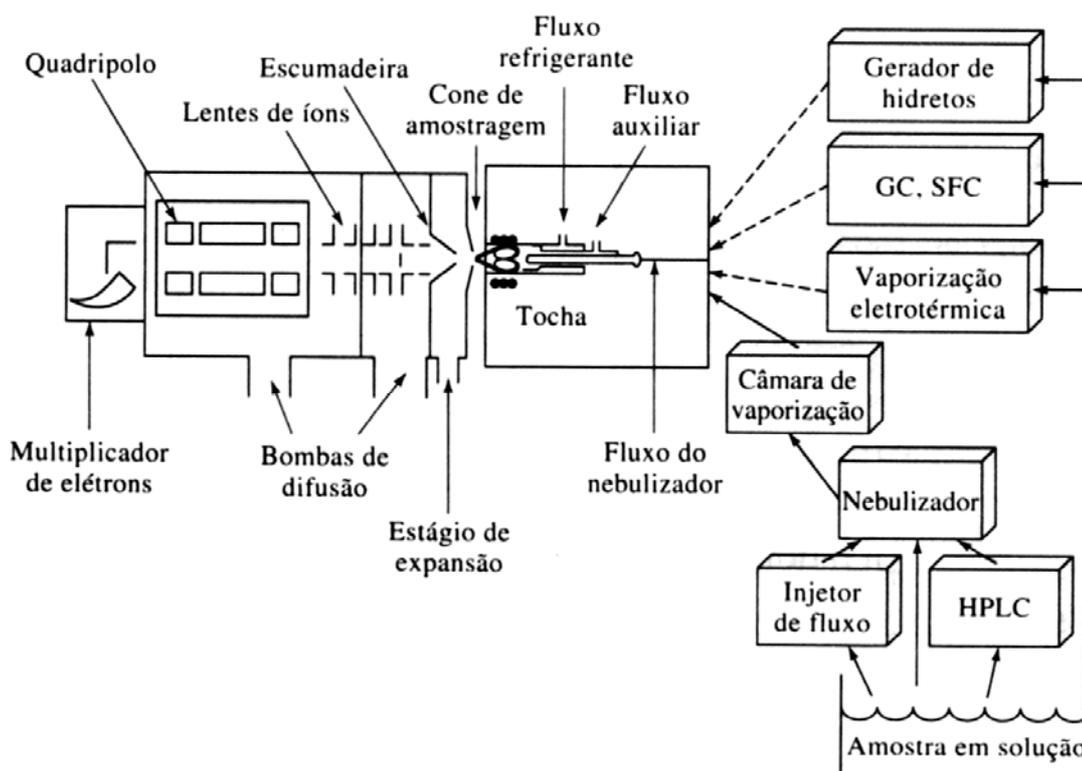


Figura 15: Desenho esquemático de um sistema ICP. As linhas tracejadas mostram a introdução da amostra gasosa; as linhas contínuas mostram a injeção das amostras líquidas.

CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA EXPERIMENTAL

A metodologia utilizada no presente trabalho pode ser resumida através do diagrama de blocos apresentado na Figura 16.

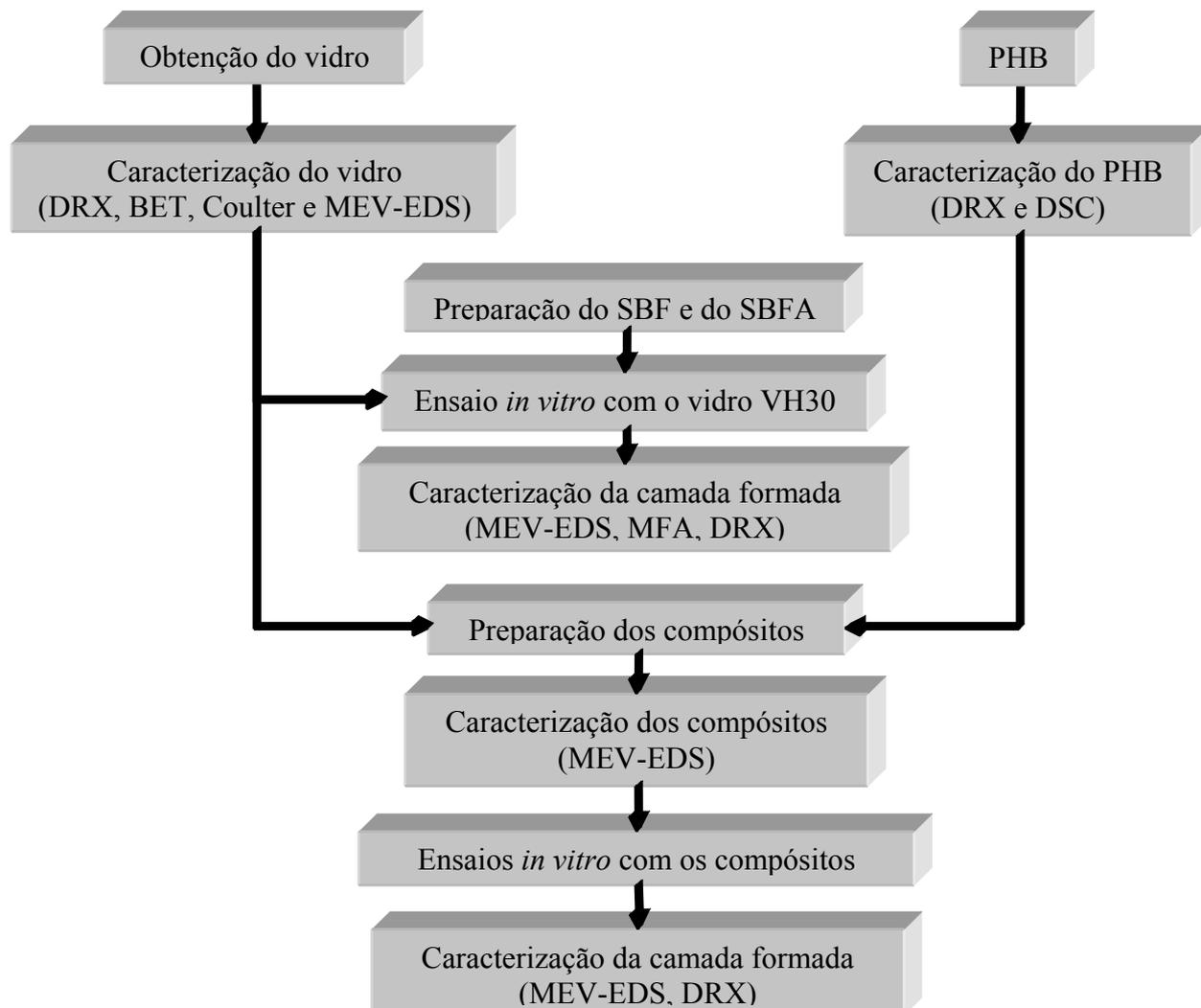


Figura 16: Fluxograma das etapas de preparação do vidro e dos compósitos vidro bioativo/PHB e ensaios envolvidos.

3.1 OBTENÇÃO DO VIDRO VH30

O vidro bioativo utilizado no presente trabalho pertence ao sistema $\text{SiO}_2\text{-3CaO.P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$, que quando apresenta a composição química da Tabela 3 é denominado VH30. A composição ponderal dos componentes do vidro bioativo VH30 foi determinada a partir do diagrama de fases ternário apresentado na Figura 4 e

indicada por uma seta no mesmo. Os reagentes utilizados foram SiO₂ (BDH), MgO (Fluka), CaCO₃ (Fluka) e Ca(H₂PO₄)₂ (Fluka).

Tabela 3: Composições ponderais do vidro bioativo VH30.

Tipo de Vidro	Composição Química (% em peso)		
	Ca ₃ P	SiO ₂	MgO
VH 30	40,44	32,76	26,80

A soma das massas dos reagentes necessários para obtenção do vidro bioativo resulta em 114,16 g. O cadinho de platina utilizado para confecção do vidro comportava apenas 100 g, portanto a massa total considerada foi de 80% desta. A Tabela 4 apresenta a massa dos reagentes utilizados para produção de 79,59 g de VH30.

Tabela 4: Massa dos reagentes para produção do VH30.

Reagentes (g)			
SiO ₂	MgO	CaCO ₃	Ca(H ₂ PO ₄) ₂
26,21	21,44	18,95	24,60

O óxido de silício (SiO₂) utilizado foi levado a um moinho de ágata (marca Retsh MR100) por 60 minutos para diminuição do tamanho das partículas. Devido a perda durante a moagem, 10% a mais de SiO₂ foi acrescentado antes de levar ao moinho. E após a moagem foi pesado novamente.

Os reagentes foram pesados em balança analítica AND HF-300G, colocados em um béquer e misturados mediante a adição de álcool etílico a 96%. A pasta obtida foi colocada em um recipiente de ágata e levada a um moinho planetário (marca Fritsh Pulverisette com bolas de ágata) por 45 minutos com a finalidade de homogeneização. Após este período a amostra foi colocada em estufa (marca Memmert) a 60°C por no mínimo 24 horas para secagem e eliminação do álcool. A amostra, após seca, foi remexida para desagregação do pó.

A fusão do vidro foi realizado em um forno cilíndrico (marca Termolab) previamente aquecido a 1500° C, por ao menos uma hora para a estabilização da temperatura do mesmo. O cadinho de platina com a mistura foi colocado no forno e deixado por 1 hora para fusão completa. Após este período, o líquido foi vazado

rapidamente em um recipiente com água para resfriamento imediato; obtendo-se assim uma frita.

A amostra de vidro foi separada da água e deixada em uma estufa (marca Memmert) para secagem por 24 horas. A amostra foi moída em moinho de ágata durante uma hora para diminuição do tamanho de partícula. Após a moagem, o vidro em pó foi peneirado manualmente utilizando uma malha de 30 μm e colocado em um recipiente para armazenamento para uso posterior. O restante foi peneirado novamente com uma malha de 71 μm e simplesmente armazenado. O retido na peneira foi descartado devido ao grande tamanho das partículas.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO VIDRO VH30

3.2.1 Difração de Raios-X (DRX)

O vidro bioativo foi submetido à Difração de Raios-X para avaliar o grau de cristalinidade do mesmo. A Difração de Raios-X foi realizada em um difratômetro (Rigaku PMG-VH), sob radiação de Cu $K\alpha$ a 40 kV e a 30 mA, variando o ângulo de difração de 10 a 80°.

3.2.2 Análise granulométrica

Para as análises das partículas do vidro procedeu-se o teste de Coulter Counter (LS 230 Particle Size Analyzer) em água como fluido e amplitude de cálculo de 0,04 a 2000 μm .

3.2.3 Análise da área superficial das partículas

Para avaliação da área superficial das partículas do vidro VH30 procedeu-se teste B.E.T. (Burnaeur-Emmet-Teller) (Gemini 2370 V5.00) em uma amostra de 0,7275 g de vidro em uma atmosfera de hélio com resfriamento através de nitrogênio líquido. A taxa de evacuação foi de 300 mm Hg/min com pressão de saturação de 786 mm Hg e o modo de análise foi por equilíbrio das fases.

3.3 POLIHIDROXIBUTIRATO

O polímero utilizado foi o poli(3-hidroxiбутирато) produzido pela PHB Industrial S.A. apresentando uma porcentagem de hidroxivalerato na estrutura inferior a 3%. O PHB foi produzido através do método biosintético utilizando bactérias *Burkholderia sacchari* sob deficiência de nitrogênio. A massa molar é cerca de 250.000 g/mol.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO POLIHIDROXIBUTIRATO

3.4.1 Difração de Raios-X

O PHB foi submetido à DRX para avaliar a sua cristalinidade do mesmo modo que o vidro bioativo. A Difração de Raios-X foi realizada em um difratômetro (marca Rigaku PMG-VH), sob radiação de Cu K α a 40 kV e a 30 mA, variando o ângulo de difração de 10 a 80°.

3.4.2. Calorimetria Exploratória Diferencial

A DSC foi realizada em um calorímetro (marca DSC-200 Netzsch Gerätebau) sob atmosfera de nitrogênio, com taxa de aquecimento e resfriamento de 20°C/min. As medições foram realizadas durante a fase de aquecimento.

3.5 PRODUÇÃO DO COMPÓSITO VIDRO BIOATIVO/PHB

Foram preparadas amostras com 2 composições diferentes do compósito como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5: Composição dos compósitos vidro bioativo PHB.

Compósitos	Vidro bioativo (% em peso)	PHB (% em peso)
40Bio/60PHB	40	60
30Bio/70PHB	30	70

O 40Bio/60PHB foi preparado adicionando acetona a 400 mg de vidro bioativo. A mistura foi colocada em agitação e adicionou-se PHB paulatinamente até a quantidade de 600 mg. Após a homogeneização da mistura, o compósito foi seco em

estufa a 60°C (marca Memmert) por 24 horas. Foram preparadas 7 amostras do compósito. As amostras foram colocadas separadamente em um molde cilíndrico e levadas a uma prensa hidráulica a quente (marca Carvers Laboratory Press modelo C) para confecção das pastilhas. Após o aquecimento do molde cilíndrico a 160°C, as amostras foram prensadas com carga de 3 000 kg por 30 minutos. Após este período, as amostras foram retiradas do molde e colocadas em um frasco plástico.

O mesmo procedimento foi realizado para o compósito 30Bio/70PHB, porém as quantidades de vidro bioativo foram de 300 mg e do polímero foram de 700 mg.

3.6 ENSAIO DE MICRODUREZA VICKERS DOS COMPÓSITOS

Uma amostra de cada compósito foi separada para o ensaio de microdureza Vickers. As amostras foram lixadas e polidas com lixas de granulometrias de 120, 500, 800 e 1200. A limpeza das amostras foi realizada mergulhando-as em água destilada e levando a cuba de ultra-som por 20 minutos. A secagem foi realizada com papel absorvente. Cada amostra teve 20 medidas de microdureza, tomando o cuidado para que as medidas fossem realizadas em áreas que abrangiam tanto a matriz como o reforço. O microdurômetro da marca Shimadzu Type M foi utilizado e a carga 300 g por 15 segundos foi aplicada.

3.7 ESTUDO DA BIOATIVIDADE *IN VITRO* DO VIDRO BIOATIVO

3.7.1 Preparação do *Simulated Body Fluid* (SBF)

A preparação da solução do SBF foi efetuada em um béquer utilizando 500 mL de água ultra-pura em agitação, onde adicionou-se os reagentes obedecendo-se a seqüência observada na Tabela 6. O pH foi corrigido com HCl 1N para pH = 7,35. O conteúdo foi passado a um balão volumétrico, onde se fez a quantidade de 1 L com água ultra-pura. Após agitação do balão o conteúdo foi passado para outro frasco e conservado em geladeira.

Tabela 6: Seqüência e quantidade de reagentes para preparação do SBF [59].

Ordem	Reagentes	Para 1 L de solução (g)
1	NaCl	7,996
2	NaHCO ₃	0,35
3	KCl	0,224
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,228
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,305
6	HCl	40 mL (\approx 90% total)
7	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,548
8	Na ₂ SO ₄	0,071
9	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ = C ₄ H ₁₁ NO ₃	6,057

3.7.2 Ensaio da bioatividade *in vitro* do vidro bioativo VH30 em SBF sem albumina

Amostras de aproximadamente 2 g de vidro bioativo VH30 com partículas menores que 30 μ m foram imersas nas soluções de SBF previamente colocadas em 7 frascos diferentes. As amostras foram esterilizadas através de radiação UV por 20 minutos em capela de fluxo laminar. Após a esterilização os frascos foram colocados em estufa (marca Heraeus Function Line) a 37°C por períodos de 2 e 7 horas, 3, 7, 14, 21 e 30 dias. Após estes períodos as soluções foram separadas do vidro para análise da possível troca iônica SBF/vidro bioativo. Esta análise foi realizada via Espectroscopia de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP). As amostras de vidro bioativo foram levadas à estufa a 60°C para secagem. Os pós secos foram levados para caracterização via Difração de Raios-X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Varredura acoplado com Espectroscopia de Energia Dispersiva (MEV-EDS).

3.7.3 Ensaio da bioatividade *in vitro* do vidro bioativo VH30 em SBF com albumina

Amostras de 2 g de vidro bioativo VH30, com o tamanho de partícula menor que 30 μ m, foram imersas em SBF contendo 2 g de albumina de ovo desidratada (marca MidWay). A solução mais o vidro bioativo foram mantidos em 2 frascos diferentes. Estes frascos contendo as amostras também foram esterilizados, seguindo o mesmo procedimento do item 3.7.2. Os frascos também foram colocados em estufa, porém

foram mantidos por 7 e 14 dias apenas. A separação e acondicionamento dos pós foram realizados conforme citado no item 3.7.2. Após então, as soluções foram descartadas.

3.7.4 Ensaio da bioatividade *in vitro* dos compósitos vidro bioativo/PHB em SBF.

As amostras dos compósitos 30Bio/70PHB e 40Bio/60PHB foram cortadas ao meio no sentido transversal, limpas em ultra-som em água destilada por 20 minutos e posteriormente secas a temperatura ambiente. Estas apresentaram a forma de pastilhas com diâmetro de 5 mm e espessura de 10 mm. Seis pastilhas do compósito 30Bio/70PHB e seis do compósito 40Bio/60PHB foram colocadas em 12 frascos diferentes contendo SBF. O conjunto frasco/amostra também foi esterilizado seguindo o procedimento citado no item 3.7.2. Devido às amostras serem em formato de pastilha, houve a necessidade de esterilizá-las em ambos os lados. Após a esterilização os frascos foram levados para estufa (marca Heraeus Function Line) a 37°C e mantidos por 2 e 7 horas, 1, 3, 7 e 14 dias. Após estes períodos as amostras foram retiradas das soluções e secas a temperatura ambiente. Estas amostras foram caracterizadas via DRX e MEV-EDS. As soluções foram conservadas em geladeira a 5°C para posterior análise via ICP.

3.7.5 Caracterização via MEV-EDS do vidro bioativo após imersão em SBF.

As amostras de vidro bioativo após imersão em SBF foram coladas em um suporte e recobertas com carbono (metalizadora da marca Emitech K950). Após o recobrimento, as mesmas foram levadas para observação em MEV (marca Hitachi S4100). A análise química das superfícies foi realizada através de EDS (marca Rontec).

