

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR *Sabina da Memória*
Cardoso de Andrade E APROVADA
PELA COMISSÃO JULGADORA EM *30.12.2012*
Geulha B. Zougla
ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

Sabina da Memória Cardoso de Andrade

**Desenvolvimento de Bionanocompósitos Poli(álcool
vinílico)-Poliuretano/Hidroxiapatita Para Enxerto
Maxilo Facial.**

N. 86/2012

Campinas/2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

Sabina da Memoria Cardoso de Andrade

**Desenvolvimento de Bionanocompósitos Poli(álcool
vinílico)-Poliuretano/Hidroxiapatita Para Enxerto
Maxilo Facial.**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para obtenção do título de Doutora em Engenharia Mecânica.

Área de Concentração: Materiais e Processos de Fabricação.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Cecília Amélia Zavaglia de Carvalho

Co-Orientadora
Prof^a. Dr^a. Carmen Gilda Barroso Tavares Dias

Campinas/2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

An24d Andrade, Sabina da Memoria Cardoso de, 1955-
Desenvolvimento de bionanocompósitos Poli(Álcool
Vinílico)-Poliuretano/Hidroxiapatita para enxerto maxilo
facial / Sabina da Memoria Cardoso de Andrade. --
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia
Coorientador: Carmen Gilda Barroso Tavares Dias.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Poliuretano. 2. Hidroxiapatita. 3. Materiais
nanocompositos. 4. Materiais biocompatíveis. 5.
Próteses e implantes. I. Zavaglia, Cecília Amélia de
Carvalho, 1954-. II. Dias, Carmen Gilda Barroso
Tavares. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Mecânica. IV. Título.

Título em Inglês: Poly(Vinyl Alcohol)-Polyurethane/Hydroxyapatite
bionanocomposites development for facial maxillo graft

Palavras-chave em Inglês: Polyurethane, Hydroxyapatite, Nanocomposite
material, Biocompatible materials, Prostheses and
Implants

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Doutora em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Gilmara de Nazareth Tavares Bastos, Maria Clara Filippini
Ierardi, Marcos Akira d'Avila, Manoel Ribeiro da Silva

Data da defesa: 30-07-2012

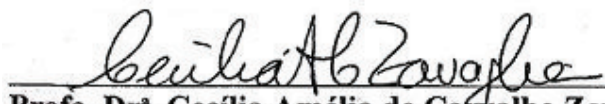
Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

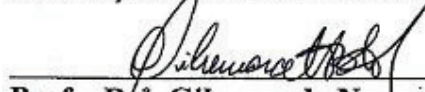
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS
TESE DE DOUTORADO

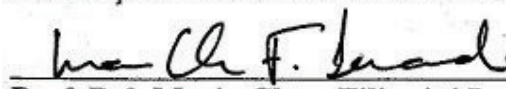
Desenvolvimento de Bionanocompósitos Poli(álcool vinílico)-Poliuretano/Hidroxiapatita Para Enxerto Maxilo Facial.

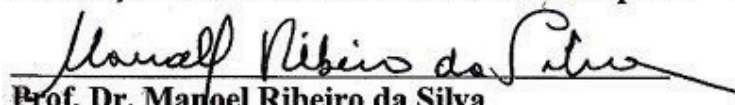
Autora: Sabina da Memória Cardoso de Andrade
Orientadora: Profa. Dr^a. Cecília Amélia Zavaglia de Carvalho
Co-Orientadora: Profa. Dr^a. Carmen Gilda Barroso Tavares Dias

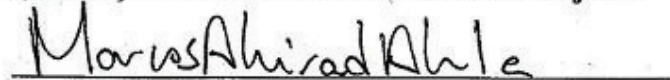
A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Tese:


Profa. Dr^a. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Presidente
Instituição: Universidade Estadual de Campinas


Profa. Dr^a. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos
Instituição: Universidade Federal do Pará


Prof. Dr^a. Maria Clara Filippini Ierardi
Instituição: Universidade Estadual de Campinas


Prof. Dr. Manoel Ribeiro da Silva
Instituição: Universidade Federal de Itajubá


Prof. Dr. Marcos Akira d'Avila
Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Campinas, 30 de julho de 2012.

Dedicatória

À minha família de origem e família constituída, em especial meu pai Pedro Tupinambá da Memória Cardoso e minha mãe Maria Raimunda Rodrigues Cardoso. (in memoriam).

Agradecimentos

A Deus, por mais uma chance de vida.

À Virgem de Nazaré, a quem sempre recorro em qualquer momento.

À Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, pela orientação, amizade e apoio.

À Profa. Dra. Carmen Gilda Barroso Tavares Dias, pela orientação, amizade e apoio.

Aos Professores Dr. Amauri Garcia, Dra. Cecília Zavaglia, Dr. Rodinei Bertazolli e Dr. Itamar Ferreira, pelos conhecimentos compartilhados.

Aos Professores Dr. Amauri Garcia e Dr. Otávio Fernandes Lima da Rocha, pela gestão do projeto DINTER.

A CAPES, pelo Projeto DINTER.

Aos Professores de odontologia da UFPA, Dra. Cecy Martins e Dr. Adriano Corrêa, por informações importantes.

Ao IFPA, pelo incentivo à capacitação.

Ao Laboratório ACECIL de Campinas e à Santa Casa do Pará, pela esterilização dos materiais para ensaios biológicos.

Ao Dr. André Jardini, pelo apoio para realização de ensaios.

À Dra Ana Beatriz Almeida e Danielle Feliciano, pelos ensaios preliminares *in vivo*.

À Dra. Ana Paula Drummond Rodrigues do Instituto Evandro Chagas de Belém, pelos ensaios *in vivo*.

Ao CEMIB/UNICAMP, pelos ensaios *in vivo*.

À Dra. Olga Zazuco e Tatiana do IPEN pelos ensaios *in vitro*.

À Dra. Ana Amélia Rodrigues do LABIMO/UNICAMP, pelos ensaios *in vitro*.

Ao Laboratório de Neuroquímica da UFPA e Leilane, pelos ensaios *in vitro*.

À USP de Lorena e Aline, pelos ensaios de caracterização.

À Ana Paula (UFPA) e Claudenete (UNICAMP), pela caracterização MEV E DSC-TG.

Ao Eduardo (UNICAMP), pelo ensaio de fluorescência.

Ao Dr. Oscar Choque do IFPA, pela caracterização de raios X.

Ao Fernando Augusto e nossos filhos Andressa Priscila e Pedro Paulo, pela existência em minha vida.

Aos meus irmãos José Ribamar, Águida Madalena e Manoel José, guerreiros sempre!

Aos meus amados sobrinhos.

À Izis, minha pequena notável.

Aos médicos que me assistiram em momento muito difícil, em especial Sonia Santos e Gilberto Erichsen, pela excelente condução do processo.

Aos professores da Coordenação de Design meu “habitat natural” Adolfo, Berredo, Edilberto, Mary, Rosângela, Samico Nelson, Luciana, Ricardo José, pelas aulas que não pude ministrar.

Ao Marcelo Henrique, Cleber, Vera Lúcia Dias e Jean Rodrigues, pelo apoio para realização de ensaios.

À Maria da Neves, por estar presente em minha vida em muitas vezes que precisei.

À Maria Andreлина, que me acompanhou em uma hora tão precisa para tratamento de saúde.

À Aline Corecha Santos, pelo carinho e apoio e por se fazer presente mesmo distante, inclusive nos congressos.

Aos “Anjos de Sampa” Betty Max e Lourdes Brasil, por inúmeros favores além de idas e vindas de São Paulo à Campinas.

Ao Gustavo de Carvalho Zavaglia, pela terapia mútua em alguns momentos quando estive em Campinas.

Ao Leonardo Rodrigues, pela amizade e gentileza em doar-me HA para desenvolver este trabalho.

À Giselle, pelo apoio e companhia em Campinas.

À Emmanuelle e Bianca, pela hospedagem em Campinas, amizade e carinho.

À Núbia, pela companhia e boas dicas em Campinas

Aos meus amigos do IFPA e aos colegas de doutorado Sandra, Syme, Edison, Célio, Expedito Rytney, Laércio, Daniel e em especial Fernando de Almeida Gonçalves nosso monitor.

À Rachel Margalho, pelo apoio sempre que precisei.

Aos colegas mestrandos e doutorandos da FEM-UFPA, pelo apoio no laboratório e amizade, em especial Izael Pinho pela realização de ensaios mecânicos e Jhonny pelos ensaios de reologia.

Aos colegas mestrandos e doutorandos da FEM-UNICAMP, pelo apoio e amizade.

À Alice, pela amizade e muitos cafezinhos.

Enfim, a todos que se sentirem envolvidos neste processo, muito obrigada!

“Quem não compreende um olhar, tampouco compreenderá uma longa explicação.”

Mário Quintana

Resumo

A coesão de um grupo de profissionais de diversas áreas onde haverá troca de informações para a concretização de um biomaterial é fator decisivo para reunir todos os requisitos necessários de caracterizações físicas, químicas e biológicas e assim garantir biocompatibilidade e biofuncionalidade, associadas à interação entre o tecido vivo e o biomaterial. *Scaffold* biodegradável que combina a bioatividade de hidroxiapatita (HA) e a degradabilidade ajustável de matriz de poliuretano (PU) obtido a partir do PVAI foi desenvolvido nesta pesquisa e submetido à caracterizações morfológicas, mecânicas e biológicas. Este novo tipo de *scaffold* não é tóxico, apresenta interconexão de poros e microporos nas paredes dos poros, boa resistência mecânica e boa ativação de crescimento celular, propriedades que satisfazem as exigências do uso clínico. As análises através de microscopia eletrônica de varredura mostram além da conexão de poros as nanopartículas de hidroxiapatita distribuídas de maneira uniforme na matriz do bionanocompósito. Os valores médios de resistência à compressão da matriz e do bionanocompósito foram próximos de 60 MPa tanto para PVAI-PU como para PVAI-PU/HA com 25% de HA, e 105 MPa PVAI-PU/HA com 33% de HA. Após 24 horas de implante o biomaterial PVAI-PU/HA já apresentou em observação por MEV, detalhe de células aderidas, sugestivas provavelmente de células de fibroblasto, espraçamento com formação de uma camada celular compacta e homogênea e após 14 dias do implante foi observada a interação do biomaterial com as camadas do tecido subcutâneo e a invasão do crescimento celular pelos poros interconectados do *scaffold*. Portanto o *scaffold* desenvolvido neste trabalho é indicado com expectativas promissoras para implantes ósseos.

Palavras-chave: poliuretano, hidroxiapatita, compósitos biocompatíveis, ensaios *in vitro*, ensaios *in vivo*, *scaffolds*, implantes.

Abstract

The cohesion of a group of professionals from many areas, exchanging information to concretize a bio material, is a crucial factor to gather all of the requirements of physical, chemical, and biological characterization and therefore ensure biocompatibility and bio functionality, associated to the interaction of the living tissue and the biomaterial. In this research it was developed and subjected to morphological, mechanical and biological characterization, a biodegradable scaffold that combines the bioactivity of hydroxyapatite (HA) and the adjustable degradability of polyurethane matrix (PU) obtained from the PVA1. This new kind of Scaffold is non toxic, has interconnected pores and micropores at the pore's wall, great mechanical resistance and great cellular growing activation. These properties meet the clinical use requirements. The scanning electronic microscopy analysis shows, beside the pore connection, the hydroxyapatite microparticles arranged evenly in the bionanocomposite. The medium values of compression resistance of the matrix and of the bionanocomposite were close to 60 MPa for PVA1-PU well as PVA1-PU/HA with 25% of HA, and 105 MPa PVA1-PUH/HA with 33% of HA. After 24 hours of insertion, the biomaterial PVA1-PU/HA presented as seen in MEV observation, adherent cells, probably coming from fibroblast cells, spreading with a cellular compact and homogeneous layer and, after 14 days of the insertion, it was observed the biomaterial interaction with the layers of the subcutaneous tissue and the invasion of the cellular growing through the scaffold's interconnected pores. Therefore, the osseous scaffold is indicated with promissing expectations to implants.

Key-words: polyurethane, hydroxyapatite, in vitro tests, in vivo tests, scaffolds, implants.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 OBJETIVOS	04
1.1.1 Objetivo geral	04
1.1.2 Objetivos específicos	04
2 REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1 TECIDO ÓSSEO	05
2.1.1 Características gerais do osso	05
2.1.2 Enxertos ósseos	06
2.1.3 Enxertos de maxilo facial	09
2.2 ENGENHARIA TECIDUAL	11
2.2.1 Biomateriais	12
2.2.2 Poli(álcool vinílico) (PVAI)	14
2.2.3 Isocianato	15
2.2.4 Poliuretano (PU)	16
2.2.5 Hidroxiapatita (HA)	17
2.2.6 Biocompósitos de poliuretano e hidroxiapatita	18
2.2.7 <i>Scaffolds</i>	21
2.3. ENSAIOS BIOLÓGICOS	22

3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 MATERIAIS	23
3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	23
3.2.1 Obtenção do bionanocompósito PVAI-PU/HA	23
3.2.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier – FTIR	27
3.2.3 Ensaio Reológicos	27
3.2.4 Difração de raios X (DR-X)	28
3.2.5 Absorção de água	29
3.2.6 Densidade	29
3.2.7 Porosidade	30
3.2.8 Ensaio mecânico de compressão	30
3.2.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	31
3.2.10 Análise espectroscópica por energia dispersiva (EDS)	32
3.2.11 Espectrofotometria de fluorescência de raios X (XRF)	32
3.2.12 Calorimetria exploratória diferencial simultânea (TG-DSC)	32
3.2.13 Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	32
3.2.14 Ensaio biológicos <i>in vivo</i>	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1 OBTENÇÃO DO BIONANOCOMPÓSITO PVAL-PU/HA	38
4.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER – FTIR	42
4.3 ANÁLISES REOLÓGICAS	47
4.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS – X	50

4.5 ENSAIOS DE ABSORÇÃO DE ÁGUA	54
4.6 DENSIDADE	54
4.7 POROSIDADE	54
4.8 ENSAIO MECÂNICO SOB COMPRESSÃO	55
4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	57
4.10 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA POR ENERGIA DISPERSIVA (EDS)	67
4.11 ESPECTROFOTOMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (XRF)	70
4.12 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (TG-DSC)	70
4.13 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO	72
4.14 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VIVO	75
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
5.1 Conclusões	81
5.2 Sugestões para trabalhos futuros	82
5.3 Trabalhos Apresentados Relacionados com o Tema da Pesquisa	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXO Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP	95

Lista de Ilustrações

Figura 1.1 – Reunião e interseção das atividades para obtenção de um implante sintético	02
Figura 2.1 – Locais com possibilidades de implantes sintéticos	11
Figura 3.1 – Fluxo dos experimentos para obtenção do bionanocompósito	25
Figura 3.2 – Fluxo dos ensaios de caracterização do bionanocompósito	26
Figura 3.3 – Fluxo das etapas dos ensaios biológicos dos bionanocompósitos	26
Figura 4.1- Imagem do biomaterial antes da cura	38
Figura 4.2 - Imagem do biomaterial em estereoscópio cura a 180°C (a) e cura a 150°C (b)	39
Figura 4.3 - Biomaterial curado em temperatura ambiente por 18 dias	39
Figura 4.4 - Moldes de aço inoxidável utilizado para cura a quente do biomaterial	40
Figura 4.5- Mistura PVAI-PU/HA com 40% de hidroxiapatita	41
Figura 4.6 - Biomaterial para caracterizações e ensaios biológicos	41
Figura 4.7 - Amostras do biomaterial no filme de PE no porta-amostra para FTIR	42
Figura 4.8 – Espectros na região do infravermelho do filme de PE	42
Figura 4.9 - Espectros do biomaterial no FTIR monitorado de 25°C até 150°C	43
Figura 4.10 - Espectros do biomaterial PVAI-PU/HA com aquecimento no FTIR	44
Figura 4.11 - Espectros de HDT no FTIR	45
Figura 4.12 - Espectros do PVAI/HDT no FTIR	45
Figura 4.13 - Espectros do HA/HDT no FTIR	46
Figura 4.14 - Espectros do biomaterial PVAI-PU/HA no FTIR	46
Figura 4.15 - Curvas de reologia de formação de PVAI-PU	48
Figura 4.16 - Curvas de reologia do biomaterial PVAI-PU/HA	48

Figura 4.17 - Biomaterial PVAL-PU/HA curado 115°C no reômetro	49
Figura 4.18 - Biomaterial PVAI-PU/HA curado a 120°C no reômetro	49
Figura 4.19 - Difratoograma de raios X (a) PVAI e (b) PVAI – PU	51
Figura 4.20 – Difratoograma de raios X da HA	51
Figura 4.21 – Difratoograma de raios X do biomaterial PVAI-PU/HA com 25% de HA	52
Figura 4.22 – Difratoograma de raios X do biomaterial PVAI-PU/HA com 33% de HA	52
Figura 4.23 - Corpos de prova ensaiados sob compressão	55
Figura 4.24 - Resistência à compressão de PVAI-PU e PVAI-PU/HA, 25% e 33% de HA	56
Figura 4.25 – Imagem micropartículas de PVAI observadas por MEV	57
Figura 4.26 – Aglomerados de nanopartículas de HA observados por MEV	58
Figura 4.27 – Imagem da blenda PVAI-PU observada por MEV	58
Figura 4.28 – Imagem da superfície da base do <i>scaffold</i> PVAI-PU/HA com 25% de HA	59
Figura 4.29 – Imagem da superfície lateral do <i>scaffold</i> PVAI-PU/HA com 25% de HA	59
Figura 4.30 – Imagem da fase PU/HA com 25% de HA observada em MEV	60
Figura 4.31 – Superfície interna de PVAI-PU/HA com 25% de HA observada em MEV	61
Figura 4.32 - Distribuição de poros no <i>scaffold</i> PVAI-PU/HA observada em MEV	62
Figura 4.33 - Interconexão de poros do <i>scaffold</i> PVAI-PU/HA observada em MEV	62
Figura 4.34- Fase PU/HA do bionanocompósito PVAI-PU/HA observada em MEV	63
Figura 4.35 - Fase PU/HA do bionanocompósito PVAI-PU/HA observada em MEV	63
Figura 4.36 - Paredes dos poros com microporos do bionanocompósito com 33% de HA	64
Figura 4.37– Bionanocompósito com porosidade mais fechada observado em MEV	65
Figura 4.38 – Bionanocompósito trincado sob compressão observado em MEV	65

Figura 4.39 – Imagem de nanopartículas de HA observada em MEV 50.000X	66
Figura 4.40 - Imagem de nanopartículas de HA observada em MEV 80.000X	66
Figura 4.41 – Espectros de micropartículas de PVAl analisados por EDS	67
Figura 4.42 - Espectros do pó de HA analisados por EDS	69
Figura 4.43 – Espectros do bionanocompósito analisados por EDS	70
Figura 4.44 - Curva de TG-DSC com 25% de HA	71
Figura 4.45 - Curva de TG-DSC com 33% de HA	72
Figura 4.46 - Curva de viabilidade celular dos testes de citotoxicidade	73
Figura 4.47 – Imagem de células NIH3T3 aderidas ao biomaterial	73
Figura 4.48 – Gráfico da comparação de viabilidade celular	74
Figura 4.49 – Calota craniana do rato com dois defeitos, com implante e controle.	75
Figura 4.50 – Lâminas após o corte para análise histológica	76
Figura 4.51 – Lâmina do material de controle	77
Figura 4.52 – Imagem do biomaterial para o grupo controle (a) e poro (b)	78
Figura 4.53 – Imagem do biomaterial implantado no tecido do camundongo 24 horas	78
Figura 4.54 - Imagem do biomaterial implantado no tecido do camundongo após 7 dias	79
Figura 4.55 - Imagem do biomaterial implantado no tecido do camundongo após 14 dias	80

Lista de Tabelas

Tabela 4.1 – Dados de difração e raios X de HA	53
Tabela 4.2 – Dados de difração e raios X do biomaterial com 25% de HA	53
Tabela 4.3 – Dados de difração e raios X do biomaterial com 33% de HA	54
Tabela 4.4 – Valores de absorção de água, densidade e porosidade do biomaterial	55
Tabela 4.5 – Elementos obtidos por EDS para o PVAI	67
Tabela 4.6 – Elementos obtidos por EDS para o pó de hidroxiapatita	68
Tabela 4.7 – Elementos obtidos por EDS para o biomaterial PVAI-PU/HA	69
Tabela 4.8 – Composição média do bioamaterial por fluorescência de raios X	70
Tabela 4.8 – Composição média do bioamaterial por fluorescência de raios X	74

Lista de Equações

Equação 1 – Equação de Bragg	28
Equação 2 – Equação para cálculo da absorção de água	29
Equação 3 – Equação para cálculo da porosidade	30

Lista de Nomenclatura e Símbolos

μ l – micro litro
 μ m – micrometro
Ab – absorção
Ca/P – relação cálcio fósforo da hidroxiapatita
CHO - Células de ovário de ratos chinês
cm – centímetro
CO₂ – Gás carbônico
cos – coseno
Den – densidade
DMEM - Dulbecco's modified Eagle's médium
DSC – Calorimetria exploratória de varredura
EDS – Análise espectroscópica por energia dispersiva
FCS – fluido corpóreo simulado
FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
g – grama
HA – Hidroxiapatita
HDI – Diisocianato de hexametileno
HDT - Trímero de HDI
IC_{50%} – Índice de citotoxicidade
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
min – minuto
ml – mililitro
MPa – megapascal
MTS-3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium),
MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NaOH – hidróxido de sódio
NIH3T3 – Mouse embryonic fibroblast cell line
nm - nanometro
nm - nanometro
 $\varnothing$ – Diâmetro
°C – grau Celcius
PBS - Phosphate buffer saline
PEAD – polietileno de alta densidade
PMS - phenazine methosulfate
Po – porosidade
PU – Poliuretano
PU/HA 1 e 2 – Material compósito poli(álcool vinílico)/poliuretano/hidroxiapatita
PVAI – Poli(álcool vinílico)
RPMI - (Roswell Park Memorial Institute) medium
SBF – Soro bovino fetal
sen – seno
TG – Termogravimetria

θ – ângulo do feixe de Raios X incidentes
 λ – comprimento de onda

Lista de Siglas

ASTM - American Society for Testing and Materials

CAPES – Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório

DINTER – Doutorado Interinstitucional

FEM – Faculdade de Engenharia Mecânica

IEC - Instituto Evandro Chagas

IFPA – Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Pará

IPEN – Instituto de Pesquisas Nucleares

LABIMO - Laboratório de biomecânica ortopédica

UFPA – Universidade Federal do Pará

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

USP – Universidade de São Paulo

SOBRAPAR - Sociedade Brasileira de Pesquisa e Assistência para Reabilitação Craniofacial

1 INTRODUÇÃO

Estudos teóricos e experimentais interdisciplinares para obtenção de biomateriais têm sido desenvolvidos por pesquisadores de diversas áreas como engenharia, física, biologia, medicina e odontologia, em benefício para diversos tratamentos relacionados a problemas causados por acidentes, doenças ou desgastes pela idade.

Os procedimentos para a recuperação de tecidos e órgãos com patologias podem ser realizados através de transplantes ou de implantes. Porém no caso dos transplantes que precisam de doadores vivos, além da questão ética e religiosa existem também os problemas de rejeição, o que obriga o paciente a ingestão de drogas imunossupressoras e outros medicamentos que impeçam a contaminação por micro-organismos. Já os materiais desenvolvidos para serem utilizados em implantes denominados de biomateriais, além de não apresentarem alguns dos problemas citados, passam por um conjunto de análises que visam à interação com os tecidos receptores do organismo. Esses biomateriais são destacados entre os diversos produtos utilizados na área de saúde.

Para a obtenção de um biomaterial torna-se necessária a troca de informações entre os profissionais das áreas envolvidas, que visem reunir todos os requisitos para caracterizações físicas, químicas e biológicas que irão garantir a biocompatibilidade e biofuncionalidade associadas à interação entre o tecido vivo e o biomaterial.

O sucesso clínico do implante requer a simultânea realização de uma interface estável entre o tecido conjuntivo a ser substituído e a correspondência do comportamento mecânico do implante (HENCH, 1991).

A atual tecnologia da engenharia tecidual possibilita com eficiência a produção de novos biomateriais para *scaffolds* de reconstituição óssea, o que irá contribuir para elevar o nível da qualidade de vida em pacientes com problemas patológicos e/ou estéticos.

Uma visão matemática da idealização de um implante sintético seria a comparação com um diagrama de Venn, que identifica a reunião e interseção de conjuntos, Figura 1.1, onde são mostrados três conjuntos que representam a união das atividades da área das engenharias que inclui desde o projeto do biomaterial para o implante até suas caracterizações morfológicas físicas e químicas, da área das ciências da saúde responsável pelas caracterizações biológicas e

do biomaterial que responderá de forma positiva ou não, após implantado no tecido vivo. Observa-se que o êxito corresponde à interseção dos três conjuntos, isto significa que apenas uma pequena parte das atividades executadas pelos profissionais envolvidos, associada a uma resposta das atividades do biomaterial poderá garantir o sucesso dos implantes.

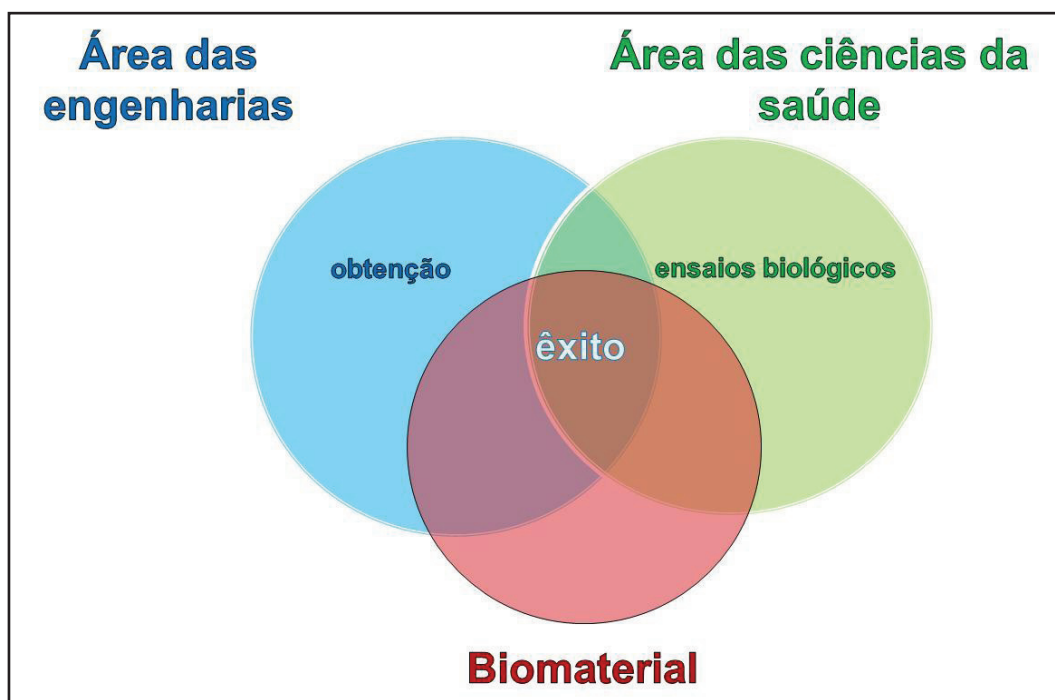


Figura 1.1 – Reunião e interseção das atividades para obtenção de um implante sintético.

Fonte: da autora.

Scaffolds desempenham um papel muito importante nas estratégias de engenharia tecidual, especialmente na reparação e regeneração de osso porque eles fornecem uma estrutura mecânica na qual as células cultivadas são estimuladas a crescer (LIU, 2009).

Muitos polímeros apresentam comprovada biocompatibilidade mostrando-se promissores para serem estudados como *scaffolds* ósseos. A indústria de polímeros está continuamente a procura de novos métodos para melhorar as propriedades dos materiais existentes, especialmente propriedades mecânicas superiores.

Poli(álcool vinílico) (PVAI) é altamente hidrofílico, não tóxico e biocompatível com propriedades excelentes para obtenção de filmes. Os filmes de PVAI tem boa resistência mecânica, térmica e estabilidade de pH (PENG, 2011).

Poliuretano (PU) biocompatível é amplamente utilizado na medicina. O êxito do uso de PU em aplicações médicas ocorre devido a sua síntese direta e a possibilidade de introdução de grupos funcionais na cadeia polimérica que pode conduzir para melhora de diversas propriedades (MACHADO, 2010).

Hidroxiapatita (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, tem sido uma das cerâmicas bioativas e biocompatíveis mais utilizadas em engenharia tecidual óssea devido a sua similaridade com o componente inorgânico dos ossos animais e a capacidade de promover a interação célula-material (DU, 2009).

Esta pesquisa baseou-se no desenvolvimento de bionanocompósitos utilizando-se hidroxiapatita (HA) nanoestruturada interconectada por poliuretano (PU), gerado a partir de reações entre poli(álcool vinílico) (PVAL) e poliisocianato alifático (HDT). O material poli(álcool vinílico) com poliuretano e hidroxiapatita (PVAL-PU/HA) foi caracterizado quanto ao comportamento mecânico, morfológico e biológico *in vivo e in vitro* e proposto como objeto de utilização na obtenção de dispositivos artificiais para enxertos ósseos, direcionado para uso odontológico em maxilo facial visando aplicações terapêuticas e/ou estéticas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver bionanocompósitos de poli(álcool vinílico)-poliuretano/hidroxiapatita destinados à enxerto maxilo facial.

1.1.2 Objetivos específicos

Caracterizar os materiais de partida, os intermediários e o produto final bionanocompósito.

Analisar *in vitro* os materiais de partida e os bionanocompósitos poli(álcool vinílico)-poliuretano/hidroxiapatita.

Avaliar o perfil *in vitro* dos bionanocompósitos à base de poli(álcool vinílico)-poliuretano/hidroxiapatita

Avaliar a biocompatibilidade *in vivo* dos bionanocompósitos poli(álcool vinílico)-poliuretano/hidroxiapatita.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

2.1.1 Características gerais do osso

Devido possuir um alto grau de rigidez e resistência à pressão, as principais funções do tecido ósseo estão relacionadas à proteção e à sustentação. Também funciona como alavanca e apoio para os músculos, aumentando a coordenação e a força do movimento proporcionado pela contração do tecido muscular. A interação entre o componente orgânico e o componente mineral da matriz resulta na extrema rigidez do tecido ósseo. A parte orgânica responsável pela elasticidade corresponde a 25-35% do peso da matriz óssea e é composta por 90-95% de colágeno tipo I, proteoglicanas e proteínas de adesão, por isso quando o osso se apresenta descalcificado, cora-se com os corantes específicos do colágeno. A parte inorgânica responsável pela rigidez constitui-se de 65-75% do peso e possui na sua composição basicamente íons fosfato e cálcio formando cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e outros minerais, Mg, Na, e K (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os tipos celulares típicos do tecido ósseo que se destacam são osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os osteócitos são células localizadas em cavidades ou lacunas dentro da matriz óssea. Destas lacunas formam-se canaliculos que se dirigem para outras lacunas, tornando assim possível a difusão de nutrientes devido à comunicação entre os osteócitos. Os osteócitos têm um papel fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea. Os osteoblastos sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, composta por colágeno tipo I, glicoproteínas e proteoglicanas. Também concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Durante a alta atividade sintética, os osteoblastos destacam-se por apresentar muita basofilia. Possuem sistema de comunicação intercelular semelhante ao existente entre os osteócitos. Os osteócitos originam-se de osteoblastos, quando estes são envolvidos completamente por matriz óssea. Então, sua síntese proteica diminui e o seu citoplasma torna-se menos basófilo. Ou seja, pelo padrão de coloração pode-se reconhecer uma célula osteoblasto ou célula osteócito, porque os osteócitos ficam menos corados quando se usa corantes básicos. Os processos de absorção e remodelação do tecido ósseo tem a participação dos osteoclastos que são células gigantes e multinucleadas, extensamente ramificadas, derivadas da fusão de monócitos que atravessam os capilares

sanguíneos. Nos osteoclastos jovens, o citoplasma apresenta uma leve basofilia que vai progressivamente diminuindo com o amadurecimento da célula, até que o citoplasma finalmente se torna acidófilo. Dilatações dos osteoclastos, através da sua ação enzimática, escavam a matriz óssea formando depressões conhecidas como lacunas de Howship (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

As membranas ósseas são constituídas de periósteo que é o ponto de ancoragem dos tendões e ligamentos e endósteo, que corresponde à membrana de tecido conjuntivo que recobre a superfície interna do osso essas membranas também contém osteoblastos e osteoclastos.

Pode se dizer que as variedades anatômicas do osso apresentam-se em duas formas, esponjosa e compacta. O osso esponjoso é poroso apresenta trabéculas, arranjo paralelo das lamelas, reveste a cavidade medular e é encontrado no centro das epófises dos ossos curtos e chatos. O osso compacto possui estrutura sem cavidade visível, arranjo lamelar concêntrico, encontrado nas diáfises de ossos longos, na periferia dos ossos curtos e nas tabas dos ossos chatos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

2.1.2 Enxertos ósseos

No reparo do esqueleto humano, a necessidade de materiais para preenchimento de defeitos é grande, por exemplo, na reconstrução crânio facial, na revisão de implantes de ortoplasia, após a remoção de cistos ósseos, perda de osso por traumas, infecções ou reabsorção (ZAVAGLIA, 2003).

Na forma macroporosa os implantes aceleram o processo de cura, já que permitem o crescimento progressivo de colágeno com a seguinte mineralização de tecido ósseo através dos poros abertos e interconectados (ZAVAGLIA, 2003).

O osso é um tecido dinâmico, pois tem uma capacidade única de auto-regeneração ou de auto-remodelação na medida certa por toda a vida sem deixar cicatriz, no entanto, muitas necessidades de enxertos ósseos são devido a defeitos ósseos, causados ou não por traumas. (MURUGAN e RAMAKRISHNA, 2005).

