

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



UNICAMP

Instituto de Química

Departamento de Físico-Química

Síntese e Propriedades de Alumoxanos: Modificações de Superfície e Aplicações.

Dissertação de Mestrado

Aluno: Helder Augusto da Silva

Orientador: Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran

Campinas, setembro 2008.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

Si38s	<p>Silva, Helder Augusto. Síntese e propriedades de alumoxanos: modificações de superfície e aplicações / Helder Augusto Silva. -- Campinas, SP: [s.n], 2008.</p> <p>Orientador: Celso Aparecido Bertran.</p> <p>Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Alumoxanos. 2. Alumina. 3. Superfície. 4. Biocompatibilidade. I. Bertran, Celso Aparecido. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	--

Título em inglês: Synthesis and properties of alumoxanes: surface modifications and applications

Palavras-chaves em inglês: Alumoxanes, Alumina, Surface, Biocompatibility

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora: Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran (orientador), Profa. Dra. Inés Joeques (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. José Mauro Granjeiro (IB-UFF)

Data de defesa: 04/09/2008

Esse trabalho é dedicado aos meus pais. Se eu cheguei aonde cheguei, eles são 100% responsáveis por isso. Devo todas as vitórias obtidas na minha vida a eles e dessa vez não foi diferente.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran, por todo o apoio, incentivo e orientação durante todo o período do meu mestrado.

A todos os meus colegas de laboratório.

A todos os técnicos do Instituto de Química da UNICAMP, cujas análises realizadas permitiram com que esse trabalho fosse realizado.

Ao Willian e à Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira, por realizarem os testes de cultura de células.

Ao Wilson e ao Prof. Dr. José Angelo Camilli, por realizarem os implantes em ratos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Súmula Curricular

Formação:

Mestre em Química

Área de atuação: Físico-Química.

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – IQ.

Conclusão - setembro/2008.

Bacharel em Química Tecnológica

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Conclusão - dezembro/2004.

Bacharel em Química

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Conclusão – julho/2007.

Licenciado em Química

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Conclusão – dezembro/2007.

Cursos Extracurriculares:

Mini-curso: “Química dos Vinhos” – outubro de 2001.

Mini-curso: “Química Forense” – outubro de 2002.

Mini-curso: “Fontes Alternativas de Energia” – outubro de 2002.

Estágios:

Local: Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS).

Estágio de Nível Superior.

Coordenador: Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin – Laboratório de Biologia Molecular.

Período: Janeiro/2005 – Dezembro/2005.

Atividades Acadêmicas:

Iniciação Científica

Projeto: “Construção e Avaliação de Eletrodos Íon-Seletivo para Cálcio”.

Orientador : Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran.

Agência de Fomento: CNPq.

Período: 01/08/2003 - 31/07/2004.

Programa de Apoio Didático (PAD)

Disciplina: Química Geral Experimental (QG102).

Coordenador da Disciplina: Prof. Dr. José de Alencar Simoni.

Instituição: Instituto de Química/UNICAMP.

Período: 2º Semestre/2004.

Programa de Estágio Docente (PED) – Grupo C

Disciplina: Físico-Química Experimental I (QF632).
 Coordenadora da Disciplina: Profa. Dra. Claudia Longo.
 Instituição: Instituto de Química/UNICAMP.
 Período: 2º Semestre/2007.

Trabalhos Apresentados Em Congressos Científicos, Simpósios e Reuniões Científicas Nacionais:

Construção e avaliação de eletrodos íon-seletivo para cálcio. *XII Congresso Interno de Iniciação Científica* – UNICAMP, Campinas, SP, setembro de 2004.

Trabalhos Apresentados Em Congressos Científicos, Simpósios e Reuniões Científicas Internacionais:

“Hydroxiapatite formation on modified alumina oxide surfaces”. *8th World Biomaterials Congress*. Amsterdã, Holanda, maio de 2008.

“Cell culture of modified aluminum oxides surfaces”. *8th World Biomaterials Congress*. Amsterdã, Holanda, maio de 2008.

“Estudo da biocompatibilidade de superfícies modificadas de alumina” *V Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*, Ouro Preto, SP, Brasil, junho de 2008.

Artigo Aceito:

Bertazzo, S.; Zambuzzi W.F.; Silva H.A.; Ferreira, C.V.; Bertran, C.A.;
 “Bioactivation of alumina by surface modification: a promising alternative for improving the applicability of alumina in the bone repair process.” *Clinical Oral Implants Research*.

Patentes:

“Material biocompatível, processo de obtenção de material biocompatível e uso de material biocompatível em implantes e próteses.” **21.06.07 – Prot. 018070039124.**

“Biocompatible material, process for obtaining said biocompatible material and use for said biocompatible material in implants and prosthesis”
 PTC/BR2008/000176 – 23/06/2008.

RESUMO

SÍNTESE E PROPRIEDADES DE ALUMOXANOS: MODIFICAÇÕES DE SUPERFÍCIE E APLICAÇÕES

Alumoxanos são materiais cujos cernes são idênticos aos da alumina, constituídos por ligações do tipo Al-O-Al e grupos pendentes como alquil, aril, haletos ou quaisquer grupos funcionais ligados aos átomos de alumínio. As primeiras sínteses desses compostos envolviam as reações de organoalumínios com água, ou com compostos contendo oxigênio. Nesse trabalho de mestrado, a síntese de alumoxanos foi realizada a partir da reação da superfície sólida de óxidos e oxihidroxidos de alumínio com soluções cujos solutos deram origem aos grupos pendentes. Os alumoxanos obtidos por essa rota de síntese, as quais os reagentes que originaram os grupos pendentes eram ácidos carboxílicos são denominados alumoxanos carboxilatos. A modificação da superfície de um óxido de alumínio, como a alumina, por exemplo, com um ácido carboxílico altera significativamente as suas propriedades químicas, mantendo-se as suas propriedades mecânicas. Nesse trabalho, foram sintetizados os alumoxanos benzoato, oxalato, vinil-acetato, succinato e adipato. Com o sucesso das sínteses, algumas aplicações para os produtos formados puderam ser investigadas, como o estudo da energia superficial do alumoxano benzoato através de medidas de ângulo de contato e a biocompatibilidade apresentada pelos alumoxanos sintetizados a partir de ácidos dicarboxílicos. As aluminas cujas superfícies foram modificadas pela reação com ácido benzóico, resultando na formação do alumoxano benzoato, mostraram um expressivo aumento de hidrofobicidade, indicado pelo ângulo de contato dessas superfícies com água de cerca de 70°. As aluminas cujas superfícies foram modificadas pela reação com ácidos dicarboxílicos, resultando na formação de alumoxano oxalato, succinato e adipato, foram analisadas segundo o teste de imersão em SBF, quanto à potencialidade de uso como biocerâmicas biocompatíveis. Apenas o alumoxano oxalato apresentou resultados satisfatórios, ocorrendo uma intensa precipitação de fosfato de cálcio na superfície desse material, o que possibilitou a realização de experimentos de adesão celular e testes *in vivo* para esse alumoxano. Os resultados desses experimentos foram concordantes com o teste de imersão em SBF, indicando uma forte possibilidade de uso do alumoxano oxalato como biomaterial.

ABSTRACT

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF ALUMOXANES: SURFACE MODIFICATIONS AND APPLICATIONS

Alumoxanes are materials which their cores are identical to alumina's core, consisting of an Al-O-Al backbone with a variety of pendant groups, such as alkyl, aryl, halides or any functional groups bonded with aluminum atoms. The first synthesis of these compounds had been made by reacting organoaluminum and water or other compounds containing oxygen. In this master's work, alumoxanes were synthesized by reactions between solid surfaces from aluminum oxides or aluminum oxihydroxide and solutions which solutes originated pendant groups. The alumoxanes made from this kind of synthesis and which reactants were carboxylic acids are named carboxylatoalumoxanes. This reaction causes drastic changes in chemical properties of an aluminum oxide, such as alumina, but keeps its mechanical properties. In this work, benzoatoalumoxane, oxalatoalumoxane, vinyl-acetatoalumoxane, succinatoalumoxane and adipatoalumoxane were synthesized. After the successful synthesis of these materials, some applications involving alumoxanes were investigated. For example: the benzoatoalumoxane surface energy, studied by contact angle experiments and the biocompatibility of alumoxanes from dicarboxylic acids. The alumina's surface modified by reaction with benzoic acid, resulting in benzoatealumoxane, showed an expressive rise about its hydrophobicity. This fact was supported by the contact angle around 70° between benzoatealumoxane surface and a drop of water. The alumina's surface which were modified by reaction with dicarboxylic acids, resulting in oxalatoalumoxane, succinatoalumoxane and adipatoalumoxane, were analyzed by SBF test, about using them as biocompatible bioceramics. Among these materials, only oxalatoalumoxane had shown good results because a lot of calcium phosphate crystals had been formed on its surface. Supported by this result, this material could be tested in cell adhesion and *in vivo* tests. Their results agreed with SBF test, showing a considerable possibility of using oxalatoalumoxane as a biomaterial.