3.7.6 Caracterização via MFA do vidro bioativo após imersão em SBF.

A preparação das amostras de vidro bioativo para observação em Microscopia de Força Atômica (MFA) foi realizada usando uma gota de acetato polivinílico em quatro diferentes lâminas de vidro, que foram espalhadas com auxílio de outra lâmina. Os pós do vidro bioativo após imersão em SBF e SBFA foram dispersos sobre a cola e

aguardou-se a polimerização da mesma. A análise por MFA foi realizada em um equipamento da marca Park Scientific Instruments com ponta de Si_3N_4 e uma alavanca com uma constante de mola de 0,26 N/m em modo não-contato foi empregado para observação das amostras.

3.7.7 Difração de Raios-X do vidro bioativo após imersão em SBF e SBFA

Após imersão em SBF e SBFA as amostras de vidro bioativo foram submetidas à Difração de Raios-X para avaliar a composição química e a cristalinidade da camada formada sobre as amostras. A Difração de Raios-X foi realizada em um difratômetro (marca Rigaku PMG-VH), sob radiação de $\text{Cu K}\alpha$ a 40 kV e 30 mA.

3.7.8 Caracterização via MEV-EDS dos compósitos após imersão em SBF.

As amostras dos compósitos após imersão em SBF foram coladas em um suporte e recobertas com carbono (metalizadora da marca Emitech K950). Após o recobrimento as mesmas foram levadas para observação em MEV (marca Hitachi S4100). A análise química das superfícies foi realizada através de EDS (marca Rontec).

3.7.9 Difração de Raios-X dos compósitos após imersão em SBF

Após imersão em SBF os compósitos foram submetidos à Difração de Raios-X para avaliar a composição e cristalinidade da camada formada sobre as amostras. A Difração de Raios-X foi realizada em um difratômetro (marca Rigaku PMG-VH), sob radiação de $\text{Cu K}\alpha$ a 40 kV e 30 mA.

3.7.10 Espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP) do SBF no qual foram imersas as amostras dos compósitos

As 6 soluções de SBF nas quais foram imersas as amostras dos compósitos por 2 e 7 horas, 1, 3, 7 e 14 dias foram também analisadas por Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP) (marca Jobin-Yvon JY70 Plus Spectrometer) para avaliar as variações nas concentrações dos íons Ca, P, Si e Mg nas soluções.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Difração de Raios-X do Vidro VH30 e do PHB

A Figura 17 apresenta os resultados da DRX do vidro bioativo VH30 antes do estudo *in vitro*. A natureza amorfa do vidro bioativo foi confirmada pela ausência de picos cristalinos definidos no espectrograma [70]. A Figura 18 apresenta o difratograma do DRX para o PHB, também antes da imersão em SBF. Picos característicos de PHB podem ser observados neste difratograma (identificados através das fichas do JCPDS – *Joint Committee of Powder Diffraction Standards*), assim como no trabalho de Ni e Wang [51].

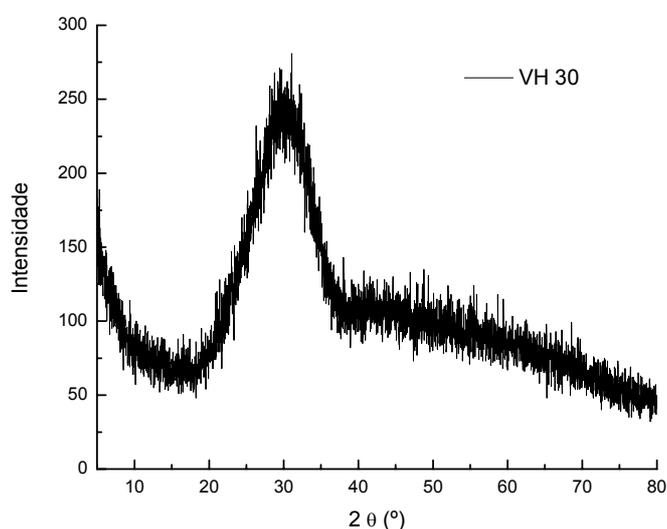


Figura 17: Difratograma do vidro bioativo VH30 como preparado.

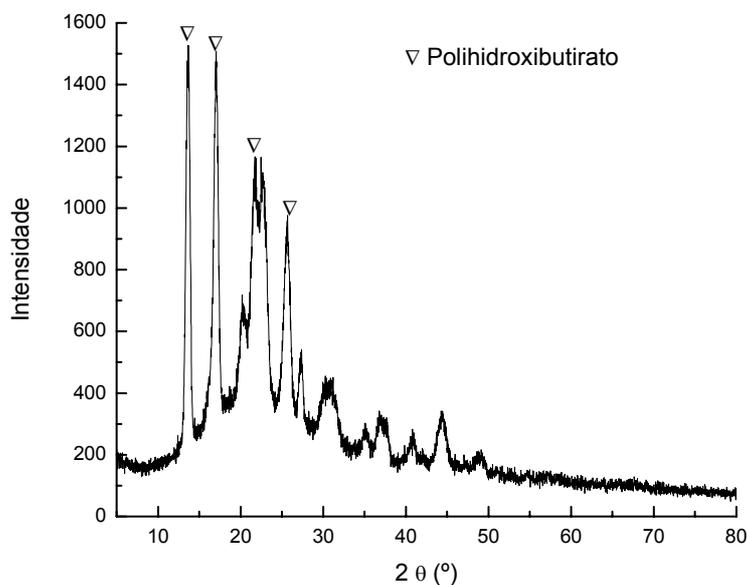


Figura 18: Difratograma do PHB como preparado.

4.2 Análise dos Tamanhos de Partícula por Coulter Counter

O tamanho médio das partículas do vidro bioativo, encontrado pelo analisador de partículas Coulter Counter, foi de $10,5 \pm 9,4 \mu\text{m}$. Este valor apresentou um alto desvio-padrão, o que pode promover uma distribuição híbrida das partículas de reforço no compósito. A distribuição híbrida aumenta a possibilidade de haver partículas de reforço (vidro bioativo) em qualquer parte do compósito, diminuindo assim a chance de propagação de uma fratura [71]. Portanto, as propriedades mecânicas dos compósitos híbridos são superiores aos compósitos monomodais e bimodais. O tamanho médio das partículas encontrado no presente trabalho está de acordo com os valores encontrados por outros autores [39, 51]. O valor de $10,5 \pm 9,4 \mu\text{m}$ é próximo do tamanho médio de partículas de fosfato tricálcico (TCP) em compósitos TCP/PHB ($4,4 \mu\text{m}$) utilizado por Wang et al [39] e ligeiramente inferior às partículas de HA em compósitos HA/PHB ($24,5 \mu\text{m}$) usado por Ni e Wang [51]. Os compósitos produzidos por estes autores com estes valores de tamanho de partículas apresentaram bioatividade. Porém, há outros fatores determinantes da bioatividade.

Jaakkola et al [72] concluíram que a quantidade de vidro bioativo e o tamanho de partículas influenciam a bioatividade dos compósitos. Segundo estes autores, partículas de tamanhos maiores e uma grande quantidade de reforços apresentam menor bioatividade do que em compósitos com partículas de tamanhos menores e uma quantidade de reforços intermediários. Jaakkola et al [72] utilizaram porcentagens de 40, 60 e 70 de vidro bioativo com tamanhos de partículas maiores que $45 \mu\text{m}$ e de 90 a $135 \mu\text{m}$ em compósitos ε -caprolactona-*co*-DL-lactato/vidro bioativo. Todavia, Ni e Wang [51] produziram compósitos HA/PHB com porcentagens inferiores de HA (10, 20 e 30%) e obtiveram uma boa formação de camada de apatita em todas as porcentagens, o que indica uma alta bioatividade com menor quantidade de reforço. Como foi citado anteriormente (Cap. II item 2.3) o volume de reforço tende a ser ótimo entre 30 e 40% no que tange a bioatividade [37,54].

4.3 Análise da Área Superficial do Vidro VH30 por BET

Os testes feitos através do BET indicam valores de área superficial de $0,7583 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ para o modo multiponto e valores de $0,6685 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ no modo ponto simples. Ambos os valores estão de acordo com os valores encontrados por Rosengren et al [73] para a zircônia, alumina, e hidroxiapatita, o que indica uma grande área reativa, aumentando a capacidade de uma formação da camada rica em Ca-P. De acordo com Zhong et al [74], somente vidros bioativos com áreas superficiais maiores que $40\text{-}80 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ poderiam induzir a formação de uma camada de HCA, por fornecerem um alta concentração de grupos silanóis na superfície. No entanto, Krajewski et al [62] comparando vidros bioativos com vidros comuns com áreas superficiais entre $0,083$ e $0,255 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ concluíram que os vidros bioativos, mesmo com áreas menores, ainda apresentam bioatividade. A área superficial depende dos tamanhos e das formas das partículas. As partículas de vidro freqüentemente apresentam a forma irregular tipo II como foi citado anteriormente (Cap. II item 2.3), então comparativamente, a área superficial dos vidros depende mais dos tamanhos de partículas do que da forma destas.

4.4 Calorimetria Exploratória Diferencial

A Figura 19 apresenta o termograma de fusão do PHB, na qual pode ser observado um pico simples de ponto de fusão. A temperatura de fusão do PHB utilizado é cerca de 162°C . Yoshie et al [75] usando algumas misturas de copolímeros polihidroxibutirato-hidroxivalerato (PHB-HV) encontrou diferentes pontos de fusão entre os polímeros. A temperatura de fusão encontrada para o PHB empregado no presente trabalho é próximo dos valores do encontrado para PHB-6%HV (167°C), que é superior ao ponto de fusão do PHB-13%HV (147°C) e inferior do que para o PHB puro (175°C). Este comportamento do PHB utilizado é devido à presença do copolímero hidroxivalerato (HV) que, mesmo em porcentagens menores do que 3%, apresentou o ponto de fusão próximo do copolímero PHB-6%HV estudado por Yoshie et al [75]. O resultado do DSC permitiu obter o valor do ponto de fusão do polímero para se poder aplicar a temperatura apropriada para a confecção do compósito através de prensa a quente.

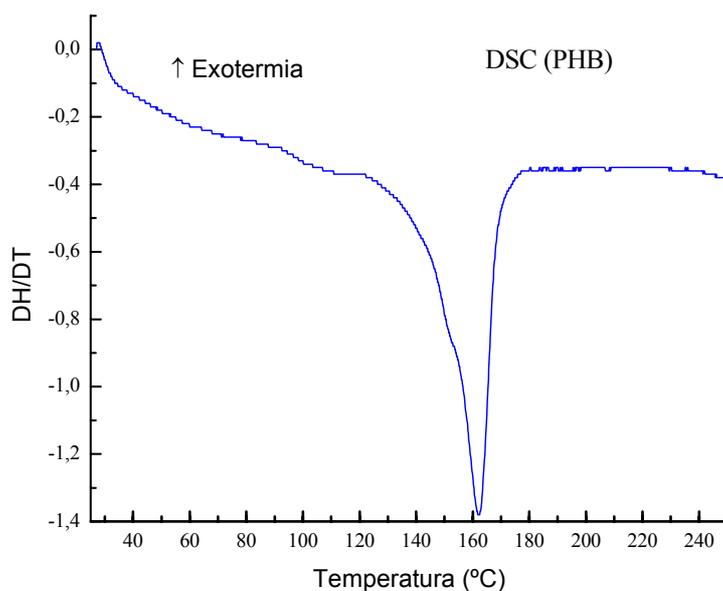


Figura 19: DSC do PHB como preparado.

4.5 Microdureza Vickers

Os resultados da microdureza Vickers estão apresentados na Tabela 7. Os resultados de microdureza Vickers para os compósitos 30Bio/70PHB e 40Bio/60PHB são superiores aos valores encontrados por Chen e Wang [50] em compósitos TCP/PHB e HA/PHB (ambos com 30% de reforço) devido à maior dureza do próprio vidro. Os valores de microdureza Vickers encontrados por estes autores foram 10.18 ± 0.16 (HV) para o TCP/PHB e 15.73 ± 0.44 (HV) para o HA/PHB. Os resultados encontrados neste trabalho foram similares aos valores obtidos por Wang et al [39] em compósitos TCP/PHB (24.66 ± 1.05 HV). De acordo com Wang [38] e Doyle et al [37] uma maior quantidade de cerâmica produz uma maior dureza do material e há uma estreita relação entre a microdureza de Vickers e o Módulo de Young. Além disso, as quantidades de HA também podem afetar a bioatividade do material. Estes autores mencionam que a bioatividade é aumentada quando as porcentagens de cerâmica estão entre 20 e 40%. Porém, esta quantidade de cerâmica pode não fornecer a propriedade mecânica desejada, para que isso ocorra há a necessidade de se aumentar a quantidade de reforço. No entanto não foram encontradas diferenças de microdureza Vickers entre os compósitos 30Bio/70PHB e 40Bio/60PHB.

Tabela 7: Resultados das medidas de microdureza Vickers nos compósitos vidro bioativo/PHB.

Compósito	Microdureza (HV)
30Bio/70PHB	24,6 ± 3,0
40Bio/60PHB	23,6 ± 2,5

4.6 Caracterização do vidro VH30 através de MEV

A Figura 20 apresenta uma imagem de MEV do vidro bioativo VH30 como preparado. Nesta imagem pode-se observar que a partícula se apresenta com ângulos vivos, indicados pela seta e com superfície relativamente lisa. A Figura 21 apresenta uma micrografia do vidro após 2 horas imerso em SBF. Nesta imagem pode-se verificar que com o tempo de 2 horas já ocorreu uma degradação da superfície, apontado pela seta; indicando uma alta reatividade do material quando imerso em SBF. As Figuras 22, 23, 24 e 25, são imagens de MEV do vidro bioativo após imersão em SBF por 7, 14, 21 e 30 dias, respectivamente. Nestas imagens pode-se observar que a degradação foi gradativa na superfície do vidro. Não são observadas formações de uma camada rica em Ca-P em nenhuma delas. Este fato pode estar relacionado à alta reatividade da superfície do vidro, pois a camada pode ter se formado e logo em seguida ter se destacado. Pereira et al [76] encontrou comportamento semelhante em vidros bioativos VH41 que têm composição muito próxima do VH30. No entanto, os autores observaram um claro destacamento da camada de Ca-P formada nas amostras do vidro bioativo em placas, que são menos reativas do que o pó.

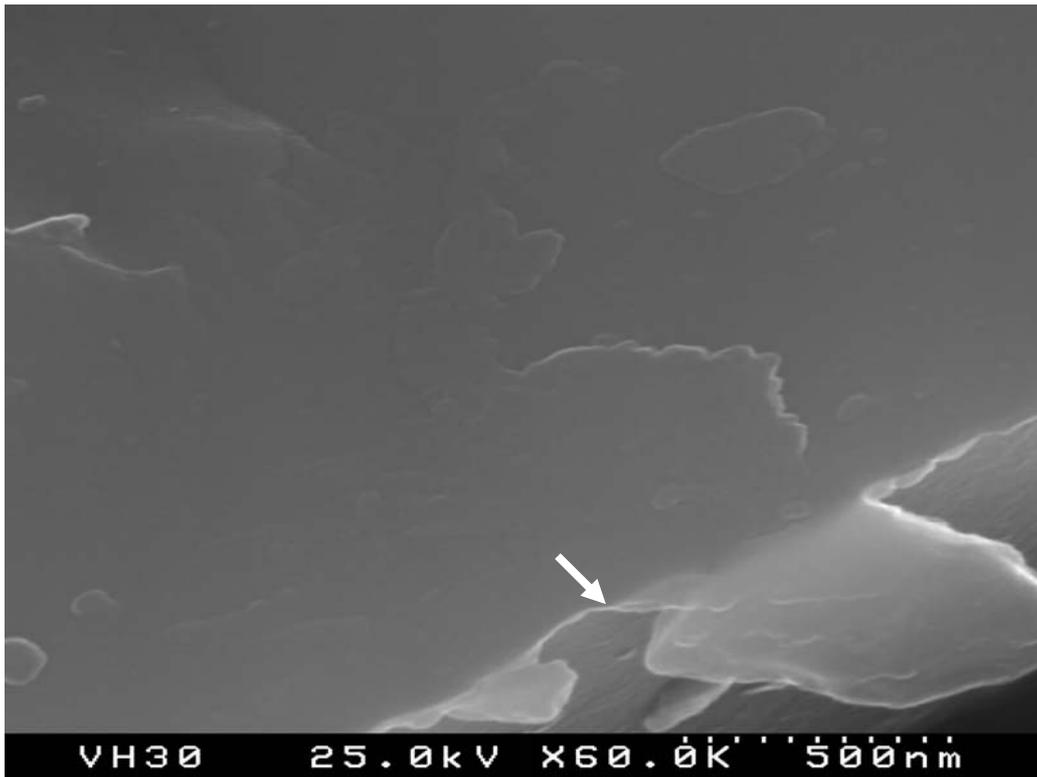


Figura 20: Fotomicrografia de MEV do Vidro bioativo VH30 como preparado.