Relatórios estatísticos referem que cerca de 6,3 milhões de fraturas ocorrem todos os anos nos Estados Unidos da América, dos quais cerca de 550.000 casos, exigem algum tipo de enxerto

ósseo. Foi observado que as fraturas ocorrem a uma taxa anual 2,4% de habitantes, sendo 2,8% de fraturas em homens e 2% em mulheres. Quadril, tornozelo, tíbia e fíbula em ordem decrescente são as fraturas que ocorrem com mais frequência. É relatado que o número total de substituições de osso de quadril foi cerca de 152.000 no ano 2000, o que representa um aumento de cerca de 33% em comparação com o ano de 1990 somente nos E.U.A. e espera-se aumentar para cerca de 272.000 até ao ano 2030, indicando que há ainda uma grande necessidade de enxerto ósseo com material sintético. Relatório realizado de acordo com o mercado pela Medtech Insight, indica que o saldo de enxertos ósseos nos E.U.A em 2001 ultrapassou o valor \$980 milhões e chegou a \$ 1,16 bilhões em 2002, o que poderia duplicar até 2006. Na Europa, o número de procedimentos de enxerto ósseo relatado foi de 287.300 em 2000 com previsão de 479.079 em 2005. Em 2000 a utilização mundial de enxerto ósseo foi estimada em 1 milhão, dos quais cerca de 15% da cirurgia utilizou enxertos ósseos sintéticos. Sugere-se que no futuro o grande crescimento da engenharia tecidual atribuir-se-á aos compósitos, ou seja, compósitos que contenham células osteogênicas e fatores de crescimento (MURUGAN e RAMAKRISHNA, 2005).

A necessidade de enxertos ósseos sintéticos depende da complicação dos defeitos ósseos. Por exemplo, se o defeito é menor, o osso tem a própria capacidade de se auto-regenerar dentro de algumas semanas. Assim, a cirurgia não é necessária. No caso de graves defeitos e perda de volume ósseo que não cicatrizam normalmente, ou seja, quando há dificuldade para fechamento do tecido, o enxerto é necessário para restabelecer a função sem danificar os tecidos. Existem vários métodos disponíveis para o tratamento de defeitos ósseos, que inclui os métodos tradicionais de auto-enxerto e enxerto por transplante. Embora essas duas terapias sejam consideradas clinicamente boas existem limitações. Por exemplo, o fornecimento de material de auto-enxerto é limitado e no enxerto a partir do transplante há uma possibilidade de transferência de patógenos, desta forma existe uma grande necessidade para o uso de enxertos ósseos sintéticos (MURUGAN e RAMAKRISHNA, 2005).

Atualmente, estão disponíveis inúmeros materiais de enxerto ósseos sintéticos, mono e multifásicos, que são capazes de melhorar algumas das complicações associadas com as práticas autógenas ou alógenas dos ossos. Embora haja bons progressos na utilização de enxerto ósseo sintético, a maneira em que se executam as suas funções *in vivo* é muito diferente e a maioria deles diferem de enxertos ósseos naturais, quer na composição ou na estrutura. Além disso, uma

única fase material também chamada monolítica, nem sempre fornece todas as características essenciais necessárias para o crescimento ósseo, o que conduz à incessante pesquisa na busca de um enxerto ósseo ideal. Eis, portanto, uma grande necessidade de materiais multifase ou compósitos, com estrutura e composição semelhantes ao osso natural, obtidos pela engenharia de materiais, mais especificamente pela engenharia tecidual.

Nanocompósitos baseados particularmente em hidroxiapatita (HA) e colágeno, ganharam imenso reconhecimento como enxertos ósseos não só devido à sua composição, estrutura e similaridade com o osso natural, mas também, devido às propriedades funcionais, como superfície e resistência mecânica superior a dos seus constituintes monofásicos. Além disso pode-se dizer que o próprio osso é um nanocompósito natural, com matriz composta principalmente de nanocristalitos de hidroxiapatita (HA), ricos em colágeno na matriz orgânica, assim é uma boa escolha optar-se por um nanocompósito HA/colágeno como um material de enxerto ósseo. Uma extensa análise de informações sobre biomateriais sugere que a HA/colágeno é um sistema indicativo para terapia regenerativa óssea, provavelmente como um dos mais adequados (MURUGAN e RAMAKRISHNA, 2005; LIU, 2009; WANG, 2009).

O sucesso de um procedimento de enxerto ósseo depende de muitos fatores. O primeiro deles é a atividade biológica inerente do enxerto, ou seja, o número de células vivas e seus produtos celulares, incluindo proteínas armazenadas dentro da matriz. O segundo fator é a capacidade do enxerto de obter uma resposta osteogênica nos tecidos no leito receptor, e uma terceira consideração deve ser a capacidade do enxerto de apoio em promover crescimento de um novo osso derivado dos tecidos circundantes no leito receptor do hospedeiro. Um enxerto não vascularizado também é completamente dependente do tecido circundante no leito receptor por sua revascularização. Outro fator importante, também contribuindo para o sucesso da enxertia, são as propriedades mecânicas no local do destinatário. Ações na interface entre o enxerto e os tecidos do hospedeiro podem comprometer a subsequente revascularização do enxerto. Tomados em conjunto, o sucesso de enxertia depende de uma sequência celular, bioquímica e biomecânica, situações que seguem uma programação bastante previsível. A incorporação do enxerto não ocorrerá se houver um problema com qualquer um destes acontecimentos ou com a ordem em que eles ocorrem (KAHNBERG, 2005).

A sequência de eventos que ocorre durante o processo de incorporação do enxerto ósseo imita o processo visto durante a cicatrização da fratura. Tanto as fraturas como o transplante de enxerto ósseo resultam em lesões para os vasos locais, com sangramento e a formação de um hematoma. Este hematoma ativa uma cascata de coagulação e, posteriormente a fibrina com a formação de coágulos. Em uma semana, irá desenvolver uma resposta inflamatória com a invasão de diferentes células de neutrófilos, linfócitos e células de plasma, ou seja, um processo inflamatório agudo. Alguns em crescimento de novos vasos podem também ser observados. No final da primeira semana após o procedimento de enxerto, um processo paralelo começará. O coágulo irá se organizar e transformar em granulação fibrosa o tecido que une o osso enxertado com o osso receptor. O tecido de granulação também atrai fagocitose de células inflamatórias, tais como macrófagos e células gigantes multinucleadas. No final da segunda semana começa angiogênese quando osteoclastos removem osso morto e detritos. Durante o primeiro ano após o implante é esperado que o osso enxertado fique mais fraco, após o que ele se tornará tão forte quanto o osso do organismo receptor (KAHNBERG, 2005).

2.1.3 Enxerto ósseo maxilo facial

Quando acontecem pequenas perdas ósseas, o enxerto muitas vezes é realizado com osso do próprio paciente. Quando a perda de crista óssea é muito grande como nos casos dos defeitos deixados por extrações dentárias extensas na anatomia dos ossos da mandíbula utilizam-se enxertos com biomateriais e assim é garantida a preservação da crista óssea o que irá favorecer um subsequente implante ou restauração de prótese dentária (WEISS, 2007).

A estabilidade inicial da mandíbula comparada com a estabilidade da maxila possibilita considerar a carga imediata de implantes, que na maioria dos casos é muito mais problemático em relação à qualidade e quantidade óssea. Pacientes com menor qualidade e menor quantidade de osso foram excluídos do tratamento com implantes por um longo tempo. No entanto, o advento da reconstrução óssea de áreas deficientes, tanto da mandíbula como da maxila, melhorou a possibilidade de tratamento para os pacientes com deficiência óssea. Diferentes técnicas de enxertia óssea foram desenvolvidas e procedimentos cirúrgicos ortognáticos adaptados às exigências especiais da cirurgia de implante fizeram com que a maioria dos problemas de ossos agora seja resolvida (KAHNBERG, 2005).

Os dentes naturais têm sido substituídos por uma variedade de materiais, incluindo osso, dentes de animais, dentes humanos, marfim, conchas marinhas, cerâmicas e metais. Atualmente são empregados em odontologia quatro grupos de materiais que são metais, cerâmicas, polímeros e resinas compostas. Apesar de aperfeiçoamentos frequentes nas propriedades físicas desses materiais, nenhum deles é permanente (ANUSAVICE, 2005).

A prática de implantodontia é citada atualmente como o método mais moderno quando são discutidos assuntos que tratam da reabilitação oral. Antes desse método o problema de reabilitação oral era resolvido pela utilização de próteses convencionais, removível ou fixa. Mas o sucesso clínico dos implantes está relacionado ao fenômeno da osteointegração ou osseointegração, que nada mais é do que a união física do implante osseointegrado com o osso receptor. Branemark e seu grupo de pesquisadores após décadas de pesquisa e desenvolvimento laboratoriais e clínicos descobriram um sistema de implante que pode substituir os dentes naturais perdidos e atingir essa osseointegração (MARTINS, 2011).

Através dos conceitos de osseointegração, as cirurgias de reabilitação de deformidades crânio-faciais apresentaram um grande avanço. A utilização de implantes devidamente confeccionados e instalados com técnicas cirúrgicas corretas é uma boa alternativa para a confecção de pilares de sustentação das próteses buco-maxilo-faciais, conferindo ao paciente a possibilidade de colocação e remoção destas, de maneira rápida e simples, uma melhor retenção, estabilidade e estética. Os implantes osteointegrados mostram excelentes resultados, mas socializar esses benefícios ainda constitui-se em grande desafio devido a questão econômica, não sendo de fácil acesso aos mais carentes que geralmente são os mais necessitam desse tipo de reabilitação (ANTUNES, 2008).

Pode-se concluir que o enxerto de banco de ossos sintéticos para a reconstrução dos ossos maxilares é uma realidade que está intimamente relacionado à terapia implantar, além de uma opção, é um método eficiente e seguro na reconstrução maxilar, apresentando-se como alternativa plausível a estabilização estética e fisiológica, além de uma ótima aceitação pelo paciente. Mostrando, assim, que a combinação de técnicas de implante com regeneração óssea promoveu o desenvolvimento da implantologia atual, na qual os profissionais podem oferecer resultados previsíveis e duradouros aos seus pacientes (SOBREIRAI, 2011).

2.2 ENGENHARIA TECIDUAL

Williams (WILLIAMS 2006) sugere que a engenharia tecidual é a criação de um novo tecido que tem por objetivo a reconstrução terapêutica do corpo humano, por deliberada e controlada estimulação de células alvo através de uma combinação sistemática de sinais moleculares e mecânicos.

A técnica, conhecida como engenharia tecidual consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos, através do recrutamento de tecido do próprio paciente, que são dissociados em células e cultivados sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços ou estruturas), para então serem reinseridos no paciente. Buscando uma padronização tanto na terminologia como na metodologia de pesquisa e aplicação dos produtos preparados pela engenharia tecidual, a regulamentação vem sendo feita por normas ASTM (entre elas F2312-03, F2027-00e1 e F2150-02e1) e por órgãos governamentais de países da Europa, Japão, Canadá e outros (BARBANTI, 2005).

A Figura 2.1 mostra as partes do corpo humano onde há possibilidade de colocação de implantes sintéticos.

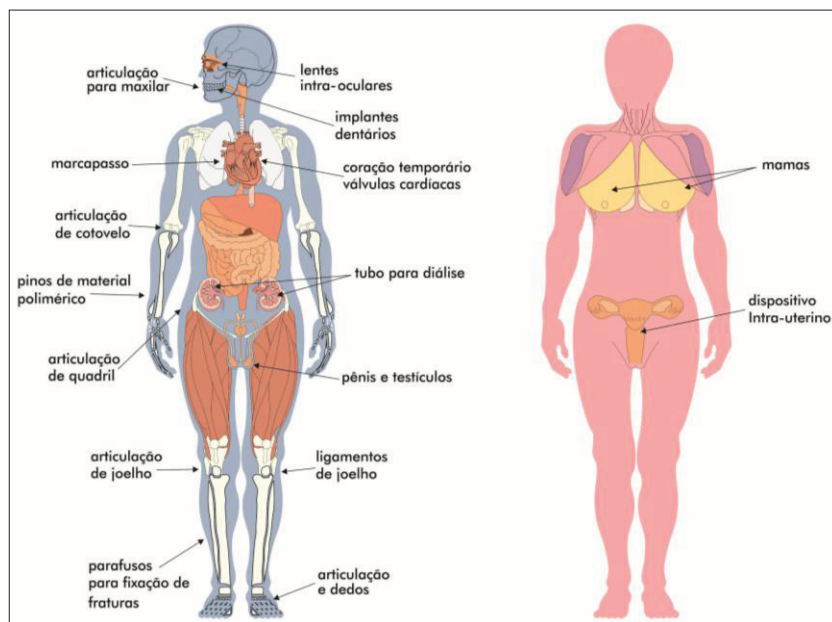


Figura 2.1 – Locais com possibilidades de implantes sintéticos. Fonte: da autora.

2.2.1 Biomateriais

Helmus (HELMUS, 1995) definiu o termo biomaterial como: “parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo”. Esta definição derivou-se do *Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*, que descreve biomaterial como todo material não vivo usado em dispositivo médico, objetivando interação desse material não vivo com o sistema biológico (WILLIAMS, 1987).

Os biomateriais podem ser naturais ou artificiais e substituem a estrutura completa ou parte de uma função natural do organismo humano (MAIA, 2010). Os biomateriais devem reunir uma combinação de propriedades mecânicas, químicas, físicas e biológicas que tornará viável sua utilização no corpo humano. Os biomateriais podem ser polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e macromoléculas naturais, como os biopolímeros que são manufaturados ou processados para se adequarem à utilização em dispositivos médicos que entrem em contato íntimo com proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos (SILVA, 2000).

O êxito do implante de um biomaterial está associado às reações do organismo do paciente, como severidade do processo inflamatório desencadeado, nível de satisfação do paciente, tempo necessário para o restabelecimento das atividades básicas e tempo de permanência do implante no organismo hospedeiro.

Biomateriais sintéticos convencionais não se remodelam, regeneram ou expressam componentes biológicos necessários ao funcionamento de partes vivas do corpo, o que limita sua capacidade de substituir perfeitamente tecidos naturais.

Biomateriais tradicionais são formados por materiais usados costumeiramente em aplicações outras que não biomédicas.

Os biomateriais devem ser projetados e construídos já especificamente programados para atuar em uma determinada aplicação, para que satisfaça as características fundamentais como biocompatibilidade em que o material implantado e seus produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar disfunções no organismo ao longo do tempo, ser quimicamente inerte e estável, de fácil esterilização e possuir biofuncionalidade, ou seja, o material deve atender às características mecânicas necessárias para cumprir a função desejada, pelo tempo que for necessário.

Muitos materiais são desenvolvidos com finalidade de aplicações médicas, como dispositivos para terapias, contraste por diagnóstico de imagens, dispositivos de distribuição controlada de fármacos (GUO, 2010) e também direcionados para reparo de nervos e tecidos por determinado período.

Materiais destinados para próteses e implantes devem ser desenvolvidos em ambientes limpos, higienizados que possam garantir a confiabilidade de purificação desses materiais. Além disso, os materiais devem ser sintetizados e esterilizados em laboratórios especializados utilizando-se métodos tradicionais. Os biomateriais devem ser projetados para não causar efeito prejudicial sobre o organismo hospedeiro e, conseqüentemente fatores como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioabsorvibilidade, taxa de degradação, tamanho de poro e morfologia da superfície que são fatores importantes em um biomaterial devem ser pesquisados (MAIA, 2010).

Através de análises *in vivo* é possível conferir a biodegradação e bioabsorção do material do enxerto. A biodegradação ocorre por dispersão, sem que haja a eliminação dos produtos e subprodutos no organismo e a bioabsorção é a dissolução do material em fluidos corpóreos (BARBANTI, 2005).

Biomateriais devem ser não cancerígenos, não tóxicos, não antigênicos, não mutagênicos e não trombogênicos. Para que o biomaterial esteja de acordo com os padrões exigidos é realizada inicialmente uma pesquisa do processo para obtenção do novo biomaterial, como as características necessárias e o local a que se destina, até que se consiga o produto desejado. Após essa etapa o biomaterial é avaliado *in vitro* e *in vivo* onde são observadas todas as reações causadas no organismo. Os testes *in vivo* são realizados sobre um suporte apropriado, onde ocorre a inoculação das células. O órgão ou tecido é regenerado e o suporte é então biodegradado, bioabsorvível ou retirado após certo tempo através de intervenção cirúrgica.

Além dos biomateriais artificiais para os procedimentos cirúrgicos ligados à reconstrução de tecidos e órgãos existem também alternativas como autotransplantes, autoenxerto, e xenoenxerto e engenharia tecidual.

As aplicações de biomateriais são realizadas mediante caracterizações morfológicas e mecânicas que visem à integração ao tecido vivo.

2.2.2 Poli(álcool vinílico) (PVAI)

O Poli(álcool vinílico) PVAI é um polímero sintético biodegradável que desperta especial atenção como biomaterial devido a sua transparência, resistência e biocompatibilidade. Foi obtido pela primeira vez em 1924, por Herrman e Hachnel (BISPO 2009, apud MARTEN, 1985), a partir da hidrólise do poli(acetato de vinila), que é a forma de obtenção comercial utilizada até hoje. É solúvel em água a temperaturas superiores a 70°C e atualmente encontram-se disponíveis no mercado composições de PVAI tanto em líquido como em partículas e dependendo de sua estrutura e mistura estereoquímica haverá influência nas propriedades específicas do produto final.

Dentre os polímeros empregados na síntese de hidrogéis, o poli(álcool vinílico) é um dos biomateriais mais estudados e utilizado como carreador de medicamentos e na produção de sistemas de liberação controlada de fármacos, devido a sua biocompatibilidade e baixa bioatividade, além de ser biodegradável, (ALCÂNTARA, 2010; SCHWALL e BANERJEE, 2009; BASAKI e ADHIKARI, 2009 e COSTA JR., 2008).

Grupos acetato residuais do PVAI são essencialmente hidrofóbicos, os quais enfraquecem as ligações intra e intermoleculares entre os átomos de hidrogênios adjacentes dos grupos hidroxila. Quando hidrolisado completamente, o ponto de fusão é registrado entre 210°C e 240°C e temperatura de transição vítrea em torno de 85°C (BAVARESCO, 2004). Pode apresentar normalmente de 20 a 35% de cristalinidade, mas após tratamento térmico acima de sua temperatura de transição vítrea (Tg), esta pode ser aumentada em até 70% e melhorar significativamente suas propriedades mecânicas (PEPAS, 1987).

Zhang (ZHANG, 2010) utilizou PVAI solubilizado em água destilada quente como dispersante em material nanoestruturado de hidroxiapatita e titânio.

Peng (PENG, 2011) pesquisou um compósito de poli(álcool vinílico) reticulado/hidrogel de colágeno e concluiu através de testes *in vivo* nos tecidos musculares de coelhos, que não houve casos de intoxicação ou morte, o que confere uma boa compatibilidade histológica *in-vivo*.

Mohsin (MOHSIN, 2011) utilizou misturas de poli(álcool vinílico) com vários percentuais em peso de glicerol e mostrou a formação de filmes com as características incolor, homogêneo e transparente, o que demonstra que o PVAI forma interações favoráveis com glicerol através de

interações intermoleculares de ligações de hidrogênio. Aumentado a percentagem de glicerol, a temperatura de fusão do PVAI diminui e amplia o pico endotérmico, o que indica que a associação ordenada de moléculas de PVAI diminui.

O PVAI altamente hidrolisado não se dissolve facilmente em água em temperaturas abaixo de 70°C, por isso que as soluções de PVAI são comumente obtidas em temperaturas a partir de 80°C como pesquisado por BAVARESCO, (2004).

2.2.3 Isocianatos

Os isocianatos são compostos orgânicos que possuem em sua estrutura química o grupo ($\text{N}=\text{C}=\text{O}$). Esses grupos NCO reagem facilmente com compostos que possuam átomos de hidrogênio ativo disponíveis, com no mínimo dois grupos funcionais. A reação do grupo isocianato acontece quando o hidrogênio suficientemente ativo está ligado a átomos com um par de elétrons disponível, como no nitrogênio e no oxigênio, e quando o hidrogênio está ligado ao oxigênio da hidroxila, esta reação é denominada reação uretânica. Além destas reações com compostos contendo hidrogênio ativo, os isocianatos também podem reagir entre si formando polímeros (PINTO, 2007).

Encontram-se atualmente disponíveis isocianatos com estrutura química alifática e aromática. Cerca de 95% de todos os isocianatos consumidos são à base de tolueno diisocianato (TDI) e metileno-difenil-isocianato (MDI), e derivados. O MDI é o isocianato de maior consumo mundial, e está sendo muito estudado academicamente (BERTOLDI, 2010; XUE, 2010; WIK, 2011; GUPTA, 2010; SMITH, 2009; CHUNG, 2010; GAO, 2011). No entanto uma das reações de importância comercial é a trimerização que leva à formação de estruturas rígidas chamadas de poliisocianatos, como por exemplo, o HDT trímero do HDI, usado neste trabalho. Esses grupos conferem rigidez e boa estabilidade térmica às estruturas de que fazem parte (DE CARLO, 2002). PINTO, (2007) e EMERSON, (2004) utilizaram o HDT no desenvolvimento de suas pesquisas.

O HDT é um poliisocianato alifático de viscosidade média, sem solventes, baseado no trímero do diisocianato de hexametileno (HDI homopolímero).

2.2.4 Poliuretano (PU)

Os poliuretanos (PUs) são de uma ampla família de polímeros que pode ser potencialmente útil na engenharia tecidual em muitos tipos de tecidos, para um grande número de aplicações médicas desde os anos 1960, tais como cateteres intravenosos, enxertos vasculares, substituições de cartilagem, corações artificiais, osso, válvulas, nervos, músculos, bexiga e fígado. (LELAH, 1987; TIENEN, 2006; DIAS, 2010) apresentam propriedades mecânicas e biocompatibilidade e também são indicados para prótese maxilo facial (ANUSAVICE, 2005).

O processo mais utilizado na produção dos poliuretanos é o que envolve a reação de um composto, com dois ou mais grupos funcionais álcool, poliol poliéter ou poliol poliéster, com um isocianato di ou polifuncional (CORDEIRO, 2007).

De acordo com a síntese de obtenção os poliuretanos podem ser, não biodegradáveis, elastoméricos e biodegradáveis,.

Uma série de poliuretanos não biodegradáveis tem sido utilizada em aplicações de contato com sangue, tais como válvulas cardíacas, membranas de hemodiálise, implantes de mama, aórticos e adesivos ósseos. Além disso, o poliuretano forma espuma espontânea durante o processo de copolimerização, que é útil para obter-se *scaffold* com boa porosidade.

Poliuretanos elastoméricos podem representar uma classe ideal de materiais para substituição de vasos sanguíneos devido à sua porosidade e elevada extensibilidade, que poderá fornecer correspondência consistente com as propriedades mecânicas dos vasos nativos (MATSUDA, 2005; STANKUS, 2007).

O PU típico pode conter além das ligações uretano, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, ésteres, éteres, amidas, uréia e grupos isocianurico. PUs são conhecidos por terem propriedades especiais, tais como, 1) método de fácil preparo, 2) alta resistência aos solventes, 3) estabilidade a longo prazo contra a exposição à luz solar e 4) consistentes propriedades elásticas (PEREIRA, 2010).

Os polímeros biodegradáveis são amplamente utilizados como *scaffold* porosos na engenharia tecidual (REZWAN, 2006). Os produtos de degradação do poliuretano devem ser biocompatíveis, atóxicos e metabolizados ou eliminados pelo organismo.

Poliuretano biodegradável é um dos materiais biocompatíveis utilizado como matrizes *scaffolds* em tecido ósseo de engenharia (HILL, 2007 e HUANG, 2009). No entanto, a preocupação principal associada com poliuretano biodegradável é a falta de grupos bioativos, o que limita a sua aplicação (HUANG, 2009). Uma solução é misturar os poliuretanos com partículas de cerâmica bioativas, tais como fosfato tricálcio ou hidroxiapatita (HA) (HUANG, 2009; BROVARONE e VERNE, 2007). Uma combinação de cerâmica e de poliuretano pode melhorar a bioatividade e as propriedades mecânicas de *scaffolds* (MATHIEU, 2001). A HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) tem atraído interesse como um material de implante para os dentes e os ossos devido à semelhança da sua cristalografia e composição química para tecido humano (LIU, 2001; KUI, 2001).

2.2.5 Hidroxiapatita (HA)

O nome hidroxiapatita é formado pela junção das palavras hidroxi e apatita. Hidroxi refere-se ao grupo hidroxila (OH) e apatita um nome mineral. Apatita vem do grego e significa "decepciono", em função de ser confundida com turmalina ou berilo, (ELLIOT, 1994). HA é formada por átomos dos elementos químicos cálcio, fósforo, oxigênio e hidrogênio, arranjados conforme mostra sua fórmula: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ com estequiometria original Ca/P igual a 1.67 citada por (ASEFNEJAD, 2011; MARTINEZ-VALENCIA, 2011; ZHANG, 2010; DU, 2009; GECER, 2009; SPRIIO, 2009; SUNDARAM, 2008; TAKASHIMA, 2008; FIDANCEVSKA, 2007) em suas pesquisas. O fósforo forma com o oxigênio o grupo fosfato, a ligação entre o oxigênio e o hidrogênio forma o chamado grupo hidroxila. Esses grupos, juntamente com o cálcio, distribuem-se espacialmente segundo um arranjo em forma hexagonal. Esse material é encontrado nos animais vertebrados na composição do esqueleto, onde atua como reserva de cálcio e fósforo. Hidroxiapatita tem sido amplamente utilizada devido à sua semelhança química com o osso e a boa biocompatibilidade (CYSTERA, 2005). Essa hidroxiapatita biológica é ainda composta por íons em concentrações diversas, tais como: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , CO_3^{2-} , etc., permitindo o controle desses importantes íons nos líquidos corporais por meio da sua liberação ou armazenamento.

Uma das características importantes da estrutura da hidroxiapatita é que ela permite que os grupos hidroxila (OH⁻) sejam retirados com relativa facilidade, gerando canais vazios entre os

hexágonos formados pelos íons de cálcio, por onde podem ser conduzidos para dentro da estrutura do material cerâmico, outros íons e moléculas (HENCH, 1991).

A hidroxiapatita é uma biocerâmica que tem composição e estrutura similares à fase mineral de ossos e dentes. Dependendo de sua pureza, ela pode suportar aquecimentos superiores a 1.200°C, sem se decompor. Além disso, pode ser modelada como a maioria dos materiais cerâmicos (ZAVAGLIA, 1993).

Hidroxiapatita, $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ é o principal componente mineral do osso, e a sua forma sintética é um dos biomateriais mais utilizados para a reconstrução do esqueleto, devido à falta de toxicidade local ou sistêmica em conjunto com suas propriedades de osteocondução (DÍAZ, 2009). Para implantes ósseos ou dentários, duráveis por muitos anos utiliza-se um material pouco solúvel, constituído por hidroxiapatita pura. Quando se deseja que o implante seja reabsorvido pelo corpo, cedendo lugar ao tecido ósseo novo, usa-se uma cerâmica mais solúvel, geralmente constituída por uma mistura de hidroxiapatita com outros fosfatos.

Outra característica da HA é sua capacidade de adsorção, isto é, de fixar em sua superfície moléculas de outra substância. Essa propriedade faz com que ela possa ser usada em implantes, como suporte para antibióticos e drogas anticancerígenas, além de poder ser empregada também em tratamentos prolongados de infecções e doenças ósseas. Neste último caso, liberando aos poucos, na região afetada, a medicação necessária. O tamanho e a morfologia dos poros de espumas altamente porosas podem ser controladas dependendo dos parâmetros do processo (CYSTERA, 2005).

2.2.6 Biocompósitos de poliuretano e hidroxiapatita.

Compósitos são materiais de composições de duas ou mais fases diferentes, onde as propriedades são sempre diferentes das propriedades das fases isoladas.

Biocompósito são materiais sintéticos constituídos de duas ou mais fases que podem ser utilizados em implantes em organismos vivos.

Bionanocompósitos são materiais de composições de duas ou mais fases, onde pelo menos uma das fases é um material nanoestruturado.

Como exemplos de compósitos, biocompósitos e bionanocompósitos citam-se, polímero e cerâmica, metal e polímero, metal e cerâmica, ou cerâmica e cerâmica.

O desenvolvimento de *scaffold* compósito hidroxiapatita (HA) poliuretano (PU) biodegradável combina a bioatividade e a degradabilidade de HA e PU respectivamente. Esse novo tipo de *scaffold* apresenta alta resistência mecânica e boa osteocondução, propriedade que satisfaz as exigências do uso clínico. A HA como parte inorgânica de *scaffold* compósito tem funções semelhantes ao tecido ósseo humano, portanto apresenta boa biocompatibilidade e bioatividade quando utilizada em implantes (LIU, 2009 e WANG, 2009).

Machado (MACHADO, 2010) estudou compósitos de PU/HA. A processabilidade dos polímeros permitiu a preparação de compósitos com teor de carga elevada e relativamente com boa homogeneidade. No entanto, a quantidade de partículas de HA deve ser controlada para evitar altos teores de enchimento, o que iria dificultar o total envolvimento de HA pela matriz.

Dong (DONG, 2009) obteve *scaffold* contendo 30% em peso de nano hidroxiapatita-(n-HA) e 70% em peso de poliuretano (PU) por um método de formação de espuma. Os resultados mostraram que as partículas n-HA ficaram dispersas homogeneamente na matriz de PU, com porosidade de 80% e resistência à compressão 271KPa. A estrutura porosa forneceu um microambiente de boa aderência para o crescimento celular, e proliferação, tendo o compósito requisito básico para a engenharia tecidual e sendo potencial para ser aplicado na reparação e substituição de meniscos humanos de cartilagem do joelho e articular.

Biocompósitos e nanocompósitos são aplicados em lugares onde não há possibilidade de utilizarem-se materiais mais comuns, por diversos motivos como, necessidade de um material com estrutura mais leve e mais resistente, propiciar crescimento de tecido ósseo, facilitar a aderência do tecido ósseo natural ao material nanocompósito (SHEN, 2008).

Vital (VITAL, 2008) avaliou compósitos de hidroxiapatita sintética e carbono (HAC) e hidroxiapatita sintética, carbono e fosfato biácido de sódio (HACF), ambos na forma sólida, como substituto ósseo em 36 coelhos adultos. Aos 150 dias foi verificado que tanto nos grupos tratados quanto no grupo controle, já existia medula óssea e, praticamente não visualizou mais a presença de tecido cartilaginoso. Nos dois grupos havia tecido ósseo maduro na região da falha, mostrando processos bem adiantados de reparação de óssea e concluíram que ambos os tipos de hidroxiapatitas usadas mostraram-se biocompatíveis, por não ter havido, em nenhum dos animais,

qualquer indício de rejeição do implante ou de reação inflamatória. Nos animais tratados, o processo de regeneração óssea ocorreu mais cedo do que nos animais do grupo-controle, o que comprova a capacidade osteocondutora da hidroxiapatita.

Scaffolds de hidroxiapatita (HA) têm sido intensamente estudados e desenvolvidos para a engenharia de tecido ósseo, mas suas propriedades mecânicas continuam a ser pesquisadas para serem melhoradas.

Hill (HILL, 2007) estudou *scaffolds* biodegradáveis de poliuretano (PU) em engenharia tecidual para criar um novo osso. Discos de PU foram semeados com osteoblastos e implantados em camundongos do tipo *nude*. Um grupo continha discos implantados de PU puro, enquanto o outro grupo continha discos implantados de PU/HA. Após 5 semanas ambos os grupos apresentaram evidência radiográfica e histológica à formação de osso significativa, com tendência para a maior formação de osso no grupo do que continha implantes do compósito PU/HA.

Wang (WANG, 2009) também trabalhou com *scaffolds* HA/PU e concluiu que os mesmos tiveram boa afinidade para as células e são adequados para a regeneração ou substituição de defeitos ósseos. Esses *scaffolds* possuíam de 20 a 60% em peso de HA.

Nos estudos realizados por Liu (LIU, 2009) foi verificado que o carregamento de PU alifático com até 50% em peso de HA mostrou resultados que indicaram o tamanho médio de macroporos e microporos de 100µm a 510µm, o que demonstra uma boa perspectiva para ser usado como *scaffold* em tecido ósseo.

Chetty (CHETTY, 2007) estudou PU revestido com HA para substituição de cartilagem auricular e observou que após 24 e 72 h, as superfícies de PU revestidas com HA exibiram, significativamente maior número de células metabolicamente ativas em comparação com as superfícies de PU virgens. Isto indica que as superfícies de PU revestidas com HA são citocompatíveis para fibroblastos e podem potencialmente serem aplicadas à substituição do tecido de cartilagem.

Dou (DOU, 2011) obteve nanocompósitos de HA-gelatina minociclina antibacteriano e concluiu que o nanocompósito tem boa bioatividade e pode ter a atividade antimicrobiana, e pode ser um biomaterial promissor para utilização como reparação e regeneração de tecido ósseo.

Enquanto que Huang (HUANG, 2007) obteve *scaffolds* de HA com elevadas porosidades de 61-65% e tamanhos adequados de macroporos de 200-600µm e resistência à compressão de até 4,0 – 5,8MPa.

2.2.7 *Scaffolds*

Scaffolds são matrizes artificiais com estrutura tridimensional, que funcionam como guia para as células na formação de novos tecidos e cujas principais características são, biocompatibilidade, bioatividade do material, biorreabsorção, propriedades mecânicas adequadas, porosidade, fácil fabricação e superfície quimicamente favorável para a fixação, adesão e crescimento celular, com elevada interação *célula-scaffold*. Além desses aspectos, a propriedade mecânica do *scaffold* deve ser similar à do tecido vivo e deve ser conectado ao sistema de vascularização do tecido hospedeiro (STAMATIALIS, 2007), para evitar má formação tecidual.

Um *scaffold* ideal para tecido ósseo deve ter boa resistência mecânica, ser degradável e ter porosidade adequada, que possa combinar o crescimento das células com o tecido ósseo (DONG, 2009).

Os poros interconectados permitem adequada difusão dos nutrientes para proliferação, diferenciação celular e vascularização completa do tecido em crescimento, para que nenhum subproduto de degradação possa gerar reações inflamatórias ou tóxicas ao organismo (OLSOON, 2008). O maior desafio dos *scaffolds* é manter as propriedades mecânicas até a formação do novo tecido.