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Alumoxanos.....	1
1.2. Alumoxanos Carboxilatos.....	3
1.3. Conceitos.....	7
1.3.1. Ângulo de Contato.....	7
1.3.2. Biomateriais.....	11
1.3.3. Biocompatibilidade.....	12
1.3.4. Testes de Biomimética e de Biocompatibilidade.....	13
1.3.4.1 Imersão em SBF.....	14
1.3.4.2. Adesão Celular.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	20
3.1. Reagentes, Equipamentos e Materiais.....	20
3.1.1. Reagentes Utilizados.....	20
3.1.2. Equipamentos e Materiais de Laboratório Utilizados.....	21
3.2. Sínteses dos Materiais.....	22
3.2.1. Preparação dos Óxidos de Alumínio.....	22
3.2.1.1. γ-Alumina.....	22
3.2.1.2. α-Alumina.....	22
3.2.1.3. Alumina Comercial.....	23
3.2.2.Preparação dos Alumoxanos.....	23

3.3. Caracterização dos Materiais.....	26
3.4. Aplicações dos Alumoxanos.....	27
3.4.1 Superfícies Hidrofóbicas.....	27
3.4.2. Testes de Biomimética.....	28
3.4.3. Testes de Biocompatibilidade.....	29
3.4.3.1. Testes <i>in vitro</i>	29
3.4.3.2. Testes <i>in vivo</i>	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. Caracterização dos Materiais.....	31
4.1.1. Alumina.....	31
4.1.2. Alumoxanos.....	37
4.1.2.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho.....	37
4.1.2.2. Análise Termogravimétrica.....	41
4.1.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	45
4.1.2.3. Avaliação do Grau de Modificação das Superfícies de Alumina.....	46
4.2. Aplicações dos Alumoxanos.....	49
4.2.1. Superfícies Hidrofóbicas.....	49
4.2.1.1. Influência do Valor de pK_a do Ácido Carboxílico na Síntese de um Alumoxano Carboxilato.....	51
4.2.2. Testes de Biomimética.....	52
4.2.3. Testes de Biocompatibilidade.....	57
4.2.3.1. Testes <i>in vitro</i>	57
4.2.3.2. Testes <i>in vivo</i>	60
4.3. Trabalhos Futuros.....	61

5. CONCLUSÕES.....	62
6. BIBLIOGRAFIA.....	64
7. ANEXOS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

p: para (dupla substituição nas posições 1 e 4 em um anel benzênico).

t-butil: terc butil

m/v: massa/volume

cos: cosseno

SBF: (do inglês) fluido corpóreo simulado

ISO: (do inglês) Organização Internacional de Padronização

M: unidade de concentração: número de mols de soluto por litro de solução

Arg: aminoácido arginina

Gly: aminoácido glicina

Asp: aminoácido ácido aspártico

nm: nanômetro

THF: tetrahydrofurano

MTT: brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)

DMSO: dimetilsulfóxido

FBS: (do inglês) soro fetal bovino

FTIR: (do inglês) espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

SEM: (do inglês) microscopia eletrônica de varredura

CHN: análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio

DRX: difratometria de raios-X

TGA: (do inglês) análise termogravimétrica

A: área

EDS: (do inglês) espectroscopia de energia dispersiva

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Concentração dos íons da solução de SBF [21] e do plasma sanguíneo humano.....	15
Tabela 3.1: Aluminas e solventes utilizados na síntese de cada alumoxano.....	25
Tabela 3.2: Obtenção dos discos para os testes de biocompatibilidade.....	29
Tabela 4.1: Porcentagens médias de massa de carbono na γ -alumina antes e após à calcinação à 950°C.....	35
Tabela 4.2: Áreas dos picos das amostras calcinadas de γ -alumina.....	36
Tabela 4.3: Variação da temperatura de decomposição dos alumoxanos em relação à mistura mecânica de seus respectivos ácidos carboxílicos com a alumina e valores de pK_a para seus respectivos ácidos carboxílicos [38].....	45
Tabela 4.4: Área superficial, porcentagem em massa de carbono, raio do círculo e porcentagem de recobrimento da superfície dos alumoxanos sintetizados a partir da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH.....	48
Tabela 4.5: Valores de pK_a dos ácidos carboxílicos empregados nesse trabalho [38].....	52
Tabela 4.6: Valores de pK_a de ácidos carboxílicos empregados nos trabalhos do grupo de pesquisa da Rice University [38].....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Estrutura de dois alumoxanos: a) $i\text{Bu}_4\text{Al}_2\text{O}$ (dímero). b) $(\text{Et}_2\text{Al})_2\text{O}$ (trímero).....	2
Figura 1.2: Estrutura tridimensional simplificada de um alumoxano carboxilato proveniente da reação entre a superfície da boemita e um ácido carboxílico.....	5
Figura 1.3: Gota em uma superfície sólida formando um ângulo de contato θ	7
Figura 2.1: Estrutura simplificada dos alumoxanos sintetizados nesse trabalho: alumoxano benzoato (a), alumoxano oxalato (b), alumoxano vinil-acetato (c), alumoxano succinato (d) e alumoxano adipato (e).....	19
Figura 3.1: Aparato para a síntese dos alumoxanos.....	24
Figura 3.2: Aparato para a determinação de ângulo de contato.....	28
Figura 4.1: Espectros na região do infravermelho obtidos a partir de pastilha de KBr da γ -alumina após calcinação à 300°C e tratamento térmico com etanol à 70°C (a) e da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH 1M (b).....	32
Figura 4.2: Termogramas das análises termogravimétricas da γ -alumina após calcinação à 300°C e tratamento térmico com etanol à 70°C (a) e da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH 1M (b).....	34
Figura 4.3: Difratogramas de raios-X da γ -alumina após calcinação à 300°C e tratamento térmico com etanol à 70°C antes de ser calcinada à 950°C (a), após 3 horas de calcinação à 950°C (b) e após 72 horas de calcinação à 950°C (c).....	35
Figura 4.4: Espectros na região do infravermelho obtidos em pastilha de KBr para o ácido benzóico (a) e para os alumoxanos benzoatos sintetizados a partir da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH (b) e da γ -alumina após calcinação à 300°C e tratamento térmico com etanol (c). Região 1: banda referente ao grupo carboxila dos alumoxanos benzoatos. Região 2: banda referente ao grupo carboxila do ácido benzóico. Região 3: banda proveniente da ligação bidentada entre a alumina e o ácido carboxílico. Regiões 4 e 5: bandas provenientes da uréia residual.....	38

- Figura 4.5:** Espectros na região do infravermelho obtidos em pastilha de KBr do ácido oxálico (a) e do alumoxano oxalato sintetizado a partir da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH. Região 6: banda proveniente da ligação bidentada entre a alumina e o ácido carboxílico. Região 7: banda referente ao grupo carboxila do ácido oxálico. Região 8: banda referente ao grupo carboxila livre do alumoxano oxalato. Região 9: banda referente ao grupo carboxila ligado à superfície da alumina..... **39**
- Figura 4.6:** Espectros na região do infravermelho do ácido vinil-acético obtido em cela de líquidos (a) e do alumoxano vinil-acetato sintetizado a partir da alumina comercial após tratamento com solução aquosa de NaOH obtido em pastilha de KBr (b). Região 10: banda proveniente do grupo carboxila do ácido vinil-acético. Região 11: banda proveniente do grupo carboxila do alumoxano vinil-acetato. Região 12: banda proveniente da ligação bidentada entre a alumina e o ácido carboxílico..... **40**
- Figura 4.7:** Espectros na região do infravermelho obtidos em pastilha de KBr do ácido adípico (a) e do alumoxano adipato sintetizado a partir da alumina comercial após tratamento com solução aquosa de NaOH (b). Região 13: banda proveniente do grupo carboxila do ácido adípico. Regiões 14 e 15: bandas provenientes das carboxilas do alumoxano adipato..... **41**
- Figura 4.8:** Termogramas de análise termogravimétrica do ácido benzóico. Perda de massa em função da temperatura (a) e derivada da perda de massa em função da temperatura (b)..... **42**
- Figura 4.9:** Termogramas de análise termogravimétrica do alumoxano benzoato e da mistura mecânica de alumina com ácido benzóico. Perda de massa em função da temperatura (a) e derivada da perda de massa em função da temperatura (b)..... **42**
- Figura 4.10:** Termogramas de análise termogravimétrica do ácido oxálico. Perda de massa em função da temperatura (a) e derivada da perda de massa em função da temperatura (b)..... **43**
- Figura 4.11:** Termogramas de análise termogravimétrica do alumoxano oxalato e da mistura mecânica de alumina com ácido oxálico. Perda de massa em função da temperatura (a) e derivada da perda de massa em função da temperatura (b)..... **44**