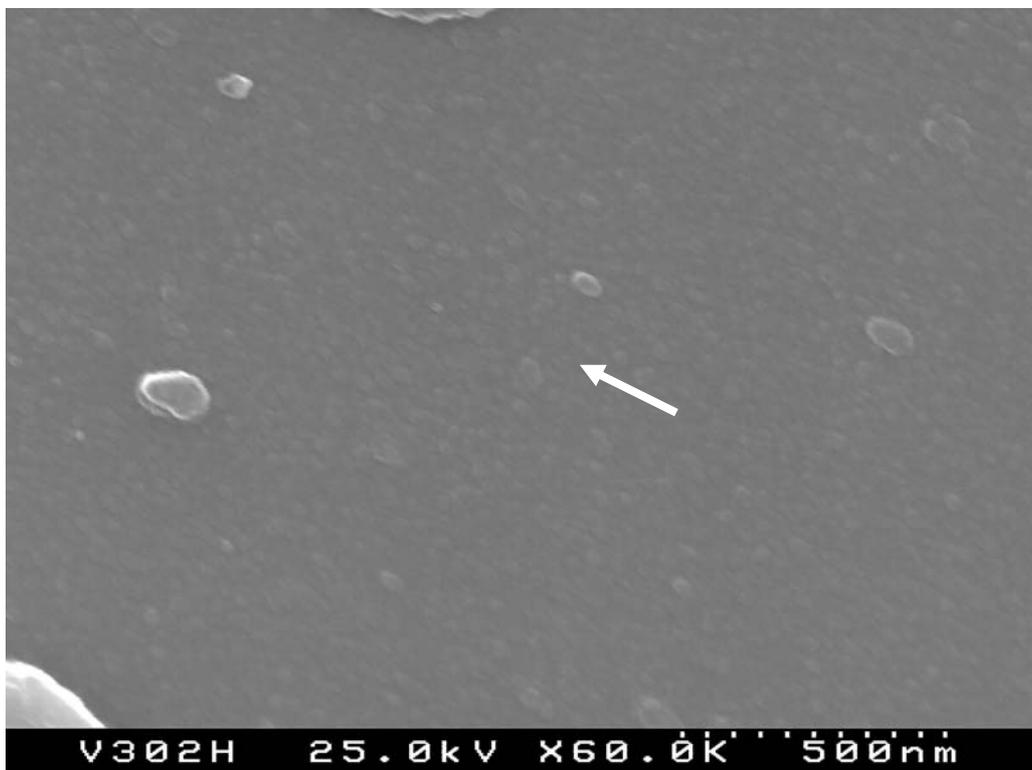


Figura 21: Fotomicrografia de MEV da superfície do vidro bioativo após imersão em SBF por 2 horas.

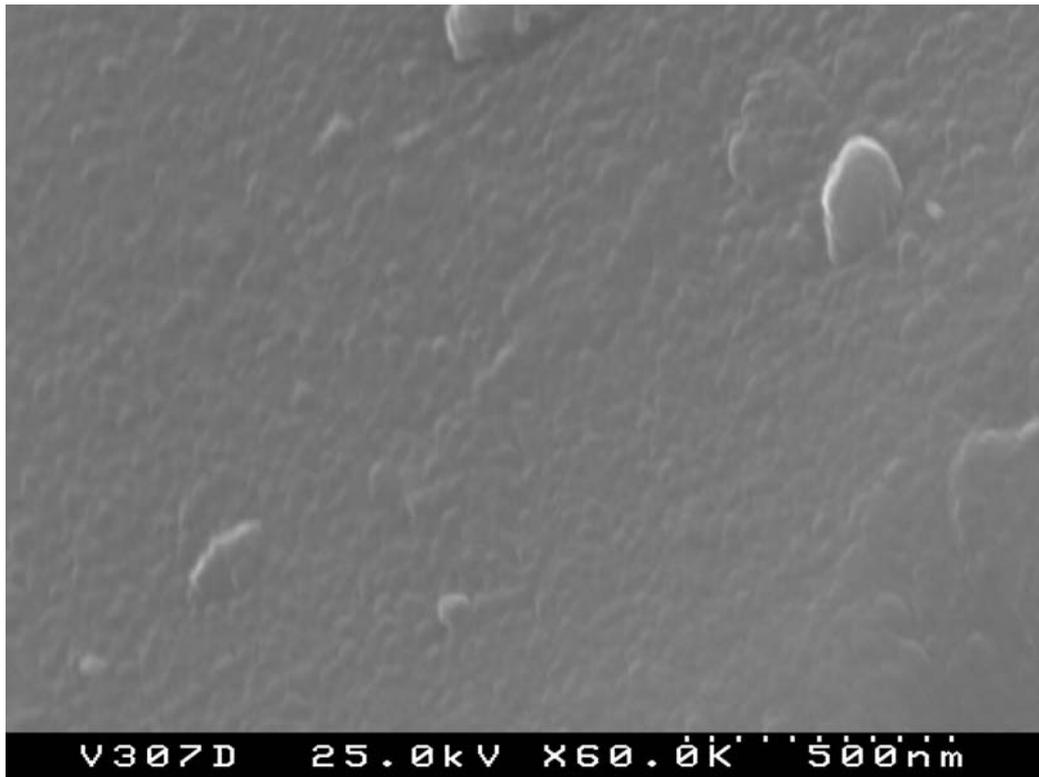


Figura 22: Fotomicrografia de MEV da superfície do vidro bioativo após imersão em SBF por 7 dias.

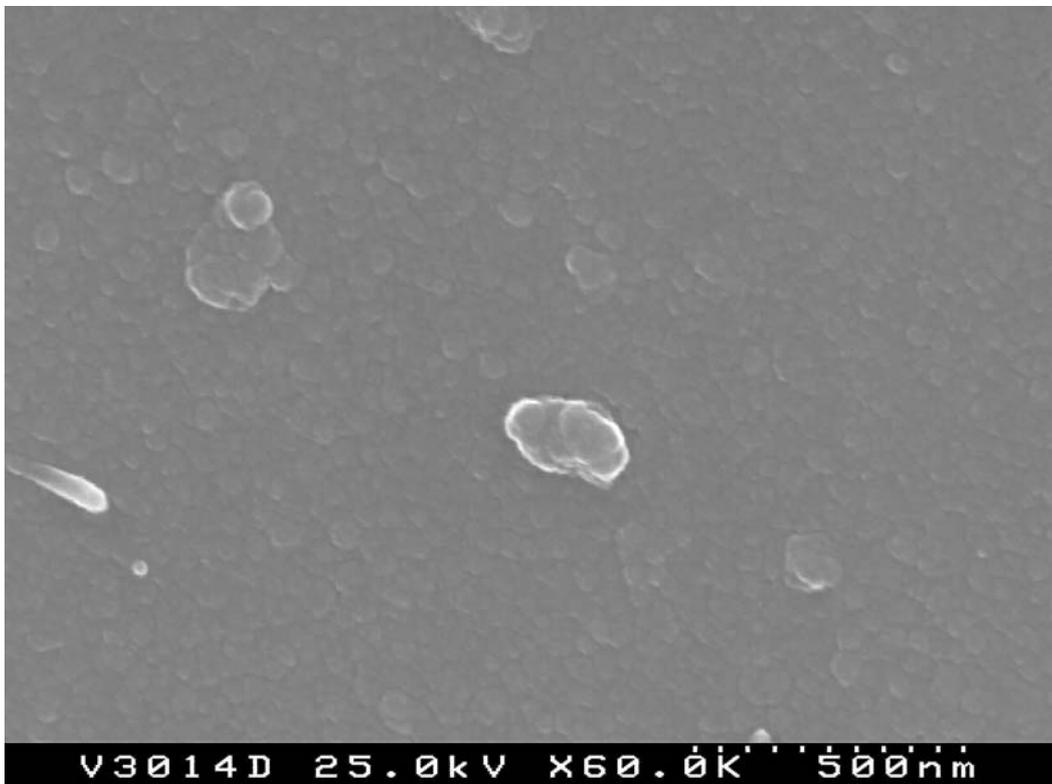


Figura 23: Fotomicrografia de MEV da superfície do vidro bioativo após imersão em SBF por 14 dias.

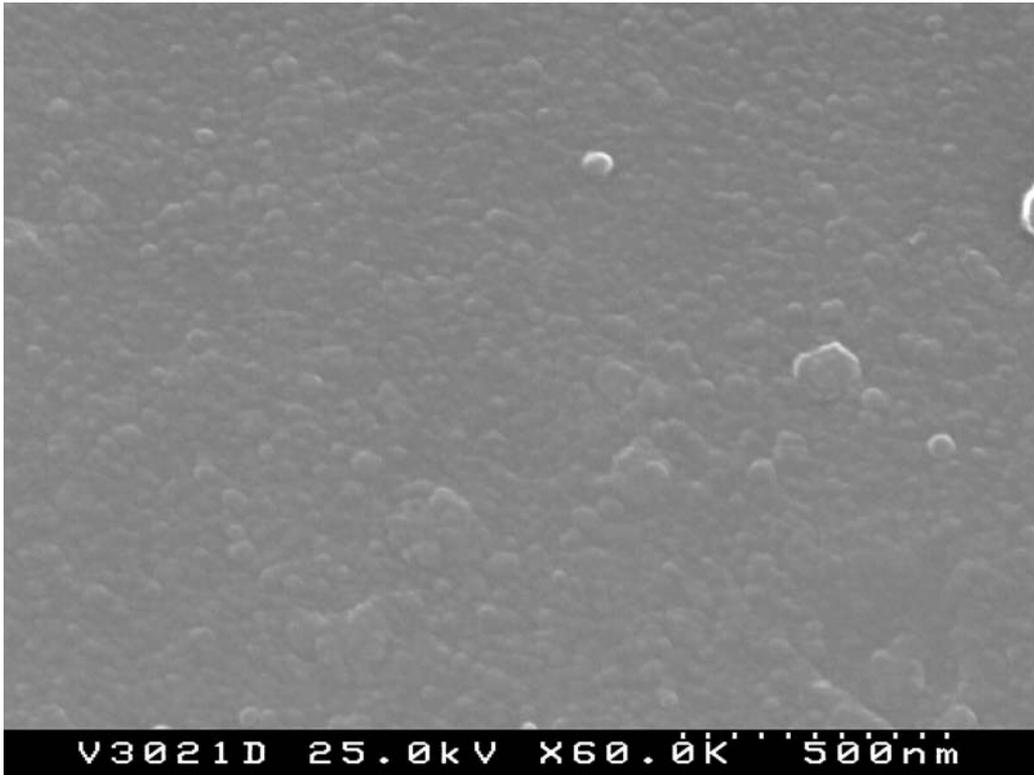


Figura 24: Fotomicrografia de MEV da superfície do vidro bioativo após imersão em SBF por 21 dias.

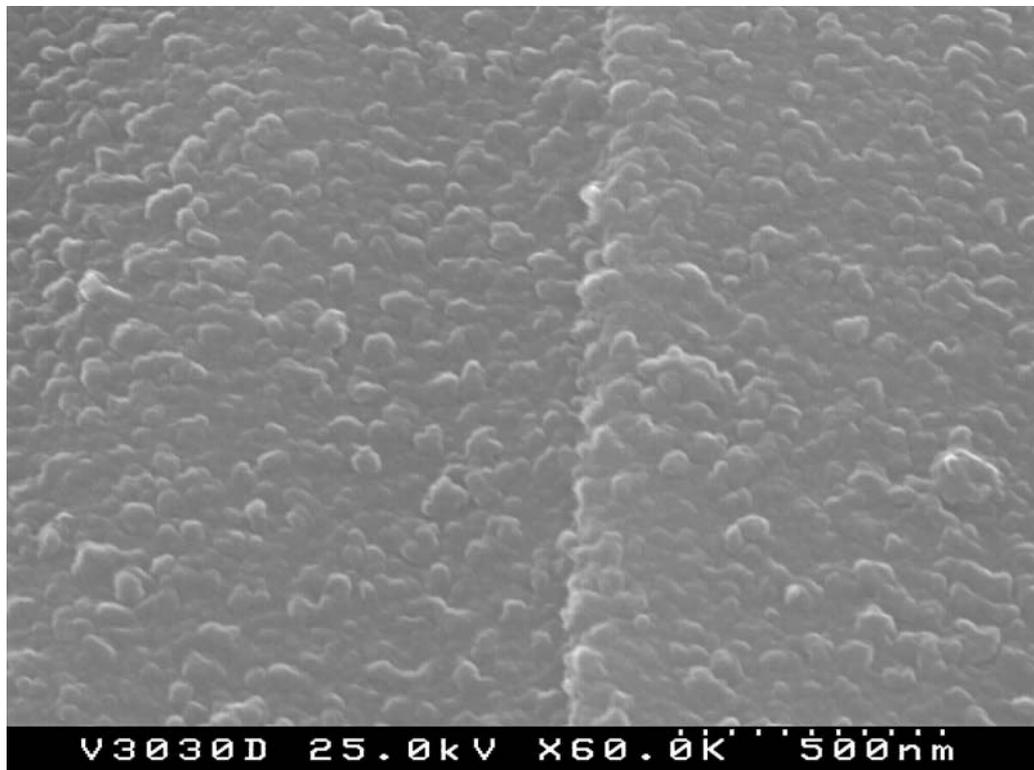


Figura 25: Fotomicrografia de MEV superfície do vidro bioativo após imersão em SBF por 30 dias.

4.7 Análise Química por EDS do Vidro VH30

As superfícies das amostras de vidro bioativo antes e após a imersão em SBF foram analisadas quimicamente por EDS. A Figura 26 apresenta o espectro do EDS antes da imersão. A Figura 27 apresenta o espectro de EDS após 7 dias de imersão em SBF. Pode-se observar que não há diferenças qualitativas nas concentrações dos elementos, portanto a superfície analisada após 7 dias não apresenta nenhuma deposição de uma camada rica em Ca-P.

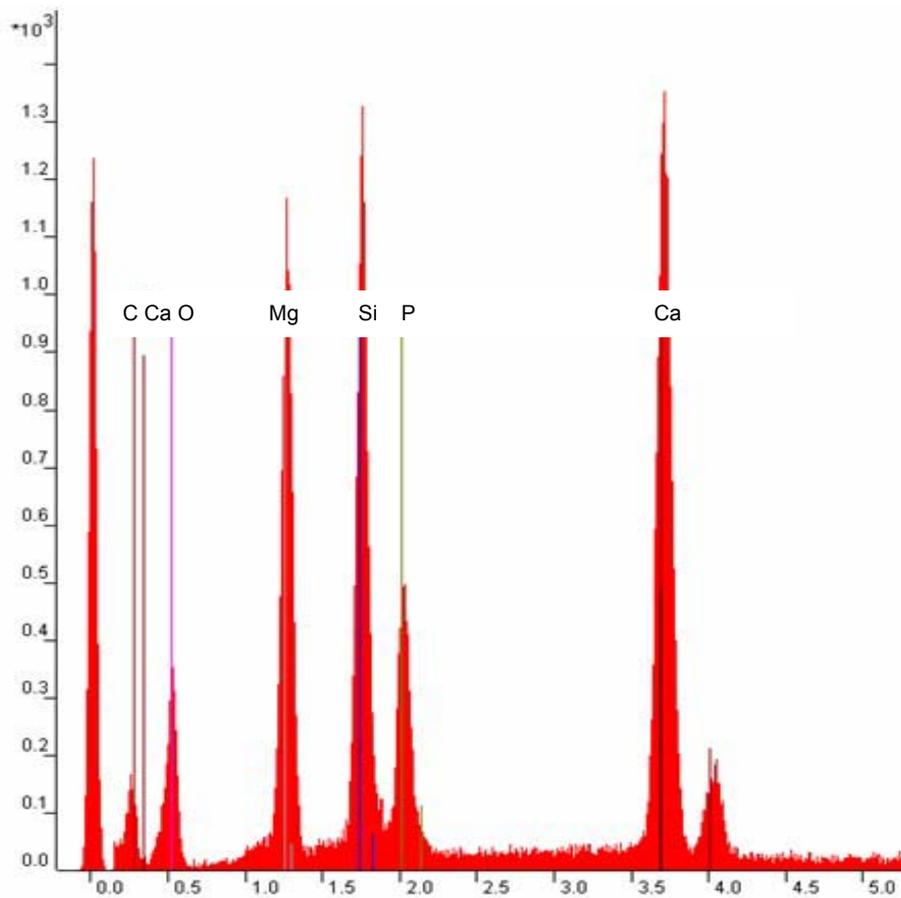


Figura 26: Espectro de EDS do vidro bioativo VH30 como preparado.

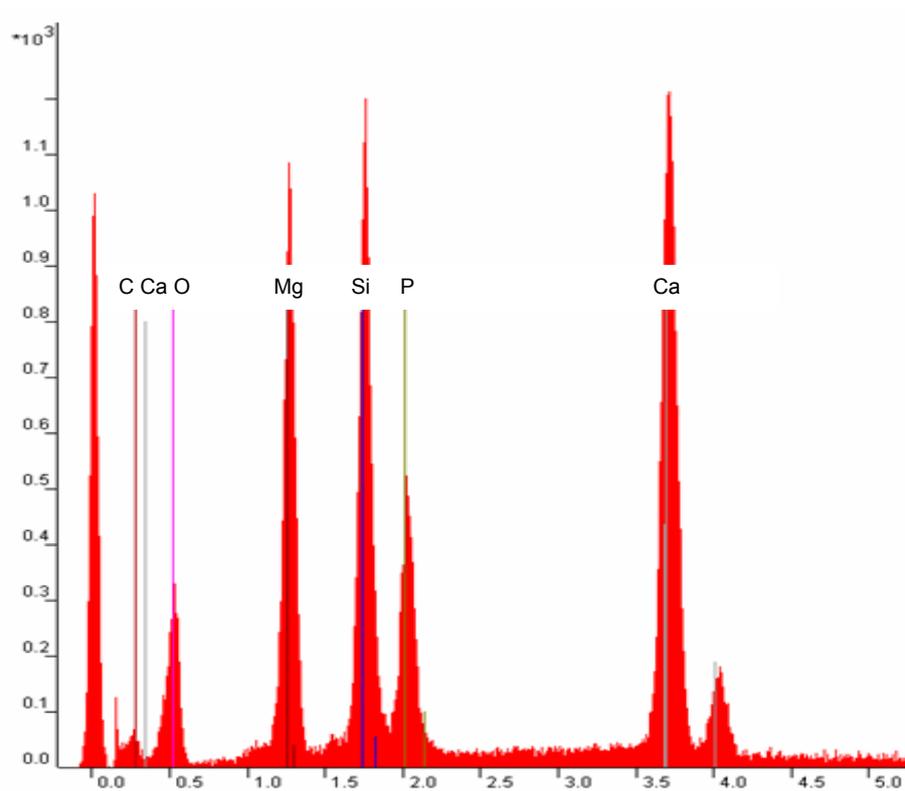


Figura 27: Espectro de EDS do vidro bioativo após imersão em SBF por 7 dias.