Para obtenção de *scaffolds* são usados polímeros naturais e sintéticos, cerâmicas, metais e compósitos. Espumas rígidas de poliuretano segmentado, biocompatíveis são materiais que possuem muitas características importantes para *scaffold* ósseo ideal (HILL, 2007).

A biocompatibilidade das cerâmicas e dos polímeros associadas às boas propriedades mecânicas são uma alternativa para os *scaffolds* compósitos.

Scaffold de poliuretano (PU) biodegradável e biocompatível tem sido utilizado para suportar a infiltração celular e formação de novo tecido subcutâneo, cardiovascular e tecido ósseo (YOSHII, 2009). Além disso, o *scaffold* de PU também pode funcionar como um sistema de liberação de fármacos (BOATENG, 2008; SIMMONS, 2008).

2.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

A bateria final de testes que se faz necessária para demonstrar a segurança, tanto dos materiais como do dispositivo final é constituída por ensaios biológicos desde simples avaliações em cultura de tecidos até o ensaio de eluato. Todos são concebidos para mostrar que não há nada no material que possa levar a uma reação entre ele e o corpo no qual o dispositivo será usado. Os tipos de ensaios que precisam ser feitos são bem documentados e virtualmente o laboratório, credenciado ou pertencente à própria empresa, pode ajudar a definir quais ensaios precisam ser feitos para cada produto em particular (SHARMA, 2012).

É interessante consultar o quadro ISO preparado pelos Associados da Ciência Norte-Americana (North American-Science Associates, NAMSA), uma organização para pesquisas clínicas para ter uma ideia sobre quais tipos de ensaios serão necessários para cada dispositivo. (CZUBA, 2011).

Shourgashti (SHOURGASHTI, 2010) realizou estudos com Plasma de poli dimetilsiloxano induzida por enxertia sobre a superfície de poliuretano e observou em ensaio *in vitro* que não houve nenhuma toxicidade.

Laschke (LASCHKE, 2010) desenvolveu um scaffold poroso de PU com HA na sua superfície e observou que o carregamento com HA não afetou a biocompatibilidade *in vivo* em vascularização e após o implante.

Deimling (DEIMLING, 2012) mostrou que células-tronco mesenquimais isoladas a partir de três espécies (humano, canina e murina) foram capazes de aderir e proliferar em três diferentes tipos de biomateriais de diferentes composições (fosfato de cálcio, colágeno e ácido L-lático).

Segundo Hafeman (HAFEMAN, 2011) os hidróxi-ácidos e os triisocianatos têm demonstrado não serem citotóxicos *in vitro*.

Alguns pesquisadores (LIU, 2010; DONG, 2009; LASCHKE, 2010; COZZENS, 2010; DIAS, 2010), realizaram ensaios *in vitro* em PU ou PU/HA, para viabilidade celular e não encontram toxicidade e indicaram que os materiais são promissores para engenharia tecidual.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os materiais de partida utilizados nesta pesquisa foram:

a) Poli-isocianato alifático (HDT), baseado no trímero do disocianato de hexametileno (HDI homopolímero), sem solventes, de viscosidade média, com as seguintes especificações: cor ≤ 40 HAZEN (APHA), viscosidade a 25°C de (2400 ± 400) MPa.s, densidade a granel de 1160 kg/m³.

b) Poli(álcool vinílico) (PVAI) Sigma-Aldrich, sendo as características do fabricante: 99% hidrolisado, Mw 85000-124000, d=1,269 , pf > 200°C.

c) Hidroxiapatita (HA) produzida pela empresa VETEC, pertencente ao lote 048768.

3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.2.1 Obtenção do bionanocompósito PVAI-PU/HA.

O processo mais utilizado na produção dos poliuretanos é o que envolve a reação de um composto com dois ou mais grupos funcionais álcool, tal como, um poliol poliéter ou poliol poliéster com um isocianato, di ou polifuncional (CORDEIRO, 2007), (ZHANG, 2011) formando ligações uretânicas.

Além do isocianato e poliol pode-se utilizar ainda um extensor de cadeia na reação, com proporções na razão molar como os pesquisadores PEREIRA, 2010; DIACONU, 2006; AWASTHI, 2010; CHUNG, 2011; FUQIANG, 2011 e DIAS, 2010, ou na razão em peso como ZHANG, 2011; MAHAPATRA, 2011; HUANG, 2011; LEE, 2010 e DEKA, 2009.

Nesta pesquisa utilizou-se um diisocianato HDT trímero do HDI, um poliol poli(álcool vinílico) na proporção em peso e não foi utilizado o extensor de cadeia.

Como pesquisas preliminares realizou-se dois tipos de monitoramentos para acompanhar a cinética das reações de formação do biomaterial até a cura. O primeiro monitoramento foi termicamente ativado e analisado por FTIR e o segundo monitoramento foi através da observação

da cura do material à temperatura ambiente. O FTIR aconteceu em duas etapas, sendo que na primeira etapa o material foi curado sob-rampa de temperatura que variou da temperatura ambiente 25°C a 180°C e na segunda etapa sob-rampa de temperatura com variação da temperatura ambiente 25°C a 150°C.

As proporções das misturas dos materiais aconteceram em duas etapas para a obtenção final do biomaterial, conforme indica a Figura 3.1. Inicialmente foram realizadas as reações para a síntese do poliuretano (PU). Misturou-se dois gramas do material viscoso HDT com um grama de partículas de Poli(álcool vinílico) a cada reação, em um becker de polipropileno, em agitação magnética com aquecimento, na faixa da temperatura ambiente até atingir a temperatura de 80°C, para obter-se o pré polímero PU. Em seguida adicionou-se hidroxiapatita à mistura em três proporções distintas de 25%, 33% e 40% em cada reação, de forma lenta e por 15 minutos, tempo que segundo analisado por FTIR os materiais já iniciaram reação na mistura, ainda com o controle de temperatura em 80°C. A mistura foi retirada do becker e envasada em três moldes diferentes. O primeiro molde fechado, de aço inoxidável, com dimensão para amostras cilíndricas com diâmetro de 6 mm e altura de 3mm. O segundo molde fechado, de polipropileno, com diâmetro interno igual a 4 mm e altura igual a 60 mm e, por terceiro, molde aberto de teflon, para amostras em forma de prisma com dimensão de 20x20x2 mm³. Após o preenchimento com a mistura, os moldes com material foram inseridos em estufa para a cura a 120°C por 30 minutos e depois retirados e resfriados naturalmente até a temperatura ambiente, desmoldados e encaminhados para as caracterizações morfológicas, mecânicas e biológicas.

As amostras para os ensaios de reologia e FTIR foram produzidas de forma a atender as caracterizações nesses equipamentos e para os ensaios biológicos os cilindros desmoldados dos moldes de polipropileno foram fatiados em forma de discos.

A Figura 3.1 mostra o fluxo dos experimentos para obtenção do bionanocompósito. A Figura 3.2 mostra fluxo dos ensaios de caracterização do bionanocompósito e a Figura 3.3 mostra o fluxo dos ensaios biológicos do bionanocompósito.

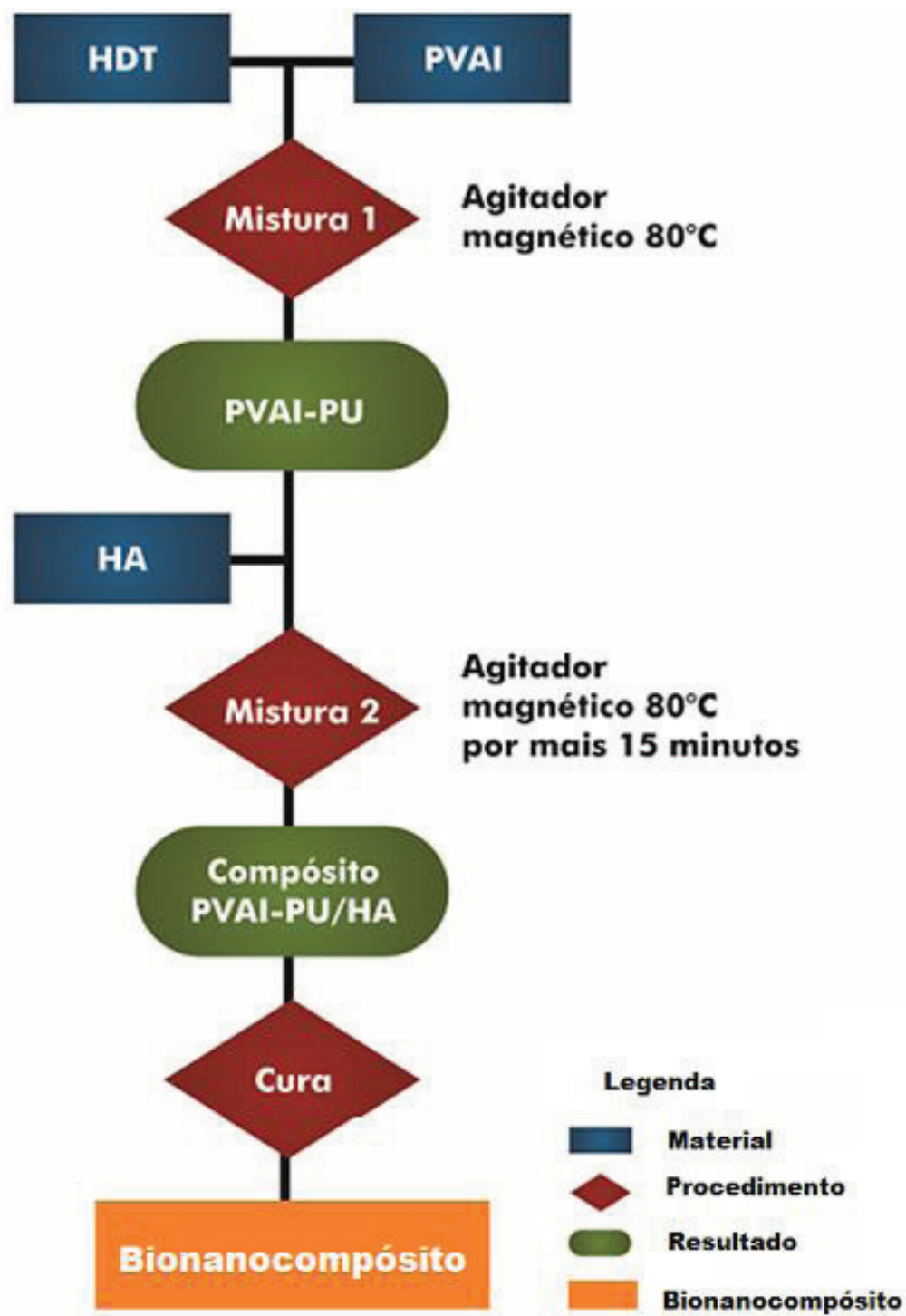


Figura 3.1 – Fluxo dos experimentos para obtenção do bionanocompósito.

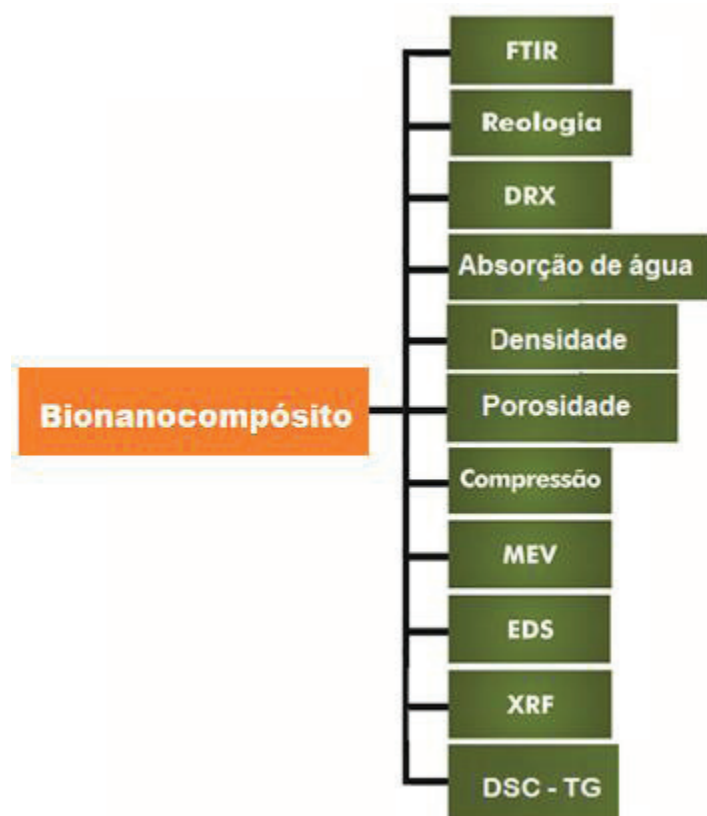


Figura 3.2 – Fluxo dos ensaios de caracterização do bionanocompósito.

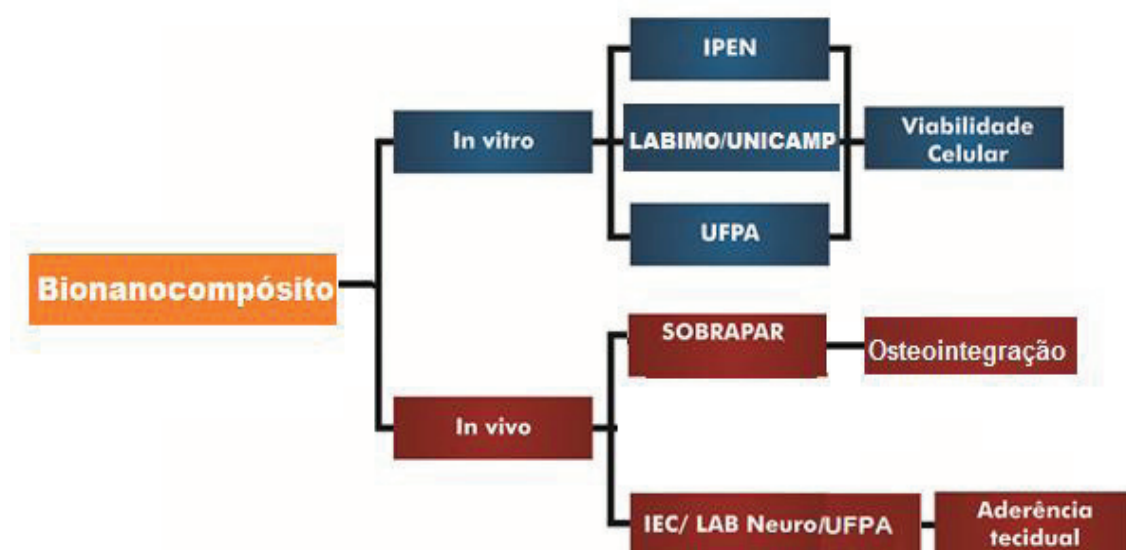


Figura 3.3 – Fluxo das etapas dos ensaios biológicos do bionanocompósito.

3.2.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier – FTIR

A espectroscopia de IR é considerada uma das mais importantes técnicas de Caracterização de polímeros e blendas poliméricas.

A absorção de radiação infravermelha causa transições de níveis vibratórios de energia das moléculas. Essa técnica baseia-se na análise dos movimentos de vibração e rotação característicos das moléculas quando elas atingem um determinado nível de energia. Esse nível de energia é obtido quando se incidem sobre uma amostra radiações infravermelhas em várias frequências. A utilização dessa técnica é sustentada pelo fato de que somente comprimentos de onda muito específicos de luz infravermelha podem ser absorvidos quando um determinado tipo de molécula está no caminho da radiação (DIAS, 2000).

A espectroscopia pode fornecer informações relacionadas à pureza e presença de grupos funcionais de um material.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados através de um espectrofotômetro da marca THERMO SCIENTIFIC NICOLET IR100 da FEM/UFPA.

Como informado anteriormente, a cinética de reações foi monitorada por FTIR e considerou-se como primeira caracterização desta pesquisa as medições de comprimento de onda do biomaterial desde a temperatura ambiente de 25°C até 150°C.

Após experimento de cura na temperatura ambiente por 18 dias, foi realizado o monitoramento por FTIR nessas mesmas condições, tanto nos materiais de partida como no biomaterial PVAI-PU/HA. Para as medidas das análises, os materiais foram envolvidos em filme de polietileno (PE) para melhor leitura em porta amostra de papel adaptado ao equipamento. As análises do material foram feitas com a subtração das bandas de PE na região de 4000 a 500 cm^{-1} .

3.2.3 Ensaios Reológicos

A reologia é responsável por obter informações sobre o efeito de vários fatores que influenciam no processamento de materiais poliméricos. Realizou-se estudos reológicos através de ensaios para a obtenção de variáveis como temperatura de processamento para cura à quente e viscosidade, tanto para a reação da mistura PVAI e HDT que formou PVAI-PU como na mistura do biomaterial PVAI-PU/HA.

Os materiais tanto PVAI-PU como PVAI-PU/HA ainda no estado viscoso foram submetidos à ensaios reológicos no laboratório de ensaios mecânicos da FEM- UFPA em reômetro HAAKE, modelo Rheo Stress 6000, de placas paralelas com 35 mm de diâmetro, sensor do tipo PP35, controlador térmico do tipo RS 6000, até 150°C, mesma temperatura adotada em FTIR. Foram verificados o módulo de armazenamento ($G'(\omega)$) e módulo de dissipação ($G''(\omega)$) em função da temperatura bem como a temperatura nos materiais PVAI/HDT e compósito PVAI-PU/HA e temperatura de processamento para cura do material compósito à quente.

3.2.4 Difração de raios X (DR-X).

As análises de raios X são constituídas por radiações eletromagnéticas de curto comprimento de onda produzido pela aceleração ou desaceleração de elétrons de alta energia ou pelas transições de elétrons dos orbitais internos dos átomos. O intervalo dos comprimentos de ondas dos raios X vai de 10^{-5} Å até 100 Å. As condições necessárias para difração de raios X são o espaçamento entre as camadas de átomos deve ser aproximadamente o mesmo que o comprimento de onda da radiação e os centros espalhadores devem estar espacialmente distribuídos em um arranjo altamente regular.

Em 1912, W.L.Bragg deduziu a chamada equação de Bragg informada em Equação. 1, onde os raios X devem ser refletidos somente se o ângulo de incidência satisfaz a condição:

$$\text{sen}\theta = n\lambda/2d \quad \textbf{Equação. 1.}$$

Onde n é um número inteiro, λ é o comprimento de onda da radiação incidente e d é a distância interplanar para o conjunto de planos $h\ k\ l$ (índice de Miller) da estrutura cristalina e θ é ângulo de incidência dos raios X.

Para detectar e analisar pequenas variações e distorções pode-se realizar o refinamento de estruturas cristalinas através do método de Rietveld (1967, 1969) e obter-se o quantitativo do material.

As medidas de raios X de PVAI e PVAI+HDT foram realizadas pela técnica de raios X em aparelho PHILIPS-binary (scan) (RD) e goniômetro PW1800 da USP de Lorena, empregando-se o método do pó, com fonte de raios X K α do cobre e varredura no intervalo de 5° a 60° (2 θ).

As fases presentes nos biomateriais e HA foram determinadas por Difração de Raios-X, método do pó, (DRX) em amostra total. Utilizou-se um difratômetro de raios-X da marca PHILIPS-binary, com Goniômetro PW 1800 do IFPA, foco normal, e com tubo de raios-X de anodo de cobre. A aquisição de dados dos registros foi obtida através de uma interfase e software, e o tratamento dos dados com o software APD, Automated Powder Diffraction.

3.2.5 Absorção de Água

A absorção de água após imersão foi calculada utilizando a Equação 2 (ASEFNEJAD, 2011; MARTINEZ-VALENCIA, 2011).

$$Ab (\%) = (m_2 - m_1) / m_1 \times 100 \quad \textbf{Equação. 2}$$

Onde m_1 é a massa seca antes imersão e m_2 é a massa úmida após a imersão.

Os ensaios para absorção, densidade e porosidade podem ser realizados utilizando-se uma relação que envolve o valor da massa seca e da massa inchada do material, numa determinada temperatura (LIU, 2010; BOTARO, 2009; WANG 2009; AOUADA 2008; CAMPESE 2007; KALITA 2003).

A análise de absorção de água desta pesquisa foi realizada no Laboratório de Química do IFPA. Cinco amostras de cada *scaffold* foram pesadas com uma precisão de $\pm 0,0001$ g em uma balança analítica e seus pesos registrados. Após a pesagem as amostras foram imersas em um becker de vidro com 10 ml de água destilada. Após 24 horas as amostras foram removidas da água e, depois a água de superfície foi removida com papel e as amostras foram novamente pesadas. O ensaio foi realizado à temperatura de 22°C.

3.2.6 Densidade

Os ensaios para cálculo da densidade foram realizados no Laboratório de Química do IFPA.

O picnômetro foi lavado com álcool, secado na temperatura ambiente e preenchido com água destilada, que foi aferida. A massa de cada amostra do biomaterial foi devidamente medida bem como a massa do picnômetro e a massa conjunta da amostra e picnômetro com a água destilada, por três vezes.

A densidade aparente do biomaterial foi calculada em função da massa do picnômetro com a água, o corpo sólido no vidro de relógio e a massa do picnômetro com o corpo sólido no seu interior. O ensaio foi realizado à temperatura de 22°C.

3.2.7 Porosidade

A porosidade do *scaffold* foi determinada usando deslocamento de líquidos ou princípio de Arquimedes, método semelhante ao relatado por (GUAN, 2005; LIU, 2010) e foram avaliadas cinco amostras para cada *scaffold* no laboratório da USP de Lorena com temperatura de 18°C.

Cada amostra do biomaterial com duas proporções distintas de hidroxiapatita foi imersa em um cilindro contendo um volume de 10 ml de etanol V_1 . A amostra foi mantida em etanol durante 5 minutos para permitir que o etanol preenchesse os poros da amostra. O volume total de etanol e o *scaffold* com etanol impregnado foi registrado como V_2 . O *scaffold* impregnado com etanol foi removido do cilindro e o volume de etanol residual foi registrado como V_3 . O ensaio foi realizado à temperatura de 18°C. A porosidade “p” do *scaffold* foi calculada de acordo com a Equação 3 (LIU, 2010; GUAN, 2005).

$$p = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) \times 100\%.$$

Equação. 3

3.2.8 Ensaio mecânico de compressão

Os ensaios mecânicos são realizados segundo orientações normativas, entre elas a ASTM D 695-96 que contém diretrizes do ensaio de compressão. Este método de ensaio determina as propriedades mecânicas de plásticos rígidos, não reforçados e reforçados, incluindo compósitos de alto módulo, quando carregado sob compressão em taxas relativamente baixas de esforço ou carregamento uniforme. São utilizados corpos de prova de forma padrão. Este processo é aplicável a um módulo de compósito até 41.370 MPa (6.000.000 psi) (ASTM D 695-96).

Ensaio de compressão é a aplicação de uma carga compressiva uniaxial em um corpo de prova e cuja resposta desse ensaio é obtida pela deformação linear medida entre a distância das placas que comprimem esse corpo.

A amostra para o teste padrão deve estar na forma de um cilindro reto ou prisma cujo comprimento é o dobro de sua largura principal ou diâmetro (ASTM D 695-96).

Um total de 30 corpos de prova cilíndricos $\varnothing$ 6 mm e 3 mm de altura, segundo a ASTM D695-96 foram ensaiados sob compressão. Os ensaios foram realizados em máquina universal Emic DL500 no laboratório de ensaios mecânicos da FEM- UFPA em 30 corpos de prova distribuídos em 10 de cada um dos materiais como segue, PVAI-PU, PVAI-PU/HA com 25% de HA e PVAI-PU/HA com 33% de HA.

Por se tratar de corpos de prova com pequenas dimensões a aplicação de carga foi interrompida antes da ruptura de aproximadamente 40% da deformação do comprimento original, (WANG, 2009; LIU, 2009; LIU, 2010), para evitar que as placas de compressão tivessem contato, o que poderia comprometer o desempenho da máquina.

3.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Microscopia eletrônica de varredura é um procedimento onde são observadas as características morfológicas dos materiais, as quais têm importância fundamental para se definir o comportamento desses materiais. Sendo assim, a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) torna-se essencial na observação e análise da microestrutura de superfícies e partículas de diversos materiais. O MEV com sua grande profundidade de campo, elevado poder de resolução e larga faixa de ampliações possíveis, se adapta perfeitamente ao estudo detalhado das superfícies de fratura (DIAS, 2000).

A caracterização das superfícies normais e de fratura tanto dos materiais de partida como dos bionanocompósitos foi obtida em Microscópio Eletrônico de Varredura LEO modelo 1450 VP Laboratório de Geociências da UFPA e Microscópio Eletrônico de Varredura marca ZEISS Modello, EVO MA-15, do Departamento de Engenharia de Materiais da UNICAMP.

3.2.10 Análise Espectroscópica por Energia Dispersiva (EDS)

A análise por EDS foi realizada tanto nos materiais de partida poli(álcool vinílico), hidroxiapatita como no biomaterial para verificar como as partículas constituintes desses materiais foram quimicamente alteradas. Após a obtenção das imagens dos materiais em MEV, foram selecionadas imagens para análise por EDS. Foram determinados aleatoriamente quatro (4) pontos em cada imagem para análise.

3.2.11 Espectrofotometria de Fluorescência de Raios X (XRF)

O ensaio de espectrofotometria de fluorescência de raios-X é uma técnica de análise quantitativa não destrutiva é utilizada para determinar e analisar as proporções dos elementos suas quantidades em determinado material.

Para análise do biomaterial desta pesquisa foi realizado ensaio de espectrofotometria de fluorescência de raios X (XRF), Os elementos do conteúdo do biomaterial PVAI-PU/HA foram determinados em espectrofotômetro da marca Rigaku, modelo Rix 3100, do departamento de Engenharia de Materiais da UNICAMP.

3.2.12 Calorimetria exploratória diferencial simultânea (TG-DSC)

As análises foram realizadas com uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto em uma atmosfera de nitrogênio na faixa da temperatura ambiente a 600°C em equipamento da marca NETZSCH, modelo STA409C, do departamento de Engenharia de Materiais da UNICAMP. Foram realizadas análises no biomaterial PVAI-PU/HA com proporções de 25% e 33% de hidroxiapatita.

3.2.13 Ensaios biológicos *in vitro*

Biosínteses/IPEN

Células de ovário de rato chinês (CHO) foram cultivadas em monocamada e mantidas em estufa com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico e suplementadas em células (*Roswell Park*

Memorial Institute) *médium RPMI 1640*, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), após a tripinização foram semeadas 3000 células em microplaca de cultura celular de 96 poços. Em seguida foram adicionadas diluições crescentes do extrato do biomaterial PVAI-PU/HA (50µl/poço, 4 poços/por diluição), após esse procedimento a placa foi equilibrada a 37°C. O volume total em cada poço deve ser de 100µl. Colunas controle de quatro poços são preparadas com o meio sem a colocação das células (branco) e meio, ao invés de extrato, com as células (controle negativo=100%). Após 72 h, 20µl de uma mistura (20:1) de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)2H tetrazolium) (MTS) a 0,2% e phenazine methosulfate (PMS) a 0,09% em Phosphate buffer saline (PBS) foi adicionada aos poços de testes e deixada em incubação por 2 horas. A incorporação do corante foi medida por meio de um leitor de microplacas a 490nm contra o branco. O índice de citotoxicidade (IC) 50% é estimado pela curva de interpolação, como a concentração do extrato do biomaterial resultante da inibição de 50% da incorporação do MTS, correlacionando o percentual médio de células viáveis em relação à concentração dos extratos a partir do gráfico.

Instituto Evandro Chagas/Lab. de Neuroinflamação - UFPA

Foi realizada uma Cultura 3D de células embrionária de ratos (*mouse embryonic fibroblast cell line - NIH3T3*) sobre o biomaterial. As células *NIH3T3* foram plaqueadas nas concentrações 5×10^5 e 10^6 células por biomaterial. O biomaterial foi mantido em 300µl de meio modificado Dulbecco (*modified Dulbecco's Eagle's médium - DMEM*) com 10% de soro fetal bovino e também com *poli-l-lisina* por três dias em estufa a 37°C com 5% de CO₂. A análise da proliferação celular foi realizada através do teste de viabilidade celular com - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (*MTT*).

Laboratório de Biomecânica Ortopédica LABIMO/UNICAMP

Cultura Celular

Foram utilizadas células VERO, uma linhagem celular do tipo fibroblastos recomendadas para testes de citotoxicidade, obtidas junto ao Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP (ISO-10993,

1993). As células foram cultivadas em meio *DMEM* (Gibco) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco) a 37°C com 5% de CO₂ na atmosfera.

Métodos

Obtenção dos extratos

Os extratos dos materiais analisados foram obtidos através da incubação destes em placa de cultura de 24 poços na proporção de 0,2g de material por ml de meio *DMEM* com 10% SFB a 37°C por 48 horas sem agitação. Decorrido o período de incubação o meio foi utilizado no cultivo das células VERO, permitindo desta forma, avaliar a possível liberação de substâncias tóxicas no meio de cultura. O teste de citotoxicidade indireta e extração dos extratos foram feitas de acordo com recomendações internacionais (ISO-10993-5, 1992; ISO-10993, 1997, NBR-ISO10993, 1999; SJOGREN, 2000).

Avaliação da Citotoxicidade Indireta

Para o teste de viabilidade celular pelo método do *MTT* (*brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium*) foi inoculada uma suspensão celular na concentração de 3x10⁶ células/ml em placa de cultura de 96 poços (*Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA*) e cultivada por 24 horas a 37°C.

Após o período de incubação de 24 horas, o meio de cultura contido na placa foi substituído pelo extrato dos materiais. Foi utilizada como controle positivo de toxidade (CPT) uma solução de meio *DMEM* com 10% SFB e 10% de Fenol e como controle negativo de toxidade (CNT) o extrato de poliestireno.

Decorrido o período de cultivo de 24 horas o extrato dos materiais foi retirado e os poços foram lavados com 200µl de solução tampão fosfato salinos (PBS). Após este procedimento foi adicionado 200µl de meio *DMEM* com 10 mM de tampão Hepes e 50µl *MTT* Sigma (5µg/ml em *PBS*) e a placa de cultura foi incubada no escuro por 4 horas a 37°C. Decorrido este período o meio com o *MTT* foi substituído por 200µl de *Dimethyl Sulphoxide* (*DMSO*) e a placa foi mantida em agitação por 30 minutos.

Foi feita leitura da absorbância em leitor de Microplacas em comprimento de onda de 540nm. Foram utilizados como controle de reação, poços onde não houve o cultivo de células (branco), nos quais foram adicionados os mesmos reagentes descritos anteriormente.

3.2.14 Ensaios biológicos *in vivo*

Os ensaios *in vivo* foram realizados em laboratórios distintos em dois acontecimentos e com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP através do protocolo nº 2482-1, de acordo com as leis nacionais de uso de animais em laboratórios de pesquisas.

Acontecimento I - Realizado no laboratório da Sociedade Brasileira de Pesquisa e Assistência para Reabilitação Craniofacial – SOBRAPAR, Campinas.

Animais

Quatro ratos Wistar com 1 ano de idade e peso médio de 400 gramas foram doados pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB), foram mantidos e monitorados em gaiolas individuais, com comida e água *ad libitum* e temperatura controlada. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais.

Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de ketamina (85 mg/kg; im) e xilazina (12 mg/kg; im). O pêlo foi raspado e foi realizada uma incisão mediana (20 mm) na pele ao longo da sutura sagital. A musculatura e o perióstio foram rebatidos expondo o osso parietal. Dois defeitos ósseos de 5,0 mm foram criados com uma trefina na calvária dos ratos. Os implantes em forma de discos com 4 mm de diâmetro e 1 mm de espessura de PVA-PU/HA esterilizados em óxido de etileno (DIAS, 2010), foram inseridos no defeito ósseo à direita e o defeito à esquerda não foi preenchido e foi usado para controle. Após a cirurgia a musculatura e o perióstio foram reposicionados. No pós-operatório foi utilizado analgésico Dipirona (500 mg/ml;

vo), para o período subsequente de 24 horas. Todos os animais foram monitorados de perto e receberam ração peletada e água “ad libitum”.

Análise histológica

Os animais foram anestesiados e sacrificados após 30 dias de implantação por deslocamento cervical. Os discos de implante foram colhidos e fixados em formalina a 10%, descalcificados (DONG, 2009), desidratados e embebidos em parafina. Cada explante foi então processado para análise histológica em que foram obtidas secções de 5µm que foram coradas com Hematoxilina & Eosina, (HILL, 2007; DONG, 2009; KIM, 2011). A biocompatibilidade do implante PU/PVA foi quantificada pela gravidade da cápsula de fibrose, reação de corpo estranho e processo inflamatório inespecífico. As propriedades de osteocondução foram determinadas pela capacidade de regeneração óssea.

Acontecimento II – Realizado no Instituto Evandro Chagas/ Lab. de Neuroinflamação-UFPA.

Animais

Camundongos suíços (30-35g) foram obtidos do Instituto Evandro Chagas do Pará. Seis animais foram divididos em três grupos de dois animais e mantidos em caixas plásticas em ciclo claro/escuro de 12 horas (JOVANOVIC, 2010) e temperatura ambiente de (22±1) °C, com água e comida ad libitum. O experimento foi desenvolvido de acordo com o comitê de ética em pesquisa para utilização de animais.

Procedimento Cirúrgico

Os camundongos foram anestesiados com ketamina/xilazina 2:1 diluído em soro fisiológico. Após os pêlos raspados, foi realizada uma incisão de 10 mm na linha média dorsal no animal e o biomaterial PVA-PU/HA em forma de disco esterilizado em autoclave para materiais termolábeis com ø 4 mm e 1 mm de espessura foi implantado no espaço subcutâneo dorsal dos ratos, (HILL, 2007). Após a cirurgia os tecidos foram reposicionados e suturados. No pós-

operatório nenhuma medicação foi utilizada. Todos os animais foram monitorados de perto e receberam ração peletada e água “ad libitum”. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, para a retirada do material implantado 1, 7 e 14 dias após o implante. (HAFEMAN, 2012).