Figura 4.12: Termogramas de análise termogravimétrica do alumoxano vinil-acetato e da mistura mecânica de alumina com ácido vinil-acético. Perda de massa em função da temperatura (a) e derivada da perda de massa em função da temperatura (b).....	44
Figura 4.13: Micrografias eletrônicas da superfície da alumina comercial tratada com solução de NaOH com aumento de 60 mil vezes (a); do alumoxano benzoato com aumento de 40 mil vezes (b); do alumoxano oxalato com aumento de 80 mil vezes e do alumoxano vinil-acetato com aumento de 45 mil vezes.....	46
Figura 4.14: Unidades representativas do alumoxano benzoato (a), oxalato (b) e vinil-acetato (c) e seus respectivos raios.....	47
Figura 4.15: Modelo proposto de empacotamento hexagonal das unidades representativas dos alumoxanos.....	48
Figura 4.16: Superfície da alumina antes (a) e depois (b) da modificação com ácido benzóico.....	49
Figura 4.17: Gota de água sobre a superfície de um disco de alumoxano benzoato.....	50
Figura 4.18: Micrografias eletrônicas das superfícies das amostras após 8 horas de imersão em SBF. (a) Alumina sem modificação com ácido oxálico. (b) e (c) e (d) Aluminas modificadas com ácido oxálico.....	53
Figura 4.19: (a) Mapeamento elementar de uma superfície de alumoxano oxalato. Em azul, alumínio e em vermelho, cálcio. (b) Espectro de EDS da mesma superfície.....	54
Figura 4.20: Reação de redução do MTT à formazano, ocorrida na mitocôndria das células.....	58
Figura 4.21: Número de células em atividade após 6, 12 e 24h ($p < 0,05$) em contato com as superfícies dos discos de alumina comercial após tratamento com solução aquosa de NaOH, alumoxano oxalato e alumoxano oxalato recoberto com fosfato de cálcio.....	58
Figura 4.22: Micrografia óptica do implante de alumina sem modificação.....	60
Figura 4.23: Micrografia óptica do implante de alumoxano oxalato recoberto com fosfato de cálcio.....	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alumoxanos

Um dos objetivos das pesquisas envolvendo novos materiais ao longo dos anos sempre foi a busca de novos compostos que apresentassem características híbridas de substâncias orgânicas e inorgânicas, de modo a aproveitar as melhores características de um material inorgânico, como a resistência à oxidação, e as dos materiais orgânicos, como flexibilidade, tenacidade e processabilidade. Dessa maneira, essas propriedades poderiam ser moduladas através de diferentes composições dos materiais, dependendo da finalidade desejada para o material sintetizado. Por exemplo: poder-se-ia sintetizar um material híbrido a partir de um material originalmente inorgânico modificando-se apenas a sua superfície, tornando-a orgânica por intermédio de uma reação química, conservando-se o cerne inorgânico.

Essa busca relatada no parágrafo anterior permitiu que a linha de pesquisa envolvendo materiais híbridos se ramificasse, em virtude de uma maior especialização dos grupos de pesquisa ao redor do mundo. Entre esses grupos, nos dias atuais, pode-se citar os que trabalham com os chamados metaloxanos, cujas estruturas básicas consistem em ligações do tipo M-O-M (M = átomo de elemento metálico). O nome desses compostos é oriundo da analogia com as estruturas dos siloxanos, compostos que possuem na sua estrutura ligações do tipo Si-O-Si com grupos orgânicos ligados aos átomos de silício. Entre as várias classes de metaloxanos existentes, a classe dos alumoxanos merece destaque devido ao grande número de trabalhos publicados envolvendo o uso e aplicações desses compostos.

São definidos como alumoxanos os materiais oligoméricos, ou até mesmo poliméricos, cujas estruturas moleculares correspondem a átomos de oxigênio ligados a dois átomos de alumínio (Al-O-Al), e grupos pendentes, como por exemplo alquil, aril, haletos ou quaisquer outros grupos funcionais, ligados aos átomos de alumínio dessa estrutura [1]. Para ilustrar essa definição, na Figura 1.1 são mostradas as estruturas de dois alumoxanos [2].

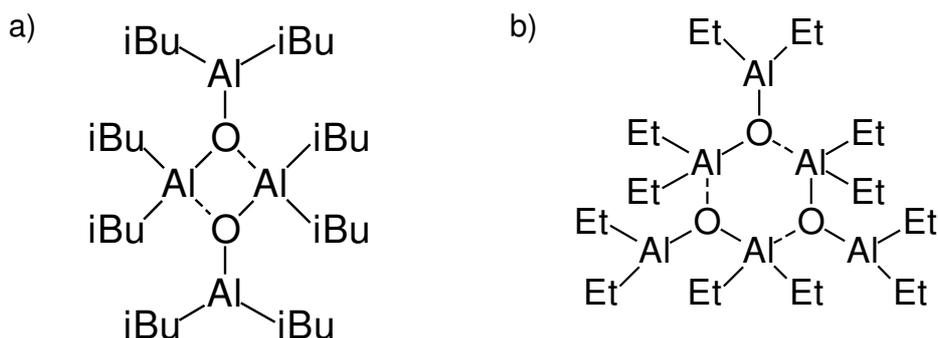
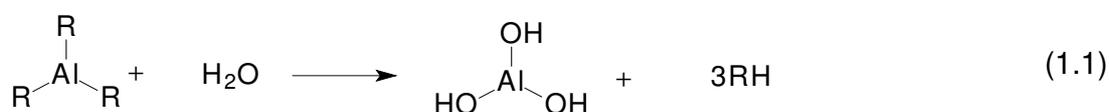


Figura 1.1: Estrutura de dois alumoxanos: a) $i\text{Bu}_4\text{Al}_2\text{O}$ (dímero). b) $(\text{Et}_2\text{Al})_2\text{O}$ (trímero).

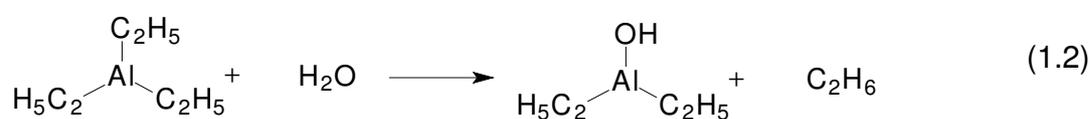
Os primeiros trabalhos relativos aos alumoxanos provêm do final dos anos 50 e início dos 60. Nesses trabalhos de Colclough e colaboradores, alquil alumoxanos foram utilizados como catalisadores na polimerização de epóxidos [3,4]. Já na década de 80, metil alumoxanos começaram a ser aplicados como catalisadores de reações de polimerização de etileno e propileno [2].

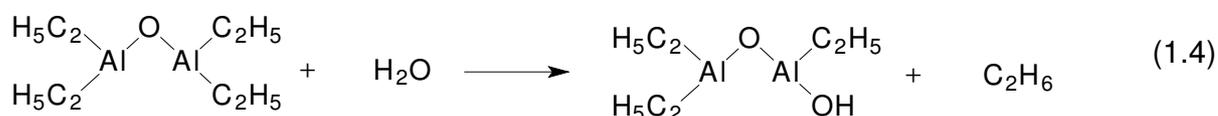
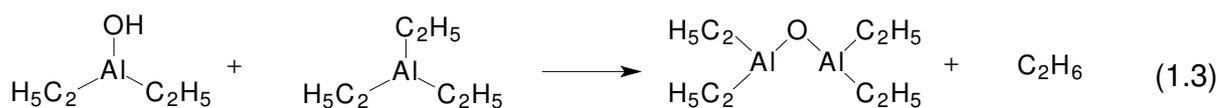
Em relação à síntese dos alumoxanos, dois métodos foram muito utilizados quando os estudos desses compostos começaram. No primeiro deles, a formação dos alumoxanos ocorria através da reação de organoalumínios com água. No segundo, a síntese ocorria através da reação de organoalumínios com compostos que continham átomos de oxigênio ligados ao átomo central da molécula.

No método de reação com água, os procedimentos eram realizados de modo a se diminuir a taxa de hidrólise dos organoalumínios, geralmente trabalhando-se a baixas temperaturas, visto que esses materiais reagem violentamente com água, sendo hidrolisados a $\text{Al}(\text{OH})_3$, conforme mostra a Equação 1.1.