4.8 Caracterização do Vidro VH30 Através de MFA

A Figura 28 apresenta uma imagem de MFA bidimensional do vidro bioativo VH30 antes da imersão em SBFA. Observa-se, como nas imagens de MEV, uma superfície relativamente lisa, ou seja, ausência de uma camada com topografia irregular. A Figura 29 apresenta o mesmo vidro bioativo, porém em uma imagem em 3 dimensões.

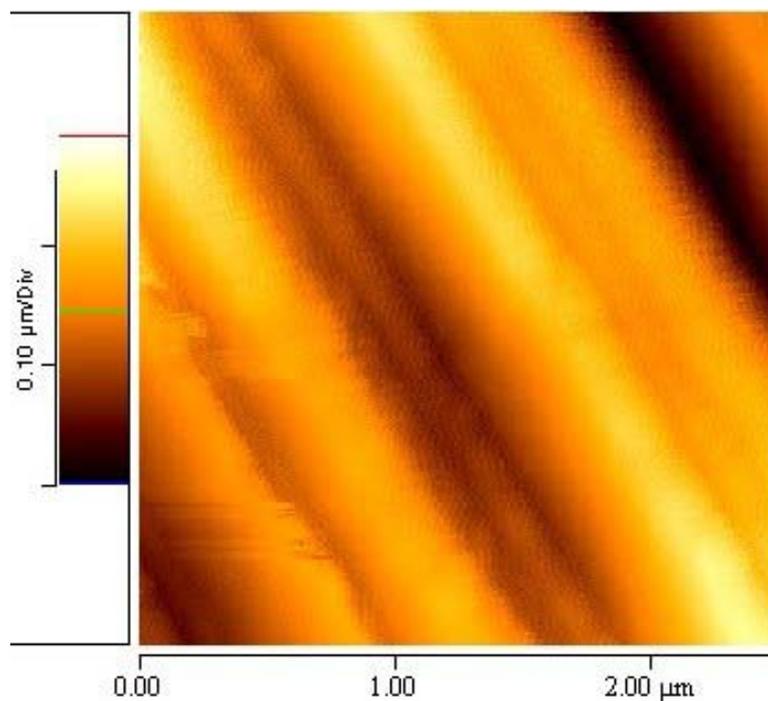


Figura 28: Fotomicrografia de MFA do vidro bioativo VH30 como preparado.

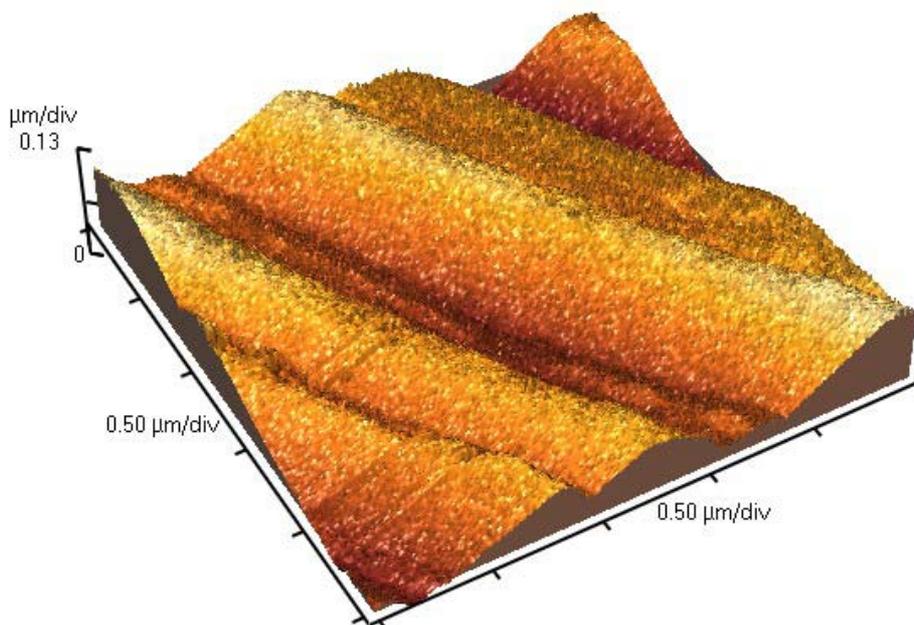


Figura 29: Fotomicrografia de MFA (3D) do vidro bioativo VH30 como preparado.

O vidro bioativo após imersão em SBFA após 7 dias e 14 dias formou uma camada de Ca-P na superfície como pode ser observado nas Figuras 30 (2D), 31 (3D) e 32 (2D), 33 (3D), respectivamente. Na Figura 33 observa-se a presença de picos na imagem o que é provavelmente artefato causado pelo toque da sonda do AFM na

amostra. As Figuras 34 e 35 são imagens do vidro bioativo imersos em SBF após 14 dias em 2D e 3D, respectivamente. Assim como foi observado nas imagens de MEV, pode ter ocorrido a formação de uma camada rica em Ca-P, todavia esta pode ter se destacado. Nas imagens de MFA indicado pelas setas das Figuras 34 e 35 observa-se mais claramente a degradação superficial do vidro. Este resultado também indica uma alta reatividade da superfície do vidro bioativo VH30 quando imerso em SBF, o que é devido à razão área superficial pelo volume da solução (As/V). A razão As/V deveria ter um valor menor do que 1, sendo $0,1 \text{ cm}^{-1}$ o valor ideal. No entanto, para os experimentos com vidro bioativo imerso apenas em SBF o valor da razão encontrada foi 1400 cm^{-1} . Assim algumas etapas da formação da camada rica em Ca-P foram inibidas, pois o valor da razão foi muito superior ao valor 5 cm^{-1} que é o valor limite para que todas as etapas aconteçam durante a formação desta camada [15].

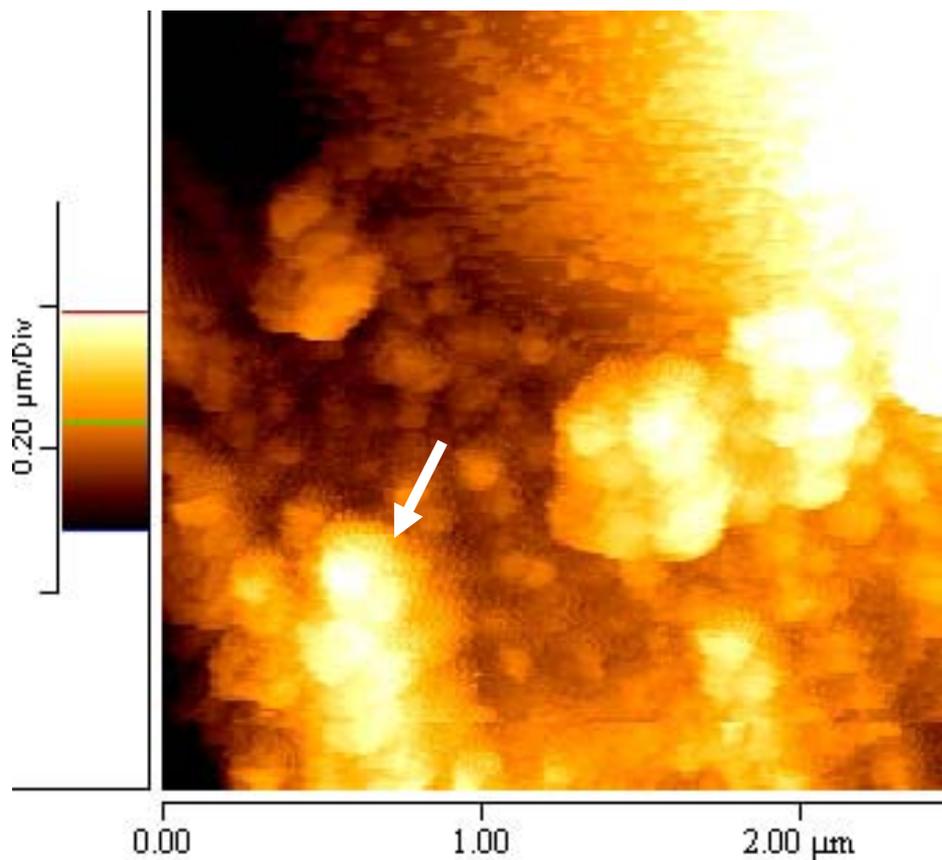


Figura 30: Fotomicrografia de MFA do vidro bioativo após imersão em SBFA por 7 dias.

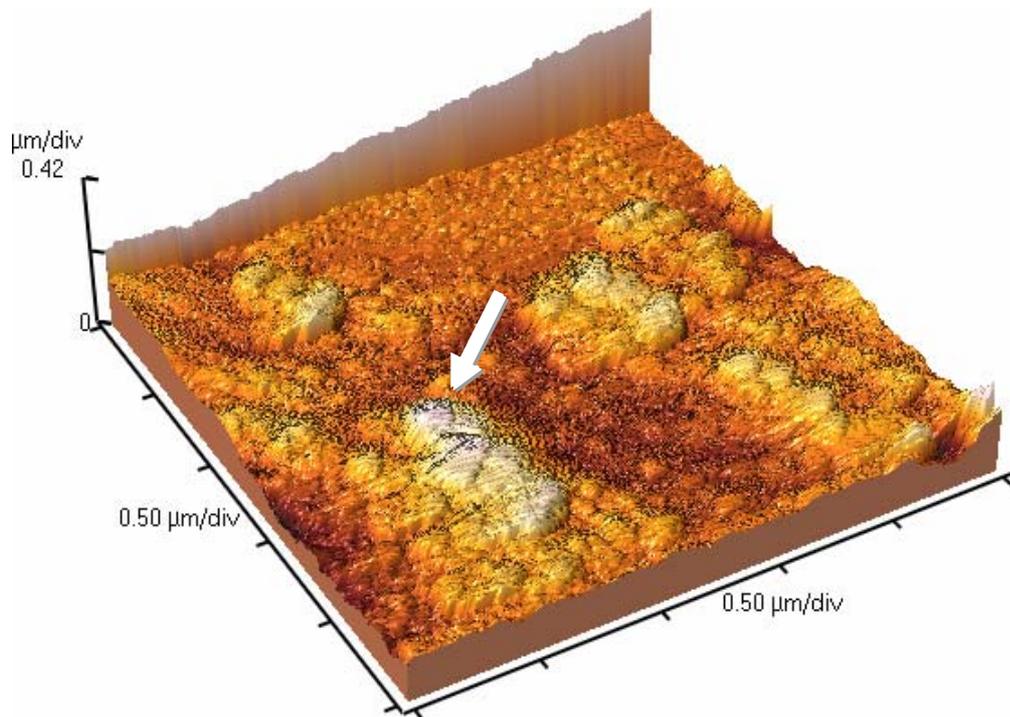


Figura 31: Fotomicrografia de MFA (3D) do vidro bioativo após imersão em SBFA por 7 dias.

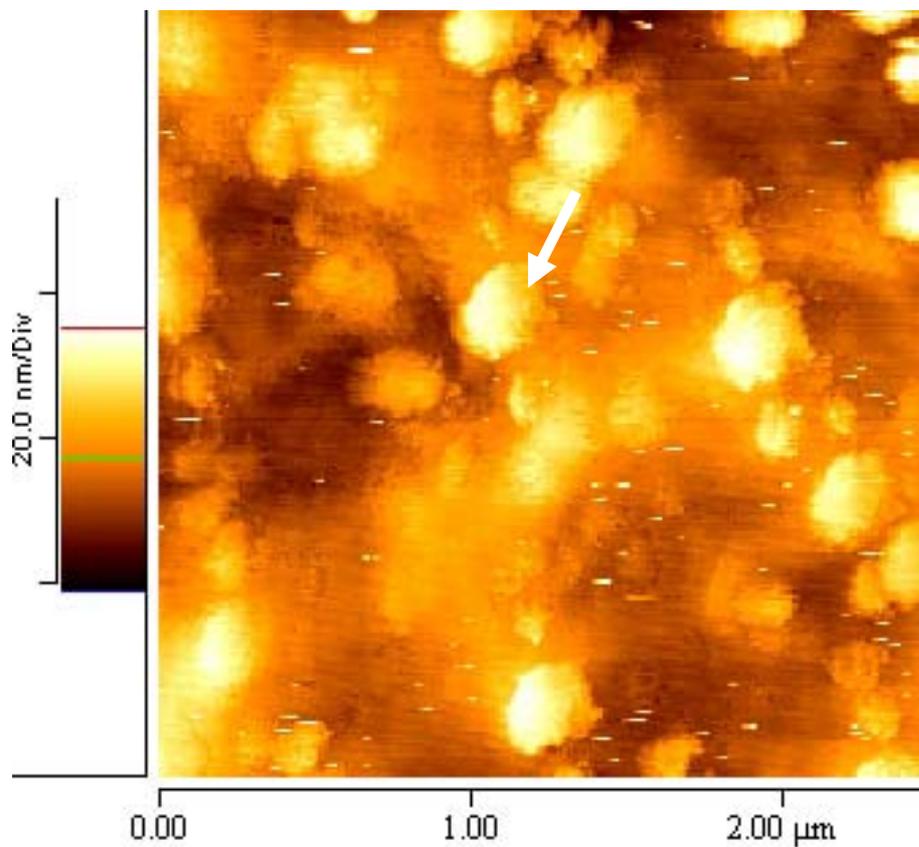


Figura 32: Fotomicrografia de MFA do vidro bioativo após imersão em SBFA por 14 dias.

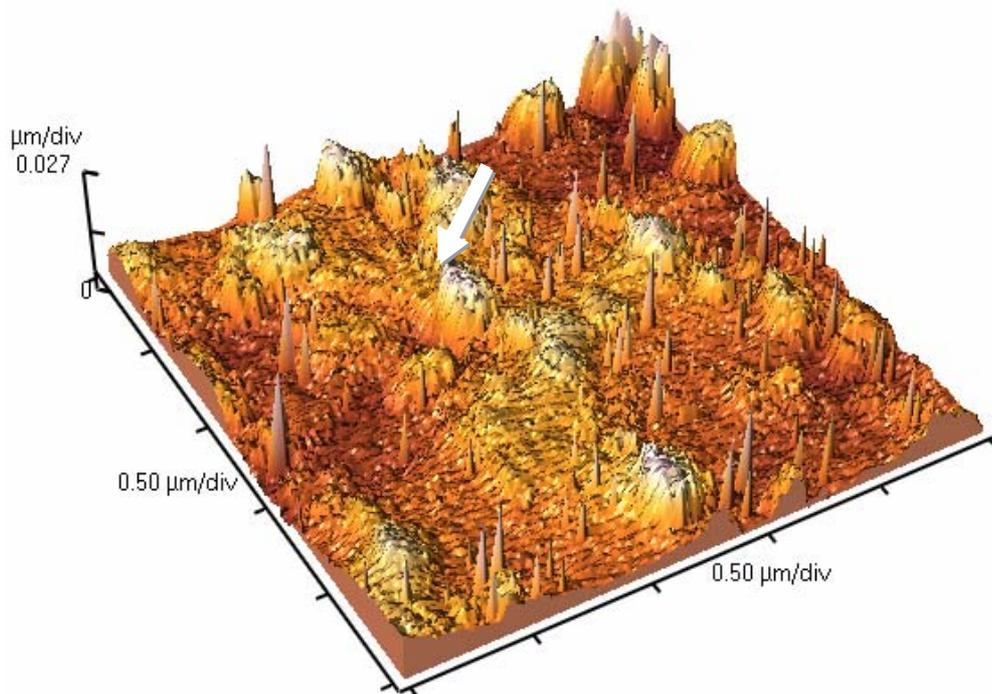


Figura 33: Fotomicrografia de MFA (3D) do vidro bioativo após imersão em SBFA por 14 dias.

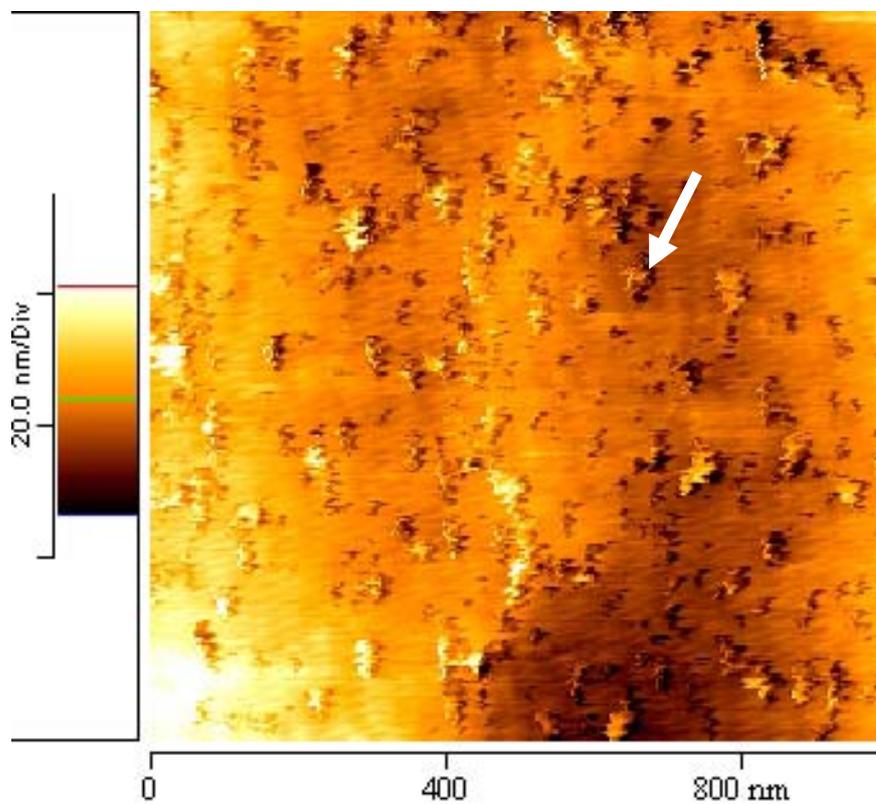


Figura 34: Fotomicrografia de MFA do vidro bioativo após imersão em SBF por 14 dias.