Análise histológica por Microscopia eletrônica de varredura

O biomaterial foi retirado juntamente com o tecido dos camundongos e fixados em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído a 25%, 4% de paraformaldeído 2,5% de sacarose, em tampão cacodilato de sódio (KHANDWEKAR, 2010), 0,1 M, pH 7.2 por 2 horas a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas 3 vezes em tampão cacodilato 0,1 M e, posteriormente, pós-fiadas em solução contendo: 1% tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio a 0,8% por 1 hora a temperatura ambiente. O material foi lavado e então desidratado em séries crescentes de etanol (50, 70, 90% e 100%) (KIM, 2011; DIAS, 2010), durante 20 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram secas pelo método do ponto crítico (Modelo K 850 - Marca Emitech) usando CO₂. O material foi montado em suporte apropriado (*stub*) e metalizado com uma película de ouro de aproximadamente 2µm de espessura, usando o aparelho Emitech K550-England. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura LEO 1450VP do Instituto Evandro Chagas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 OBTENÇÃO DO BIONANOCOMPÓSITO PVAI-PU/HA.

A Figura 4.1 mostra a mistura do biomaterial antes da cura, onde é possível observar as partículas do PVAI envolvidas pelo material viscoso que contém HA e HDT.

Em temperaturas de processo a 180°C e 150°C obtiveram-se materiais porosos, visivelmente degradados de coloração aproximada ao marrom Figura 4.2 (a) e do amarelo, Figura 4.2 (b).

No material curado em temperatura ambiente, pode-se observar pela figura 4.3, a formação de material compósito poroso, sem degradação visual, tonalidade clara aproximada à cor branca semelhante à cor e estrutura do osso. Na Figura 4.4 estão apresentados os moldes fechados de aço inoxidável utilizados para a cura à quente do biomaterial.

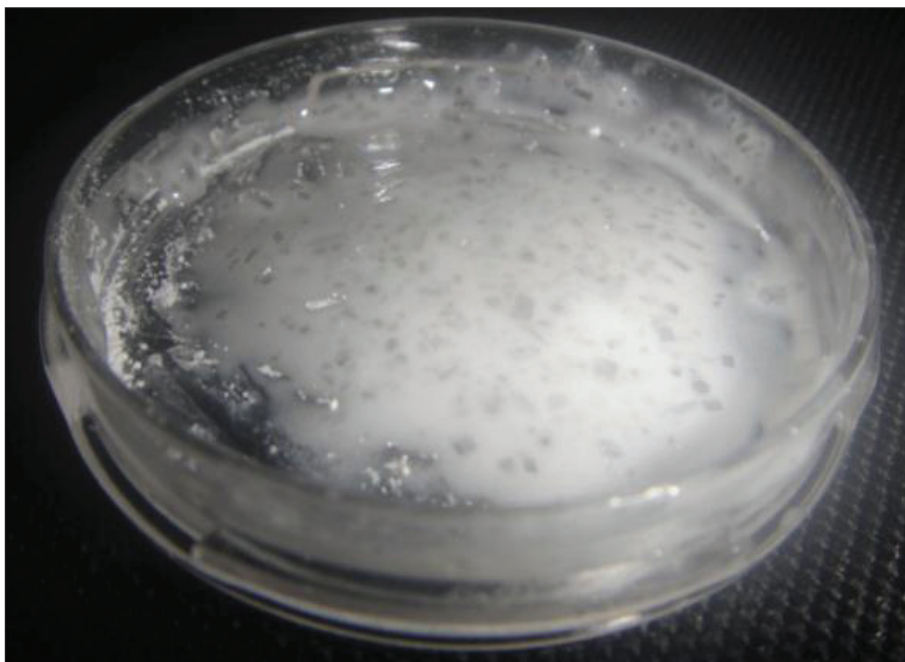


Figura 4.1 – Imagem do biomaterial antes da cura.

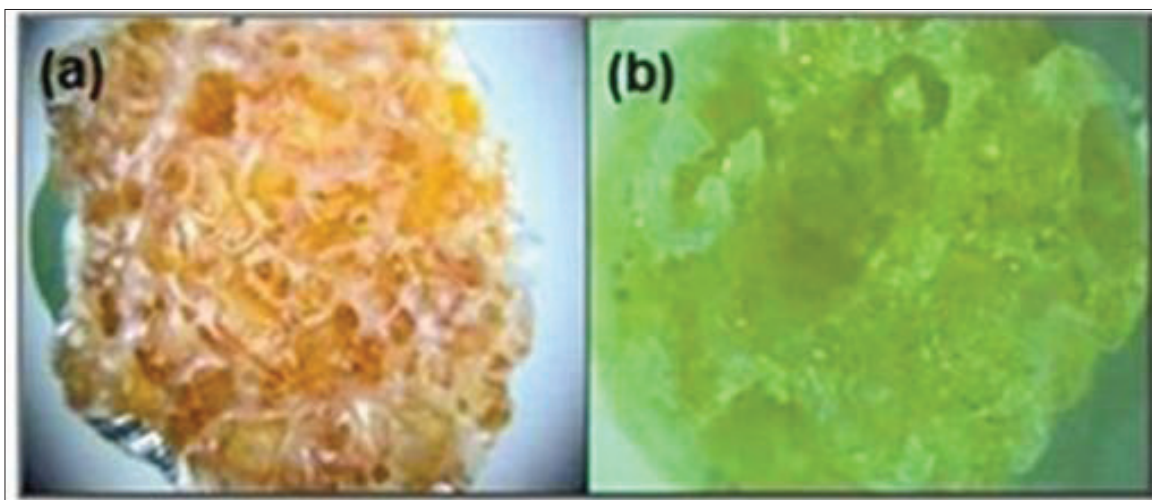


Figura 4.2 - Imagem do biomaterial em estereoscópio cura a 180°C (a) e cura a 150°C (b) por 105 e 75 minutos respectivamente.



Figura 4.3 - Biomaterial curado em temperatura ambiente por 18 dias.



Figura 4.4 - Moldes de aço inoxidável utilizado para cura a quente do biomaterial.

Duas das três misturas em diferentes proporções de hidroxiapatita, que foram curadas à quente resultaram em material poroso e semelhante ao osso. A terceira mistura com 40% de hidroxiapatita, apresentada na Figura 4.5, permaneceu em forma de pó sem formar filme e foi descartada desta pesquisa.

Na Figura 4.6 observa-se o biomaterial obtido em três formas distintas para as caracterizações mecânicas, morfológicas e ensaios biológicos.



Figura 4.5 - Mistura PVAI-PU/HA com 40% de hidroxiapatita.

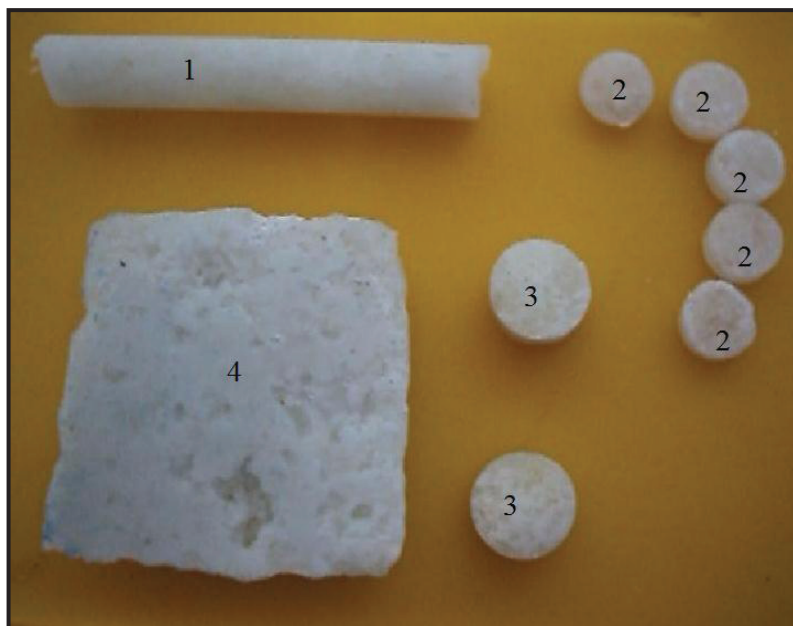


Figura 4.6 - Biomaterial para caracterizações e ensaios biológicos nas dimensões, $\varnothing$ 4mm e altura igual a 60mm (1) $\varnothing$ 4mm e altura igual a 1mm (2) $\varnothing$ 6mm e altura igual 3mm (3) e 2cm $\times$ 2cm (4).

4.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).

Nas análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier as características das moléculas são mostradas através de curvas de transmitância versus comprimento de onda.

Na Figura 4.7 observa-se as amostras que foram monitoradas por 18 dias em FTIR e a Figura 4.8 mostra espectros na região do infravermelho do filme de PE utilizado para envolver as amostras.



Figura 4.7 - Amostras do biomaterial no filme de PE no porta-amostra para FTIR.

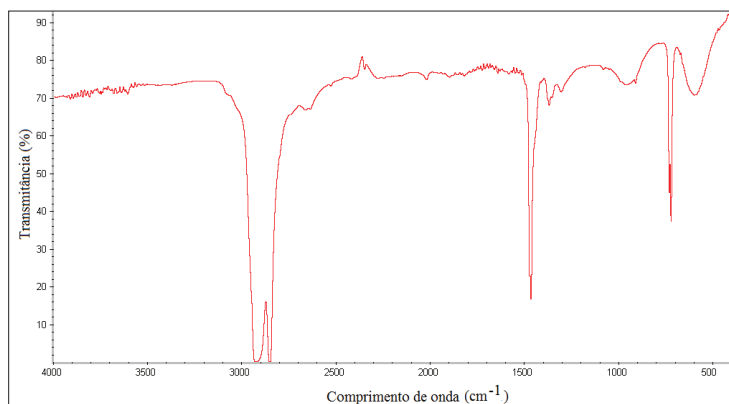


Figura 4.8 – Espectros na região do infravermelho do filme de PE.

Os espectros na região do infravermelho de PVAI-PU/HA que foram monitorados desde a temperatura ambiente de 25°C até 150°C são apresentados na Figura 4.9. Nota-se que absorções típicas de movimentos dos íons OH da hidroxiapatita são de difícil visualização logo após o início da mistura (ponto 1) e visíveis nos instante finais da reação (ponto 2); vibrações dos fosfatos da apatita (ponto 3) são alteradas durante a formação da matriz PU e recuperadas nos instantes finais (ponto 4). Liberação de CO₂ durante a reação é responsável pela formação de poros na estrutura (ponto 5).

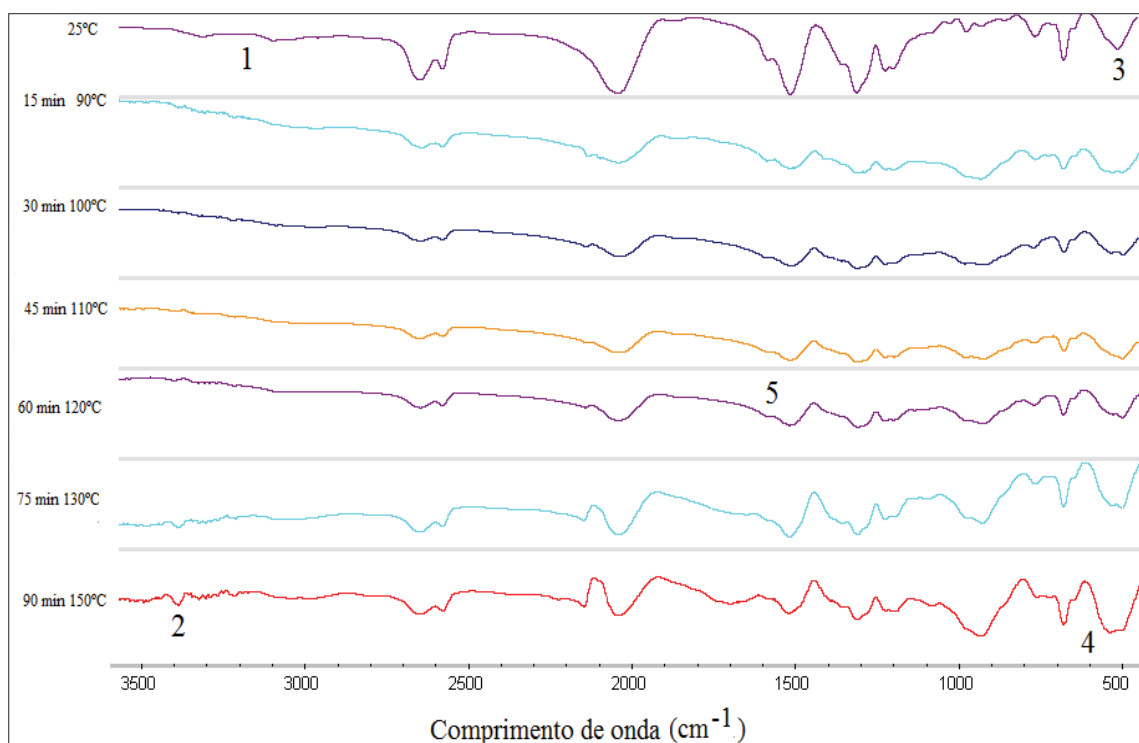


Figura 4.9 - Espectros do biomaterial PVAI-PU/HA no FTIR monitorado de 25°C até 150°C.

A Figura 4.10 mostra espectros do biomaterial monitorados durante a cinética de formação no FTIR com aquecimento de 15 até 75 minutos, onde são destacados os pontos de modificações dos íons hidroxila e formação de grupo NH do PU e modificações nos grupos fosfato (PO) da hidroxiapatita.

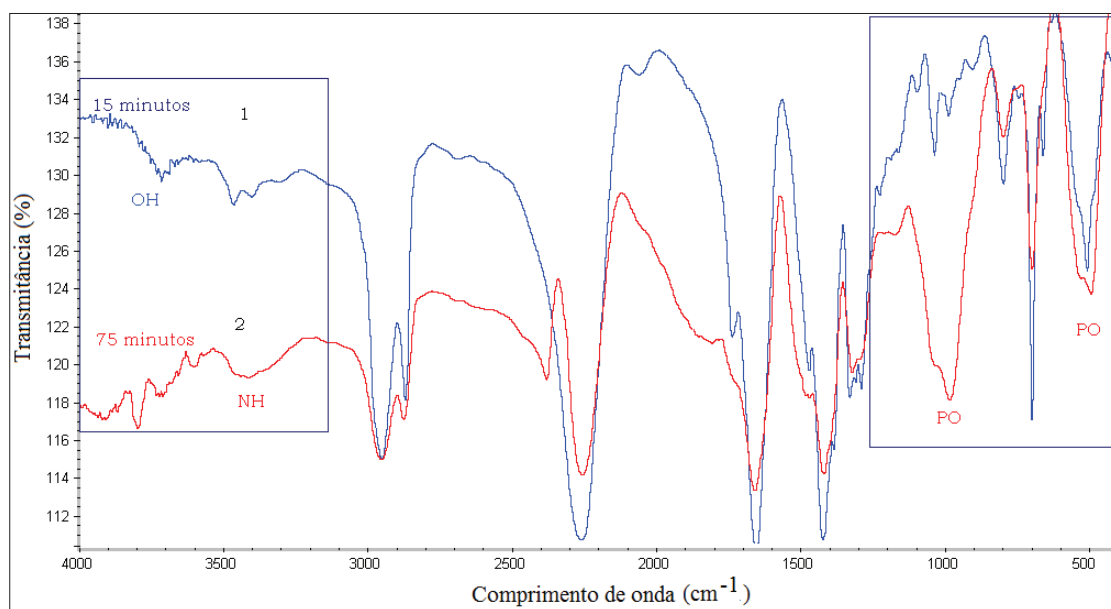


Figura 4.10 - Espectros do biomaterial PVAI-PU/HA com aquecimento no FTIR.

Os espectros referentes aos materiais HDT, PVAI/HDT(PU), HA/HDT e o biomaterial PVAI-PU/HA estão mostrados nas Figuras 4.11- 4.14, respectivamente. As bandas características de poliuretano formado são observadas nos espectros do HDT em $3342,46\text{ cm}^{-1}$ sugerindo reação de auto-adição entre os diisocianatos formando PU, Figura 4.11; nos espectros de PVAI/HDT em $3337,63\text{ cm}^{-1}$ pela reação uretânica do poliol com o diisocianato, Figura 4.12, nos espectros de HA/HDT em $3347,77\text{ cm}^{-1}$ Figura 4.13 e nos espectros do biomaterial PVAI-PU/HA em $1685,68$ e $3342,75\text{ cm}^{-1}$, Figura 4.14. A banda observada em $3567,98\text{ cm}^{-1}$ dos espectros do biomaterial PVAI-PU/HA está associada à vibração longitudinal da ligação intermolecular O-H, em $2914,88$ e $2849,31\text{ cm}^{-1}$ da ligação dos grupos alquilas e em $1762,52\text{ cm}^{-1}$ e da ligação intermolecular C=O dos grupos acetatos remanescentes do PVAI. As bandas em $566,71$ e $1038,93\text{ cm}^{-1}$ pertencem ao grupo fosfato e $602,04\text{ cm}^{-1}$ é característica de nano partículas de hidroxiapatita, Figuras 4.13 e Figura 4.14. Observa-se a ausência de bandas de intensidade 2200 cm^{-1} nos espectros do biomaterial referente à $\nu(\text{NCO})$ residual do diisocianato o que atesta que HDT reagiu totalmente (ASEFNEJAD 2011; MARTINEZ-VALENCIA 2011; WIK 2011; COSTA-JÚNIOR 2009; LI 2009; MANSUR 2008; ZHOU 2007).

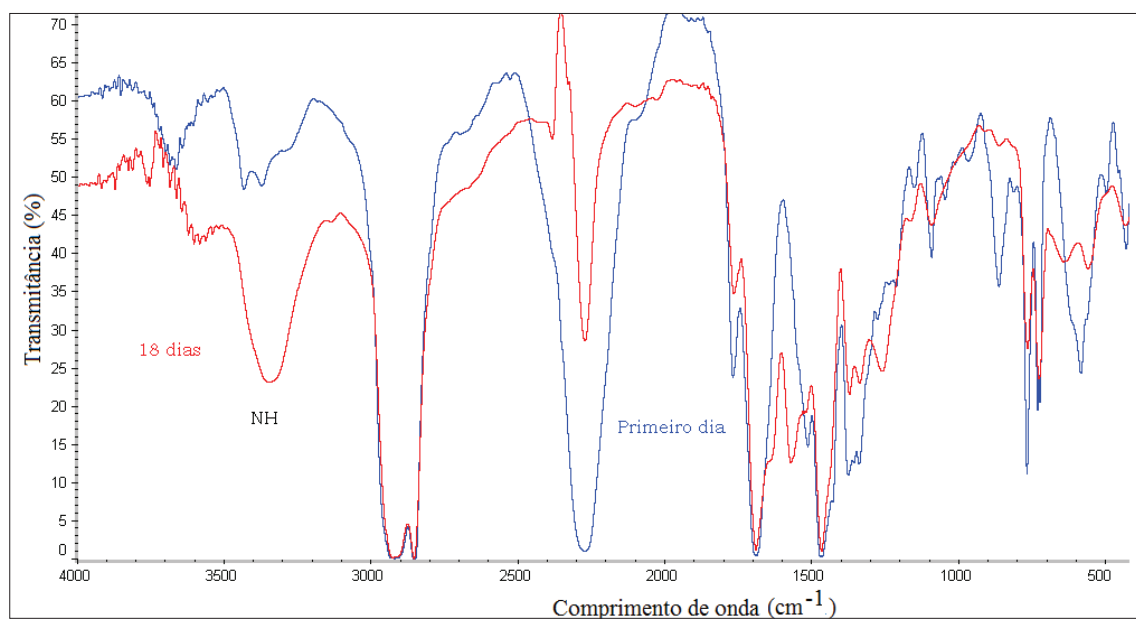


Figura 4.11 - Espectros de HDT no FTIR.

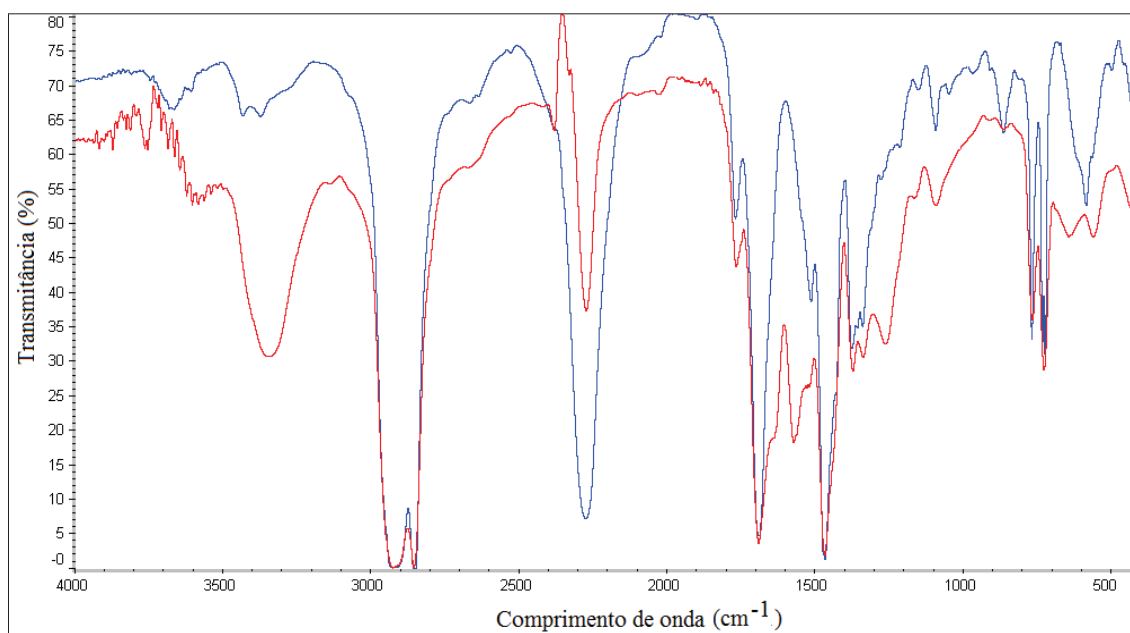


Figura 4.12 - Espectros do PVAI/HDT no FTIR.

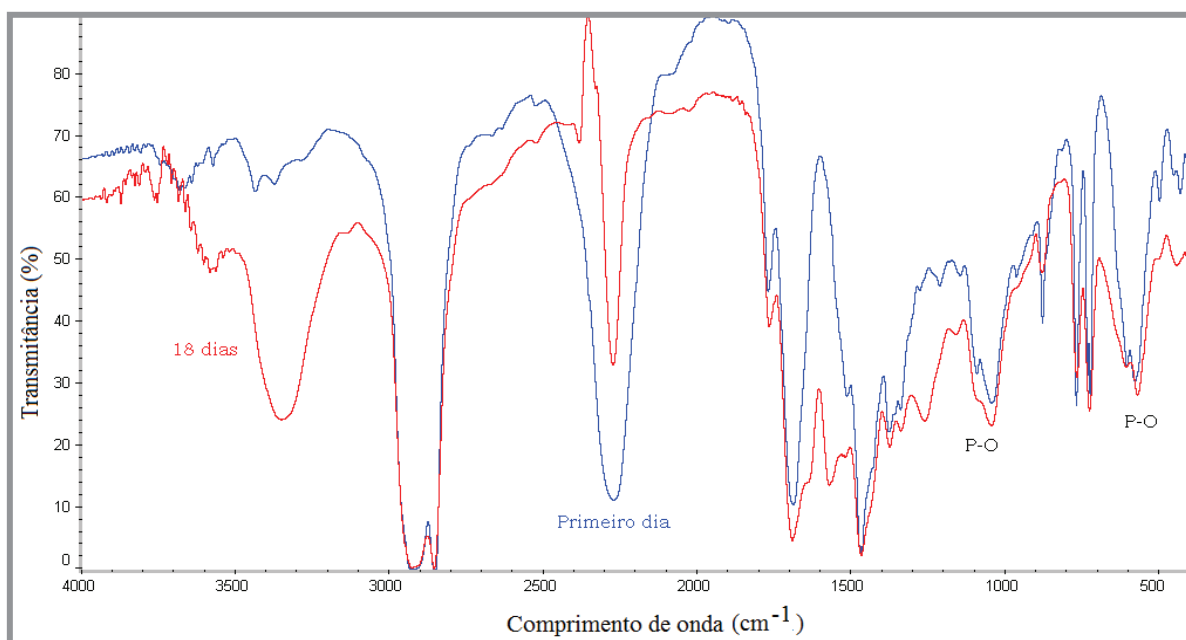


Figura 4.13 - Espectros do HA/HDT no FTIR.

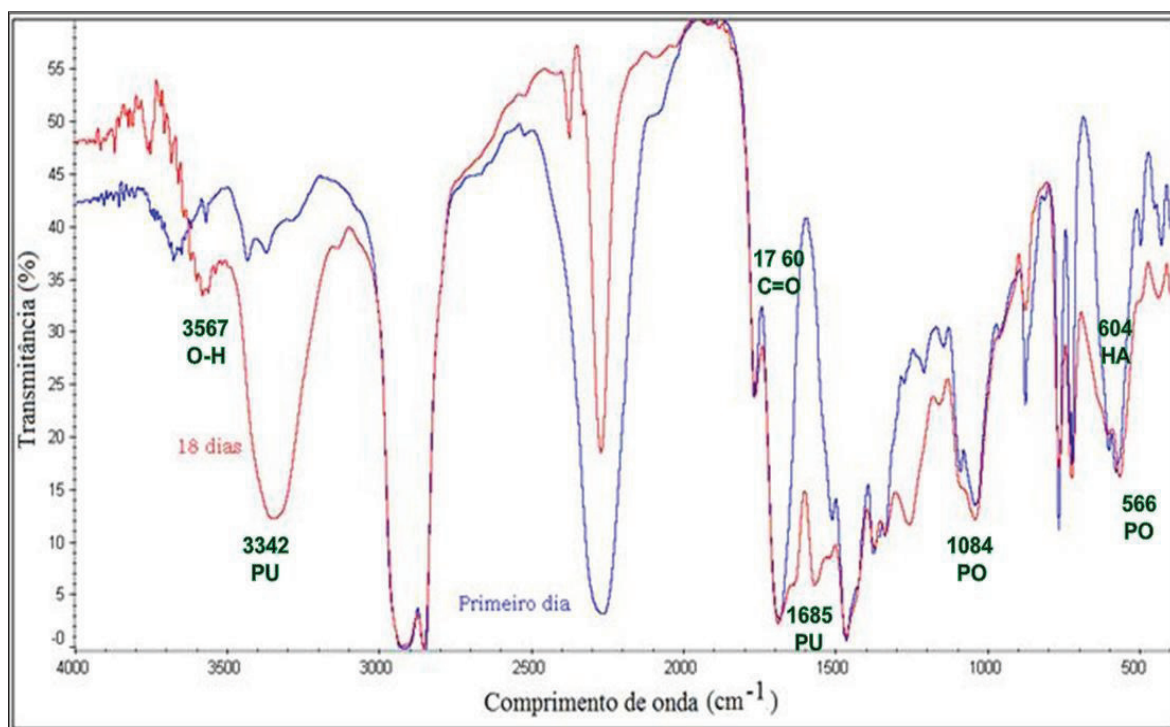


Figura 4.14 - Espectros do biomaterial PVAI-PU/HA no FTIR.

4.3 ANÁLISES REOLÓGICAS

No gráfico de reologia do compósito, a presença de HA no sistema reativo altera as temperaturas de processo pela formação de ionômeros.

Para um material termorrígido o ponto de gel, que é importante para observação da mudança de estado do material, ocorre quando o módulo dinâmico de armazenamento elástico é igual ao módulo dinâmico de perda, $G' = G''$, caracterizando variações da viscosidade e formação de ligações cruzadas, onde se considera o início da cura do material. Muitos fluidos não são newtonianos e ao aquecer não apresentarão o ponto de gel. Contudo, a maioria das resinas termorrígidas antes de curar apresenta comportamento newtoniano. Por ser o fluido composto de um termoplástico como é o caso do PVAI, no início do aquecimento o módulo elástico é elevado, caindo com acréscimo da temperatura e diminuindo a viscosidade.

O poliisocianato é o líquido responsável pelo elevado módulo viscoso, que cai ao ser aquecido. O primeiro ponto de cruzamento dos módulos reflete a melhor temperatura de manuseio, quando a queda da viscosidade do sistema permite maior interação dos componentes. As reações prosseguem aumentando o peso molecular tornando o sistema mais elástico. O segundo ponto de cruzamento reflete a temperatura de formação de ramificações. O terceiro ponto de cruzamento próximo a 130°C é o ponto de gel, quando o reticulado é formado. As Figuras 4.15 e 4.16 mostram as curvas de reologia da formação do PU e do biomaterial PVAI-PU/HA, respectivamente.

A partir da determinação dos pontos de gel da formação de PVAI-PU em 130°C e da formação de PVAI-PU/HA em 115°C, utilizou-se a faixa da temperatura ambiente até 120°C como temperatura de cura do biomaterial PVAI-PU/HA, por 30 minutos nessa última temperatura. Tais condições apresentaram excelente resultado para processamento de cura. A presença dos nanocristais poderá restringir o relaxamento de poliol, levando ao comportamento viscoelástico, (WIK, 2011).

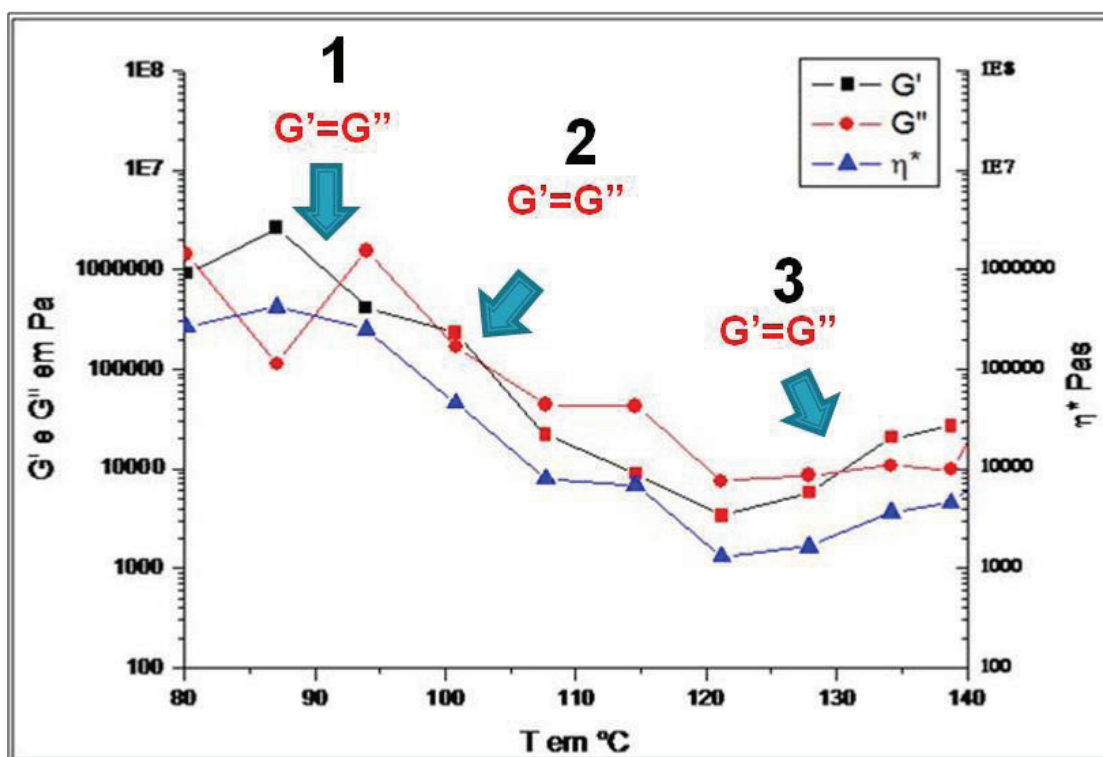


Figura 4.15 - Curvas reologia de formação de PVAI-PU.

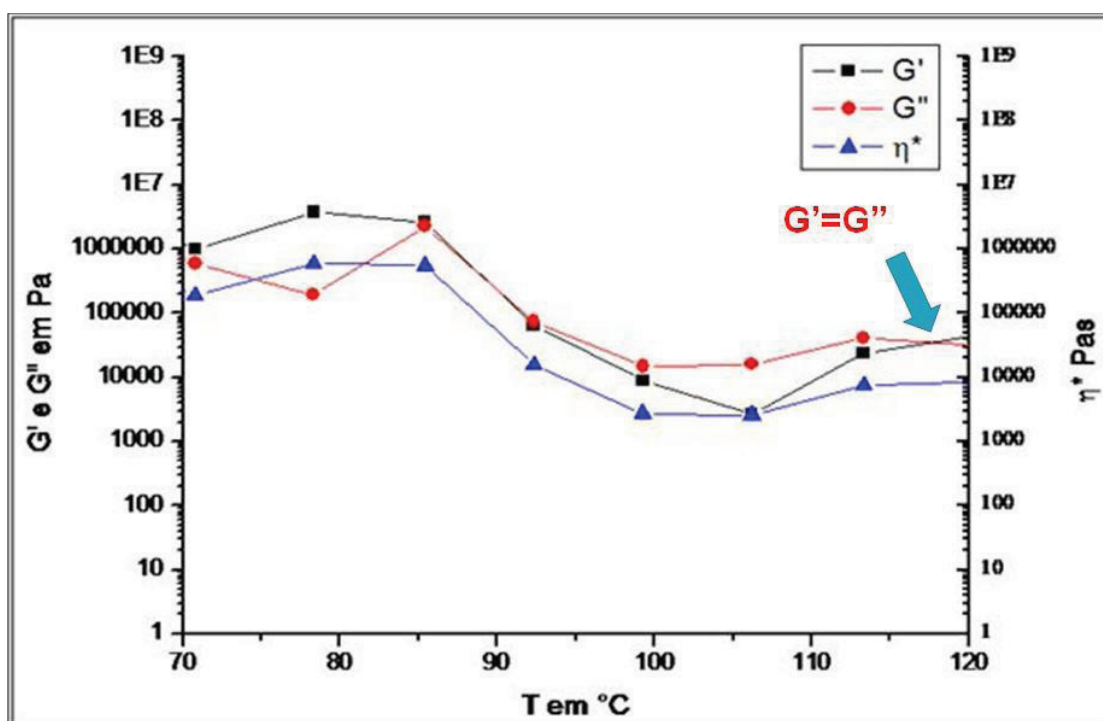


Figura 4.16 - Curvas de reologia do biomaterial PVAI-PU/HA.