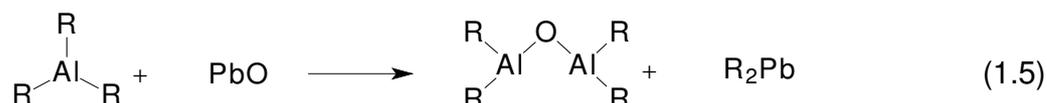


Um exemplo da síntese a partir da reação de organoalumínios com água foi reportado por Saegusa e colaboradores [5] utilizando-se o trietilalumínio como material de partida em um sistema à 0°C . Devido a ter sido realizada a baixas temperaturas, a reação ocorria de maneira controlada, representada pelo seguinte conjunto de equações:

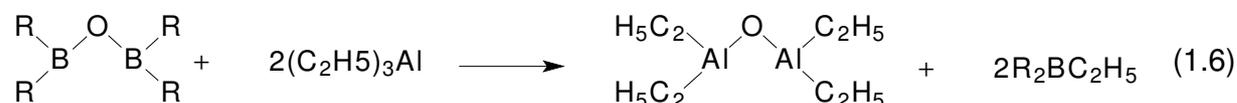




Em um artigo publicado por Pasynekiewicz [2] foi feita uma revisão abrangente a respeito das sínteses de alumoxanos pelo método da reação de organoalumínios com compostos contendo átomos de oxigênio. Entre os trabalhos por ele citados estão o de Boleslawski e Pasynekiewicz, que promoveram a reação de um alquilalumínio com óxido de chumbo, como mostra a Equação 1.5:



e de Serwatowski, que obteve um alumoxano a partir da reação do trietilalumínio com tetraorganodiboroxano, conforme é mostrado na Equação 1.6:



com o grupo R_2 podendo ser ou $(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ou 1,5-ciclooctadienil.

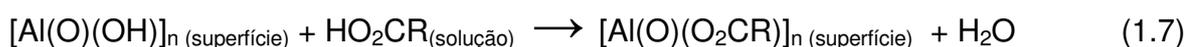
1.2. Alumoxanos Carboxilatos

Os alumoxanos mostrados na sessão anterior necessitam de cuidados especiais para as suas respectivas sínteses, como em relação aos seus reagentes (organoalumínios são facilmente hidrolisáveis) e às condições do meio reacional. Porém, uma outra possibilidade para a obtenção desses compostos envolve um processo de síntese mais simples, que consiste na utilização de um material sólido com a sua superfície em contato com uma solução cujo soluto são as moléculas a serem inseridas como grupos pendentes.

Em 1995, Barron e colaboradores [1], da Rice University, reportaram um trabalho

no qual a superfície da boemita, um mineral que é um oxihidróxido de alumínio, foi modificada através de uma reação química com ácidos carboxílicos. Através desse trabalho, abriu-se a perspectiva de se trabalhar com óxidos e óxihidróxidos de alumínio como materiais de partida para a formação de alumoxanos ao invés de se utilizar os compostos de alumínio com baixo peso molecular, como os citados no item 1.1, como reagentes.

A vantagem da utilização da boemita como precursor para a síntese de um alumoxano consistia no fato que a estrutura desse material já apresentava ligações do tipo Al-O-Al. Com isso, era necessária apenas a inserção dos grupos pendentes à sua estrutura. Para isso, foram utilizados ácidos carboxílicos. Esses ácidos podem reagir com a superfície da boemita através de uma reação ácido-base, conforme é mostrado na equação 1.7, em que há a formação de uma ligação química entre o mineral e o ácido carboxílico. O produto dessa reação é chamado de alumoxano carboxilato.



É necessário ressaltar que essa síntese é responsável apenas pela modificação da superfície da boemita e que a Equação 1.7 mostra apenas a equação da reação na sua forma simplificada. Por essa razão é que há o índice n tanto no reagente sólido quanto no produto formado. O cerne do óxido de alumínio não sofre alteração em relação à sua estrutura.

Entretanto, diferentemente do que é indicado pela Equação 1.7, nesse mesmo trabalho dos pesquisadores da Rice University foi reportado que esse procedimento não proveu como resultado uma superfície totalmente modificada pelos grupos carboxilatos, uma vez que houve a presença de grupos OH remanescentes da superfície original da boemita após a reação. Os autores, mesmo não relatando de que maneira chegou-se a essa conclusão, propuseram a fórmula geral $[\text{Al}(\text{O})_x(\text{OH})_y(\text{O}_2\text{CR})_z]_n$ como representação da superfície de um alumoxano carboxilato.

Uma das principais contribuições do trabalho de Barron está relacionada à estrutura desses materiais, antes propostas como lineares ou cíclicas, análogas aos siloxanos. Segundo o modelo proposto por Barron, os alumoxanos são estruturas tridimensionais semelhantes à estrutura da Figura 1.2, que é análoga à da boemita. Ao se compararem as estruturas da Figura 1.1 com a estrutura da Figura 1.2, percebe-se que a diferença estrutural está no fato que as moléculas da Figura 1.1 possuem

tamanho finito, sendo no máximo oligômeros, enquanto que na Figura 1.2 é mostrado que uma pequena parte da boemita é modificada, visto que ela é constituída de uma cadeia de ligações Al-O-Al com grupos orgânicos pendentes na sua superfície.

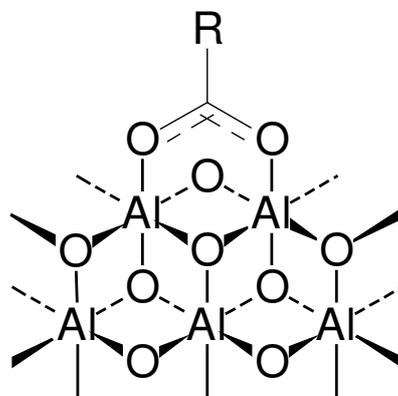


Figura 1.2: Estrutura tridimensional simplificada de um alumoxano carboxilato proveniente da reação entre a superfície da boemita e um ácido carboxílico.

O grupo de pesquisa da Rice University detém o maior número de publicações relacionadas ao assunto encontradas na literatura, visto que a área de aplicação dos alumoxanos é bem ampla, dependendo do ácido carboxílico utilizado, e, portanto, da estrutura dos grupos R, uma vez que as propriedades desses compostos variam bastante de ácido para ácido utilizado na reação química de modificação de superfície. Sendo assim, um resumo dos trabalhos de Barron contribuirá para uma visão mais completa do desenvolvimento das pesquisas com esses compostos:

1997 - síntese de alumoxanos carboxilatos em água a partir dos ácidos carboxílicos contendo grupos éter nas suas cadeias como os ácidos metoxiacético, metoxetoxiacético e metoxietoxietoxiacético [6] com a obtenção de alumoxanos com uma relativa solubilidade em água.

2000 – com o ácido p-hidroxibenzóico e com lisina, foram sintetizados alumoxanos para atuar como carga de resinas epóxi, provendo grupos OH e NH, respectivamente, à superfície da boemita para promover a abertura do anel da molécula de éter diglicílico do bifenol A, que promove o processo de “cross-linking” no processo de formação da resina [7].

2000 – utilização de alumoxanos na impregnação de tecidos de Kevlar e de fibra de carbono [8]. Neste caso, o uso dos ácidos bifuncionais (os mesmos que foram utilizados no trabalho de 1997) teve por objetivo explorar o aumento da molhabilidade

causada pela presença das cadeias polióxí que revestiram as nanopartículas do aluminoxano-carboxilato, resultando em uma melhor dispersão e adesão dessas partículas sobre as fibras do tecido de Kevlar ou sobre as fibras de carbono.

2001 – preparação de membranas de alumina para ultrafiltração através da termólise de alumoxanos carboxilatos. Para esse alumoxano, o ácido carboxílico utilizado foi o ácido acético. Esse procedimento permitiu a obtenção de membranas, que além de possuírem tamanhos de poros compatíveis com o de uma ultramembrana, possuíam uma faixa muito estreita na distribuição de tamanho de poros [9].

2001 – atuação como cocatalisador em polimerização de olefinas. Para isso, foram utilizados t-butil metilalumoxanos contribuindo para a atuação do catalisador, que era um metalloceno de zircônio, de modo a ativá-lo para a polimerização de etileno e propileno [10].

2002 – reparação de corpos cerâmicos de alumina. Nesse trabalho, utilizou-se boemita com superfície modificada com ácido acético (alumoxano acetato) de modo que ao se realizar um tratamento químico com uma solução aquosa de 1% m/v desse alumoxano em um corpo danificado de alumina, com a infiltração da solução no material, seguido de tratamento térmico, houve um sensível reparo dos corpos de alumina [11], segundo os autores. Entretanto, chegou-se à essa conclusão apenas analisando-se as micrografias eletrônicas de varredura da superfície dos corpos de alumina antes e depois do procedimento.

Em trabalho recentemente publicado por Bertran e colaboradores [12], originado de parte do trabalho desenvolvido nessa dissertação de mestrado, alumoxanos carboxilatos mostraram-se materiais com potencial para serem utilizados como biomateriais. Essa conclusão deve-se aos excelentes resultados obtidos nos experimentos de imersão de discos de alumina com superfície modificada com um ácido dicarboxílico em fluido corpóreo simulado. Por conseguinte, esses resultados poderão impulsionar as pesquisas relacionadas à melhoria da biocompatibilidade de próteses e implantes que tenham partes ou que sejam na sua totalidade constituídos de alumina, os quais já apresentam a dureza e a resistência típicas desse material [13].