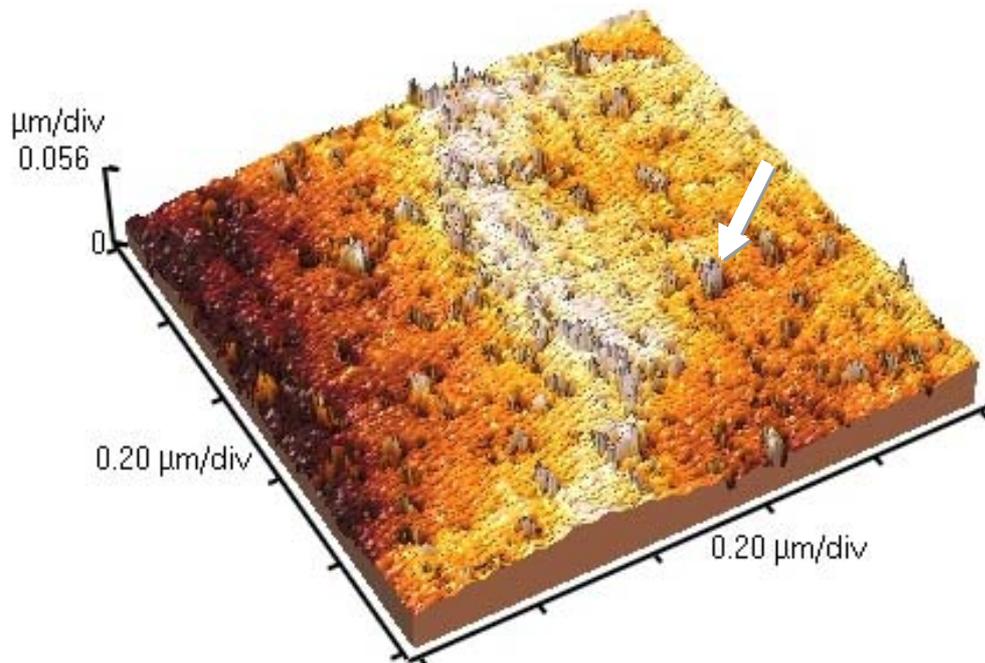


Figura 35: Fotomicrografia de MFA (3D) do vidro bioativo após imersão em SBF por 14 dias.

As Figuras 30-31 mostram claramente uma formação globular relacionada à nucleação de Ca-P na superfície do vidro bioativo, estas formações estão indicadas pelas setas. O tamanho médio dos glóbulos é de $121,4 \pm 17,2$ nm após 7 dias de imersão em SBFA e de $239,3 \pm 4,0$ nm após 14 dias de imersão em SBFA, Figuras 30-31 e 32-33, respectivamente. O tamanho dos glóbulos do precipitado após 7 dias de imersão em SBFA tem aproximadamente o mesmo tamanho encontrado por outro estudo (126,6 nm) [77], porém após imersão em SBF por 5 dias. O precipitado tende a crescer quanto maior o tempo de imersão das amostras em SBF. As camadas também tendem a se tornarem mais espessas e uniformes [77]. Este fato pode ser observado ao comparar as imagens das Figuras 30-31 e 32-33, onde nota-se uma formação de uma nova camada nas amostras imersas após 14 dias sobre a camada preexistente, indicada pelas setas.

O fosfato de cálcio apresenta cinco fases distintas: DCPD ou bruxita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), OCP ou fosfato octacálcio [$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$], β -TCP ou β -Tricálcio fosfato ou β -whitloquita [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], HA ou hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$] e ACP ou fosfato de cálcio amorfo. A porção mineral do osso e de outros tecidos duros do corpo humano tem como principal componente a HA. Variações na composição da HA podem

ocorrer devido à presença de íons CO_3^- , por exemplo, que substituem os íons OH^- ou PO_4^- . De acordo com LeGeros [78], a morfologia globular está relacionada à presença de hidroxicarbonato de apatita (HCA). A concentração de íons carbonato (CO_3^-) na molécula de HA define sua morfologia, variando de cristais aciculares a globulares. As formações globulares apresentam cerca de 12,5% de CO_3^- na estrutura. A autora afirma que toda apatita biológica apresenta uma alta porcentagem de CO_3^- . A morfologia da camada de Ca-P encontrada no presente trabalho está de acordo com a forma esférica da HCA. Esta camada de HCA deve ter uma espessura e uma estabilidade adequada, pois vai influenciar na adesão de células, orientando, por exemplo, a formação de tecido conjuntivo [79].

A composição do vidro é o principal fator relacionado à bioatividade. Entretanto, pode-se afirmar que as áreas superficiais do vidro em conjunto com características químicas locais também contribuem para uma formação da camada de Ca-P. Alguns autores sugerem que a presença de albumina na solução de SBF promove as características suficientes para melhorar a adesão da camada de Ca-P sobre os vidros bioativos [73,80,81]. A adição da albumina não interfere na estrutura do vidro bioativo e aproxima a solução de SBF ainda mais do plasma humano, pois neste não estão presentes os componentes protéicos.

As reações químicas entre o implante e o tecido a ser regenerado é o que decide a viabilidade biológica daquele enquanto auxiliar da reparação óssea. As proteínas extracelulares têm um papel importante na integração entre os enxertos e os tecidos adjacentes, uma vez que auxiliam a adesão da camada de Ca-P na superfície dos vidros. Elas vão permitir também a adesão de células mesenquimais e conjuntivas, que por sua vez vão permitir a neoformação de tecido ósseo, colágeno, vasos e outros tecidos. Estas ligações químicas fazem a adesão das células através de interações dipolo (relacionadas ao potencial-Z das superfícies) e da relação de grupos funcionais hidrofílicos/hidrofóbicos. [82]

4.9 Difração de Raios-X do Vidro VH30 após Imersão em SBF e SBFA

As amostras de vidro bioativo que foram imersas em SBF (7 e 14 dias) e em SBFA (7 e 14 dias) foram submetidas à DRX, os resultados estão apresentados nas Figuras 36 e 37, respectivamente.

Na Figura 36 não pode ser observada a presença de picos, o que indicou um material amorfo, portanto sem a presença de uma camada de Ca-P cristalina. Este resultado confirma que não há uma deposição de Ca e P na superfície. A Figura 37 apresenta picos para ambos os períodos de imersão em SBFA, 7 e 14 dias, respectivamente. No entanto os picos estão mais intensos para as camadas de Ca-P formadas após 14 dias de imersão em SBFA do que os picos de 7 dias de imersão o que caracteriza um aumento na quantidade dos cristais de Ca-P. A fase do fosfato de cálcio encontrada nas caracterizações dos vidros bioativos imersos em SBFA por 7 e 14 dias são correspondentes ao fosfato octacálcio $[\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$ (identificados através das fichas do JCPDS). Os cristais presentes na camada de Ca-P formada tendem aumentar em número tornando os picos, correspondentes a esta fase, mais intensos. A incorporação de mais íons Ca na estrutura também é esperado, bem como íons CO_3^- , o que formará uma camada madura de HCA.

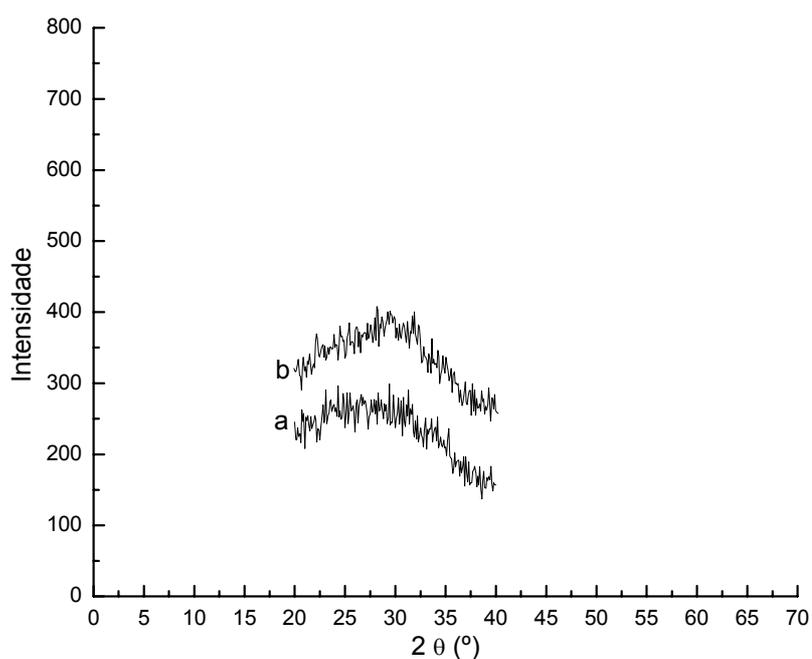


Figura 36: Difratograma dos vidros bioativos imersos em SBF por 7 dias (a) e 14 dias (b).

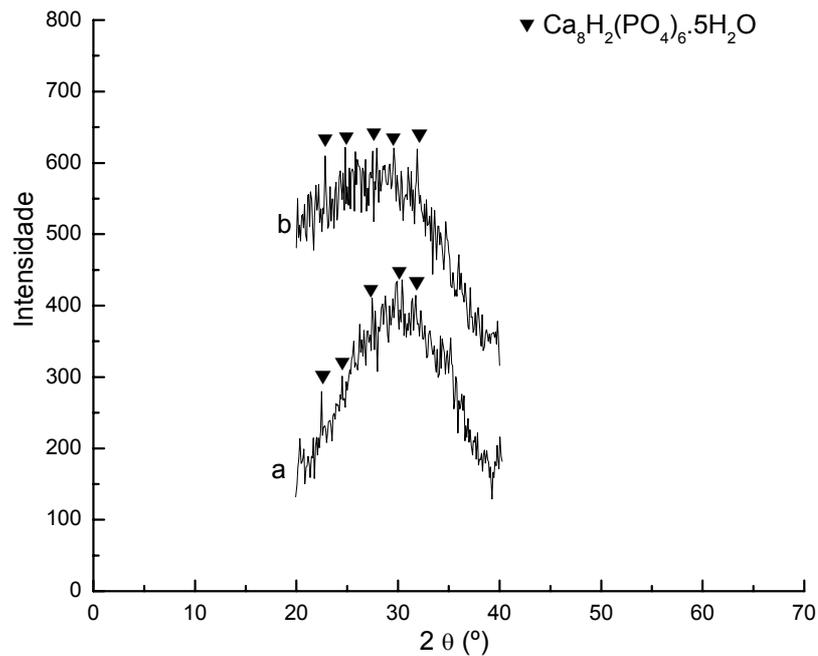


Figura 37: Difratoograma dos vidros bioativos imersos em SBFA por 7 dias (a) e 14 dias (b).

4.10 Observação da morfologia dos Compósitos Vidro Bioativo/PHB através de MEV

As Figuras 38 a 40 são imagens de MEV dos compósitos 30Bio/70PHB antes de imersão em SBF e após imersão por 7 e 14 dias, respectivamente. As Figuras de 41 a 43 são imagens dos compósitos 40Bio/60PHB antes de imersão em SBF e após imersão por 7 e 14 dias.

Nas Figuras 38 e 41 podemos observar os compósitos 30Bio/70PHB e 40Bio/60PHB assim como preparados. Nestas imagens pode observar a distribuição do reforço nos compósitos que estão apontados pelas setas. O 30Bio/70PHB apresenta uma distribuição mais uniforme das partículas, porém o compósito 40Bio/60PHB apresenta uma variação maior dos tamanhos de partícula. As condições de distribuição e tamanho de partículas do vidro bioativo nos compósitos contribuem positivamente para a bioatividade.

Nas Figuras 39 observa-se a formação de uma camada rica em Ca-P indicado pelas setas. A morfologia da camada também se apresentou de forma globular após 7 dias de imersão em SBF. Essa morfologia globular também foi encontrada por Jaakkola et al [72] após 7 dias de imersão em SBF, porém em compósitos ϵ -caprolactona-co-DL-lactato/vidro bioativo. Chen e Wang [50] também observaram morfologia similar formada sobre compósitos HA/PHB, todavia somente após 28 dias de imersão em SBF. A Figura 42 também apresenta formação de uma camada de Ca-P, porém não recobre uma área tão ampla quanto a camada formada sobre o compósito 30Bio/70PHB, indicadas pelas setas. A morfologia encontrada da camada de Ca-P formada sobre o compósito 40Bio/60PHB é similar à encontrada por Ni e Wang [51] quando estudou o compósito HA/PHB após 7 dias de imersão em SBF. Comparando a qualidade da camada formada sobre o compósito 30Bio/70PHB, nota-se que esta se formou mais uniforme e contínua do que a camada formada sobre o compósito 40Bio/60PHB. Esta característica, associada à área recoberta pela camada de Ca-P, indica que o compósito 30Bio/70PHB apresenta uma bioatividade superior ao compósito, nas condições ensaiadas. Ambos os compósitos apresentaram valores da razão As/V próximos de 1 cm^{-1} , o que propiciou a formação da camada de Ca-P, no entanto devido a maior quantidade de vidro bioativo nos compósitos 40Bio/60PHB, a formação foi ligeiramente inibida.

A formação da camada de Ca-P é contínua à medida que aumenta o tempo de imersão, como pode ser observado nas Figuras 40 e 43. Estas figuras são imagens dos compósitos 30Bio/70PHB e 40Bio/60PHB, respectivamente, após 14 dias de imersão em SBF. Nota-se que as camadas se tornam mais coesas com o tempo em ambos os compósitos, indicado pelas setas brancas e há também a formação de uma nova camada sobre a primeira, apontado pelas setas azuis. Roether et al [52] usando compósitos porosos de poli(DL-ácido lático)/Bioglass[®] encontrou morfologia similar à estas ao imergir as amostras em SBF. Os autores observaram um crescimento de HA no compósito após 7 dias de imersão em SBF. Todavia, a morfologia similar ao presente trabalho somente foi encontrada por Roether et al [52] após 28 dias. Este fato indica que o compósito compacto utilizado no presente trabalho apresentou um bioatividade maior do que o compósito poroso utilizado por Roether et al [52].

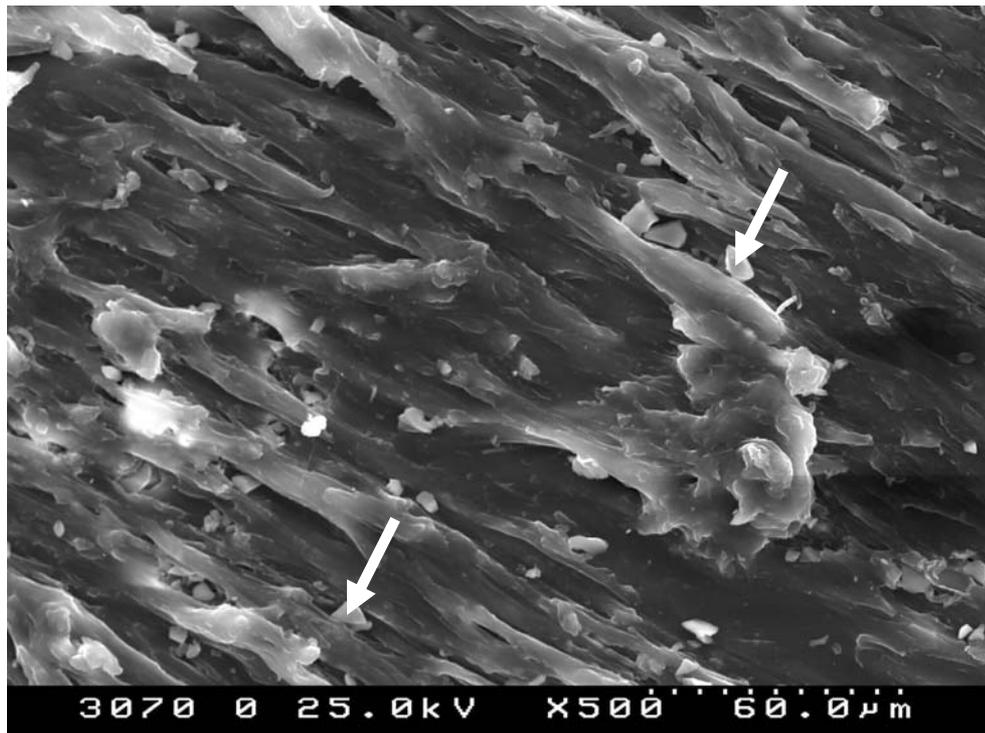


Figura 38: Fotomicrografia por MEV do compósito 30Bio/70PHB como preparado.

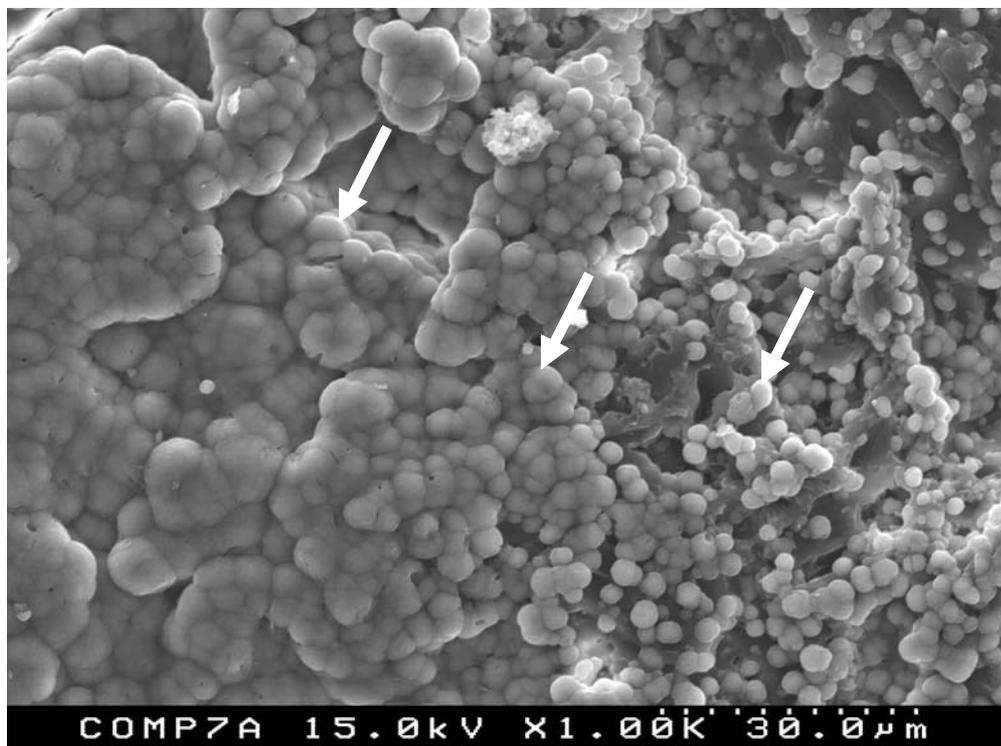


Figura 39: Fotomicrografia por MEV do compósito 30Bio/70PHB após 7 dias de imersão em SBF.