O material curado no reômetro a 115° apresentou coloração branca e não apresentou sinais de degradação como mostra a Figura 4.17, essa morfologia visual foi determinante para o prosseguimento dos processamentos para obtenção dos bionanocompósitos com as características adequadas.

A Figura 4.18 mostra imagem do biomaterial em que o processamento de cura foi realizado na temperatura de 120°C, por trinta minutos. Esse valor de temperatura foi adotado a partir dos valores de cura do bionanocompósito PVAI-PU/HA em 115°C e da blenda PVAI-PU em 130°C no reômetro.



Figura 4.17 - Biomaterial PVAI-PU/HA curado a 115°C no reômetro.

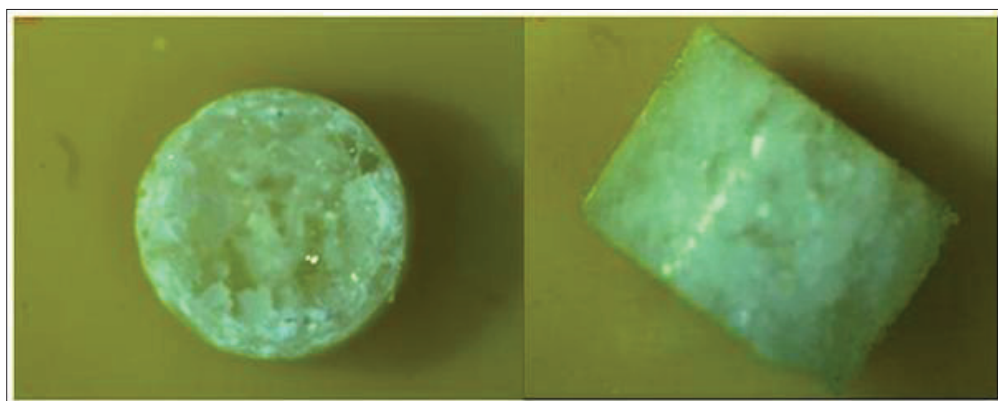


Figura 4.18 - Biomaterial PVAI-PU/HA curado a 120°C por 30 minutos.

4.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DR-X)

As Figuras 4.19 (a), 4.19 (b), 4.20, 4.21 e 4.22 apresentam os difratogramas de raios X do PVAI (1.a), reação de HDT mais PVAI para forma PU (1.b), hidroxiapatita, do biomaterial com 25% de HA e do biomaterial com 33% de HA respectivamente. Os ângulos característicos dos picos que aparecem nas Figuras e as distâncias interplanares correspondentes estão listados nas tabelas de 4.1 a 4.3.

A Figura 4.19 (a) mostra o difratograma de raios X do PVAI que apresenta característica de material semicristalino com um pico intenso em $2\theta = 20^\circ$ e um pico de pequena intensidade em $2\theta = 40^\circ$. A Figura 4.19 (b) PVAI-PU mostra um halo largo e pico menos intenso, o que significa que a cristalinidade do PVAI diminuiu na presença do material amorfo PU.

Observa-se na Figura 4.20 os três picos mais intensos de HA em $2\theta = 25,89^\circ$, $31,81^\circ$, $32,87^\circ$, $34,08^\circ$ e $39,87^\circ$ que se assemelham com aqueles para apatita óssea corroborando com (LIU, 2009).

Os halos amplos encontrados na região próxima de $2\theta = 18^\circ$ a 24° da Figura 4.21 e na região próxima de $2\theta = 17^\circ$ a 22° da Figura 4.22 são característicos de PU. Valores estes que estão próximos aos de (LIU, 2009) e (WANG, 2011) que analisaram PU puro.

Nas Figuras 4.21 e 4.22 a intensidade dos picos de HA torna-se mais fraca na presença de PU atestando uma diminuição da cristalinidade de HA no biomaterial PVAI-PU/HA com menor quantidade de HA, situação também encontrada por (WANG, 2009). Os três picos mais intensos de HA tiveram pequeno deslocamento no biomaterial PVAI-PU/HA com proporção de 25% de HA, o que significa que depois de reação de formação de PU pode ter havido mudança na natureza da HA pela reação das hidroxilas de sua estrutura.

O biomaterial PVAI-PU/HA apresenta ainda picos sobrepostos em 2θ próximos de 20° (cristalino) e em 2θ próximo de 40° (amorfo) característico de PVAI semicristalino (ZHANG, 2010) confirmando a remanescência do PVAI em análise por FTIR.

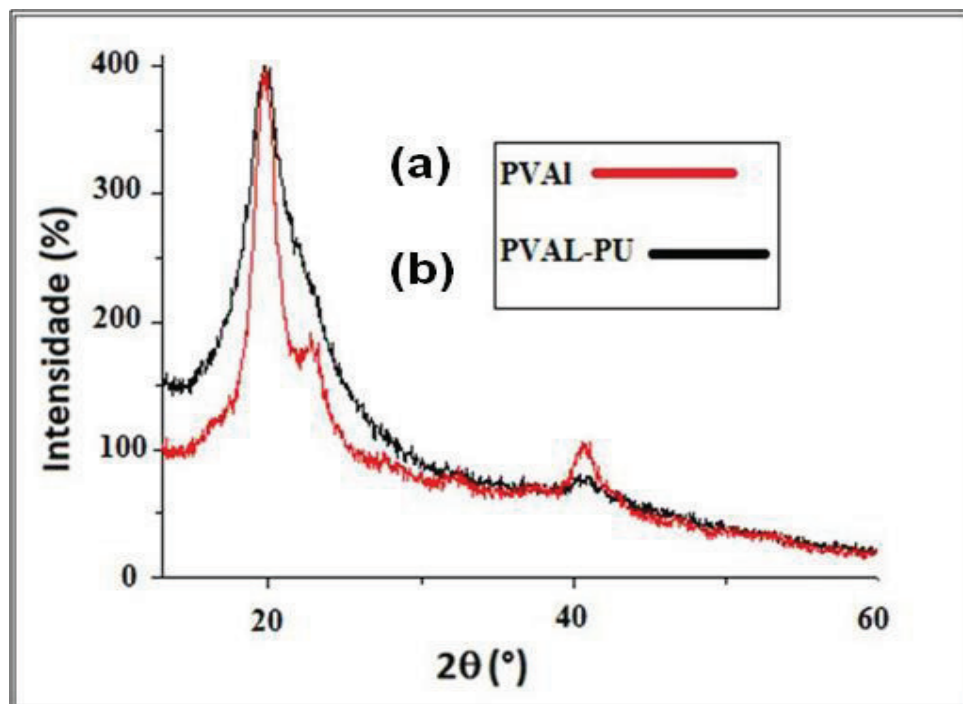


Figura 4.19 - Difratoograma de raios X (a) PVAI e (b) PVAI – PU.

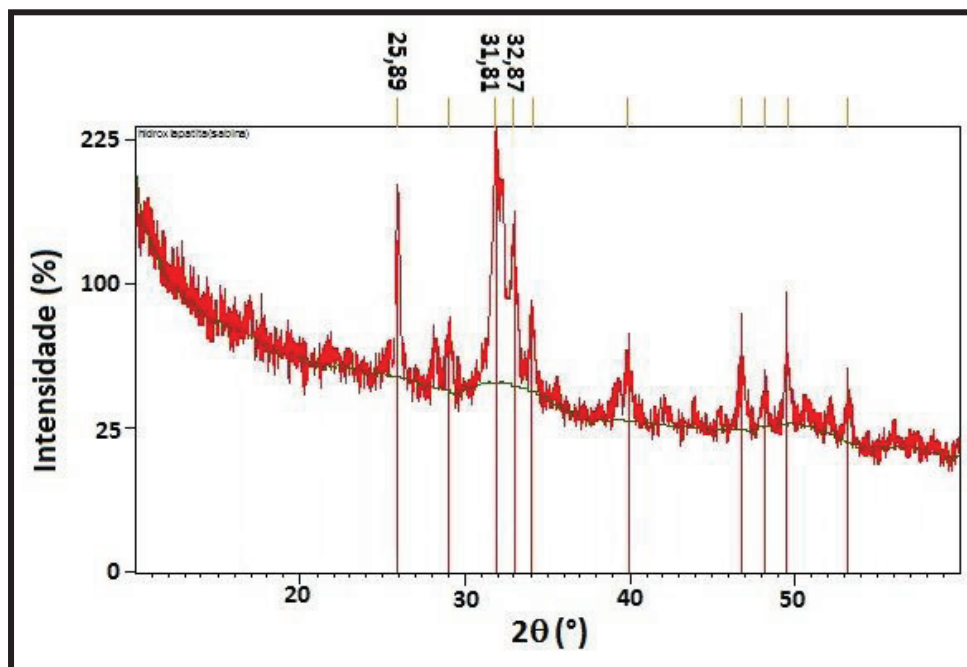


Figura 4.20 – Difratoograma de raios X da hidroxiapatita.

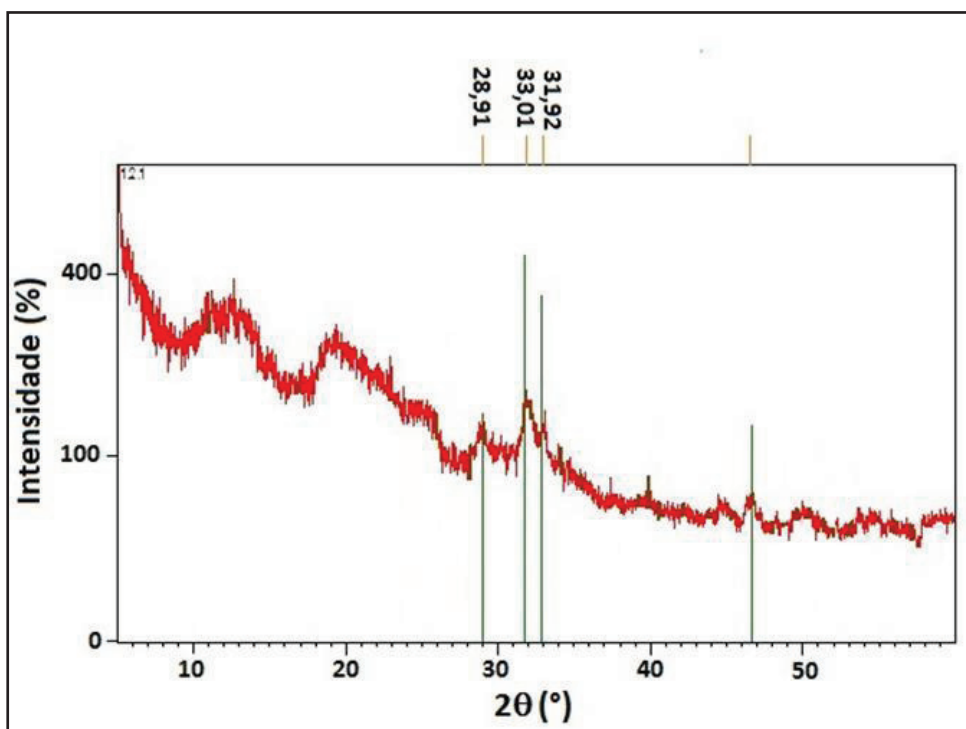


Figura 4.21 – Difratoograma de raios X do biomaterial PVAI-PU/HA com 25% de HA.

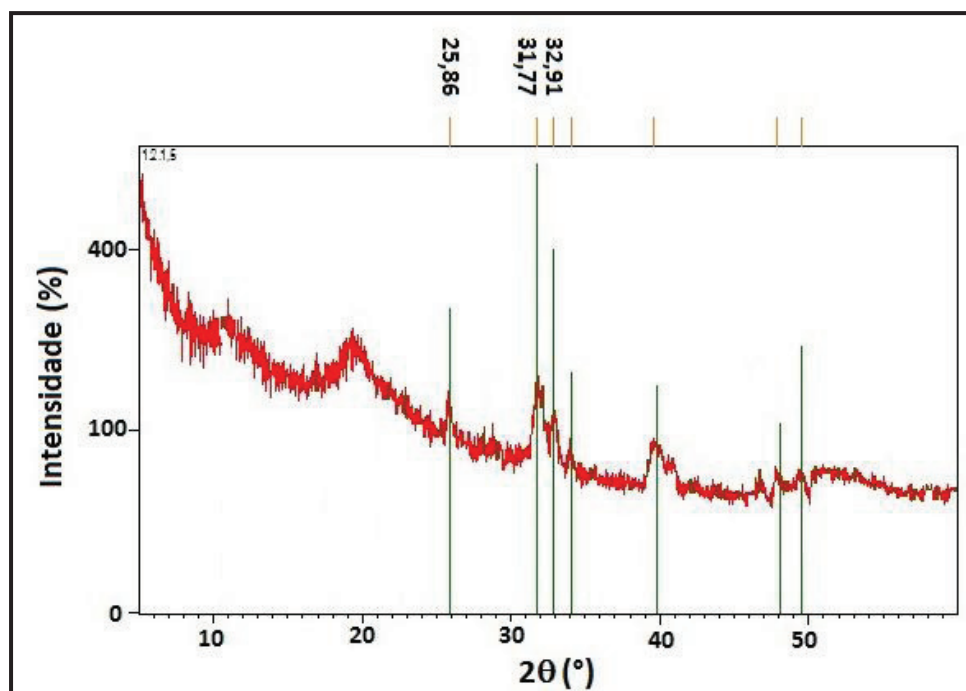


Figura 4.22 – Difratoograma de raios X do biomaterial PVAI-PU/HA com 33% de HA.

Tabela 4.1 – Dados de difração e raios X de HA.

Posição[2 θ]	d [Å]	I/I ₀
25,8978	3,44042	63,99
29,0109	3,07793	14,36
31,8121	2,81302	100,00
32,9744	2,71647	50,76
34,0868	2,63032	22,96
39,8717	2,26102	15,22
46,8078	1,94088	15,10
48,1397	1,89025	6,71
49,5324	1,84031	15,33
53,2613	1,71851	8,43

Tabela 4.2 – Dados de difração e raios X do biomaterial com 25% de HA.

Posição [2 θ]	d [Å]	I/I ₀
28,9105	3,08840	44,26
31,9201	2,80374	100,00
33,0122	2,71345	64,35
46,5690	1,94866	23,38

Tabela 4.3– Dados de difração e raios X do biomaterial com 33% de HA.

Posição [2 θ]	d [Å]	I/I ₀
25,8601	3,44536	44,68
31,7752	2,81620	100,00
32,9183	2,72097	55,36
34,0300	2,63458	18,62
39,5809	2,27696	36,58
47,8983	1,89921	17,25
49,4957	1,84007	11,45

4.5 ENSAIOS DE ABSORÇÃO DE ÁGUA

Os valores de absorção de água encontrados nesta pesquisa 6,3% e 2,2% foram inversamente proporcionais às quantidades de hidroxiapatita, o que mostra que a natureza hidrofílica do biomaterial foi maior com menor proporção de HA.

Segundo Kannan, (KANNAN, 2010) a absorção de água depende principalmente da natureza hidrofílica do material.

4.6 DENSIDADE

Os valores para densidade aparente do biomaterial foram de $\rho=1,3 \text{ g/cm}^3$ e $\rho=1,1 \text{ g/cm}^3$ que são diretamente proporcionais às quantidades de hidroxiapatita contida no biomaterial.

4.7 POROSIDADE

Os valores de porosidade foram $p=21,5\%$ para o material com maior quantidade de hidroxiapatita e $38,2\%$ para o biomaterial com menor proporção de hidroxiapatita.

Os resultados de absorção de água, densidade e porosidade que estão apresentados na Tabela 4.4 justificam a escolha do biomaterial com menor proporção de hidroxiapatita para os ensaios biológicos, devido apresentar maior porosidade, maior absorção de água e menor densidade adequadas para um biomaterial.

Tabela 4.4 - Valores de absorção de água, densidade aparente e porosidade do biomaterial.

Propriedade	Com 25% de HA	Com 33% de HA
Absorção de água	6,3%	2,2%
Densidade	1,1 g/cm ³	1,3 g/cm ³
Porosidade (teste em etanol)	38,2%	21,5%

4.8 ENSAIO MECÂNICO DE COMPRESSÃO

Na Figura 4.23 são apresentadas as imagens dos corpos de prova do biomaterial ensaiados sob compressão, onde é possível observar que os mesmos não romperam com a interrupção do ensaio a 40% da deformação em relação a altura.



Figura 4.23 - Corpos de prova ensaiados sob compressão.

A Figura 4.24 mostra os valores de cada resistência média e desvio padrão da blenda PVAI-PU e dos bionanocompósitos com 25% e 33% de HA sob compressão. Esses valores são resultantes dos ensaios dos bionanocompósito até a deformação de até 40% do comprimento total do corpo de prova. Pode ser visto que o resultado com conteúdo de 33% de HA no compósito com matriz PU torna a resistência à compressão mais elevada como observado por WANG (2009).

Apesar do resultado mais elevado com maior proporção da hidroxiapatita, o material selecionado para ensaios biológicos foi o que contém menor proporção de hidroxiapatita, por considerarem-se outras propriedades importantes para um biomaterial como, porosidade, densidade e absorção que foram mais adequadas no bionanocompósito com menor proporção de HA.

Alguns valores de resistência média à compressão em materiais com PU e/ou HA encontrados na literatura como os de (WANG, 2009; LIU, 2009; LIU, 2010), são menores que os encontrados nesta pesquisa.

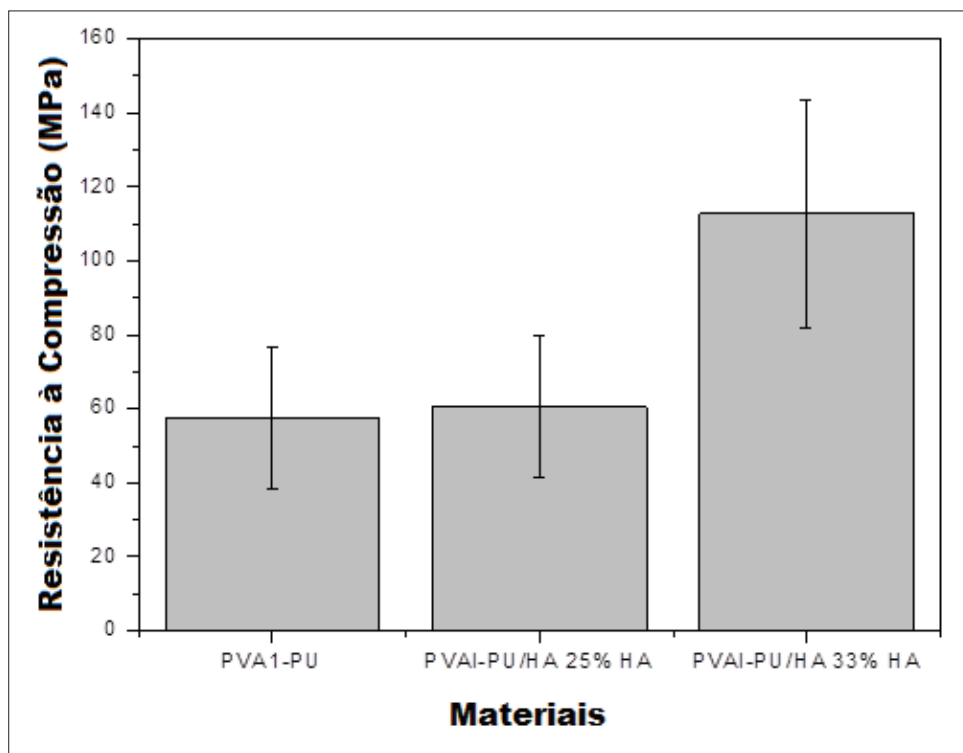


Figura 4.24 - Resistência média à compressão da blenda PVAI-PU e dos bionanocompósitos PVAI-PU/HA com 25% e 33% de HA.

4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os materiais de partida utilizados para obtenção do bionanocompósito observados em MEV são mostrados pelas figuras como se descreve a seguir. A Figura 4.25 mostra imagens de micropartículas do PVAI observadas em MEV e a Figura 4.26 mostra nanopartículas de HA de forma aglomerada também observadas em MEV.

A Figura 4.27 mostra imagem da superfície de PVAI-PU onde se observa principalmente o PU formado e não sendo perceptíveis as partículas de PVAI.

A Figura 4.28 mostra imagens da superfície da base *scaffold* PVAI-PU/HA com 25% de HA.

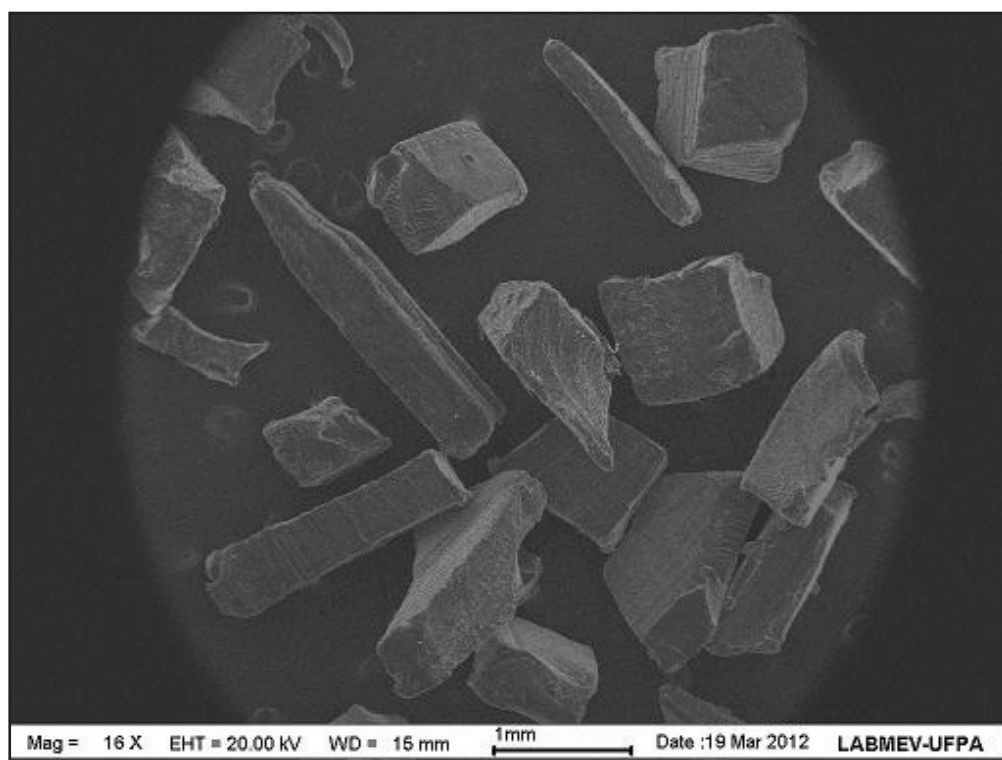


Figura 4.25 - Imagens de micropartículas do PVAI observadas em MEV.

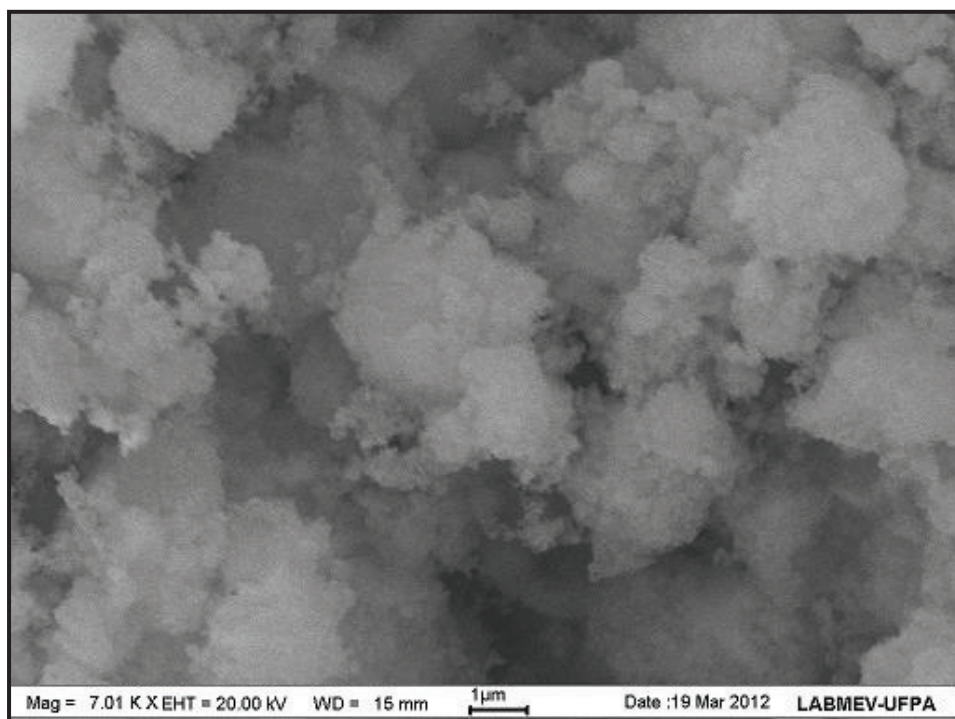


Figura 4.26 Alomerados de nanopartículas de HA observados por MEV.

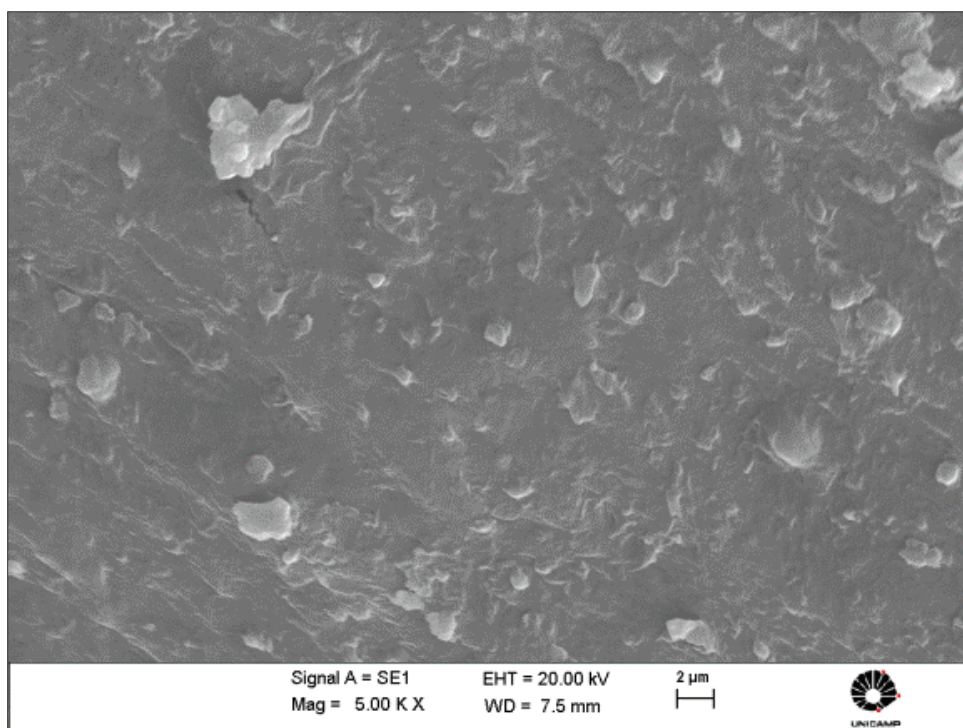
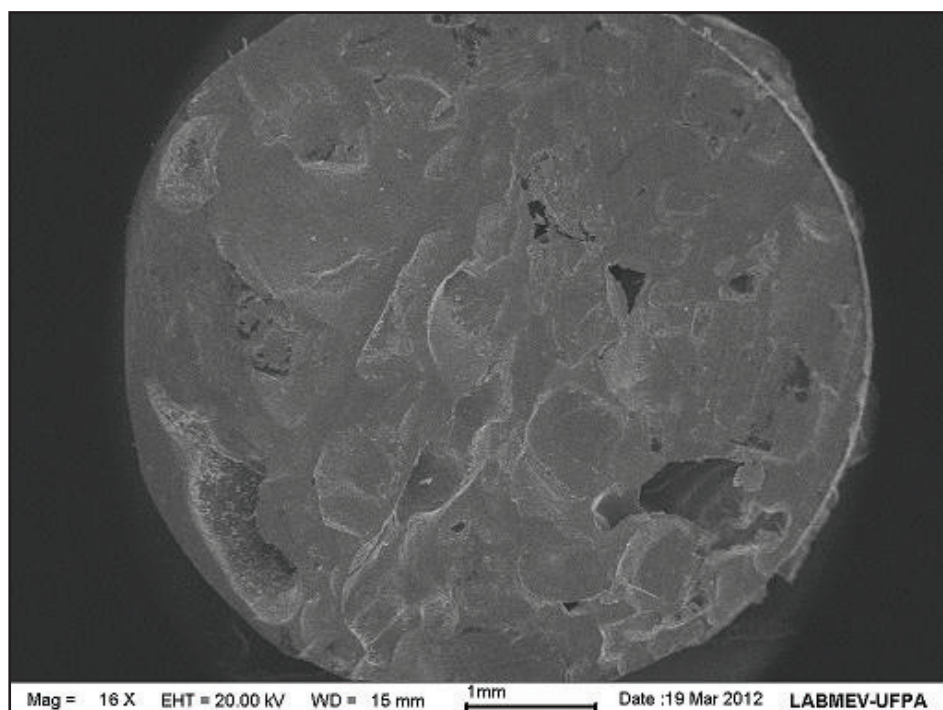
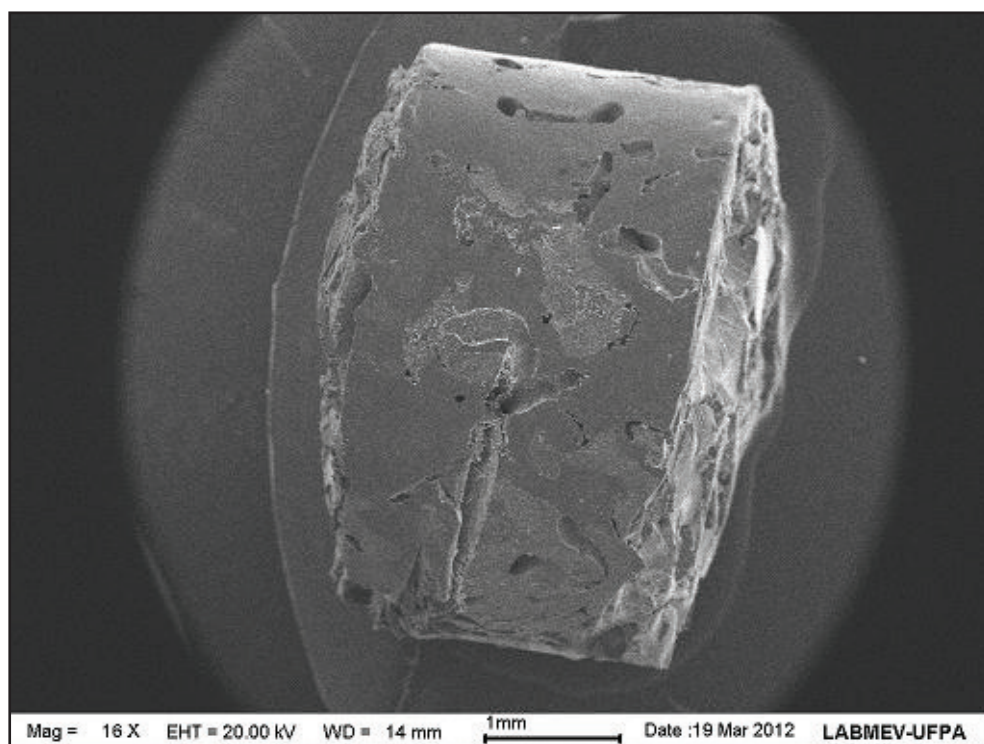


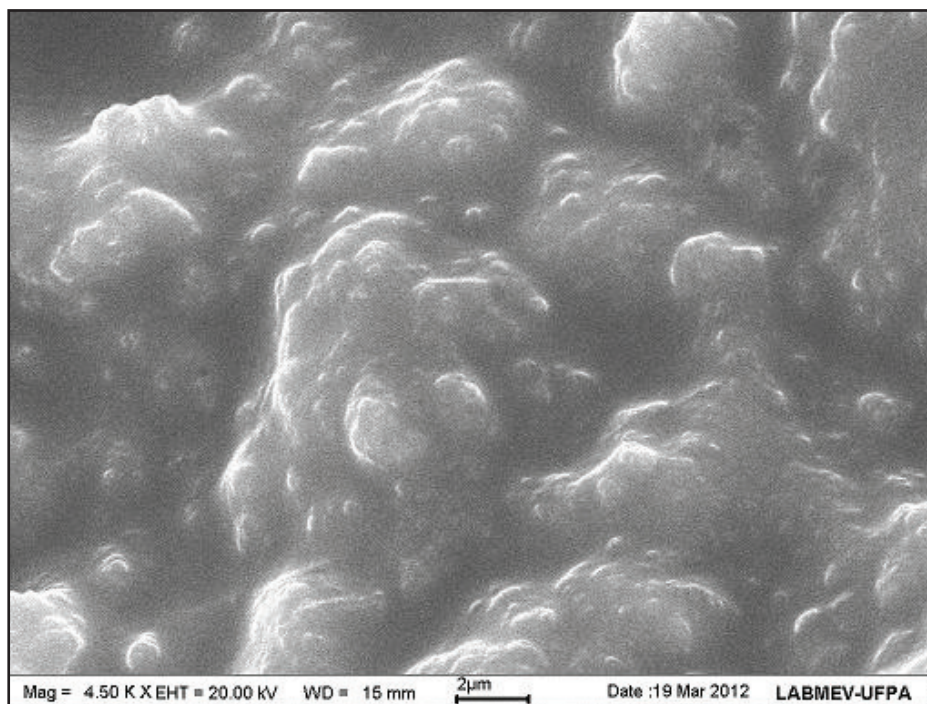
Figura 4.27 - Imagem da superfície da blenda PVAI-PU observada por MEV.