Pelo histórico dos trabalhos envolvendo alumoxanos carboxilatos é exeqüível o emprego de diferentes óxidos e oxihidróxidos de alumínio nas sínteses de alumoxanos carboxilatos. A boemita, reagente provedor da estrutura contendo as ligações Al-O-Al dos trabalhos de Barron pode ser preterida por outros óxidos e oxihidróxidos de

alumínio, como a alumina do trabalho de Bertran e colaboradores, descrito de maneira resumida no parágrafo anterior. Essa afirmação é sustentada pelo fato que a modificação das superfícies desses compostos de alumínio com ácidos carboxílicos é possível desde que haja, ou que se possa formar, grupos OH nas suas superfícies. Sendo assim, conforme foi mostrado nos parágrafos anteriores, a reação com diferentes ácidos carboxílicos permite que materiais com propriedades diferentes sejam obtidos, porém mantendo-se as características mecânicas dos óxidos e oxihidróxidos de alumínio, devido ao interior de suas estruturas não apresentar mudanças.

O princípio exposto no parágrafo anterior é o sustentáculo para este trabalho. Porém, antes de se expor os seus objetivos, alguns conceitos serão abordados para que o leitor se familiarize com o contexto no qual esse trabalho se encontra.

1.3. Conceitos

1.3.1. Ângulo de Contato

Um líquido sobre uma superfície sólida pode tanto se espalhar completamente por ela, formando um filme fino, como também esse espalhamento pode ocorrer de maneira limitada, permanecendo o líquido na superfície em equilíbrio termodinâmico com a sua fase gasosa. Visualmente, esse equilíbrio é perceptível pela formação de uma gota na superfície do material sólido. A formação dessa gota permite que se quantifique a interação interfacial do líquido com a superfície sólida através da medição do ângulo entre essas duas fases, chamado de ângulo de contato, como é mostrado na Figura 1.3.

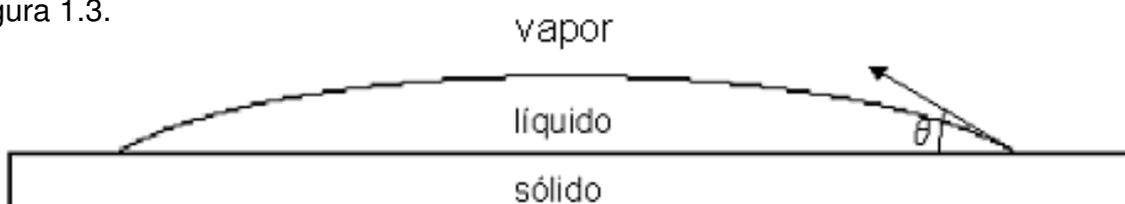


Figura 1.3: Gota em uma superfície sólida formando um ângulo de contato θ .

A literatura refere-se a esse comportamento do líquido na superfície de um sólido através de um parâmetro denominado molhabilidade, que pode ser tanto da superfície pelo líquido ou a capacidade de molhabilidade do líquido na superfície, dependendo do

ponto de vista. A medida quantitativa desse processo é dada justamente pelo valor de θ , o ângulo de contato. O valor desse ângulo é resultado de um equilíbrio de forças, conforme será mostrado matematicamente mais adiante nesse mesmo item: as forças intermoleculares do líquido e a das tensões interfaciais sólido/líquido, líquido/vapor e sólido/vapor.

No caso do líquido que forma um filme uniforme na superfície (isto é, $\theta = 0^\circ$) o sólido é considerado como totalmente molhável pelo líquido, ou considera-se que o líquido molha completamente o sólido. Quando um ângulo diferente de zero é formado, há controvérsias em relação à descrição do sistema. Se um ângulo é formado ($\theta > 0^\circ$) alguns trabalhos descrevem o sólido como parcialmente molhado. Outros preferem fazer uma distinção baseada no valor do ângulo de contato. Por exemplo, uma superfície seria molhada se o ângulo de contato medido estivesse entre 0° e 30° , entre 30° e 89° , parcialmente molhada e acima de 90° , sem nenhuma molhabilidade. Alternativamente, qualquer sistema com $0^\circ < \theta < 180^\circ$ poderia ser parcialmente molhável e apenas para valores de $\theta = 180^\circ$ poder-se-ia considerar a ausência de molhabilidade da superfície.

O ângulo de contato pode ser geometricamente definido como o ângulo formado pela intersecção dos planos tangentes às superfícies sólida e líquida no perímetro de contato entre as duas fases e a terceira fase que está ao redor das duas primeiras. Tipicamente, a terceira fase será o ar ou vapor, embora haja sistemas nos quais essa terceira fase pode ser um líquido imiscível tanto à superfície sólida quanto à líquida [14].

Na literatura, o primeiro trabalho envolvendo ângulo de contato foi publicado por Tomas Young em 1805. Nesse trabalho, Young estabeleceu a relação matemática entre o ângulo de contato e as tensões interfaciais envolvidas. A equação em que essa relação é indicada (Equação 1.8) recebeu o nome de Equação de Young, em homenagem ao trabalho desse pesquisador [15]:

$$\cos\theta = (\sigma_{SV} - \sigma_{SL})/\sigma_{LV} \quad (1.8)$$

com σ_{ij} correspondendo à tensão interfacial. Portanto, σ_{SV} corresponde à tensão interfacial sólido/vapor; σ_{SL} corresponde à tensão interfacial sólido/líquido e σ_{LV} corresponde à tensão interfacial líquido/vapor.

As tensões interfaciais da Equação de Young podem também fornecer um entendimento sobre a natureza química da superfície através da relação com

grandezas termodinâmicas como a energia livre de Gibbs (ΔG), sendo representada nesse sistema pelo trabalho de adesão (W_a). Esse trabalho é definido matematicamente pela Equação 1.9:

$$-\Delta G = A(\sigma_{SV} + \sigma_{LV} - \sigma_{SL}) = W_a \quad (1.9)$$

sendo A a área da interface sólido/líquido.

Pela Equação 1.9 é possível perceber que uma diminuição na energia interfacial sólido-líquido (σ_{SL}) produz um aumento no trabalho de adesão e conseqüentemente, uma diminuição do valor de ΔG . O oposto ocorre para um aumento nos valores das energias interfaciais entre a superfície sólida e o ar (σ_{SV}) e entre a superfície da gota e o ar (σ_{LV}).

Substituindo-se a Equação 1.8 na Equação 1.9, estabelece-se uma relação matemática entre o ângulo de contato e o trabalho de adesão, mostrada na Equação 1.10.

$$-\Delta G = W_a = A\sigma_{LV}(1 + \cos\theta) \quad (1.10)$$

Através da Equação 1.10 é possível notar que o trabalho de adesão será máximo quando o líquido se espalhar totalmente pela superfície, com $\theta = 0$ e $\cos\theta = 1$. O oposto é observado para superfícies que apresentem ausência de molhabilidade por um líquido, com $\theta = 180^\circ$, $\cos\theta = -1$ e $W_a = 0$.

A molhabilidade total da superfície é causada pela perfeita interação atrativa das moléculas do líquido pelos grupos funcionais presentes na superfície sólida. Isso significa que as forças intermoleculares do líquido se equivalem às de adesão com as moléculas da superfície do sólido. Por outro lado, a total ausência de molhabilidade da superfície indica que a interação sólido/líquido é desprezível se comparada às interações entre as moléculas do líquido, com a gota permanecendo como uma esfera sobre a superfície.

Sendo assim, valores intermediários de ângulo de contato são influenciados pelo balanço entre as forças dessas interações anteriormente citadas. Com isso, ao se utilizar um líquido como a água, é possível verificar e estudar a modificação de uma superfície através do ângulo de contato quando essa modificação envolve uma mudança de polaridade e quantificar a variação no valor do trabalho de adesão. Por exemplo, pode haver a formação de uma gota de água sobre uma superfície originalmente hidrofílica, ou seja, que originalmente apresentava molhabilidade total por

esse líquido, ao se adicionarem grupos hidrofóbicos à essa superfície através de reações químicas. O ângulo de contato resultante dependerá da hidrofobicidade e do grau de modificação dessa superfície.

O ângulo de contato é definido para um líquido depositado sob uma superfície sólida polida. Entretanto, a rugosidade de uma superfície pode modificar o valor desse ângulo. Dessa maneira, tem-se um ângulo de contato aparente, cujo valor é diferente do ângulo de contato real. Obviamente, poucas superfícies sólidas aproximam-se de um perfil ideal, ou seja, perfeitamente lisas. Comumente são encontradas superfícies aparentemente polidas que apresentam rugosidade quando observadas em microscópios. Essa rugosidade é expressa pelo fator de rugosidade (R_w), que se relaciona com o ângulo de contato da seguinte forma:

$$\cos\theta = R_w \cos\theta' \quad (1.11)$$

sendo θ o ângulo de contato aparente e θ' o ângulo de contato real.