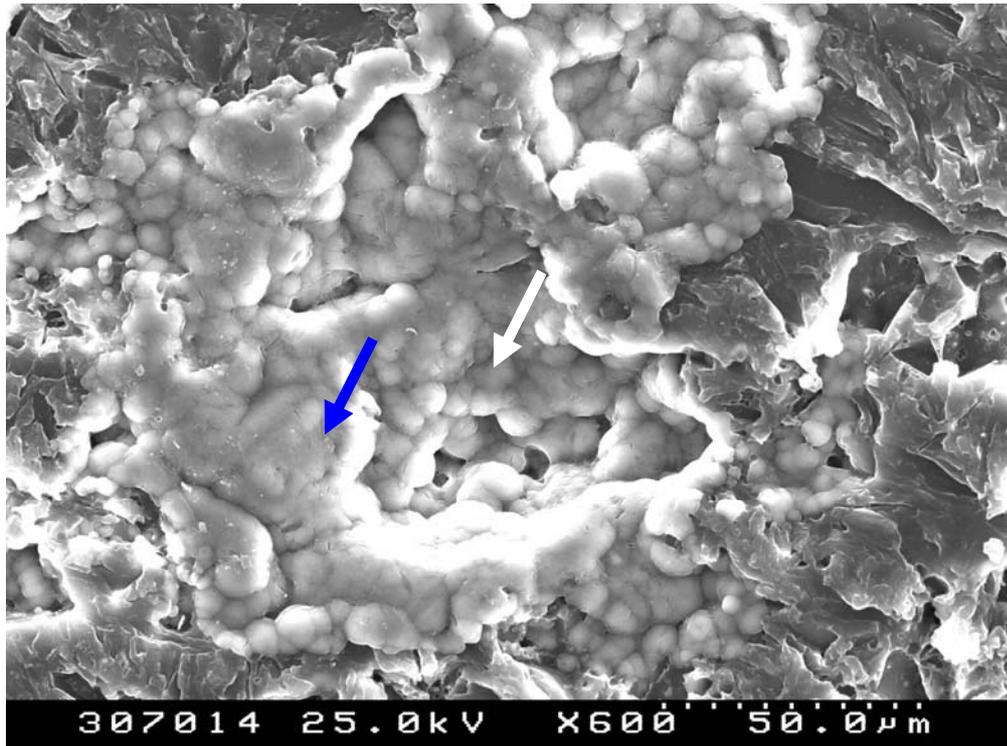


Figura 40: Fotomicrografia por MEV do compósito 30Bio/70PHB após 14 dias de imersão em SBF

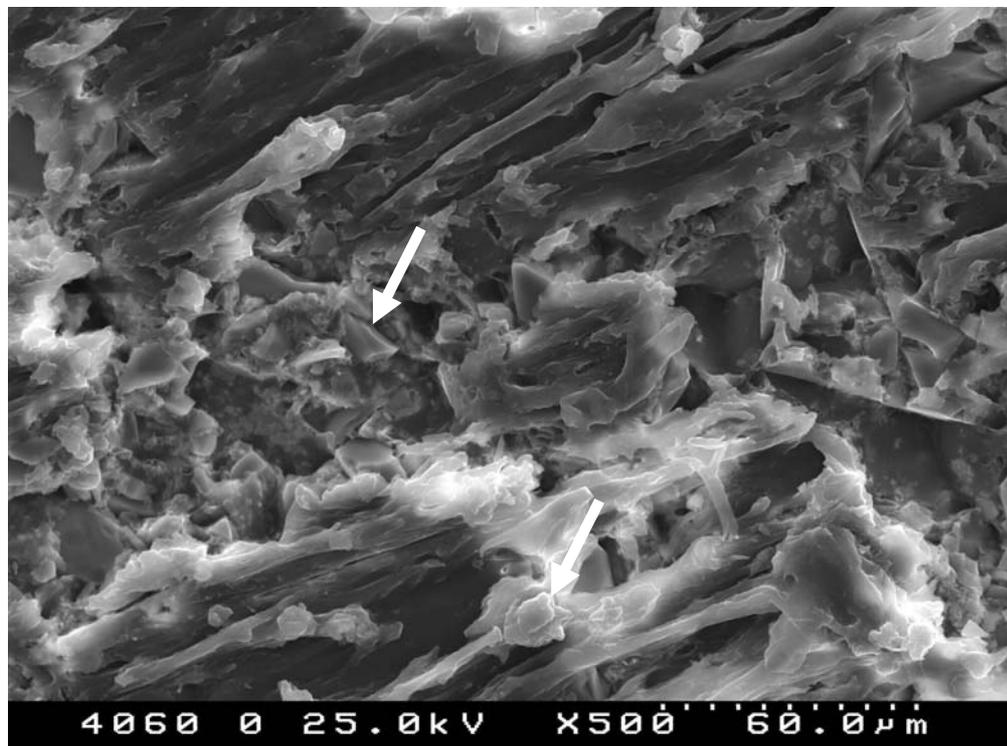


Figura 41: Fotomicrografia por MEV do compósito 40Bio/60PHB como preparado.

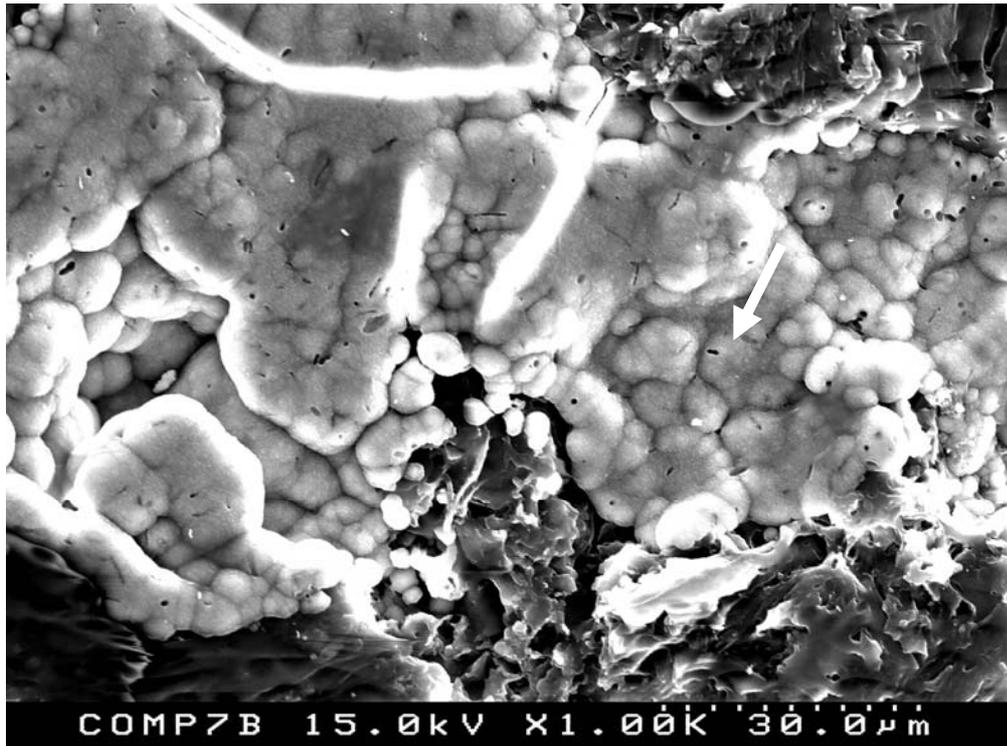


Figura 42: Fotomicrografia por MEV do compósito 40Bio/60PHB após 7 dias de imersão em SBF.

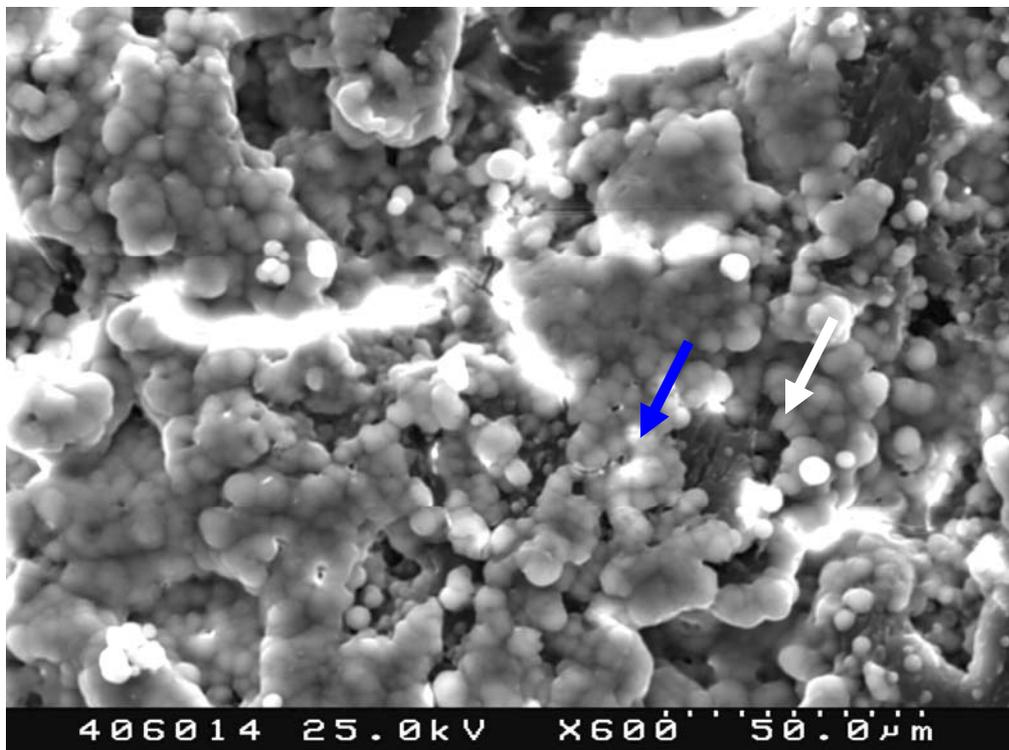


Figura 43: Fotomicrografia por MEV do compósito 40Bio/60PHB após 14 dias de imersão em SBF.

4.11 Análise Química dos Compósitos Vidro Bioativo/PHB por EDS

Os resultados de EDS dos compósitos vidro bioativo/PHB são mostrados nas Figuras 44 a 47. As Figuras 44 e 45 apresentam os espectrogramas de EDS dos compósitos 30Bio/70PHB e 40Bio/60PHB como preparados, respectivamente. As Figuras 46 e 47 mostram os espectros de EDS dos compósitos 30Bio/70PHB e 40Bio/60PHB após 7 dias de imersão em SBF, respectivamente. Como pode ser observado há um intenso aumento das concentrações de Ca e P na superfície dos compósitos após imersão em SBF, o que indica que as camadas observadas nas imagens de MEV são, de fato, Ca-P. A intensidade dos picos é maior nos resultados do compósito 30Bio/70PHB, corroborando com os resultados de MEV de que este compósito indica uma maior bioatividade, nas condições ensaiadas. Estes resultados de EDS podem ser comparados com os resultados das Figuras 44 e 45, na qual os picos mais intensos antes da imersão em SBF são de Mg, Si, Ca e P, que são constituintes do vidro. Estes gráficos de EDS são qualitativamente semelhantes aos encontrados no trabalho de Salinas et al [83], os quais também observaram um intenso aumento dos picos de Ca e P em vidros bioativos após imersão em SBF.

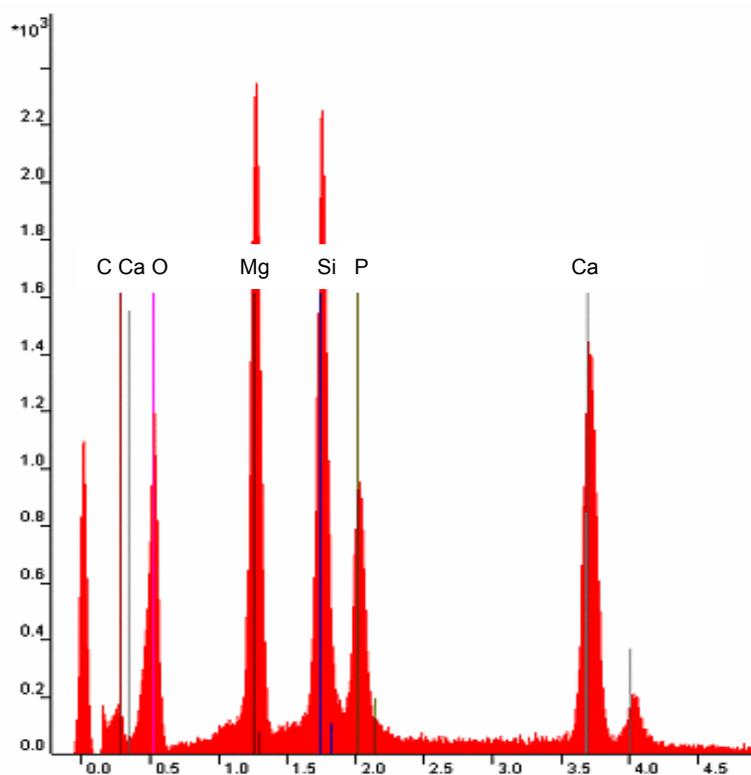


Figura 44: Espectrograma de EDS do compósito 30Bio/70PHB como preparado.

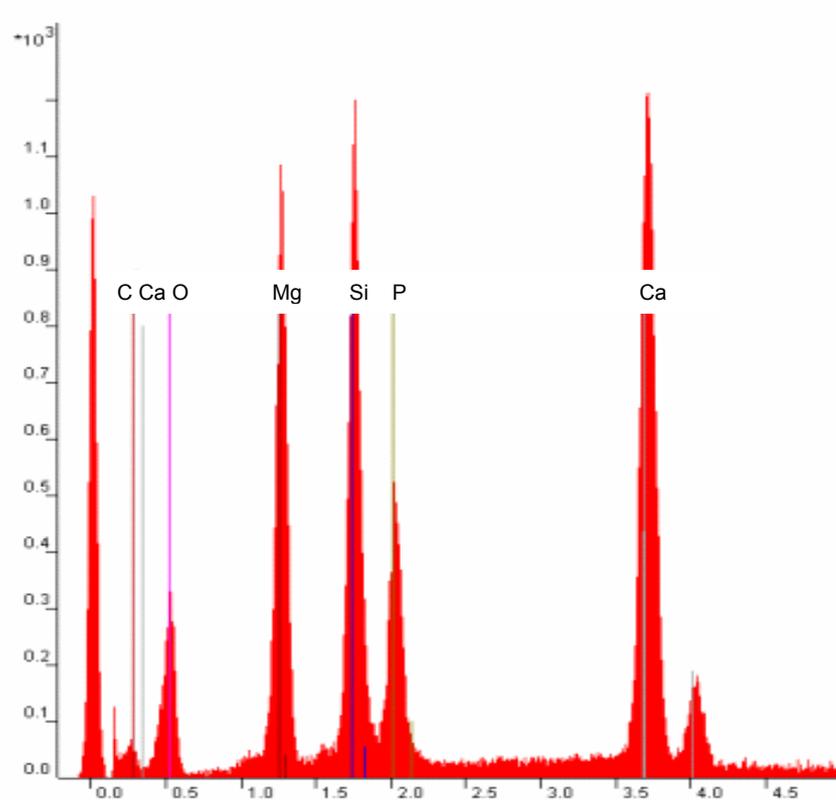


Figura 45: Espectrograma de EDS do compósito 40Bio/60PHB como preparado.

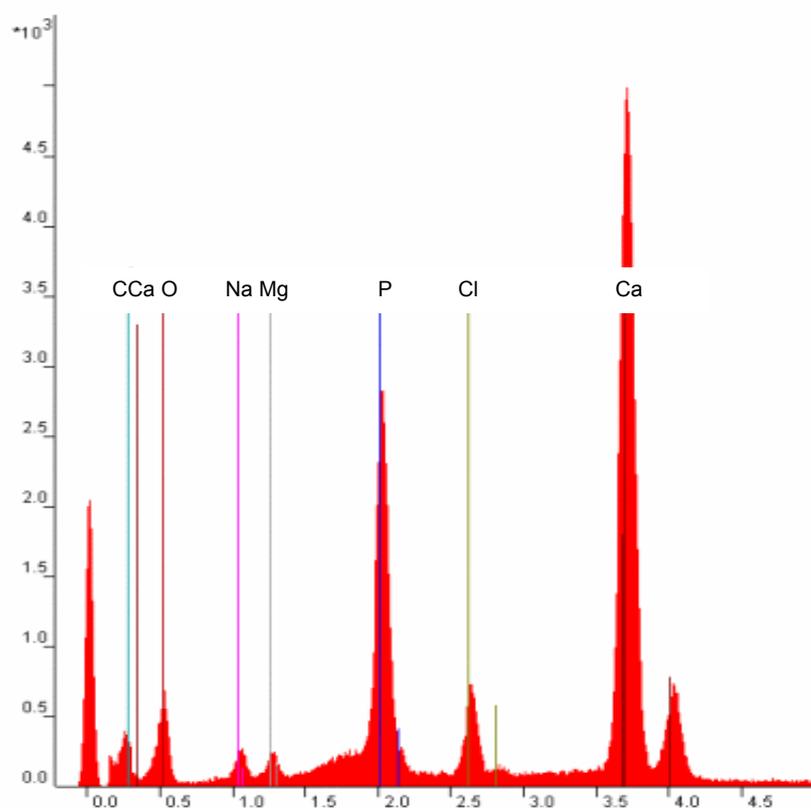


Figura 46: Espectrograma de EDS do compósito 30Bio/70PHB após 7 dias de imersão em SBF.