A Figura 4.28 Imagem da superfície da base do *scaffold* PVAI-PU/HA com 25% de HA.



A Figura 4.29 Imagem da superfície lateral do *scaffold* PVAI-PU/HA com 25% de HA da observada em MEV.



A Figura 4.30 Imagem da fase PU/HA do *scaffold* PVAI-PU/HA com 25% de HA observada em MEV.

A Figura 4.31 mostra imagem da superfície interna do *scaffold* conforme foi usado nos ensaios biológicos, onde são observadas micropartículas de PVAI no domínio do bionanocompósito, fase de poliuretano e hidroxiapatita, poros e microporos distribuídos e com tamanhos variados, os quais possuem arquitetura adequada para *scaffold* com aplicação em engenharia tecidual.

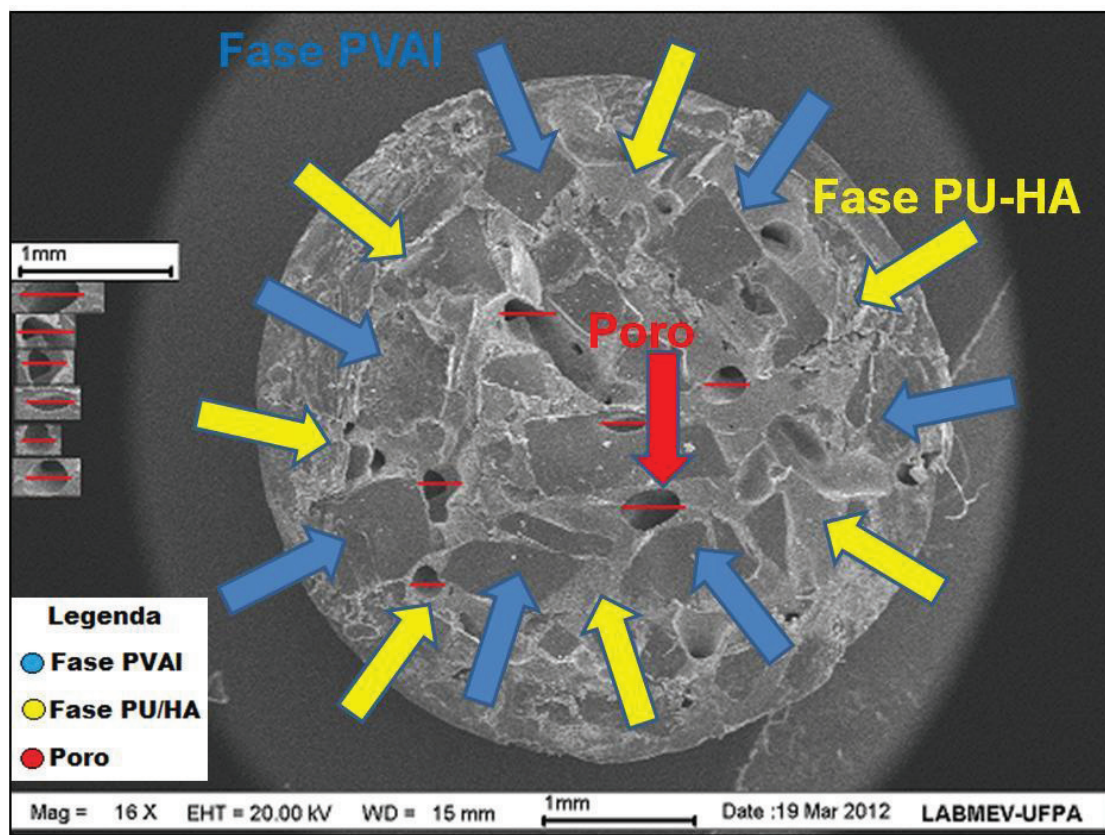


Figura 4.31 - Superfície interna do biomaterial com 25% de HA, observada por MEV.

As microestruturas de superfícies de fratura sob compressão de PVAI-PU/HA mostradas na Figura 4.32 revela a distribuição de poros ao longo do *scaffold*, a Figura 4.33 mostra a interconexão de poros, as Figuras 4.34 e 4.35 mostram imagens das fases poliuretano e hidroxiapatita do bionanocompósito PVAI-PU/HA e a Figura 4.36 mostra imagens de microporos localizados nas paredes dos poros.

O tamanho, a morfologia e a interconexão dos poros determina a capacidade dos *scaffolds* para a difusão de nutrientes, a distribuição do produto no metabolismo, ligação de células, crescimento interno de tecido e angiogênese (ASEFNEJAD, 2011).

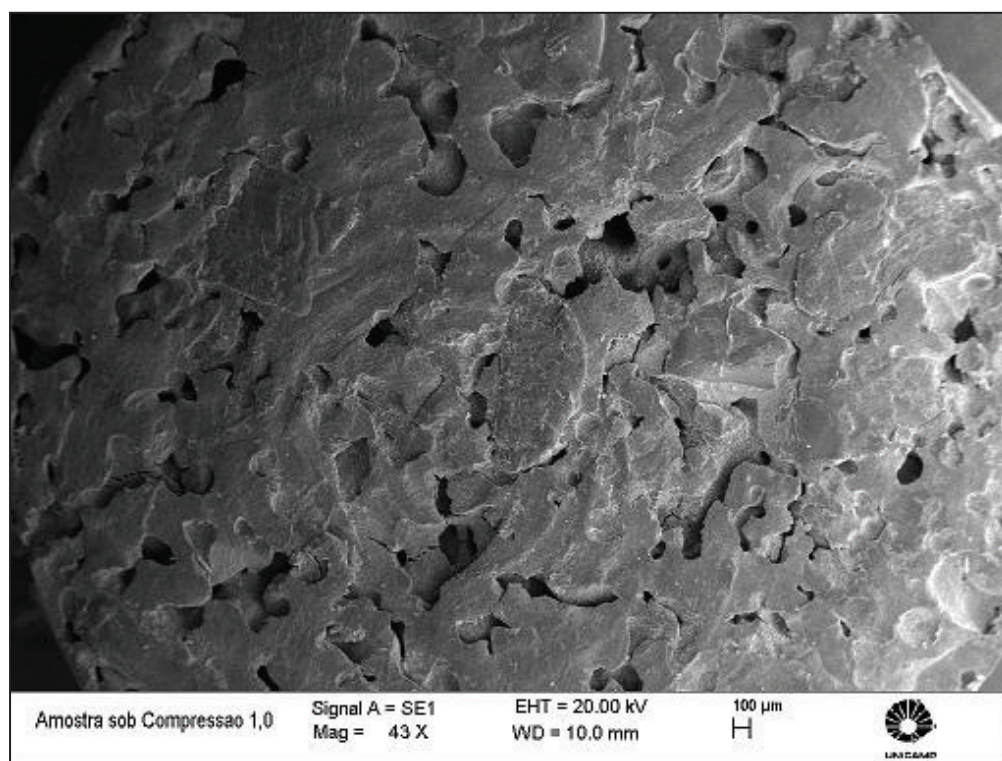


Figura 4.32 Distribuição de poros no *scaffold* PVAI-PU/HA observada em MEV.

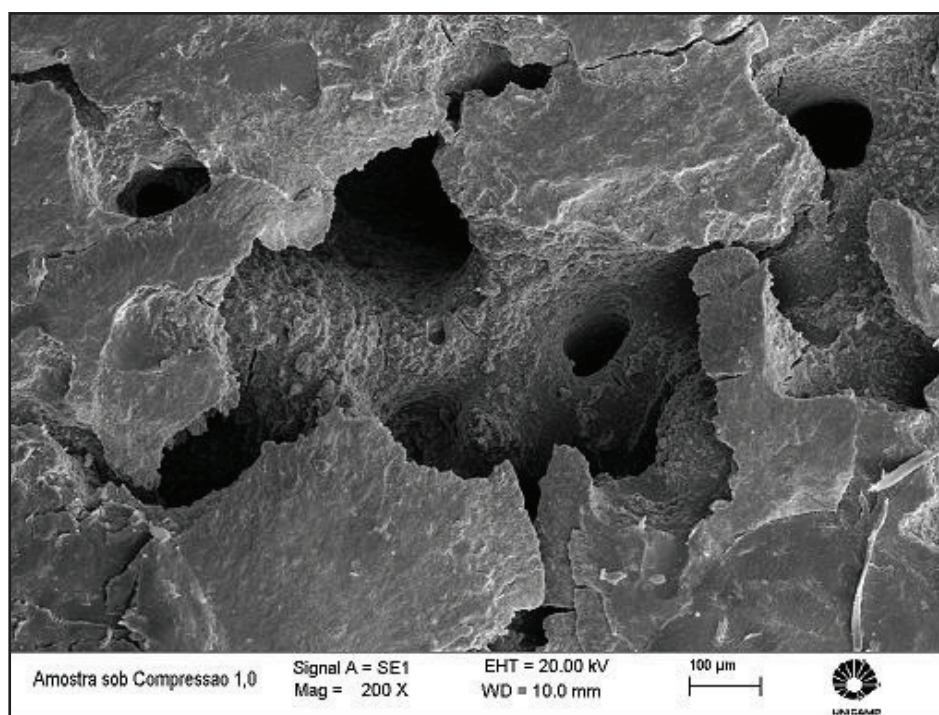


Figura 4.33 - Interconexão de poros do *scaffold* observada em MEV.

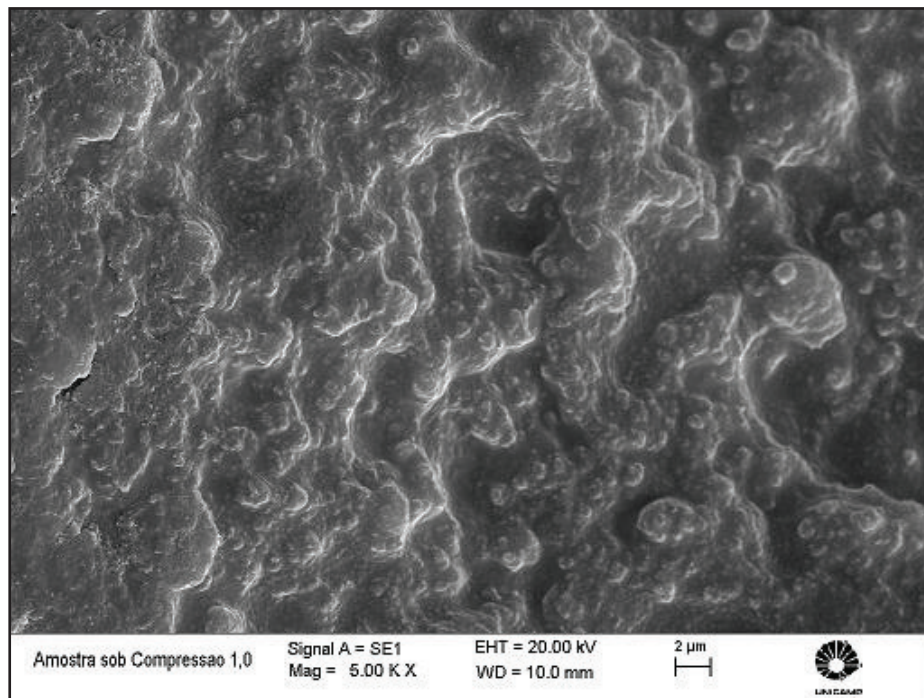


Figura 4.34 - Fase PU/HA do bionanocompósito PVAI-PU/HA observada em MEV.

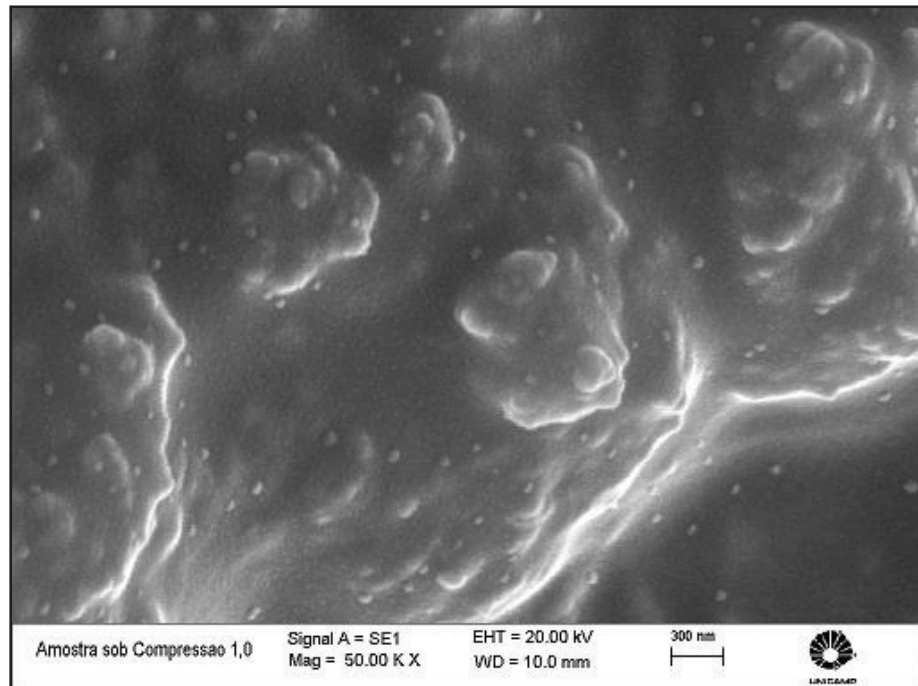


Figura 4.35- Fase PU/HA do bionanocompósito PVAI-PU/HA observada em MEV.

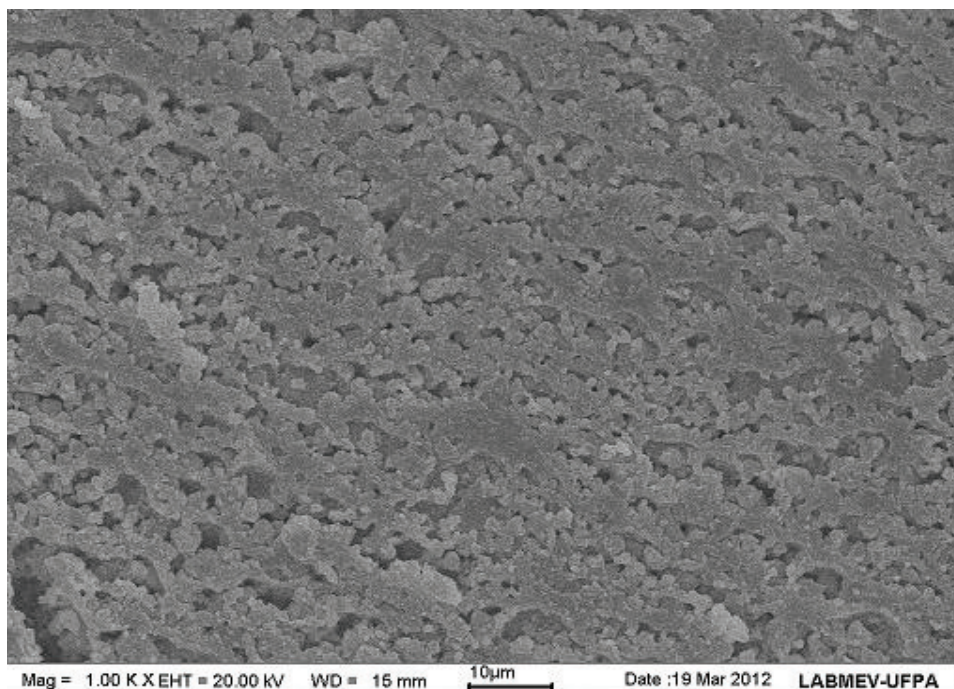


Figura 4.36 - Paredes dos poros com formação de microporos do bionanocompósito com 33% de HA.

As Figuras a seguir mostram imagens do bionanocompósito com 33% de hidroxiapatita, com superfícies fraturadas sob compressão. Observa-se imagem com porosidade mais fechada Figura 4.37 e material trincado pelo efeito do ensaio Figura 4.38. O aumento do conteúdo de hidroxiapatita diminuiu a porosidade e o tamanho dos poros. A porosidade mais fechada é formada nas amostras contendo maior teor de HA (ASEFNEJAD, 2011). As Figura 4.39 e 4.40 mostram uma distribuição uniformemente dispersa de nanopartículas de HA que é devido a propriedade dispersante do PVAI em materiais nanoestruturados (ZHANG, 2010).

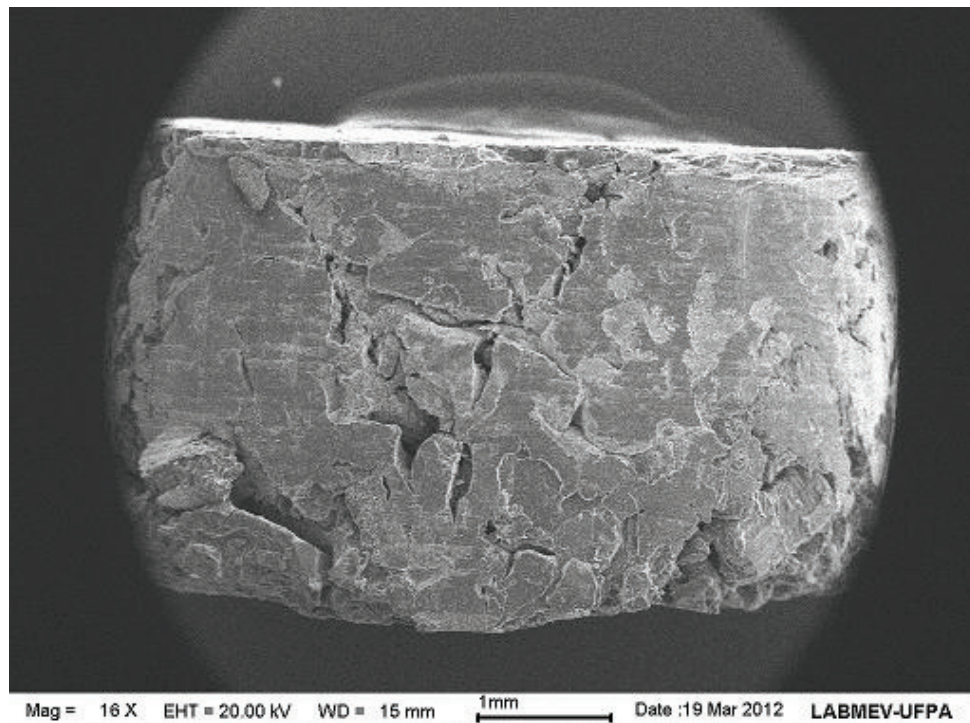


Figura 4.37 - Bionanocompósito PVAI-PU/HA com porosidade mais fechada, observado em MEV.

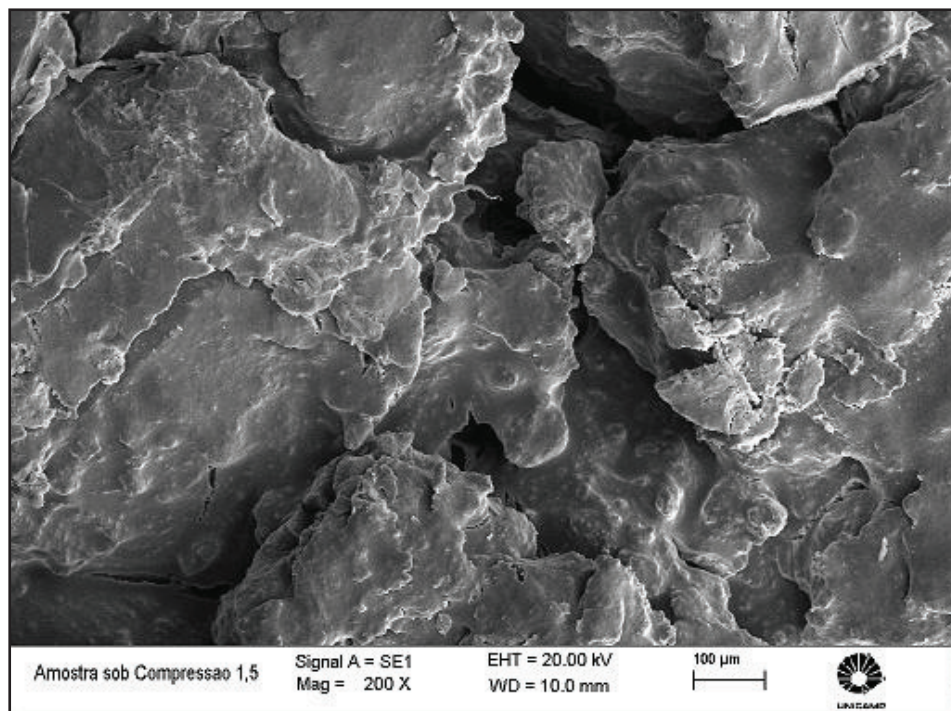


Figura 4.38 - Bionanocompósito trincado pelo efeito do ensaio de compressão, observado em MEV.

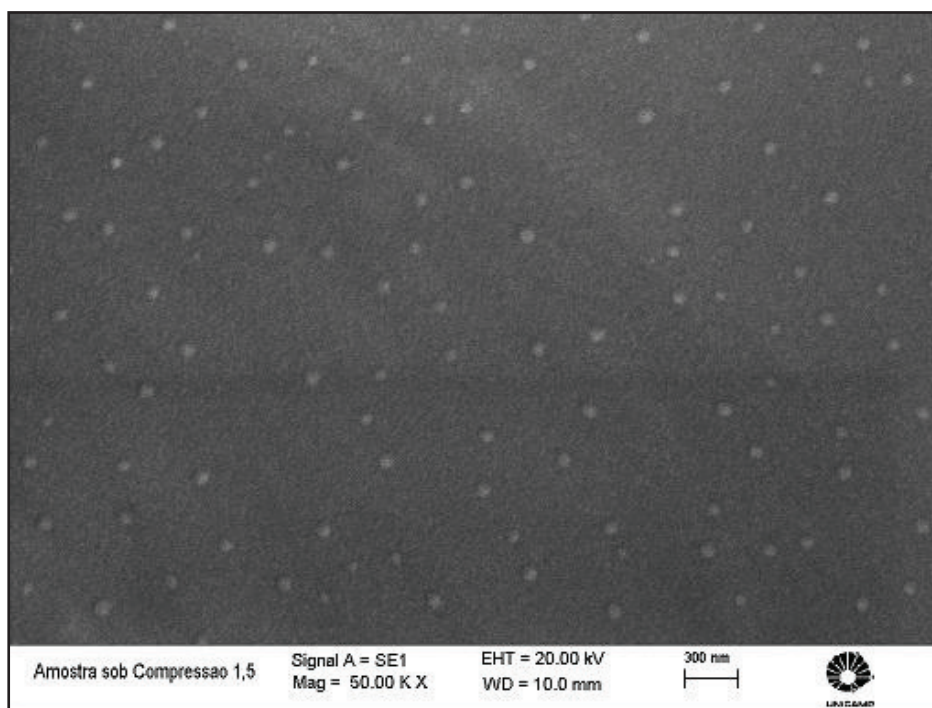
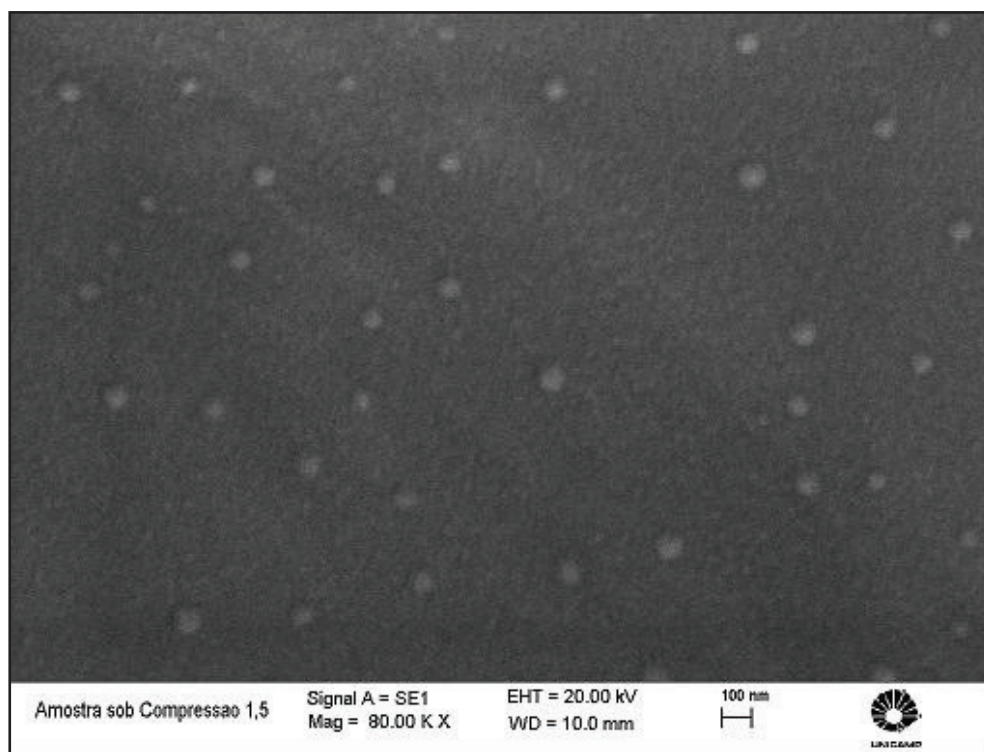


Figura 4.39 - Imagem de nanopartículas de HA observadas em MEV 50.000X.



As Figura 4.40 - Imagem de nanopartículas de HA observadas em MEV 80.000X.

4.10 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA POR ENERGIA DISPERSIVA (EDS).

As imagens do PVAI mostram além de seus constituintes químicos uma pequena quantidade de sódio que pode ser atribuída ao sal orgânico que resulta da reação de poli(acetato de vinila) com a base NaOH para obtenção do poli(álcool vinílico), Tabela 4.5 e Figura 4.41

Tabela 4.5 – Concentração dos elementos obtidos por EDS para o PVAI.

Espectro 1		Espectro 2	
Elemento	Concentração	Elemento	Concentração
C	65,21	C	64,669
O	33,431	O	34,027
Na	1,359	Na	1,305
Espectro 3		Espectro 4	
Elemento	Concentração	Elemento	Concentração
C	64,571	C	63,997
O	34,13	O	34,557
Na	1,299	Na	1,447

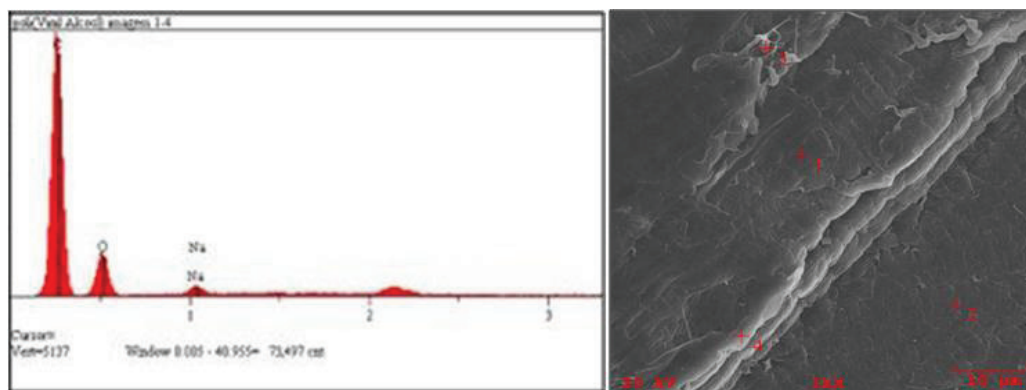


Figura 4.41 - Espectros de micropartículas de PVAI analisados por EDS.

Em todos os pontos determinados para análise por EDS no material em forma de pó de hidroxiapatita verificou-se que o material possui somente seus constituintes químicos e não foi encontrado nenhum material de contaminação. No entanto observa-se nos espectros que a razão Ca/P nos quatro pontos do material HA teve uma variação de 2.0 a 2.3, superior à razão original que é de 1,67 para a hidroxiapatita óssea, como citado por (ASEFNEJAD, 2011; MARTINEZ-VALENCIA, 2011; ZHANG, 2010; DU, 2009; GECER, 2009; SPRIO, 2009; SUNDARAM, 2008; TAKASHIMA, 2008; FIDANCEVSKA, 2007) em suas pesquisas. Com base neste contexto pode-se dizer que a mistura da fase apatita desta pesquisa possui um excesso de cálcio na sua constituição. A Tabela 4.6 mostra a concentração dos elementos registrados em análise por EDS. e a Figura 4.42 mostra espectros do pó de HA analisados por EDS à esquerda e determinação de pontos no material HA à direita.

Tabela 4.6 – Concentração dos elementos por EDS para o pó de hidroxiapatita.

Espectro 1		Espectro 2	
Elemento	Concentração	Elemento	Concentração
O	24,444	O	29,384
P	22,57	P	21,836
Ca	52,987	Ca	48,78
Espectro 3		Espectro 4	
Elemento	Concentração	Elemento	Concentração
O	18,603	O	43,193
P	22,865	P	19,036
Ca	58,532	Ca	37,771

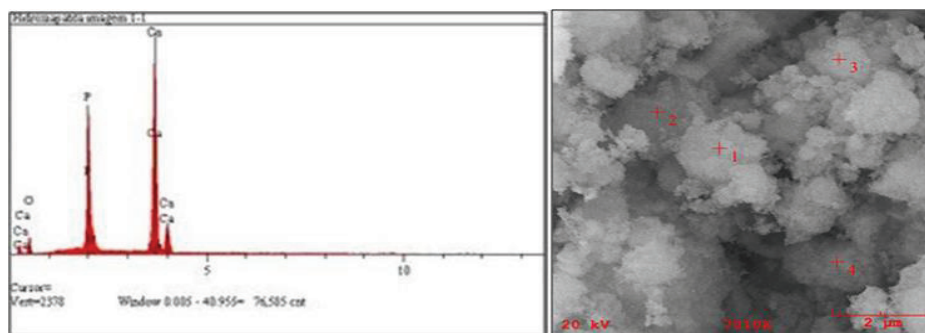


Figura 4.42 - Espectros do pó de HA analisados por EDS.

As imagens do biomaterial PVAI-PU/HA, Figura 4.43, mostra espectros do bionanocompósito analisados por EDS à esquerda e determinação de pontos no material PVAI-PU/HA à direita atestando que a estrutura contém os elementos constituintes dos materiais de partida e a relação Ca/P teve uma variação de 2,3 a 3,1. A distribuição uniforme desses materiais irá influenciar ativamente no equilíbrio iônico entre o fluido biológico e o biomaterial. A Tabela 4.7 apresenta a concentração dos elementos que compõem o bionanocompósito analisados por EDS.

Tabela 4.7 – Concentração dos elementos obtidos por EDS para o biomaterial PVAI-PU/HA.

Espectro 1		Espectro 2	
Elemento	Concentração	Elemento	Concentração
C	31,432	C	40,129
O	24,927	O	31,814
P	12,767	P	9,487
Ca	30,873	Ca	18,57
Espectro 3		Espectro 4	
Elemento	Concentração	Elemento	Concentração
C	24,428	C	22,071
O	21,738	O	12,868
P	13,019	P	17,877
Ca	40,815	Ca	47,184

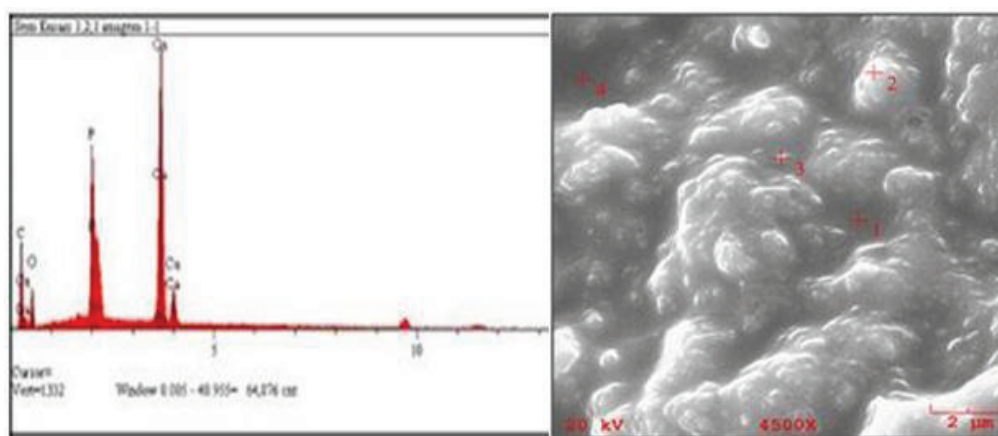


Figura 4.43 - Espectros do bionanocompósito analisados por EDS.

4.11 ESPECTROFOTOMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X (XRF)

Os resultados do ensaio de fluorescência mostram que a relação Ca/P da hidroxiapatita é maior que o valor original, isto confirma o excesso de cálcio na estrutura da hidroxiapatita do biomaterial. Os valores das quantidades são mostrados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Composição média do bioamaterial por fluorescência de raios X.

Composição	Composição Medida	Spectrum	Intensidade (kcps)	Resultados (wt%)	Normalização (wt%)
C	C	C – KA	0.3937	54.16	41.96
O	O	O – KA	0.0409	32.95	25.52
Ca	Ca	Ca – KA	12.7257	9.43	7.30
P	P	P – KA	5.4617	3.44	2.67

4.12 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL SIMULTÂNEA (TG-DSC)

As curvas TG-DSC apresentadas nas Figuras 4.44 e 4.45 fornecem informações sobre a estabilidade térmica dos biomateriais com 25% e 33% de HA, respectivamente.

O primeiro pico endotérmico próximo de 225°C é referente a temperatura de fusão do biomaterial. O segundo pico endotérmico é devido à combustão de material orgânico quando acontece a perda de massa do material. E o terceiro pico corresponde à reação da hidroxiapatita no biomaterial.