O fator de rugosidade é definido como a razão das áreas das superfícies real e aparente. Superfícies altamente polidas costumam apresentar $R_w \geq 1,5$. Obviamente, esse valor irá depender da topografia da superfície. Por exemplo, se a superfície possuir poros, capilares, fendas ou outras estruturas que possuam características próprias em relação à molhabilidade e à penetração do líquido, o ângulo de contato aparente será afetado por essas estruturas.

Pela Equação 1.11 é notório que se o ângulo de contato real for menor que 90° em uma superfície lisa, ele será menor em uma superfície rugosa. Entretanto, o oposto ocorrerá se esse mesmo ângulo for maior que 90° . Matematicamente, para $\theta < 90^\circ$, tem-se $\theta' < \theta$ e para $\theta > 90^\circ$, tem-se $\theta' > \theta$ [14]. Resumidamente, o que foi dito na frase anterior indica que a molhabilidade de um substrato sólido possui relação direta com a sua rugosidade. Dessa maneira, a rugosidade da superfície de um material pode ser alterada de acordo com o interesse de aplicação. Para superfícies hidrofílicas, um aumento da rugosidade aumentaria ainda mais a molhabilidade do material. De maneira oposta, para superfícies hidrofóbicas, o aumento da rugosidade aumentaria a sua capacidade de repelência à água.

1.3.2. Biomateriais

A descrição mais comum para um biomaterial é a de “uma substância utilizada em próteses ou aparatos médicos projetados para terem uma aplicação durante um período de tempo muito longo no corpo humano” [16]. A área de pesquisa envolvendo os biomateriais é muito abrangente, possuindo várias ramificações, devido à constante busca por novos materiais que possam substituir partes danificadas ou desgastadas do organismo humano. Essa busca do desenvolvimento de biomateriais permitiu o desenvolvimento dessa área de pesquisa com o passar dos anos em várias partes do mundo.

Evidentemente que, devido à abrangência dessa área, conforme relatado no parágrafo anterior, uma descrição a respeito de todos os assuntos relacionados aos biomateriais não seria conveniente nessa dissertação, visto que esse não é o intuito desse trabalho. Entretanto, como parte dele envolve a síntese de um material com características de biocompatibilidade envolvendo a possibilidade de substituição de tecidos ósseos, a discussão será focada nos biomateriais empregados na substituição desses tecidos.

O grande desafio na área dos biomateriais utilizados para substituir os ossos sempre foi o desenvolvimento de materiais que estimulassem a formação óssea ao seu redor permitindo que houvesse a completa restauração óssea da região em que os materiais foram implantados [17]. Para isso, os principais materiais que vêm sendo utilizado nesse tipo de pesquisa [16] são polímeros, metais, compósitos e materiais cerâmicos. Novamente, em virtude do escopo desse trabalho, apenas os materiais cerâmicos serão discutidos nesse item. Devido ao fato de cerâmicas serem empregadas como biomateriais, esses materiais são comumente chamados de biocerâmicas.

A maior parte das aplicações de biocerâmicas envolve o reparo e/ou o reforço de partes do esqueleto humano, composto por ossos, articulações e dentes. Biocerâmicas também são usadas para substituir partes do sistema cardiovascular, especialmente válvulas do coração e também no preenchimento de regiões ósseas danificadas por tumores [16]. As biocerâmicas mais utilizadas são as aluminas e os fosfatos de cálcio. Nesse trabalho, através da síntese dos alumoxanos carboxilatos, tentou-se aliar esses

dois materiais, com a formação de fosfato de cálcio ligado quimicamente à superfície modificada da alumina, devido à presença de grupos complexantes de íons cálcio na sua superfície.

1.3.3. Biocompatibilidade

Os primeiros estudos de biocompatibilidade de biocerâmicas eram baseados na idéia que, estando os elementos metálicos das cerâmicas em estados elevados de oxidação (por exemplo, como óxidos), elas não seriam degradadas no corpo humano nem fariam parte de reações biológicas. Sendo assim, a busca era por materiais cerâmicos bioinertes. Como materiais cerâmicos são também caracterizados por uma elevada dureza, eles eram usados como partes de próteses de articulações. Por atender a todos esses requisitos, um material que se tornou comumente usado em próteses foi a alumina, que foi utilizada pela primeira vez na substituição total do osso da região pélvica em 1970 [18, 19].

Entretanto, nenhum material empregado como prótese óssea é inerte. Todo material produz uma resposta do tecido ao redor e, desse modo, esses materiais deveriam ser biocompatíveis em relação aos tecidos. Baseando-se nesse fato, foi proposta a hipótese que a biocompatibilidade de um material implantado deveria ser máxima se fosse promovida a formação de tecido ósseo na sua superfície e também se fosse estabelecida uma interface contínua capaz de suportar a pressão que geralmente ocorre no lugar do implante.

Quando implantados em sítios ou cavidades ósseas, para que sejam corrigidos pequenos defeitos, os materiais cerâmicos podem causar as seguintes respostas por parte do organismo:

- 1) Para materiais tóxicos, ocorre a morte do tecido ao redor.
- 2) Para materiais não-tóxicos e dissolvíveis, o tecido ao redor substitui o implante.
- 3) Para materiais inativos e biologicamente não-tóxicos, uma cápsula de tecido fibroso, cuja espessura pode variar, é formada ao redor da superfície do material em contato com o organismo.
- 4) Para materiais não tóxicos e biologicamente ativos, ocorre a formação de ligações interfaciais.

Sendo assim, o objetivo atual é produzir materiais que sejam reconhecidos e assimilados pelo organismo humano. Ou seja, materiais que ocasionem a formação de ligações interfaciais entre o tecido original e o implante. Para satisfazer essa condição, muitas vezes são requeridos vários anos de pesquisa, já que da passagem dos primeiros testes de biocompatibilidade para um material comercialmente utilizado como implante pode ser necessário um tempo muito longo, chegando a mais de dez anos, dependendo da aplicação do material [16].

Alguns testes de biomimética podem mostrar um indício de biocompatibilidade de um material e servem como testes preliminares antes de se realizarem testes *in vivo*.

1.3.4. Testes de Biomimética e de Biocompatibilidade

Os testes de biomimética e de biocompatibilidade são importantes ferramentas para a verificação da biocompatibilidade de um material. No caso desse trabalho, foram muito adequados para constatar a diferença de comportamento da alumina antes e após a modificação da sua superfície através da reação com ácidos dicarboxílicos. Para verificar a modificação nas propriedades de um material devido à modificação da sua superfície, esses tipos de teste podem ser realizados. Entre os mais comuns encontrados na literatura estão os testes de imersão em fluido corpóreo simulado (SBF) e o teste de adesão celular (testes de biomimética e de biocompatibilidade, respectivamente). Para esse trabalho, esses testes foram extremamente válidos, porém vale destacar que eles não se restringem somente ao estudo de modificações de superfícies.

Entretanto, antes de falar sobre cada um desses testes é necessário ressaltar que ao longo dos anos, várias tentativas foram realizadas para se estabelecer um protocolo mundialmente aceito para a constatação da biocompatibilidade de um material. Mesmo nesse trabalho foram utilizadas algumas delas, porém, para que o leitor fique ciente, nos dias atuais há uma tendência maior nos principais periódicos relacionados a essa área de aceitarem trabalhos cujos testes de biocompatibilidade sigam as normas da Organização Internacional de Padronização, cuja sigla em inglês é ISO, mais especificamente a norma ISO 10993.

Como nesse trabalho era mais importante o estudo das modificações de superfície do que a obtenção e teste de um biomaterial, a ISO 10993 não foi utilizada como protocolo para os experimentos, mas sim outros testes encontrados na literatura e amplamente aceitos como avaliação prévia da biocompatibilidade de um material.

1.3.4.1. Imersão em SBF

Na literatura, freqüentemente podem ser encontrados trabalhos em que o experimento de imersão em SBF é utilizado quando se deseja prever o comportamento de organismos vivos em contato com determinados materiais implantados, supostamente biocompatíveis, sem que haja a necessidade da realização do implante ósseo para que esse estudo seja realizado. Trata-se de um experimento que não envolve nenhum tipo de contato de um material com algum reagente proveniente de um organismo vivo. Por essa razão, a designação mais adequada para esse experimento seria a de teste de biomimética.

O fluido corpóreo simulado é uma solução aquosa que contém os mesmos íons do plasma sanguíneo humano e nas mesmas concentrações, conforme é mostrado na Tabela 1.1. Os primeiros usos dessa solução em estudos envolvendo biomateriais provêm de 1990, quando, segundo Kokubo e colaboradores [20], a formação de apatita (um tipo de fosfato de cálcio) na superfície de uma biocerâmica em testes *in vivo* podia ser reproduzida imergindo-se o material na solução de SBF. Entretanto, uma solução contendo os íons na mesma concentração do plasma sanguíneo humano só foi preparada e reportada no trabalho de Oyane *et al* em 2003 [21]. As concentrações dos íons dessa solução são mostradas na Tabela 1.1.