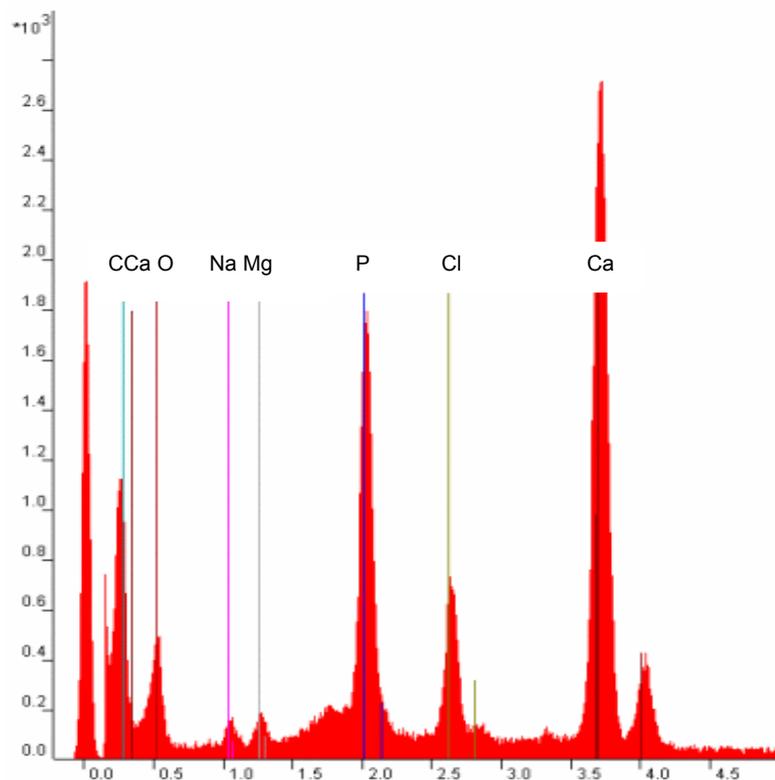


Figura 47: Espectrograma de EDS do compósito 40Bio/60PHB após 7 dias de imersão em SBF

As razões Ca/P das camadas formadas nas amostras dos compósitos foram obtidas através dos valores quantitativos das áreas dos picos dos respectivos elementos. As razões Ca/P das camadas formadas sobre os compósitos 30Bio/70PHB nos períodos de 3, 7 e 14 dias de imersão em SBF estão próxima de 1,67, como pode ser observado na Figura 48. As razões Ca/P das amostras do 40Bio/60PHB, estão apresentadas na Figura 49. Estas não se mostraram constantes, porém apresentaram valores próximos de 1,5; 1 e 2 para os períodos de 3, 7 e 14 dias de imersão em SBF. A razão Ca/P de 1,67 é a razão da HA presente nos ossos do corpo humano [11]. As razões Ca/P apresentadas pelas camadas formadas nos compósitos 40Bio/60PHB também são razões Ca/P de fases do fosfato de cálcio, que também podem estar presentes no corpo humano [11].

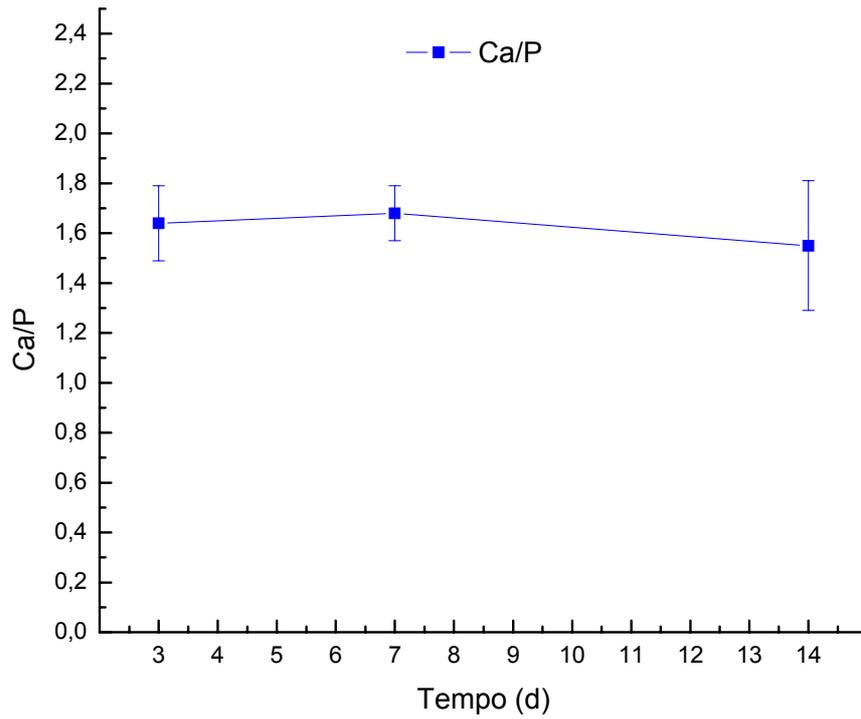


Figura 48: Variação das razões Ca/P das camadas formadas sobre as amostras do compósito 30Bio/70PHB em diferentes tempos de imersão em SBF.

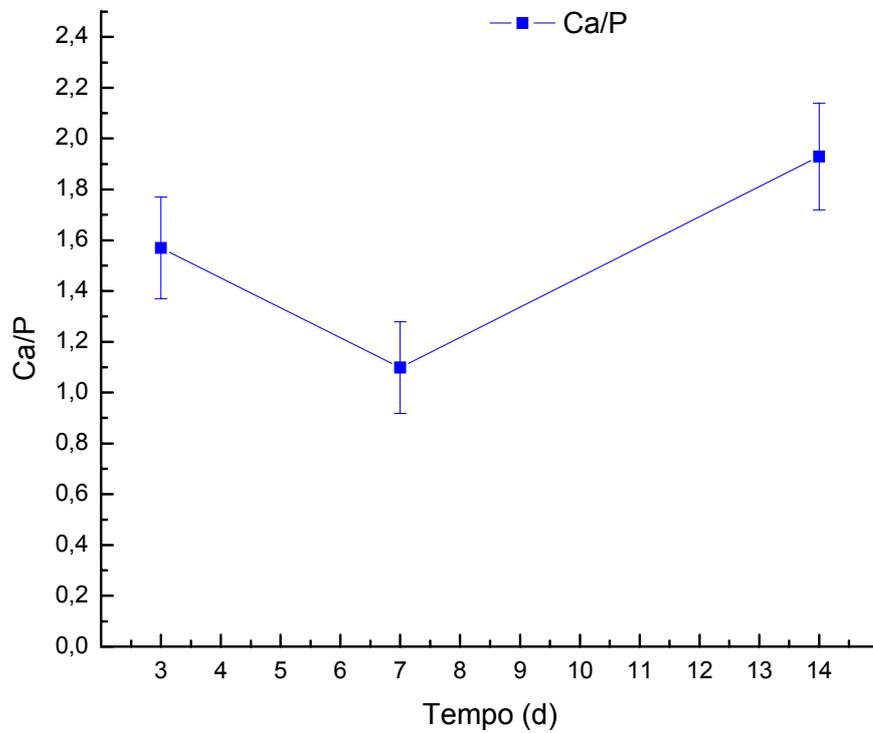


Figura 49: Variação das razões Ca/P das camadas formadas sobre as amostras do compósito 40Bio/60PHB em diferentes tempos de imersão em SBF

4.12 Difração de Raios-X dos Compósitos Vidro Bioativo/PHB

Os difratogramas dos compósitos 30Bio/70PHB e 40Bio/60PHB após imersão em SBF por 7 dias estão apresentados nas Figura 50 e 51, respectivamente. Ambos os difratogramas apresentaram picos de hidrogeno fosfato de cálcio hidratado (identificados através das fichas do JCPDS), todavia estes têm pouca intensidade. Este fato se deve ao pouco tempo de imersão em SBF. Como foi descrito por Peitl [15], inicialmente forma-se uma camada rica em fosfato de cálcio amorfo e após incorporação de íons OH^- e CO_3^{2-} acontece a cristalização da camada transformando-se em uma camada de HCA. Estes resultados sugerem que 7 dias de imersão em SBF não são suficientes para uma cristalização completa.

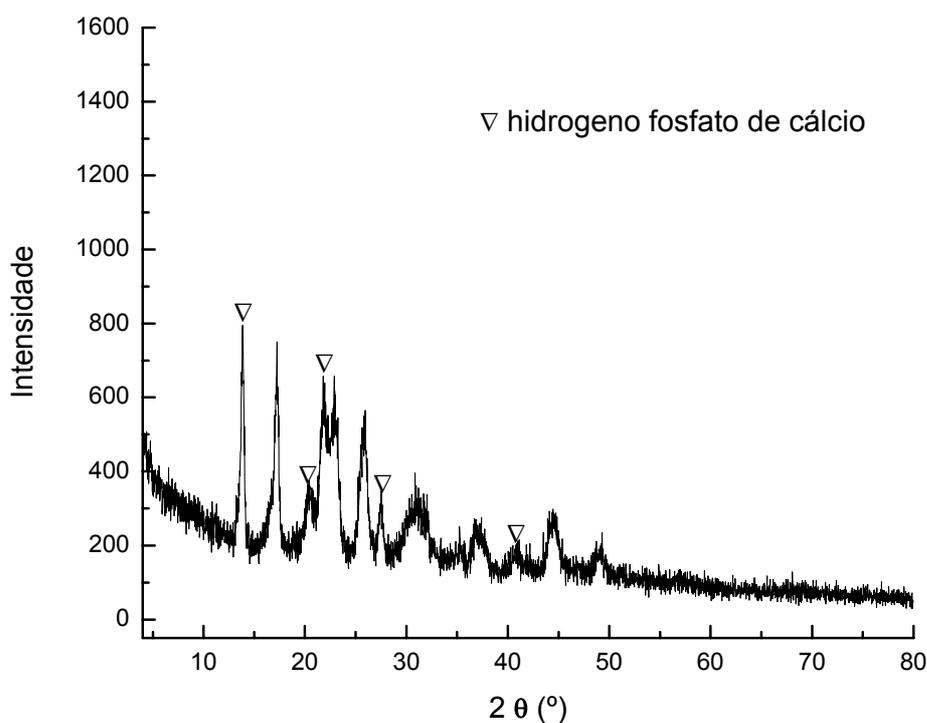


Figura 50: Difratograma do compósito 30Bio/70PHB após imersão em SBF por 7 dias.

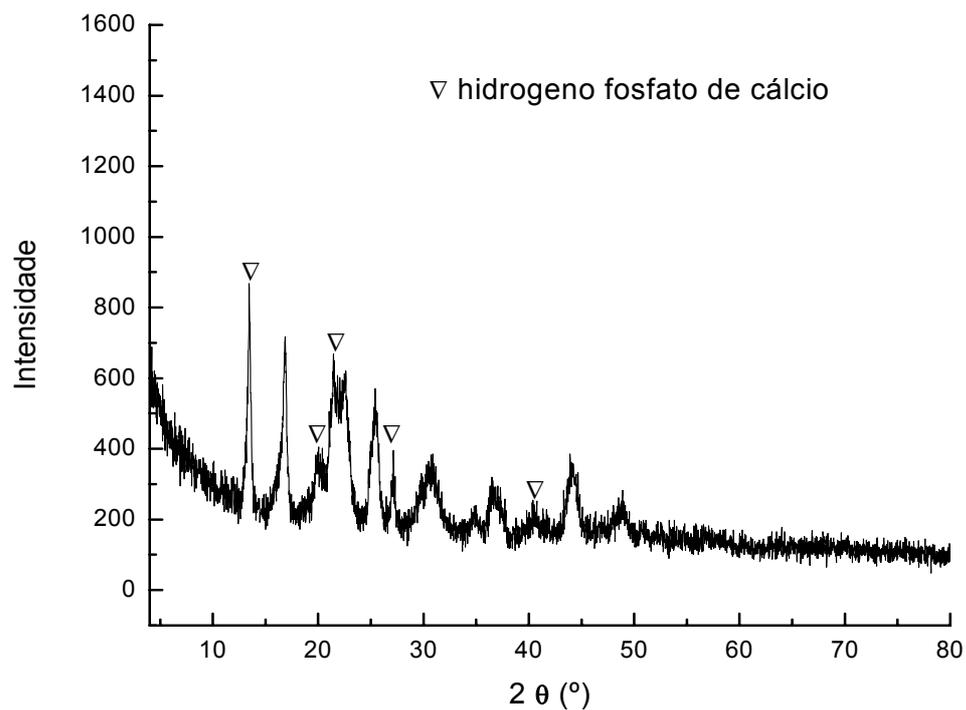


Figura 51: Difratoograma do compósito 40Bio/60PHB após imersão em SBF por 7 dias.

4.13 ICP das Soluções de SBF Utilizada nos Ensaio *In Vitro*

As mudanças nas concentrações dos íons Ca, Mg, Si e P nas soluções de SBF nas quais foram imersos os compósitos 30Bio/70PHB e 40Bio/60PHB, podem ser observadas nas Figuras 52 e 53, respectivamente. Em ambas as figuras nota-se uma clara dissolução dos íons do vidro bioativo para a solução. No entanto, após 1 dia de imersão as concentrações de Ca e P começam a decrescer. Esse decréscimo está relacionado à deposição destes íons na superfície do compósito, como pode ser observado nas imagens de MEV. As concentrações dos íons Si e Mg das soluções que banharam o compósito 30Bio/70PHB aumentam continuamente, porém em uma taxa menor, o que indica uma degradação contínua do vidro bioativo enquanto imerso em SBF. A degradação dos íons Si e Mg do compósito 40Bio/60PHB apresentou um ligeiro decréscimo após 7 dias. Este fato pode estar relacionado à menor bioatividade deste compósito. Jaakkola et al [72] afirmam que a dissolução do Si do vidro bioativo é um indicador de bioatividade e essa dissolução é maior para partículas de vidro de tamanhos menores. Os resultados do ICP são similares aos encontrados em outros

trabalhos [15,49,83]. Esse comportamento de dissolução e precipitação dos íons está de acordo com os estágios de formação do HCA sobre os vidros bioativos quando imerso em SBF como foi mostrado no Capítulo II item 2.4.

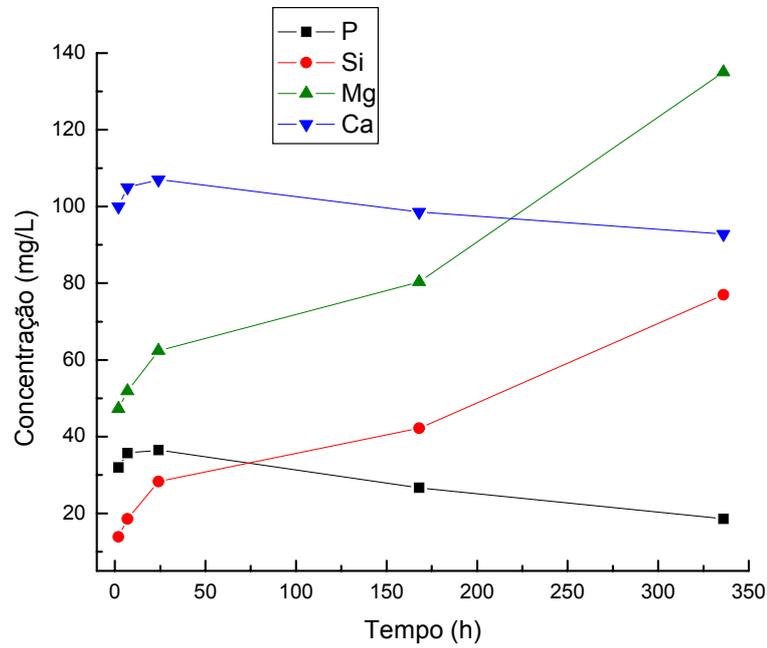


Figura 52: Evolução das concentrações iônicas das soluções de SBF nas quais foram imersas as amostras do composto 30Bio/70PHB.

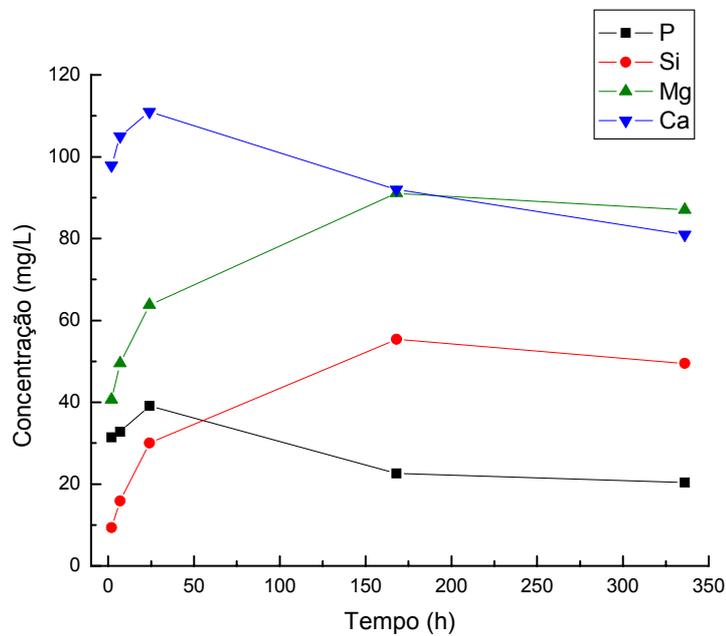


Figura 53: Evolução das concentrações iônicas das soluções de SBF nas quais foram imersas as amostras do composto 40Bio/60PHB.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

A formação da camada de Ca-P ocorreu no vidro bioativo VH30 nas condições ensaiadas, sendo mais estável quando o vidro foi imerso em SBFA do que em SBF, o que indica a influência da presença de albumina na solução em relação à adesão da camada. A fase da camada de Ca-P formada foi identificada como sendo fosfato octacálcio. A formação da camada rica em Ca-P aconteceu de forma contínua para os tempos mais longos de imersão.

A camada de Ca-P formada sobre o vidro bioativo VH30 quando imerso em SBF se destacou devido à alta reatividade e degradação superficial do vidro.