Mudanças significativas de início de perda de massa não foram observadas entre as curvas, já que ambas iniciam em aproximadamente 250°C. Esta perda é consequência da decomposição dos biomateriais. Entretanto, observa-se uma perda de 25% para a composição com 25% de HA e de 17% para a composição com 33% de HA. Desta forma é possível afirmar que com o aumento da quantidade de HA, ocorre, ainda que pequeno, um aumento da estabilidade térmica do material.

A partir de aproximadamente 300°C um decaimento intenso ocorre e isto pode estar relacionado com a quebra de segmentos rígidos do biomaterial, produzindo radical livre que atacam os segmentos macios do biomaterial, resultando em processo de quebra de cadeia (LEE A, H.-F. AND YU, H. H., 2011).

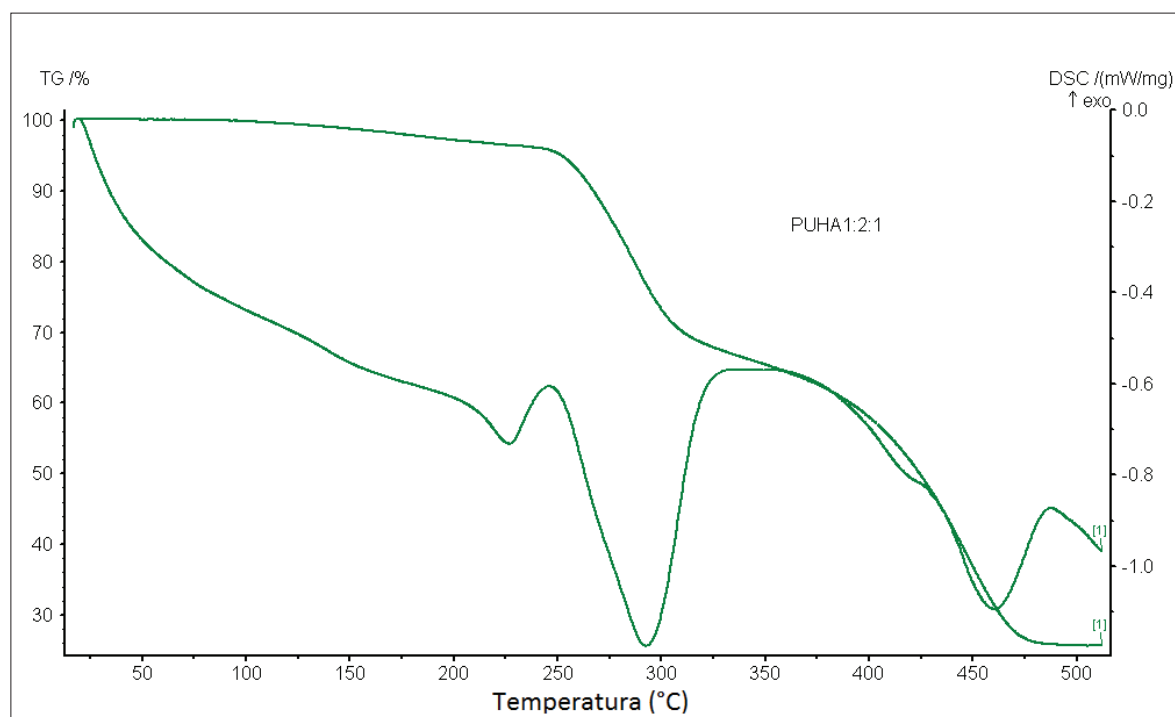


Figura 4.44 – Curva TG-DSC do biomaterial com 25% de HA.

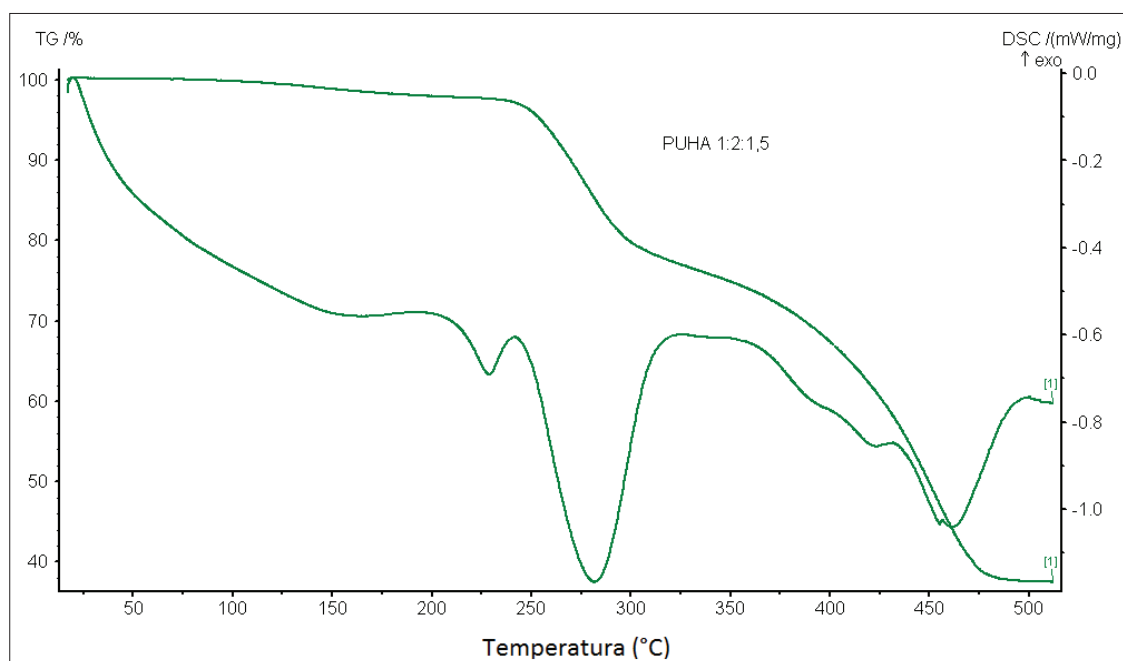


Figura 4.45 – Curva TG-DSC do biomaterial com 33% de HA.

4.13 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

BIOSÍNTESES/IPEN

Nos testes realizados no IPEN através dos controles positivo e negativo pode-se verificar que tanto os componentes poli(álcool vinílico) que em reação com o diisocianato formou o poliuretano e hidroxiapatita como os compósitos obtidos pela mistura não apresentaram toxicidade conforme mostra a Figura 4.46. Projetando-se a média da porcentagem de sobrevivência das células em função da concentração de extrato (%), obtêm-se uma curva que fornece o índice de citotoxicidade $(IC)_{50\%}$ de acordo com (DAGUANO, 2007) e os dados produzidos no IPEN.

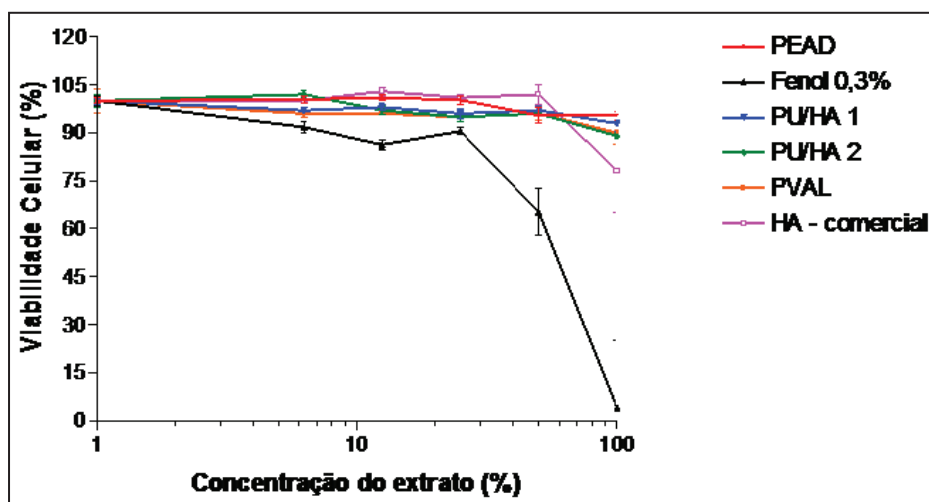


Figura 4.46 - Curvas de viabilidade celular dos testes citotoxicidade.

Instituto Evandro Chagas/ Lab. de Neuroinflamação - UFPA

Os resultados dos testes realizados no IEC/ Lab. de Neuroinflamação - UFPA pelo método de MTT demonstram que as células NIH3T3 - fibroblastos de murinos, cultivadas sobre o biomaterial são viáveis já que as células plaqueadas em presença do reagente formaram formazam, que pode ser visualizado devido a coloração azul turquesa observada nas imagens. Observou-se também que a utilização de proteína de adesão é de grande necessidade para a adesão celular. Utilizaram-se também diferentes concentrações de células sobre o biomaterial, mas independente da concentração a adesão foi eficiente. Corroborando com (DEIMLING, 2012), Figuras 4.47 (a) e 4.47(b).

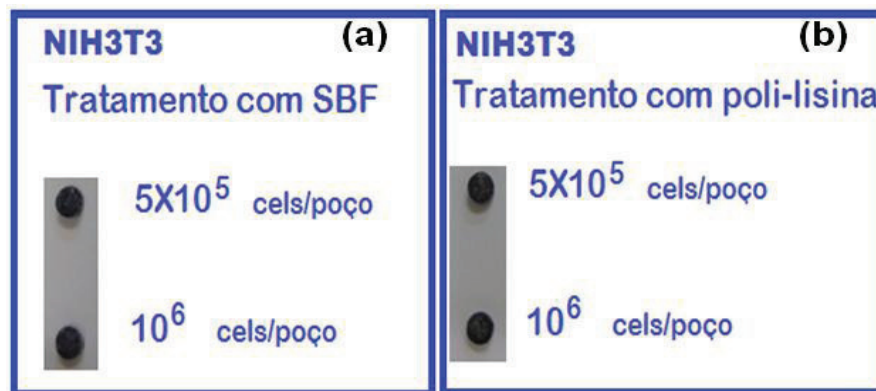


Figura 4.47 – Imagem de células NIH3T3 embebidas em soro fetal bovino (a) e poli-lisina (b), aderidas ao biomaterial.

Os dois tratamentos tanto com SBF como com poli-lisina mostraram aderência celular. Não houve diferença nos resultados que são similares aos de Wang (WANG, 2009), onde foi observado que um biomaterial formado por uma mistura de poliuretano e hidroxiapatita também apresentou citocompatibilidade a MG63, uma linhagem de osteocarcinoma. Ou seja, os poros do biomaterial apresentam uma excelente estrutura tridimensional para a migração de fibroblastos.

A Tabela 4.9 e a Figura 4.48 apresentam os valores obtidos dos controles positivo e negativo de PU-HA e o gráfico comparativo de viabilidade celular MTT, respectivamente.

Tabela 4.9 - Comparação entre os controles positivo e negativo de PVAI-PU/HA.

	CPT	CNT	PVAI-PU/HA
	0,122	0,345	0,47
	0,366	0,405	0,498
	0,334	0,48	0,596
	0,344	0,571	0,627
	0,342	0,586	0,377
média	0,3016	0,4774	0,5136
devpad	0,101098	0,104083	0,100565

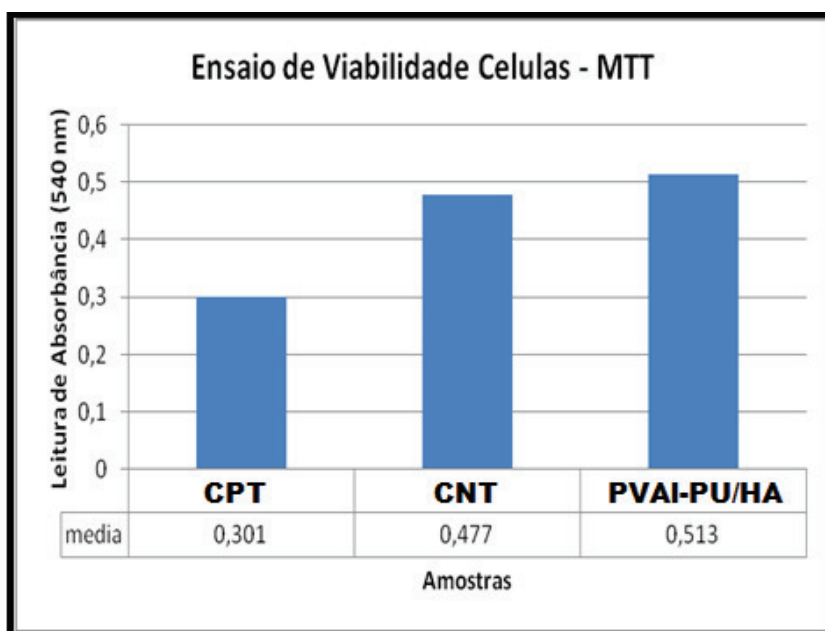


Figura 4.48 - Gráfico da comparação de viabilidade celular.

Os segmentos rígidos apresentados na estrutura química do poliuretano e a osteocondução da hidroxiapatita são fatores importantes nas propriedades morfológicas e mecânicas dos *scaffolds*. As análises *in vitro* mostraram que o biomaterial não é citotóxico, portanto é promissor para uso em enxerto maxilo facial.

4.14 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VIVO*

SOBRAPAR - CAMPINAS

A Figura 4.49 mostra imagens dos procedimentos *in vivo* realizados no SOBRAPAR, onde é possível observar os animais com os dois defeitos na calota craniana, à direita preenchidos com o biomaterial PVA-PU/HA e à esquerda sem preenchimento (controle).

Dos quatro animais, três permaneceram em observação por 30 dias após a cirurgia, quando foram sacrificados para a formação de lâminas para o estudo histológico apenas um animal veio a óbito, fato este que não sugere atribuição ao biomaterial do implante, pois a maioria 75% permaneceu viva até o sacrifício.

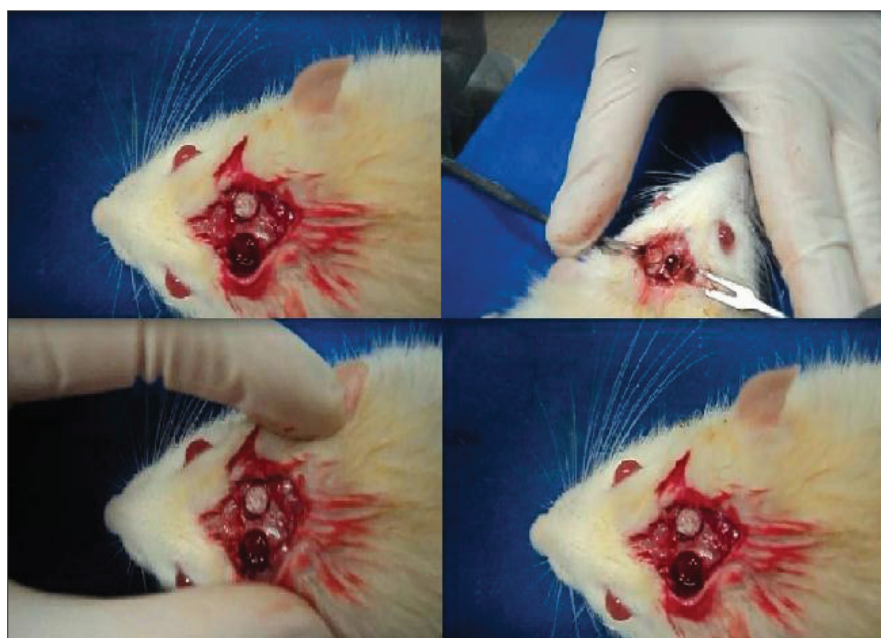


Figura 4.49- Calota craniana do rato com dois defeitos, com implante e controle.

Análise histológica do acontecimento I

Em lâmina do implante, Figura 4.50, observa-se a presença de massas sólidas compactas basófilas, acelulares, espessas, assemelhando-se a tecido ósseo sintético, entremeado por fibrinas, capilares dilatados e congestionados, esparsas células gigantes denominadas de osteoclastos.

Na lâmina do controle, Figura 4.51, observou-se a presença de osteócitos em destaque o tecido lesionado e precisaria de certo tempo para fechar o que não acontece com a lâmina do implante onde é visível o fechamento do tecido com o bionanocompósito confirmando a biointegração e biocompatibilidade entre o bionanocompósito e o osso receptor. Observa-se também algumas fibroses em ambas as lâminas. Os resultados desta pesquisa corroboram com (LASCHKE, 2010) o qual afirma que compósitos de PU representam *scaffolds* promissores para engenharia tecidual, combinando propriedades do material flexível PU com a vantagem de uma superfície osteocondutora.

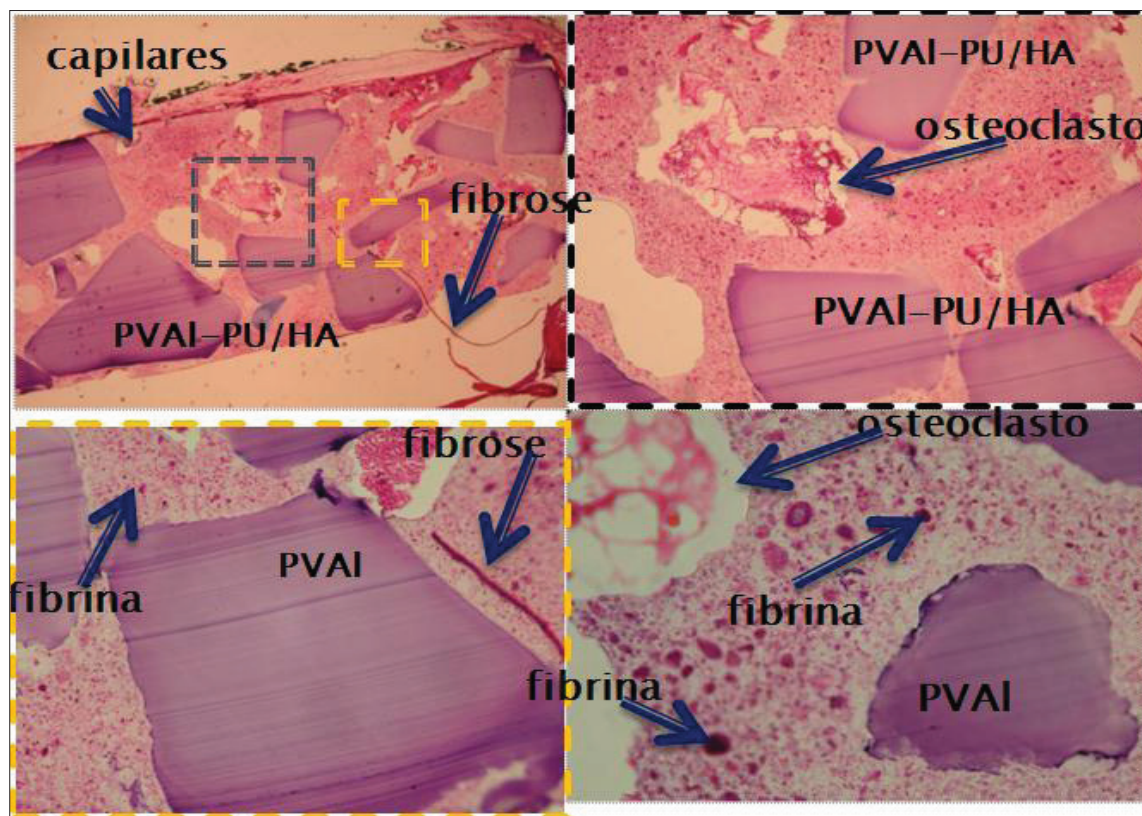


Figura 4.50 – Lâminas após o corte para análise histológica.

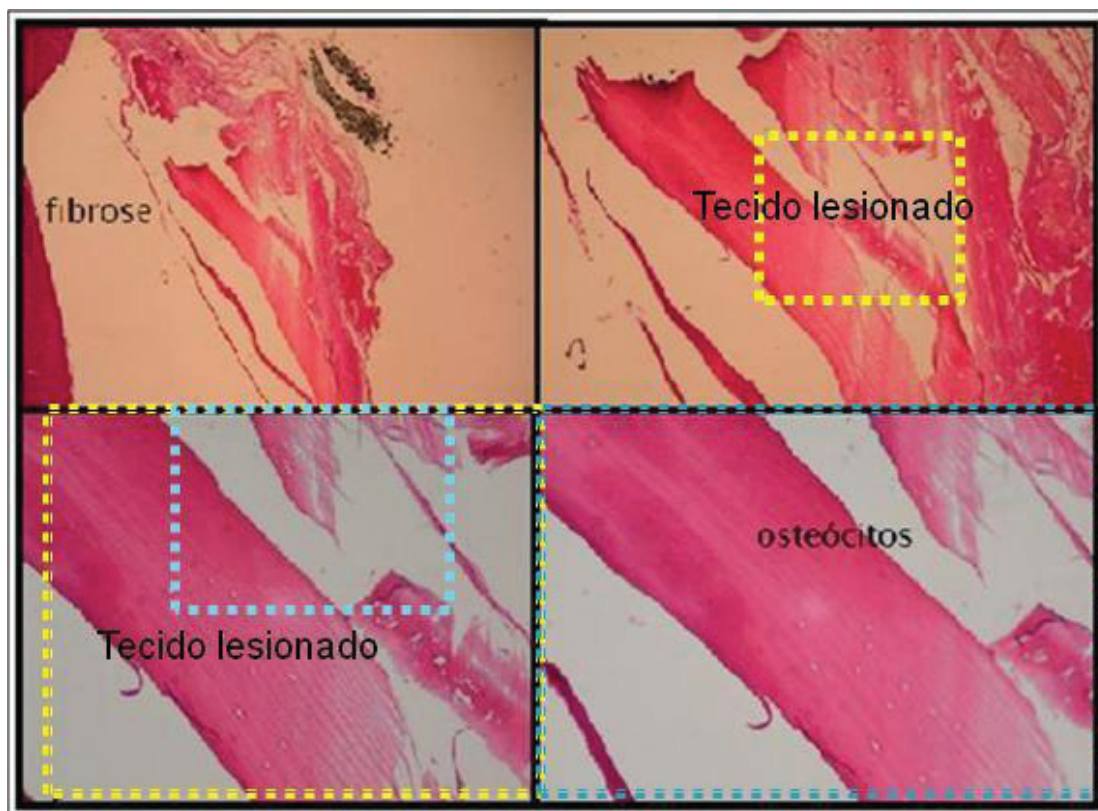


Figura 4.51 - Lâmina do material de controle.

Análise histológica do acontecimento II por microscopia eletrônica de varredura

A Figura 4.52 mostra imagens do biomaterial para o grupo controle. É observado o *scaffold*, isento de qualquer tipo de tecido biológico (a) e imagem de poro com aproximadamente 150 μm de diâmetro, ideal para *scaffold* ósseo (b).

A Figura 4.53 mostra imagens do biomaterial implantado no tecido subcutâneo do dorso do camundongo por 24 horas em microscopia eletrônica de varredura, onde é possível observar a visão geral da interação do biomaterial com as camadas celulares formadas (a), detalhe de células aderidas, provavelmente fibroblasto 24 horas após implantação do biomaterial (b), células sugestivas de fibroblastos na região externa (*) do biomaterial, apresentando espraio e formação de uma camada celular compacta e homogênea (seta).

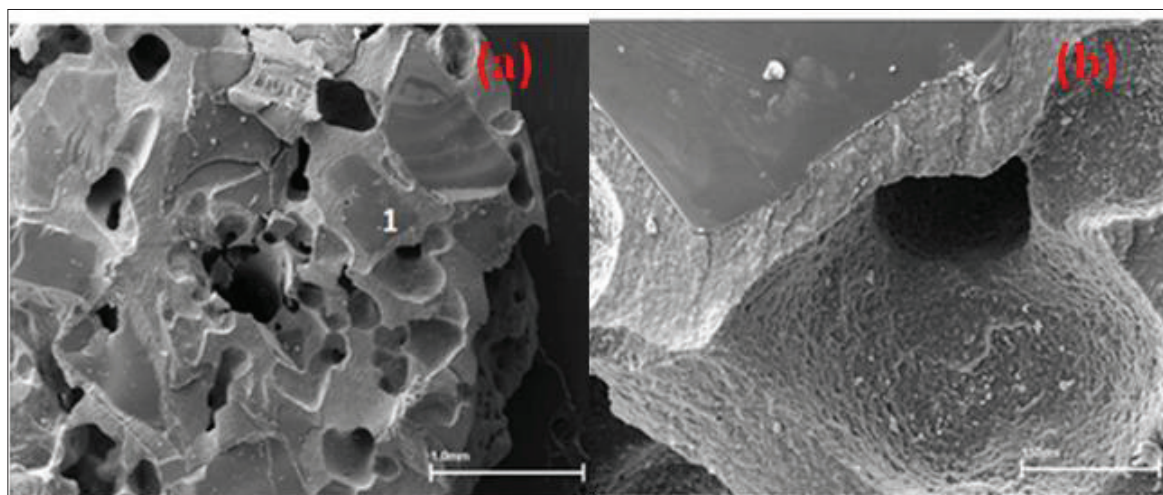


Figura 4.52 - Imagens do biomaterial para o grupo controle *scaffold*, isento de tecido biológico (a) poro com aproximadamente 150 µm de diâmetro (b).

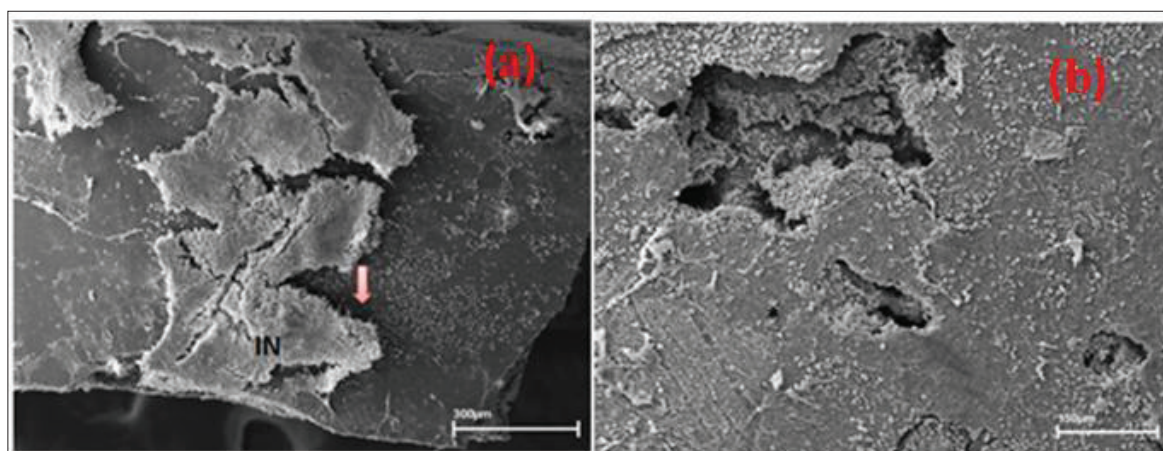


Figura 4.53 - Imagens do biomaterial implantado no tecido subcutâneo do dorso do camundongo por 24 horas. IN: região interna do biomaterial; *região externa do biomaterial camadas celulares formadas (a) detalhe de células aderidas (b).

A Figura 4.54 mostra imagens do biomaterial implantado no tecido subcutâneo do dorso do camundongo por 7 dias em microscopia eletrônica de varredura, onde é possível observar: A- visão geral da interação do biomaterial com as camadas celulares formadas; B- detalhe da região destacada 1-A. Observa-se células sugestivas de fibroblastos na região interna (IN) do biomaterial apresentando extenso espraioamento (seta); C- detalhe da região destacada 2-A. células sugestivas de fibroblastos na região externa (*) do biomaterial, apresentando espraioamento e formação de uma camada celular compacta e homogênea (seta); D- detalhe da região destacada 3-A. Observar prolongamentos sugestivos de fibras colágenas.

Na Figura 4.55 observa-se imagem do biomaterial implantado no tecido subcutâneo do dorso do camundongo por 14 dias, obtida por microscopia eletrônica de varredura. A- visão geral da interação do biomaterial (BM) com as camadas do tecido subcutâneo; B- detalhe da região destacada em A. Observa-se o contato íntimo da camada fibrosa celular formada em torno do biomaterial (seta) e os prolongamentos do material fibroso que compõe a camada; C- visão geral da interação do biomaterial com as camadas da pele. Observa-se a formação da camada fibrosa em torno de todo o biomaterial; D- detalhe da região destacada em C. Observa-se o processo de invasão das células no biomaterial.

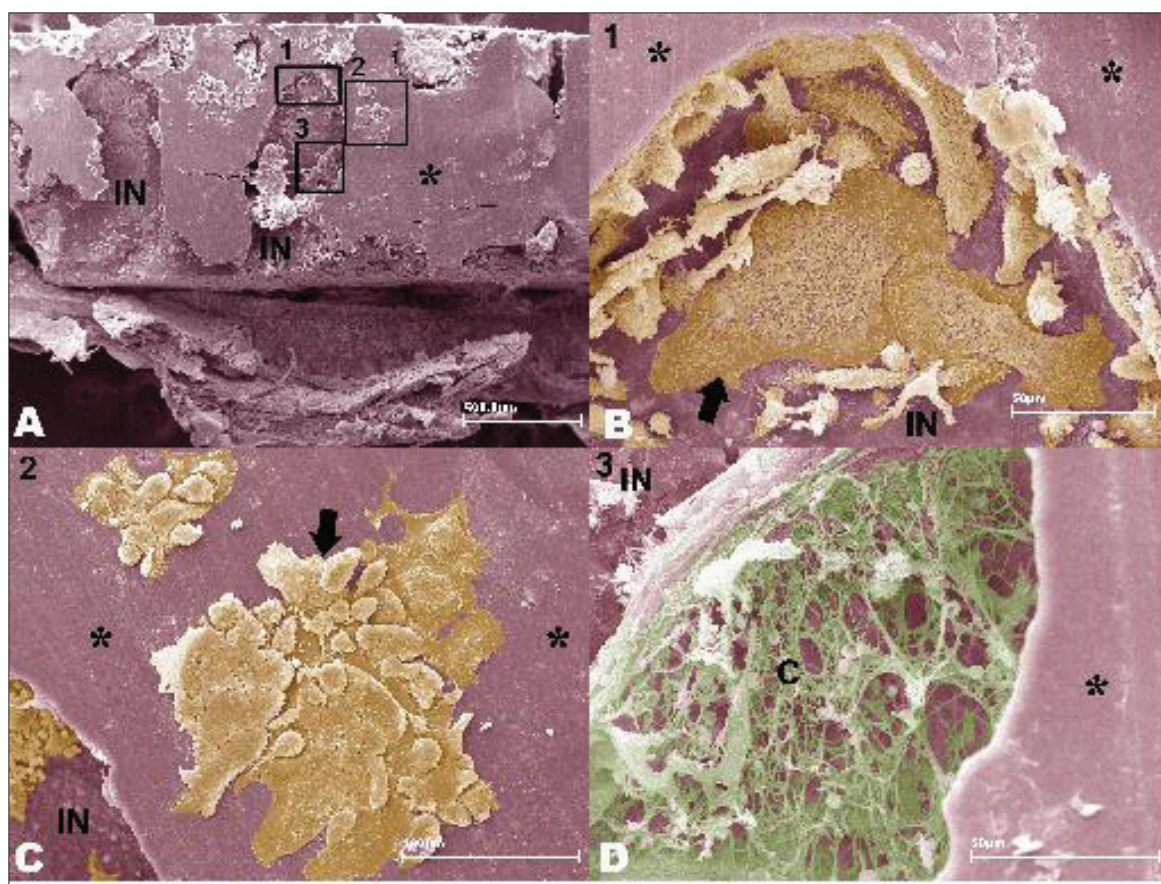


Figura 4.54 - Imagem do biomaterial implantado no tecido subcutâneo do dorso do camundongo por 7 dias observada em microscopia eletrônica de varredura. IN: região interna do biomaterial; *região externa do biomaterial; C: material fibroso.

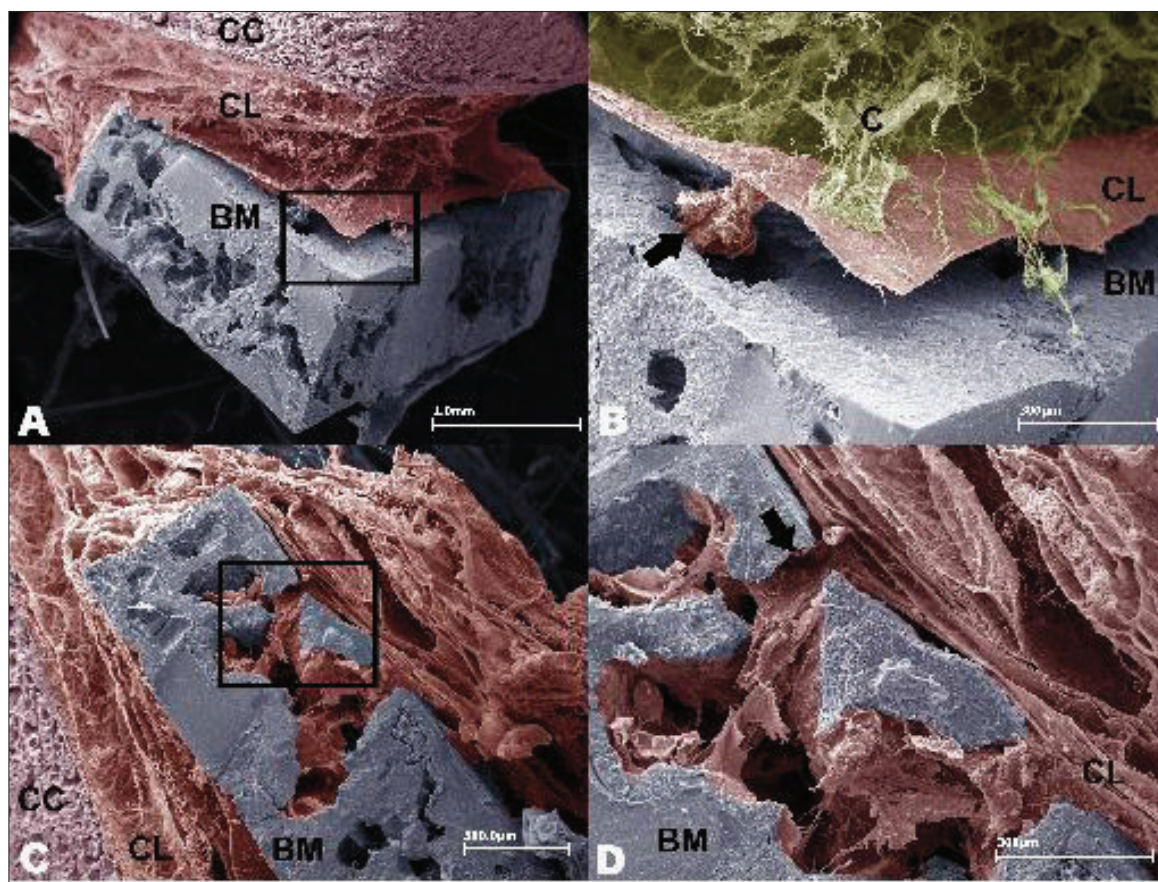


Figura 4.55 - Imagem do biomaterial implantado no tecido subcutâneo do dorso do camundongo por 14 dias, observada em microscopia eletrônica de varredura. C: material fibroso; BM: biomaterial; CL: camada fibrosa; CC: camada córnea.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

5.1 Conclusões

O poliisocianato alifático HDT baseado no trímero do diisocianato de hexametileno HDI analisado por FTIR foi totalmente reagido e sugere reação de auto-adição com formação de PU.