Ainda sobre o trabalho de Kokubo, em 1991, em virtude das superfícies que apresentavam formação de apatita em testes *in vivo* também apresentarem os mesmos resultados com SBF e o mesmo acontecendo em relação aos resultados negativos, esses autores propuseram que esse teste poderia servir como um estudo prévio da biocompatibilidade de um material [22].

Tabela 1.1: Concentração dos íons da solução de SBF [21] e do plasma sanguíneo humano.

Íons	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Concentração no plasma sanguíneo humano (10 ⁻³ M)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5
Concentração no SBF (10 ⁻³ M)	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

Ao se analisarem os valores da concentração dos íons na solução de SBF é possível perceber que essa solução apresenta-se supersaturada em relação ao fosfato de cálcio [22]. Portanto, a precipitação é um fenômeno termodinamicamente favorável, porém a sua cinética pode ser alterada por vários fatores, entre eles a inclusão de um material na solução que pode causar uma precipitação através da nucleação heterogênea do fosfato de cálcio.

Diferentemente da nucleação homogênea, que ocorre preferencialmente na solução, a nucleação heterogênea ocorre na superfície de um material nela imerso. A expressão da energia livre desse processo é dada pela Equação 1.12 [23]:

$$\Delta G = -RT \ln S + \sigma_{cl} A_{cl} + (\sigma_{cl} - \sigma_{sl}) A_{cs} \quad (1.12)$$

Resumidamente, pode-se analisar a equação dividindo-a em duas partes. A primeira, composta por $-RT \ln S$ (sendo S o grau de supersaturação da solução) é um termo que não sofre variação na solução de SBF em virtude da solução sempre ser a mesma em todos os experimentos. A segunda parte, composta por $\sigma_{cl} A_{cl} + (\sigma_{cl} - \sigma_{sl}) A_{cs}$ (sendo T a temperatura, A a área da partícula e σ a sua energia interfacial, com os índices c , s e l indicando respectivamente a partícula cristalina, o substrato e a fase líquida) é a parte dependente do material imerso na solução e é esse termo que governa o sinal da energia livre de Gibbs.

Por essa equação, é possível notar que ao se diminuir o grau de supersaturação, a seletividade da superfície torna-se mais pronunciada, tornando-se máxima em superfícies que possuam uma menor barreira para a nucleação [23]. Essa alteração da energia superficial pode ser obtida através de uma modificação química da sua superfície, com a inclusão de diferentes grupos funcionais à mesma.

1.3.4.2. Adesão celular

Novamente, antes de iniciar uma discussão mais aprofundada, vale destacar aqui que a abordagem da discussão sobre adesão celular será focada nas células de osteoblastos, em virtude da aplicação dos estudos envolvendo a modificação da superfície de alumina com ácidos dicarboxílicos envolverem a interação desse material com o tecido ósseo, sendo os osteoblastos as células formadoras desse tipo de tecido.

A biocompatibilidade de um material está fortemente relacionada ao comportamento das células em contato com o material em questão e particularmente à adesão celular à sua superfície. Características da superfície, como a topografia, estrutura química ou energia superficial são importantes fatores na adesão de osteoblastos em biomateriais. Essas características superficiais determinam como moléculas biológicas serão adsorvidas na superfície e particularmente determinam a orientação dessas moléculas.

O termo adesão, na área de biomateriais, envolve diferentes fenômenos. Primeiramente, ocorre um primeiro contato envolvendo eventos de curta duração como interações eletrostáticas, forças de van der Waals, etc. Em seguida, ocorre a fase de adesão, envolvendo períodos de tempo mais longos e moléculas biológicas: proteínas de membrana, extracelulares e do citoesqueleto. Por último, ocorre o espalhamento das células no material [24].

A adesão de osteoblastos em materiais pode ser considerada também em relação à expressão de várias proteínas de adesão. Essas proteínas podem ser divididas em três grupos:

1) Proteínas de matriz extracelular

A matriz extracelular óssea é composta de 90% de proteínas de colágeno e 10% de proteínas não-colagenosas. Todas essas proteínas são sintetizadas por osteoblastos e a maioria está relacionada à adesão celular. Algumas das proteínas relacionadas aos ossos possuem propriedades adesivas notadamente porque contêm a seqüência de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD) a qual é específica para a fixação de receptores de membrana celular [25].

2) Proteínas do citoesqueleto

Os sítios de adesão entre cultura de células de tecidos e a superfície dos substratos são chamados de contatos focais. Os contatos focais são junções nas quais a distância entre a superfície do substrato e a membrana celular é de 10 a 15nm. A face externa do contato focal apresenta proteínas com receptores específicos como as integrinas.

3) Moléculas de adesão

As moléculas relacionadas à adesão celular são caracterizadas pela sua capacidade de interagir com um ligante específico. Esses ligantes podem estar situados na membrana de células vizinhas ou em proteínas da matriz extracelular.

Vale destacar que as células não interagem com o material “nu” tanto *in vitro* como *in vivo*. Em cada passo, o material é condicionado pelos componentes do fluido biológico [26]. O pH, assim como a composição e força iônica da solução, a temperatura e os grupos funcionais dos substratos são fatores determinantes para a adesão. A característica hidrofílica e hidrofóbica de um material também é de grande importância para a adesão celular, que geralmente é melhor para superfícies hidrofílicas [27].

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho consistiram na síntese de alumoxanos carboxilatos através da modificação da superfície de diversas aluminas com diferentes ácidos carboxílicos. A partir do sucesso da síntese de cada alumoxano, as propriedades das superfícies de cada material puderam não somente ser confirmadas, mas também devidamente exploradas, valendo-se do fato que as características da superfície de um alumoxano carboxilato são dependentes do grupo R do ácido carboxílico da Equação 1.7.

As sínteses e aplicações mostradas nesse trabalho referem-se a cinco alumoxanos: alumoxano benzoato, oxalato, vinil-acetato, succinato e adipato. As estruturas simplificadas das superfícies dos materiais são mostradas na Figura 2.1. Uma descrição breve a respeito de cada um deles será feita nos próximos parágrafos desse capítulo. Em virtude das propriedades químicas de cada uma dessas superfícies, foram realizadas algumas aplicações para esses alumoxanos, o que permitirá que o leitor possa notar como que, através do conhecimento sobre as estruturas químicas das suas superfícies e dos conceitos abordados no capítulo anterior, os alumoxanos puderam ser empregados nesse trabalho.

Alumoxano benzoato é o termo referente à alumina com a superfície modificada com ácido benzóico. A superfície da alumina, inicialmente hidrofílica pela presença de grupos OH, tornou-se hidrofóbica, uma vez que após a reação, grupos fenila, os quais são apolares, ficaram expostos na superfície, conforme mostra a Figura 2.1a. Essa mudança na característica da superfície de polar para apolar foi passível de ser estudada medindo-se a diferença na energia superficial do alumoxano, através de medidas de ângulo de contato de um líquido sobre a superfície do material sólido.

Em relação ao alumoxano oxalato, esse é o termo referente à alumina com a superfície modificada com ácido oxálico. A estrutura desse material é mostrada na Figura 2.1b. Ao se modificar a superfície da alumina com esse ácido, os grupos OH foram substituídos por grupos carboxila. O intuito dessa substituição consistiu na tentativa de modificação das características da alumina relativas à sua biocompatibilidade em virtude de já haver trabalhos na literatura que relacionam a biocompatibilidade de um material à presença desses grupos na superfície [28,29].

Na Figura 2.1c é mostrada a estrutura do alumoxano vinil-acetato, um composto obtido através da reação entre a alumina e o ácido vinil-acético. Através dessa reação, a superfície da alumina passou a apresentar ligações duplas. Esse tipo de ligação apresenta reatividade adequada para que outros grupos possam ser inseridos através de reações de adição eletrofílica [30]. Em outras palavras, a formação do alumoxano vinil-acetato abriu a possibilidade da funcionalização da alumina por grupos que originalmente não poderiam ser inseridos através de uma reação química com apenas uma etapa.

Pelas estruturas mostradas na Figura 2.1d e 2.1e, nota-se uma semelhança funcional entre o alumoxano oxalato, alumoxano succinato e alumoxano adipato. As suas superfícies apresentam grupos carboxilatos livres, em virtude dos materiais serem oriundos de ácidos dicarboxílicos. O que os diferencia é o tamanho da cadeia carbônica, visto que no alumoxano oxalato não há grupos metileno entre as duas carboxilas, no alumoxano succinato há dois e no alumoxano adipato, quatro. Através da síntese dos alumoxanos succinato e adipato, foi possível um estudo de comparação do comportamento do alumoxano oxalato com alumoxanos provenientes de ácidos dicarboxílicos com cadeias mais longas. Como continuação do trabalho com o alumoxano oxalato como biomaterial, esperava-se constatar se não só a presença de grupos carboxila na superfície da alumina ocasionava uma melhora em relação às suas propriedades relacionadas à biocompatibilidade, mas também se houve influência do comprimento da cadeia carbônica do grupo pendente na alteração dessa propriedade.