A camada de Ca-P também se formou nos compósitos vidro bioativo/PHB, mesmo quando imersos somente em SBF. A fase das camadas de Ca-P formadas foi identificada como sendo hidrogeno fosfato de cálcio hidratado. A formação foi mais rápida e coesa no compósito 30Bio/70PHB, que também apresentou uma camada de melhor qualidade por ter uma maior quantidade de Ca e P na composição. A formação da camada de Ca-P também aconteceu de forma contínua para os tempos mais longos de imersão.

O tamanho, distribuição, formato e área das partículas do vidro bioativo atuaram de forma positiva na formação da camada de Ca-P em ambos os compósitos.

Os resultados de ICP das soluções de SBF indicaram um grande aumento das concentrações dos íons Mg e Si e um decréscimo da concentração dos íons Ca e P na superfície dos compósitos. Este fato indica que os íons formadores da camada rica em Ca-P são provenientes da solução, o que acontece concomitantemente à degradação do vidro bioativo.

Os ensaios de microdureza Vickers indicaram valores de $24,291 \pm 8,76$ HV e $25,273 \pm 10,82$ HV para os compósitos Bio40/60PHB e Bio30/70PHB, respectivamente. Estes valores também foram encontrados na literatura para outros compósitos cerâmicas/PHB.

TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar a camada de Ca-P através de *Fourier Transformed Infra-Red*;
- Realizar ensaios mecânicos com os compósitos;
- Realizar o estudo *in vivo* do vidro bioativo e dos compósitos;
- Estudar novas composições de compósitos vidros bioativos/PHB;
- Estudar relações matriz/reforço que produzem compósitos com melhor bioatividade e propriedades mecânicas adequadas.

REFERÊNCIAS

1. Ring M.E. *História Ilustrada da Odontologia*. 1ª ed. Editora Manole: São Paulo, 1998.
2. Kasuga T, Sawada M, Nogami M e Abe Y. Bioactive ceramics prepared by sintering and crystallization of calcium phosphate invert glasses. *Biomaterials* 1999;20:1415.
3. Lopes M A, Santos J D, Monteiro F J, Knowles J C. Glass-reinforced hydroxyapatite: A comprehensive study of the effect of glass composition on the crystallography of the composite. *J. Biomed Mater Res*;1998;39:244-251.
4. Höland W. Biocompatible and bioactive glass-ceramics – state of the arte and new directions. *J. Non-Crystal Solids* 1997;219:192-197.
5. Ratner D. *Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine*. 1ª ed. Academic Press: San Diego, 1996.
6. San Román J., Reis R. *Biodegradable Systems in Medical Functions: Design, Processing, Testing and Applications*. 1ª ed. Editora CRC: Boca Ratón, 2004.
7. Neves E. *Morfologia de recobrimentos cerâmicos e cultura de células osteoblásticas para aplicações clínica*. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Itajubá, Brasil, 2002.
8. Van Vlack L H. *Propriedades dos materiais cerâmicos*. 1ª ed Editora Edgard Blucher: São Paulo, 1973.
9. Hulbert S F, Hench L L, Forbes D e Bowman L S. *Ceramics in Surgery*. 1983:3-25.
10. Streicher R M e Scho R. Ceramics surface as wear partners for polyethylene. *Bioceramics* 4, 1991.
11. Hench L.L. e Wilson J. *An introduction to bioceramics*. 1st ed. World Scientific: Singapore, 1993.
12. Hench L.L., Splinter R.J., Allen W.C., Greenlee T.K. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res Symp* 1971;36:117-141.

13. Oliveira J.M., Correia R.N., Fernandes M.H. Surface modifications of a glass and a glass-ceramic of the MgO-3CaO.P₂O₅-SiO₂ system in a simulated body fluid. *Biomaterials* 1995;16:849-854.
14. Gomez-Vega JM, Saiz E, Tomsia AP, Marshall GW, Marshal SJ. Bioactive glass coatings with hydroxyapatite and Bioglass[®] particles on Ti-based implants. 1. Processing. *Biomaterials* 2000;21:105-111.
15. Peitl O., Zanutto E.D. e Hench L.L. Highly bioactive P₂O₅-Na₂O-CaO-SiO₂ glass-ceramics. *J. Non-Cryst Solids* 2001;292:115-126.
16. Leonelli C, Lusvardi G, Malavasi G, Menabue L, Tonelli M. Synthesis and characterization of cerium-doped glasses and in vitro evaluation of bioactivity. *J. of Non-Cryst Solids* 2003;316:198–216.
17. Oliveira JM, Correia RN, Fernandes MH, Rocha J. Influence of the CaO/MgO ratio on the structure of phase separated glasses: a solid state ²⁹Si and ³¹P MAS NMR study. *J. Non-Cryst Solids* 2000;265:221-229.
18. Łączka M, Cholewa K, Łączka-Osyczka A. Gel-derived powders of CaO-P₂O₅-SiO₂ system as a starting material to production of bioactive ceramics. *Journal of Alloys and Compounds* 1997;248:42-51.
19. Schrooten J e Helsen JA. Adhesion of bioactive glass coating to Ti6Al4V oral implant. *Biomaterials* 2000;21:1461-1469.
20. Strnad Z. Role of the glass phase in bioactive glass-ceramics. *Biomaterials* 1992;13:317-321.
21. Kokubo T. Apatite formation on surfaces of ceramics metals and polymers in body environment. *Acta mater.* 1998;46:2519-2527.
22. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Klokkevold PR, Kenney EB, Dimitrijevic B, Nedic M, Jancovic S, Orsini M. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontias. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90:581-586.
23. Thronson RR, Sexton SB, Tex G. Grafting mandibular third molar extraction sites: A comparison of bioactive glass to a nongrafted site. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:413-9.
24. Kinnunen I, Aitasalo K, Pöllönen M, Varpula M Reconstruction of orbital floor fractures using bioactive glass *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2000;28:229-234.

25. Allan I, Newman H e Wilson M. Particulate Bioglass[®] reduces the viability of bacterial biofilms formed on its surface in an *in vitro* model. *Clin. Oral. Impl. Res* 2002;23:53-58.
26. Allan I, Newman H e Wilson M. Antibacterial activity of particulate Bioglass[®] against supra- and subgingival bacteria. *Biomaterials* 2001;22:1683-1687.
27. Wheeler D L, Stokes K E, Holellrich R G, Chamberland D L, McLoughlin S W. Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of enacellous defects. *J Biomed Mater Res* 1998;41:527-533.
28. Bloyer D R, Gomez-Vega J M, Saiz E, McNamey J M, Cannon R M e Tomsia P. Fabrication and characterization of a bioactive glass coating on titanium implant alloys. *Acta Mater.* 1999;47:4221-4224.
29. Schrooten J, Roebben G e Helsen JA. Young's modulus of bioactive glass coated oral implants: porosity corrected bulk modulus versus resonance frequency analysis. *Scripta Materialia* 1999;41:1047-1053.
30. Owen A.J., Henzel J., Škrbić. Ž., Divjaković. Crystallization and melting behaviour of PHB and PHB/HV copolymer. *Polymer* 1992;33:1563-1567.
31. Savenkova L, Gercberga Z, Nikolaeva V, Dzene A, Bibers I e Kalnin M. Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films. *Process Biochemistry* 2000;35:573-579.
32. Wang Y W, Wu Q e Chen G Q. Attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts on random biopolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds. *Biomaterials* 2004;25:669-675.
33. Rosa D S, Lotto N T, Lopes D R, Guedes C G F. The use of roughness for evaluating the biodegradation of poly-β-(hydroxybutyrate) and poly-β-(hydroxybutyrate-co-β-valerate). *Polymer Testing* 2004;23:3-8.
34. Freier T., Kunze C., Nischan C., Kramer S., Sternberg K., Saß M. Hopt U. T., Schmitz K.P. In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch base on poly(3-hydroxybutyrate). *Biomaterials* 2002;23:2649-2657.
35. N. K. Kalfoglou, D. S. Skafidas, "Compatibility of blends of poly(ethylene terephthalate) with the ionomer of ethylene-methacrylic acid copolymer", *European Polymer Journal* 1994;30:933-939.
36. Saito T, Tomita K, Juni K, Ooba K. In vivo an in vitro degradation of poly(3-hydroxybutyrate) in rat. *Biomaterials* 1991;12:309-312.

37. Doyle C., Tanner E. T. Bonfield W. In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite. *Biomaterials* 1991;12:841-847.
38. Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials* 2003; 24:2133-2151.
39. Wang M. et al. Developing Tricalcium Phosphate/ Polyhydroxybutyrate composite as a new biodegradable material for clinical applications. *Bioceramics* 2001;13:193-195.
40. Merrick J M, Steger R e Dombroski D. Hydrolysis of native poly(hydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB, and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. *Int. J. Biol, Macromolec* 1999;25:129-134.
41. Nurbas N.M., Kutsal T. Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Alcaligenes eutrophus*. *National Chemical Engineering Congress*; Middle East Technical University, Ankara, 1994, p. 162.
42. Qi Q e Rehm B H A. Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of polyhydroxybutyrate synthesis. *Microbiology* 2001;147:3353-3358.
43. Reddy C S K, Ghai R, Rashmi, Kalia V C. Polyhydroxyalkanoates: na overview. *Bioresource technology*. 2003;7:137-146.
44. Liebergessel M, Sonomoto K, Madkour M, Mayer F, Steinbüchel A. Purification and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid) granules. *Eur. J. Biochem*. 1994;226:71-80.
45. Mirtha E F, López N I, Méndez B S, Fürst U P, SteinBüchel A. Isolation and partial characterization of *Bacillus megaterium* mutants deficient in poly(3-hydroxybutyrate) synthesis. *Can. J. Microbiol*. 1994;41:77-79.
46. Zhang H, Obias V, Gonyer K, Dennis D. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant Escherichia coli an Klebsiella strains. *Appl. Environ. Microbiol*. 1994;60:1198-1205.
47. Bonfield W., Grynypas M.D., Tully A.E., Bowman J., Abram J. Hydroxyapatite reinforced polyethylene – a mechanically compatible implant material for bone replacement. *Biomaterials* 1981;2:185-186.

48. Heikkilä J.T., Aho A.J., Kangasniemi I., Yli-Urpo A. Polymethylmethacrylate composites: disturbed bone formation at the surface of bioactive glass and hydroxyapatite. *Biomaterials* 1996;17:1755-1760.
49. Oréfice R.L., et al. *In vitro* bioactivity of polymer matrices reinforced with a bioactive glass phase. *J Braz. Chem. Soc.* 2000;11:78-85.
50. Chen L. and Wang M. Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer. *Biomaterials* 2002;23:2631-2639.
51. Ni J. e Wang M. *In vitro* evaluation of hydroxybutyrate reinforced polyhydroxybutyrate composite. *Mat. Sci and Eng.* 2002;20:101-109.
52. Roether J. et al. Development and *in vitro* characterization of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass® for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2002;23:3871-3878.
53. Anusavice K.J. Philips: Materiais Dentários. 10th ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1998.
54. Boccaccini AR e Maquet V. Bioresorbable and bioactive polymer/Bioglass® composites with tailored pore structure for tissue engineering applications. *Composites Science and Technology*, artigo em impressão, 2003.
55. Hench L L. Bioceramics: theory and clinical application, in: Andersson O H e Yli-Urpo A (Eds), *Proceedings of the 7th International Symposium on Ceramics in Medicine*, Turku, 1994;7:3.
56. Gao T, Aro HT, Ylänen H, Vuorio. Silica-based bioactive glasses modulate expression of bone morphogenetic protein-2 mRNA in Saos-2 osteoblasts *in vitro*. *Biomaterials* 22, 2001; 1475-1483.
57. Hulbert S F, Bokros J C, Hench L L, Wilson J e Heimke G. Ceramics in clinical applications, past, present and future, in *High tech ceramics*. 1^a ed. Elsevier Science Pub: Amsterdam, 1987.
58. Kokubo T. Surface chemistry of bioactive glass-ceramics. *J. Non-Cryst Solids* 1990;120:138-151.
59. Kokubo T., Kushitani H., Ohtsuki C., Yamamuro T. Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramic with a simulated body fluid. *J. Mater Sci: Materiasl in Medicine* 1992;3:79-83.
60. Guyton A C e Hall J E. *Human Physiology and Mechanisms of Disease*. 6^a ed W.B. Saunders Company: Philadelphia 1997.

61. Junqueira L C e Carneiro J. *Histologia Básica*. 8ª ed Guanabara-Koogan: Rio de Janeiro, 1995.
62. Krajewski A, Malavolti R e Piancastelli A. Albumin adhesion on some biological and non-biological glasses and connection with their Z-potentials. *Biomaterials* 1996;17:53-60.
63. Bronzino J. *Handbook of biomedical engineering*. 2ª ed CRC Press:New York, 2003.
64. Krajewski A, Piancastelli A e Malavolti R. Albumin adhesion on ceramics and correlation with their Z-potential. *Biomaterials* 1998;19:637-641.
65. Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A. *Princípios de análise instrumental*. 5ª ed Bookman, 2002.
66. Callister W D. *Ciência e engenharia de materiais: uma introdução*. 5ª ed LTC: Rio de Janeiro, 2002.
67. Rawle A. Basic principles of particle size analyzer. *Malvern Instruments Limited*. www.malvern.co.uk
68. Jennings H H, Thomas J J. A discussion of the paper “The BET-specific surface area of hydrated Portland cement and related materials” by Ivan Odler. *Cement and Concrete research* 2004;34:1959-1960.
69. Paiva A O, Clerici J H, Costa N, Fernandes M H V. Evaluation of influence of albumin on the adhesion of bioactive layer by Atomic Force Microscopy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, submetido, 2004.
70. Helsen J A, Proost J, Schrooten J, Timmermans G e Brauns E. Glasses and bioglasses: synthesis and coatings. *J European. Ceramic Society* 1997;17:147-152.
71. Schwartz M.M., editor. *Composite materials handbook*. 2ª ed. McGraw-Hill: New York, 1992.
72. Jaakkola T., Rich J., Tirri T., Närhi T., Jokinen M., Seppälä J., Yli-Urpo A. In vitro Ca-P precipitation on biodegradable thermoplastic composite of poly(ϵ -caprolactone-co-dl-lactide) and bioactive glass (S53P4). *Biomaterials* (2004) em impressão.
73. Rosengren Å, Pavlovic E, Oscarsson S, Krajewski A, Ravaglioli A and Piancastelli A. Plasma protein adsorption pattern on characterized ceramic biomaterials. *Biomaterials* 2002;23:1237-1247.

74. Zhong J.P.; Greenspan D.C.; Feng J.W. A microstructural examination of apatite induced by Bioglass(r) in vitro. *Journal of Materials Science: Materials In Medicine* 2002;13:321-326.
75. Yoshie N, Saito M, Inoue Y. Effect of chemical compositional distribution on solid-state structures and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Polymer* 2004;45:1903-1911.
76. Pereira D, Cachinho S, Ferro M C e Fernandes M H V. *Journal of the European Ceramic Society* 2004, em impressão.
77. Leonor I B, Ito A, Onuma K, Kanzaki N e Reis R L. *In vitro* bioactivity of starch thermoplastic/hydroxyapatite composite biomaterials: an *in situ* study using atomic force microscopy. *Biomaterials* 2003;24:579.
78. LeGeros R Z. Apatites in biological systems. *Prog. Crystal. Growth Charact.* 1998;4:1771-1777.
79. Costa N e Maquis P.M. Biomimetic processing of calcium phosphate coating. *Medical Engineering & Physics* 1998;20:602-606.
80. Mahmood T A e Davies J E. Incorporation of amino acids within the surface reactive layers of bioactive glass *in vitro*: an XPS study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2000;11:19-23.
81. Krajewski A e Ravaglioli A. Interpretation of difficulties in the initial adhesion of bioactive glasses to bone. *Biomaterials* 1988;9:449-453.
82. Horbett T A. Cells and proteins of blood. In: *Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine* Academic Press:San Diego, 1996.
83. Salinas A J, Román J, Vallet-Regí M, Oliveira J M, Correia R N, Fernandes M H. *In vitro* bioactivity of glass and glass-ceramics of the $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO} \cdot \text{SiO}_2\text{-CaO} \cdot \text{MgO} \cdot 2\text{SiO}_2$ system. *Biomaterials* 2000;21:251-257.
84. Leonor I. et al. *In situ* study of partially crystallized Bioglass[®] and hydroxylapatite *in vitro* bioactivity using atomic force microscopy. *J Biomed Mater Res* 2002;62:82-88.

Anexos

Publicações em periódicos

Neto D. G. M., Paiva A. O., Costa N. G. **Caracterização de compósitos biovidro/polihidroxibutirato quanto a morfologia e microdureza.** *Revista Matéria* 2005;10:51-62.

Artigos submetidos

Paiva A. O., Clerici J.H., Fernandes M.H.V., Costa N.G. **Evaluation of influence of albumin on adhesion of bioactive layer by Atomic Force Microscopy.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2004. (aceito para publicação)

Paiva A. O., Duarte M. G., Fernandes M.H.V., Gil M.H., Costa N.G. **In vitro studies of bioactive glass/polyhydroxybutyrate composites.** *Biomaterials*, 2004.

Congressos

2004 – “Bioatividade in vitro de compósitos biovidro/polihidroxibutirato”

Apresentação em pôster – Artigo completo publicado nos anais do congresso

XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência de Materiais

Porto Alegre/RS

2004 – “Caracterização de compósitos biovidro/polihidroxibutirato quanto a morfologia e microdureza”

Apresentação oral – Resumo publicado nos anais do congresso

II Congresso em Ciência de Materiais do Mercosul

Joinville/SC

2004 - “Síntese, caracterização e análise in vitro de compósitos biovidro/polihidroxibutirato”

Apresentação oral – Resumo publicado nos anais do congresso

III Congresso Latino Americano de Órgão Artificiais e Biomateriais

Campinas/SP

Estágio no exterior

Estágio realizado na Universidade de Aveiro – Portugal, com a Prof^{ta}. Dr^a. Maria Helena Fernandes (CICECO), que consistiu na obtenção do vidro e do compósito e caracterizações via Coulter Counter, B.E.T, DSC, DRX, MEV-EDS e estudo in vitro dos materiais, no período de 8 de novembro de 2003 a 26 março de 2004.