A obtenção de PU a partir do PVAI aconteceu por reação na superfície deste e no bionanocompósito há domínios de PVAI como confirmado em FTIR, DRX e MEV.

Foram observadas em FTIR bandas característica de nano partículas de hidroxiapatita, confirmado por imagem do bionanocompósito em MEV.

A melhor temperatura de cura do biomaterial PVAL-PU/HA foi a de 120°C por um tempo de 30 minutos.

A distribuição dos materiais observada em MEV apresenta-se de maneira uniforme o que influencia ativamente no equilíbrio iônico entre o fluido biológico e o biomaterial.

O material com 25% de HA apresentou maior percentual de absorção de água, maior porosidade e menor densidade quando comparado ao material com 33% de HA.

A inserção de 33% de HA na mistura alterou significativamente o valor da resistência mecânica sob compressão.

O valor médio da resistência à compressão do biomaterial usado no implante, próximo de 60 MPa foi superior a alguns valores encontrados na literatura.

A análise *in vitro* mostrou resultados promissores, pois as amostras nas duas proporções de HA utilizadas apresentaram comportamentos semelhantes ao controle negativo, ou seja, não apresentaram citotoxicidade.

O biomaterial apresenta estrutura tridimensional adequada para a migração de fibroblastos, pois apresentou citocompatibilidade a MG63, uma linhagem de osteocarcinoma.

A análise histológica comprovou a interação entre o material implantado e o tecido de reestruturação, pois o material promoveu fechamento da lesão óssea.

A presença de osteoclastos e de vasos sanguíneos confirma a estabilidade entre o tecido biológico e o biomaterial, ou seja, existe biocompatibilidade.

O biomaterial implantado e analisado após observação em MEV apresenta células sugestivas de fibroblastos na região interna do *scaffold* com intenso espraio e formação de uma camada celular compacta e homogênea, além de prolongamentos sugestivos de fibras colágenas e material fibroso na região externa após 7 dias do implante.

Após 14 dias do implante foi observada em MEV a interação do biomaterial com as camadas do tecido subcutâneo e a invasão do crescimento celular pelos poros interconectados do *scaffold*.

O biomaterial PVAI-PU/HA após 24 horas de implante apresentou detalhes de células aderidas, sugestivas provavelmente células de fibroblasto, espraio com formação de uma camada celular compacta e homogênea como aparece também com 7 e 14 dias após o implante.

O biomaterial desenvolvido nesta pesquisa é uma alternativa promissora para aplicação em implantes ósseos.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Analisar as propriedades mecânicas com mais variações de proporções de HA no material PVAL-PU.

Realizar ensaios biológicos *in vivo* com o biomaterial PVAI-PU/HA na calota craniana de animais até a conclusão dos resultados.

Realizar ensaios clínicos após toda sequência com os testes em animais.

Pesquisar a regularidade de poros no bionanocompósito.

5.3 Trabalhos relacionados com o Tema da Pesquisa

“Caracterização mecânica e morfológica de um bionanocompósito hidroxiapatita/poliuretano”^{55º} Congresso Brasileiro de Cerâmica. Junho/2011.

“Development and characterization of aliphatic polyurethane and hydroxyapatite scaffold for bone tissue regeneration”.

X Encontro da Sociedade brasileira de Pesquisas em Materiais. Setembro/2011.

“Propriedades reológicas de biocompósito poliuretano/hidroxiapatita”.

11º Congresso Brasileiro de Polímeros. Outubro/2011.

“Biocompósitos hidroxiapatita/poli(vinil álcool)-poliuretano para enxerto ósseo”.

56º Congresso Brasileiro de Cerâmica. Junho/2012

“Novo biomaterial à base de poliuretano para enxerto ósseo”, (submetido e aprovado).

XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Setembro/2012

“Ensaio in vitro e in vivo de biomaterial compósito Poli(álcool vinílico)/Poliuretano/Hidroxiapatita para enxerto maxilo facial”, (submetido e aprovado).

Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais - COLAOB. Agosto/2012.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD EL-MOHDY, H. L.; GHANEM, S.. Biodegradability, antimicrobial activity and properties of PVA/PVP hydrogels prepared by γ -irradiation. *J Polym Res* 16, p.1–10, 2009.
- ALCÂNTARA, M.T.S.; VARCA, G.H.C.; GIANNINI, D. R.; RIELLA, H.G.; LUGÃO, A.B. 19º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – CBECIMat, 21 a 25 de novembro de 2010, Campos do Jordão, SP, Brasil.
- AMARAL, R. H., ANUNCIATO R. V.; ALCÂNTARA M. T. S.; DITCHFIELD, C.; ROGERO S. O.; ROGERO, J. R.; LUGÃO, A. B.. Avaliação das Propriedades Mecânicas do Hidrogel de Poli(vinil álcool) (PVAI). 18º CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. 2008.
- ANTUNES, A. A.; CARVALHO, R. W. F.; LUCAS NETO, A. LORETTO, N.R.M. ; SILVA E. D. O. Utilização de Implantes Ósseointegrados para Retenção de Próteses Buco-Maxilo-Faciais: Revisão da Literatura. *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac.*, Camaragibe v.8, n.2, p. 09 - 14, abr./jun. 2008.
- ASEFNEJAD, A.; BEHNAMGHADER, A.; KHORASANI, M. T.; FARSADZADEH, B.. Polyurethane/fluor-hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. Part I: morphological, physical, and mechanical characterization. *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, p. 93-100, 2011.
- AZAMI, M.; ORANG, F.; MOZTARZADEH, F.. Nanocomposite bone tissue-engineering scaffolds prepared from gelatin and hydroxyapatite using layer solvent casting and freeze-drying technique. *Intl. Conf. On Biomedical and Pharmaceutical Engineering ICBPE* 2006.
- AZOUBEL A.; RICARDO A.; CARVALHO W.F.I; LORETTO NETO, A. N. R. M.; SILVA E. D. O. Utilização de Implantes Ósseointegrados para Retenção de Próteses Buco-Maxilo-Faciais: *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-fac.*, Camaragibe v.8, n.2, p. 09 - 14, abr./jun. 2008.
- BAVARESCO, V.P. “Tese de Doutorado” Estudo Tribológico de Hidrogéis Poliméricos para serem Utilizados como Cartilagem Auricular Artificial. Universidade Estadual de Campinas, Campinas - São Paulo, 2004.
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R.. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros*, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.
- BARRALET, J. E.; et. al., 2002. Effect of Porosity Reduction by Compaction on Compressive Strength and Microstructure of Calcium Phosphate Cement. *Journal of Biomedical Materials Research.*, Vol. 63, p.1-9. 2002.

BERTOLDI, S., FARE', S.; DENEGRI, M.; ROSSI, D.; HAUGEN, H. J.; PAROLINI, O.; TANZI, M. C.. Ability of polyurethane foams to support placen adhesion and osteogenic differentiation: preliminary results. *J Mater Sci: Mater Med*, v. 21, n. 3, p. 1005-1011, 2010.

BOTARO, V. R.; SANTOS, C. G.; OLIVEIRA, V. A. Hidrogéis Superabsorventes a Base de Acetato de Celulose Modificado por Dianidrido 3, 3', 4, 4' Benzofenona Tetracarboxílico (BTDA): Síntese, Caracterização e Estudos Físico-Químicos de Absorção. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 19, nº 4, p. 278-284, 2009.

BISPO, V. M. "Tese de Doutorado" Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA". Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais-2009.

BROCAS, A.-L.; CENDEJAS, G.; CAILLOL, S.; DEFFIEUX, A.; CARLOTTI, S. Controlled Synthesis of Polyepichlorohydrin with Pendant Cyclic Carbonate Functions for Isocyanate-Free Polyurethane Networks. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 49, p. 2677-2684, 2011.

BROEKEMA, F. I.; OEVEREN W. V.; ZUIDEMA, J.; VISSCHER, S. H.; BOS, R. R. M In vitro analysis of polyurethane foam as a topical hemostatic agent. *J Mater Sci: Mater Med* 22, p.1081-1086, 2011.

BROVARONE, C.V.; VERNE, E. Development of glass ceramic scaffolds for bone tissue engineering: characterization, proliferation of human osteoblasts and nodule formation. *Acta Biomater.*;3, p.199-208, 2007.

CAMPESE, G. M. E.; TAMBOURGI, E. B.. Resistência mecânica de hidrogéis termo-sensíveis constituídos de Alginato-Ca²⁺ /PNIPAAm, tipo semi-IPN. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 7, p.1649-1652, 2007.

CHETTY A.; STEYNBERG T.; MOOLMAN S.; NILEN R.; JOUBERT A.; RICHTER W.. Hydroxyapatite -coated polyurethane for auricular cartilage replacement: An in vitro study. Council for Scientific and Industrial Research (CSIR), 2006.

CHUNG, Y.-C.; NGUYEN, D. K.; and CHUN, B. C. Lateral Flexible Linking of Polyurethane Copolymer and the Effect on Shape Recovery and Tensile Mechanical Properties. *Polymer Engineering and Science*-2010.

CYSTERA, L.A.; GRANTA, D.M.; HOWDLEB, S.M.; ROSE, F.R.A.J.; IRVINED, D.J.. FREEMAND, D.; SCOTCHFORDA, C.A.; SHAKESHEFF, K.M. The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26, p.697-702, 2005.

CORDEIRO, R. A. “Tese de Doutorado” Preparação e caracterização de microsferas para liberação controlada de fármacos em Oftalmologia. 2005, 85p. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra.

COSTA-JÚNIOR, E. S.; PEREIRA, M.M. MANSUR, H. S.. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. *J Mater Sci: Mater Med* 20, p.553–561, 2009.

COSTA JÚNIOR, E.S. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais). Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulada para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.

COZZENS, D.; OJHA, U.; KULKARNI, P.; FAUST, R.; DESAI, S.; Longterm in vitro biostability of segmented polyisobutylene-based thermoplastic polyurethanes. *Online Library (wileyonlinelibrary.com)* 2010.

CYSTERA, L.A.; GRANTA, D.M.; HOWDLEB, S.M.; ROSE, F.R.A.J. IRVINED, D.J. FREEMAND, D.; SCOTCHFORDA, C.A.; SHAKESHEFF, K.M.. The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26, p. 697–702. 2005.

DEKSNYS T. P.; MENEZES, R.R.; FAGURY-NETO, E.; KIMINAMI, R.H.G.A.. Synthesizing Al₂O₃/SiC in a microwave oven: a study of process parameters. *Ceram. Int.*, v.33, n.1, p.67-71, 2007.

DIAS, R. C. M.; GÓES, A. M.; SERAKIDES, R. ; AYRESA E.; ORÉFICE, R. LAMBERT.. Porous Biodegradable Polyurethane Nanocomposites: Preparation, Characterization, and Biocompatibility Tests. *Materials Research.*; 13(2): p.211-218, 2010.

DIAS, C.G.B.T. “Tese de Doutorado” Tenacificação de Sistemas épxi com modificadores de impacto elastomérico (CTBN) e Termoplástico (PEI). Universidade Federal de São Carlos. 2000.

DÍAZ, M.; BARBA, F. MIRANDA, M.; GUITIÁN, F. TORRECILLAS, R.; AND MOYA, J. S.. Journal of Synthesis and Antimicrobial Activity of a Silver-Hydroxyapatite Nanocomposite *Nanomaterials* – 2009.

DONG Z.; LI Y.; ZOU Q.. Degradation and biocompatibility of porous nano hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering. *Applied Surface Science* 255, p. 6087–6091, 2009.

DOU, X.-C.; ZHU, X.-. ZHOU, J.; CAI, H.-Q.; TANG J.; AND LI, Q.-L.. Minocycline-released hydroxyapatite–gelatin nanocomposite and its cytocompatibility in vitro. *Biomed.Mater.* 6 025002 (7 p). 2011.

DU, C.; JIN, J.; LI, Y.; KONG, X.; WEI.; K.; AND YAO, J.. Novel silk fibroin/hydroxyapatite composite films: Structure and properties *Materials Science and Engineering C* 29, p.62–68, 2009.

ELLIOT, C.. *Structure and Chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates: Studies in Inorganic Chemistry* 18, Elsevier Science, 1994.

EMERSON IV, R. J.; AND CAMESANO, T.A. Nanoscale Investigation of Pathogenic Microbial Adhesion to a Biomaterial *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, No. 10, p. 6012–6022. 2004.

FIDANCEVSKA, E.; RUSESKAA, G.; BOSSERTB, J. LINC, Y.-M. ; BOCCACCINIC, A.R.. Fabrication and characterization of porous bioceramic composites based on hydroxyapatite and titania. *Materials Chemistry and Physics* 103, p.95–100, 2007.

FONSECA, FLAVIA MENDONÇA Bioceramicas porosas bifásicas e trifásicas à base de hidroxiapatita produzidas por gelcasting. *Dissertação mestrado - Instituto Militar de Engenharia – Rio de Janeiro*, 2007.

FOREST N, OUHATOUN J. P.. Evaluation of the osteogenic potential of biomaterials implanted in the palatal connective tissue of miniature pigs using undecalcified sections. *Biomaterials* 15: 2001-7p, 1994.

GAO, Z.; WANG, W.; ZHAO, Z.; GUO, M.. Novel whey protein-based aqueous polymerisocyanate adhesive for glulam. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 120, n. 1, p. 220-225, 2011.

GEARY, C.; JONES, E.; FITZPATRICK, D.; KELLY, C. P.; AND BIRKINSHAW, C.. In-vitro evaluation of a polyurethane compliant-layer glenoid for use in shoulder arthroplasty. *Proc. IMechE Vol. 224 Part H: J. Engineering in Medicine* 2009.

GEGER, A.; YILDIZ, N.; KAVAK, D.; CALIMLI, A.. Comparison of Chitosan Apatite Composites Synthesized by Different Methods. *Polymer Composites* 2009.

GHUSSN, L.. “Tese de Doutorado” Síntese e caracterização de vidros niobofosfatos e ferrofosfatos utilizados como meio para imobilização de U3O8. *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo*. 100 p. 2005.

GLEGHORN, J. P.; DOTY, S. B.; WARREN, RUSSELL. F.; WRIGHT, T. M.; MAHER, S. A.; BONASSAR, L. J.. Analysis of Frictional Behavior and Changes in Morphology Resulting from Cartilage Articulation with Porous Polyurethane Foams. *Journal of Orthopaedic Research* october 2010.

GUAN, J.J.; FUJIMOTO, K.L.; SACKS M.S.; WAGNER W.R.. Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. *Biomaterials*; 26:p.3961– 3971, 2005.

GUO, Q.; KNIGHT, P. T.; WU, J.; MATHER, P. T.. Blends of Paclitaxel with POSSBased Biodegradable Polyurethanes: Morphology, Miscibility, and Specific Interactions. *Macromolecules*, v. 43, n. 11, p. 4991-4999, 2010.

GUO, S.; ZHANG, C.; PENG, H.; WANG, W.; LIU, T.. Structural characterization, thermal and mechanical properties of polyurethane/CoAl layered double hydroxide nanocomposites prepared via in situ polymerization. *Composites Science and Technology* 71 p.791–796, 2011.

GUHA, A.; NAYAR, S. AND THATOI, H.N. BIOINSP.. Microwave irradiation enhances kinetics of the biomimetic process of hydroxyapatite nanocomposites *Biomim.* 5 024001(5p) 2010.

HAFEMAN, A. E.; ZIENKIEWICZ, K. J.; ZACHMAN, A. L.; SUNG, H.-J.; NANNEY, L. B.; DAVIDSON, J. M.; AND GUELCHER, S.A.. Characterization of the Degradation Mechanisms of Lysine derived Aliphatic Poly(ester urethane) Scaffolds. *Biomaterials* 2012.

HELMUS, M.N. & TWEDEN, K.. Materials Selection – In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, part A, v.1 p. 27-59, 1995.

HENCH, L.L. Bioceramics: from concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.*, 74, n.7, 1487-510, 1991.

HILL C. M.; AN Y. H.; KANG Q. K.; HARTSOCK L. A. GOGOLEWSKI S.; GORNA K.. Osteogenesis of Osteoblast Seeded Polyurethane-Hydroxyapatite Scaffolds in Nude Mice. *Macromol. Symp.*, 253, 94–97, 2007.

HUANG, M.N.; WANG, Y.L.; LUO, Y.F.. Biodegradable and bioactive porous polyurethanes scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Sci Eng.* ;2:p.36–40, 2009.

HUANG, X. and MIAO X.. Novel Porous Hydroxyapatite Prepared by Combining H₂O₂ Foaming with PU Sponge and Modified with PLGA and Bioactive Glass. *J. Biomater Appl* 21: 351J, 2007.

JOZAKI, T.; AOKI, K.; MIZUMOTO, H.; KAJIWARA, T.. In vitro reconstruction of a three-dimensional mouse hematopoietic microenvironment in the pore of polyurethane foam. *Science+Business Media B.V.* 2010. *Cytotechnology* 62, p.531–537, 2010.

JUNQUEIRA L. C. U.; CARNEIRO J., Histologia Básica, (2004), 10^a edição.

KALITA, S. J.; BOSE, S.; HOSICK, H. L.; BANDYOPADHYAY, A.. Development of controlled porosity polymer-ceramic composite scaffolds via fused deposition modeling. Materials Science and Engineering C 23 p.611– 620, 2003.

KALFUS, J.; JANCAR, J.. Elastic Response of Nanocomposite Poly(vinylacetate)-hydroxyapatite With Varying Particle Shape. Polymer Composites 2007.

KANNAN, M.; BHAGAWAN, S.S.; JOSE, T.; THOMAS, S.; JOSEPH, K.. Preparation and Characterization of Nanoclay-Filled Polyurethane/Polypropylene Blends. Polymer Engineering And Science-2010.

KAPANDJI, I. A.. Fisiologia Articular: Membro superior. 5^a edição, volume 1. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2001.

KAHNBERG K.-E., RASMUSSEN L. AND ZELLIN G. Bone Grafting Techniques for Maxillary Implants by Blackwell Munksgaard, 2005.

KATTI, K.S.; KATTI, D.R.; DASH, R.. Synthesis and characterization of a novel chitosan/montmorillonite/hydroxyapatite Nanocomposite for bone tissue engineering. Biomed.Mater.3 034122(12p). 2008.

KHANDWEKAR, A. P.; PATIL, D.P.; HARDIKAR, A. A.; SHOUICHE, Y.S. AND DOBLE, M.. In vivo modulation of foreign body response on polyurethane by surface entrapment technique. Wiley Periodicals, INC. 2010.

KIM, H.-W.; LEE, H.-H.; KNOWLES, J. C.. Electrospinning biomedical nanocomposite fibers of hydroxyapatite/poly(lactic acid) for bone regeneration. Wiley Inter Science 2006.

KIM, Y.-H.; ANIRBAN J. M. AND SONG, H.-Y. In Vitro and In Vivo Evaluations of 3D Porous TCP-coated and Non-coated Alumina Scaffolds. Journal of Biomaterials Applications Vol. 25 2011.

KUI, C.; GE, S.; WENJIAN, W.; et al.. Synthesis of hydroxyapatite/fluoroapatite solid solution by a sol-gel method. *Mater Lett.*; p.51:37–41, 2001.

KUSMANTO, F.; WALKER, G.; GAN, Q.; WALSH, P.; BUCHANAN, F. DICKSON, G.; MCCAIGUE, M.; MAGGS, C. AND DRING, M.. Development of composite tissue scaffolds containing naturally sourced microporous hydroxyapatite. Chemical Engineering Journal 139 p.398–407, 2008.

LEE, J.-H.; LEE, U.-S.; JEONG, K.-U. SEO, Y.-A.; PARK. S.-J.. Preparation and characterization of poly(vinyl alcohol) nano fiber mats crosslinked with block disocyanate prepolymer. *Polym Int*; 59, p.1683–1689. Society of Chemical Industry, 2010.

LEE, H.-F. AND YU, H. H. Study of electroactive shape memory polyurethane–carbon nanotube hybrids, *Soft Matter*, 7p, 3801, 2011.

LI, N.W.C.; et.al., Blood compatibility of novel poly(γ -glutamic acid)/poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.47, p.43–49, 2006.

LIU H.; ZHANG L.; SHI P.; ZOU Q.; ZUO Y.; LI Y.. Hydroxyapatite/polyurethane scaffold incorporated with drug-loaded ethyl cellulose microspheres for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* Vol 95b, Issue 1. 2010.

LIU, H.; ZHANG, L.; ZUO, Y.; WANG, L.; HUANG, D.; SHEN, J.; SHI, P.; AND LI, Y.. Preparation and Characterization of Aliphatic Polyurethane and Hydroxyapatite Composite Scaffold. *Wiley InterScience* DOI 10.1002/app.29862, 2009.

LUO, Y; MCCANN, L.; INGHAM, E.; JIN, Z.-M.; GE, S.; AND FISHER, J.. Polyurethane as a potential knee hemiarthroplasty biomaterial: an in-vitro simulation of its tribological performance. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, p.224: 415, 2010.

MACHADO H. B., CORREIA R. N., COVAS J. A., Synthesis, extrusion and rheological behaviour of PU/HA composites for biomedical applications. *Springer Science+Business J. Mater Med* 21:p.2057–2066, 2010.

MAIA, M., KLEIN, E. S., MONJE, T. V., PAGLIOSA, C. Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão da literatura. *Rev. Bras. Cir. Plást*, v. 25, n. 3, p. 566:572, 2010.

MANJULA, K.S.; KUMAR, M. N. S.; SOARE, B.G.; PICCIANI, P. and SIDDARAMAIA, H.. Biobased Chain Extended Polyurethane and Its Composites with Silk Fiber. *Polymer Engineering and Science*, 2010.

MANSUR, H.S.; SADAHIRA, C.M.; SOUZA, A. N. MANSUR, A.A.P.. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde *Materials Science and Engineering C* 28 539–548, 2008.

MARTINEZ-VALENCIA, A. B.; CARBAJAL-DE LA TORRE, G.; TORRES-SANCHEZ, R.; TELLEZ-JURADO L. AND ESPARZA-PONCE, H. E.. Production of polyurethane/nano-hydroxyapatite hybrid materials and microstructural characterization. *International Journal of the Physical Sciences* Vol. 6(11), pp. 2731–2743, 2011.

MARTINS, V.; BONILHA, T.; FALCÓN-ANTENUCCI, R. M.; VERRI, A. C. G.; VERRI, F.R.. Osseointegração: Análise e fatores clínicos de sucesso e insucesso. Revista Odontológica de Araçatuba, v.32, n.1, p. 26-31, 2011.

MATHIEU, L.M.; MUELLER, T.L.; BOURBAN, P.E.; PIOLETTI, D.P.; MULLER, R.; MANSON, J.A.E.. Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*.;27, p. 905–916, 2006.

MOHSIN M., HOSSIN A., HAIK, Y.. Thermal and Mechanical Properties of Poly(vinylalcohol) Plasticized with Glycerol Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) 2011.

MURUGAN R.; RAMAKRISHNA S.. Development of nanocomposites for bone grafting Composites Science and Technology Singapore 117576, Singapore 65 2385–2406, 2005.

NAIR, M.B.; BABU, S. S.; VARMA, H.K.; JOHN, A.. A triphasic ceramic-coated porous hydroxyapatite for tissue engineering application. *Acta Biomaterialia* 4, p.173–181, 2008.

NUGENT, M. J. D.; HANLEY, A.; TOMKINS,P.T.; HIGGINBOTHAM, C. L.. Investigation of a novel freeze-thaw process for the production of drug delivery hydrogels. *Journal of materials science: materials in medicine* 16, p.1149– 1158, 2005.

OLIVEIRA I. R.; STUDART A. R.; PILEGGI R. G.; PANDOLFELLI, V.C.. Dispersão e Empacotamento de Partículas, Princípio e Aplicações em Processamento Cerâmico. Fazendo Arte editorial, 2000.

ORTEGA F.S.; SEPULVEDA, P.; INNOCENTINI, M.D.M.; PANDOLFELLI V.C., SURFACTANTS: A necessity for producing porous ceramics. *American Ceramic SocietyBulletin* v.80, n.4, p.37-42. 2001.

PENG Z.; AND SHEN Y.. Study on Biological Safety of PolyvinylAlcohol/Collagen Hydrogel as a Tissue Substitute (II) *Journal of Macromolecular Science, Part A* . 2011.

PEPPAS N. A.; ZACH H. J.; KHADEMHOSEINI A.; LANGER, R.. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles. *Bionanotechnology*. 18, p.1345–1360, 2006.

PEPAS, N.A., KOSMEYER, R,W., Hidrogels in medicine and pharmacology, Boca Raton, Flórida, CRC Press, 1987.

PEREIRA I. M.; GOMIDE V.; ORÉFICE R. L.; LEITE M.F.; ZONARI A. A.C.; GOES A. M.. Proliferação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo em poliuretanos com biodegradabilidade sintonizável revista@abpol.org.br revista@abpol.org.br 2010.

PEREIRA P. H.; DIAS, S. C.; ÁVILA G. B.; RIBEIRO, J. C. R.; MOYSÉS M. R.; AGNELLI J. A.M.; PEREIRA L. J.. Avaliação do comportamento mecânico de modelos odontológicos obtidos em resina de poliuretano. Arquivos em Odontologia Volume 46 1 N° 01 2010.

PERSTORP. Folheto de informações de segurança de produtos químicos. Produto:Tolonate HDT. Disponível em: http://www.perstorp.com/upload/pds_tolonated_hdt-v_engl_v5_perstorp.pdf. Acesso em 16 de fevereiro de 2011.

RAHMAN, M. S.; CHANGEZ, M.; MIN, J.; SHAH, P. N.; SAMAL, S.; LEE, J.-S.. Functionalization of amphiphilic coil-rod-coil triblock copolymerpoly(2-vinylpyridine)-b-poly(n-hexylisocyanate)-b-poly(2-vinylpyridine) with fluorine moiety and C 60. Polymer 52, p.1925-1931, 2011.

REZWAN, K.; CHEN, Q.Z.; BLAKER, J.J.; BOCCACCINI, A.R.. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*; 27:3413–3431, 2006.

SARAIVA L.G.; LAZARETTI-CASTRO M.. Marcadores bioquímicos de remodelação óssea na prática clínica. Arq. Bras. Endocrinol Metab; 46(1):p.72-78, 2002.

SHARMA, C.; SZYCHER, Szycher (editores). Blood Compatible Materials and Devices. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, p. 131-1-1-0, 1991.

SHOURGASHTI, Z.; KHORASANI, M.T.; KHOSROSHAHI, S.M.E.. Plasma-induced grafting of poly dimethylsiloxane onto polyurethane surface: Characterization and in vitro assay. Radiation Physics and Chemistry, p.79-94, 2010.

SILVA, M. H. P. Apostila de Biomateriais. [2000]. Disponível em: <http://200.19.182.147/Materiais/Arquivos_Biomateriais.html>. Acesso em: 12 out. 2009.

SMITH, R. A.; HALLAB, N. J.. In vitro macrophage response to polyethylene and polycarbonate-urethane particles. Journal of Biomedical Material Research, v. 93A, n. 1, p. 347-355, 2010.

SOBREIRA T.; MAIA F. B. M.; PALITÓ A. P. P. G.; GALDINO A.S.; MORAIS F.R.. Enxerto Ósseo Homógeno para Reconstrução de Maxila atrofica Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac., Camaragibe v.11, n.1, p. 9-12, 2011.

SPRIO, S.; TAMPIERI, A.; CELOTTI, G.; LANDI, E.. Development of hydroxyapatite/calcium silicate composites addressed to the design of load-bearing bone scaffolds. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 2 , p.147–155, 2009.

SUNDARAM, C. S.; VISWANATHAN, N.; BIORESOURCE, S. M. Uptake of fluoride by nano-hydroxyapatite/chitosan, a bioinorganic composite. *Technology* 99, p.8226–8230, 2008.

TAKASHIMA, H.; IWAKI, K.- I.; FURUKUWA, R.; TAKISHITA, K.; SAWADA, H.. Preparation and applications of a variety of fluoroalkyl end-capped oligomer/hydroxyapatite composites. *Journal of Colloid and Interface Science* 320 p.436–444. 2008.

TIENEN, T. G.; HEIKANTS, R. G.; DE GROOT, J. H. et al.. Meniscal replacement in dogs. Tissue regeneration in two different materials with similar properties. *J Biomed Mater Res B*, p.72, 389, 2006.

TONG, H.-W.; WANG, M.; LI, Z.-Y. AND LU, W.W.. Electrospinning, characterization and in vitro biological evaluation of nanocomposite fibers containing carbonated hydroxyapatite nanoparticles. *Biomed.Mater.* 5 054111, (13p) 2010.

VITAL C.C.; BORGES A.P.B.; FONSECA C.C.; TSIOMIS A.C.; CARVALHO T.B.; FONTES E.B.; SENA M.P.; FÓFANO G.. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.2, p.175-183, 2006.

WANG, E.; LEE, S.-H. AND LEE, S.-W.. Elastin-Like Polypeptide Based Hydroxyapatite Bionanocomposites. *Biomacromolecules* 2010.

WANG L., SHEN Y.; & LAI, X.; LI, Z., AND LIU, M.. Synthesis and properties of crosslinked waterborne polyurethane. *J. Polym. Res.* 18: p.469-476, 2011.

WANG L.; LI Y.; ZUO Y.; ZHANG L.; ZOU Q.; CHENG L. AND JIANG H. Porous bioactive scaffold of aliphatic polyurethane and hydroxyapatite for tissue regeneration. *Biomed. Mater.* 4 025003 (7p), 2009.

WANG, Z. AND HU, Q.. Preparation and properties of three-dimensional hydroxyapatite/chitosan nanocomposite rods. *Biomed.Mater.* 5 045007(6p), 2010.

WEISS, P.; LAYROLLEA, P.; CLERGEAU, L. P.; ENCKEL, B.; PILET, P.; AMOURIQ, Y.; DACULSI G.; AND, GIUMELLI, B.. The safety and efficacy of an injectable bone substitute in dental sockets demonstrated in human clinical trial, *Biomaterials* v.28, p. 3295-3305, 2007.

WIK, V.M.; ARANGUREN, M.I.; MOSIEWICKI, M.A. Castor Oil-based Polyurethanes Containing Cellulose Nanocrystals. *Polymer Engineering and Science* -2011.

WILLIAMS D. F. To engineer is to create: the link between engineering and regeneration. *Trends In Biotechnology*, v.24, n.1, p.4-8, 2006.

WILLIAMS, D.F. Definitions in biomaterials. Progress in Biomedical Engineering, v.4.1987.

XUE, L.; DAI, S.; LI, Z.. Biodegradable shape-memory block co-polymers for fast selfexpandable stents. Biomaterials, v. 31, n. 32, p. 8132-8140, 2010.

ZHANG, M. Y.; YE, C.; ERASQUIN, U. J.; HUYNH, T.; CAI, C.; AND CHENG, G.J.. Laser Engineered Multilayer Coating of Biphasic Calcium Phosphate/Titanium Nanocomposite on Metal Substrates. ACS Applied Materials & Interfaces, 2010.

ZAVAGLIA, A. C.. Aplicações de biocerâmicas em próteses ortopédicas. Campinas S Paulo, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Tese de livre docência. 1993.

ZAVAGLIA, A. C.. Curso de Introdução à cerâmicas. Campinas São Paulo, Faculdade de engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Apostila de biocerâmicas. 2003.

ZHANG, L.; DENIZ, Y. E.; SCHJODT-THOMSEN, J.; RAUHE, J. C.; PYRZ, R.. MWNT reinforced polyurethane foam: Processing, characterization and modeling of mechanical properties. Composites Science and Technology 71 p.877–884, 2011.

ZHANG, M. Y.; YE, C.; ERASQUIN, U. J.; HUYNH, T. CAI, C. AND CHENG, G.J.. Laser Engineered Multilayer Coating of Biphasic Calcium Phosphate/Titanium Nanocomposite on Metal Substrates. ACS Applied Materials & Interfaces 2010.

ZHOU, S.; ZHENG, X.; YU, X.; WANG, J.; WENG, J.; LI, X. FENG, B.; AND YIN, M.. Hydrogen Bonding Interaction of Poly(D,L-Lactide)/hydroxyapatite Nanocomposites. Chem. Mater., 19, p.247-253, 2007.



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

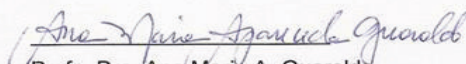
CERTIFICADO

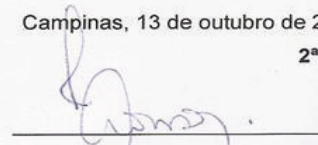
Certificamos que o projeto **"Bionanocompósito Poliuretano/hidroxiapatita para enxerto de Maxilo Facial"** (protocolo nº **2482-1**), sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Ana Beatriz Albino de Almeida / Danielle Ferreira Feliciano / Sabina da Memoria Cardoso de Andrade**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **04 de julho de 2011**.

Campinas, 13 de outubro de 2011.

2ª. VIA


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>