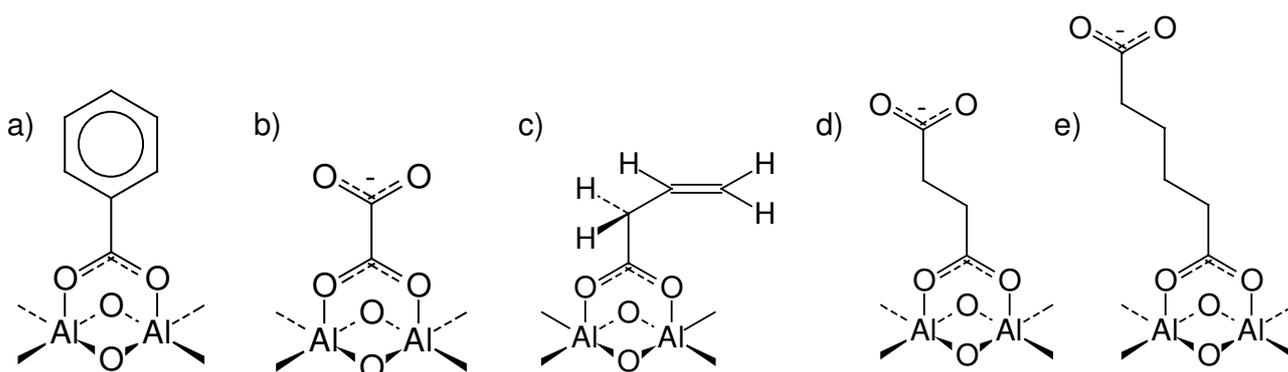


Figura 2.1: Estrutura simplificada dos alumoxanos sintetizados nesse trabalho: alumoxano benzoato (a), alumoxano oxalato (b), alumoxano vinil-acetato (c), alumoxano succinato (d) e alumoxano adipato (e).

3. PARTE EXPERIMENTAL

Antes de apresentar ao leitor o procedimento experimental detalhado desse trabalho, na sessão 2.1 são listados os reagentes, equipamentos e materiais de laboratório utilizados.

3.1. Reagentes, Equipamentos e Materiais

3.1.1. Reagentes Utilizados

- $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ P.A. (Merck)
- Uréia P.A. (Swartz/Mann)
- Al_2O_3 P.A. (Merck)
- NaOH P.A. (Synth)
- Ácido benzóico P.A. (Química Fina)
- Ácido oxálico dihidratado P.A. (Merck)
- Ácido vinil-acético 97% (Aldrich)
- Etanol P.A. (Synth)
- Xilol P.A. (Merck)
- THF P.A. (Merck)
- NaCl P.A. (Synth)
- KCl P.A. (Synth)
- Na_2CO_3 P.A. (Synth)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ P.A. (Synth)
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ P.A. (Synth)
- Na_2SO_4 P.A. (Synth)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ P.A. (Ecibra)
- MTT P.A. (Sigma)
- DMSO P.A. (Merck)
- Meio α MEM (Nutricel)
- FBS P.A. (Nutricell)
- Penicilina P.A.

- Estreptomicina P.A.
- Células de pré-osteoblastos de camundongo MC3T3-E1
- Cloridato de xilazina 2% (Vyrbaxil)
- Cloridato de cetamina (Francotar)

3.1.2. Equipamentos e Materiais de Laboratório Utilizados

- Vidrarias em geral
- Banho termostático Q-226M2 (Quimis)
- pHmetro 827 pH lab (Metrohm)
- Chapa de Aquecimento modelo 752A (Fisatom)
- Manta de Aquecimento classe 300 (Fisatom)
- Ultra-som Thornton (Art Lab)
- Balança Analítica AY220 (Shimadzu)
- Estufa 315 SE (Fanem)
- Forno Edgcon 3P (EDG Equipamentos)
- Placas para cultura de células (Corning)
- Espectrômetro FTIR Modelo B100 (Bomem MB-Series)
- Prensa hidráulica Modelo 3912 (Carver)
- Analisador termogravimétrico TGA 2050 (TA Instruments)
- Difrator de Raios-X XRD 7000 (Shimadzu)
- Analisador elementar (Perkin Elmer 2400)
- Microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6360LV)
- Metalizador (Voltec)
- Analisador de Área (QuantaChrome Autosorb-1)
- Microscópio óptico (Micronal)
- Câmera fotográfica digital (Sony CCD-Iris/RGB)

3.2. Sínteses dos Materiais

3.2.1. Preparação dos Óxidos de Alumínio

3.2.1.1. γ -Alumina

A síntese de γ -alumina através do processo sol-gel é um procedimento conhecido no grupo de pesquisa em que esse projeto foi desenvolvido, sendo essa síntese reportada por Macedo, Osawa e Bertran [31]. O trabalho desses pesquisadores serviu de base para a preparação desse material. Nesse procedimento, nitrato de alumínio eneahidratado ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) foi dissolvido em água destilada até próximo do ponto de saturação (70g/100mL de água). Em seguida, adicionou-se uréia de modo a se atingir uma razão molar Al^{3+} /uréia de 1/13 em solução. A solução foi mantida em repouso à temperatura ambiente por uma hora e filtrada por gravidade em seguida, utilizando-se papel de filtro qualitativo.

A solução foi mantida em estufa em torno de 90°C até o início da formação do gel, quando foi calcinada à 300°C durante uma hora. Para a completa eliminação das impurezas provenientes da síntese no material, após a calcinação foram realizados os seguintes procedimentos:

- tratamento térmico da amostra em etanol à 70°C durante oito horas;
- calcinação da amostra à 400°C por três horas.

3.2.1.2. α -Alumina

A α -alumina sintetizada nesse projeto foi obtida através da calcinação da γ -alumina. Nesse procedimento, o pó de γ -alumina sintetizada foi calcinado à 950°C durante três horas em um primeiro experimento e em um segundo, repetiu-se o procedimento, alterando-se apenas o tempo de calcinação para setenta e duas horas. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, reagiram-se os pós formados com uma solução 1M de NaOH para a formação de grupos OH na superfície dos materiais, sob agitação magnética à temperatura ambiente por cinco minutos. Em seguida, foi feita

filtração simples e lavagem de cada material com água deionizada. Por fim, as amostras foram mantidas em estufa à 100°C por doze horas.

3.2.1.3. Alumina Comercial

O óxido de alumínio da Merck, que de agora em diante será chamado nesse trabalho de alumina comercial, foi modificado para a formação de grupos OH na sua superfície utilizando-se o mesmo procedimento de reação com solução aquosa de NaOH da α -alumina, assim como o restante do procedimento (filtração, lavagem com água deionizada e secagem).

3.2.2. Preparação dos Alumoxanos

Síntese a partir do pó de alumina

Todas as sínteses foram realizadas em um sistema bifásico, contendo uma fase sólida (pó de alumina) e uma fase líquida (ácido carboxílico + solvente). Cada alumoxano foi obtido através da reação da alumina com o seu respectivo ácido carboxílico. Inicialmente foram realizadas sínteses em pequena escala para que o procedimento fosse testado. Para cada alumoxano esse procedimento foi realizado em triplicata, consistindo na dissolução de 0,028mol de ácido carboxílico em 25mL de solvente. Essa solução foi colocada em um balão de fundo redondo de 50mL. Em seguida adicionou-se 0,714g de pó de alumina (γ -alumina calcinada à 300°C e tratada com etanol à 70°C, alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH 1M e α -alumina calcinada durante setenta e duas horas) previamente moída em um moinho de bolas durante duas horas, de modo que a proporção molar ácido carboxílico/alumina fosse de 4/1, conforme reportado por Barron e colaboradores [1]. A exceção ocorreu na síntese do alumoxano adipato, em que essa mesma razão foi de 2/1.

Após a realização das sínteses de alumoxano carboxilato em pequena escala, foram realizadas as sínteses em grande escala, com um aumento de dez vezes na massa dos reagentes e dos volumes de solvente e dos balões de fundo redondo,

mantendo-se a mesma proporção molar ácido carboxílico/alumina. Esse procedimento foi realizado em duplicata.

Todos os sistemas foram mantidos em capela sob refluxo, adicionando-se a cada balão algumas pedras de ebulição. O tempo total do processo de síntese em todos os procedimentos foi o mesmo que o do trabalho do grupo de pesquisa da Rice University: noventa e seis horas. Entretanto, enquanto que Barron e colaboradores realizaram a síntese em quatro dias, por se tratar de um procedimento sem interrupção, as sínteses apresentadas nessa dissertação ocorreram em doze dias, mantendo-se os sistemas em refluxo durante oito horas diárias. O xilol foi utilizado inicialmente como solvente, já que no trabalho empregado como referência para esse procedimento foi feito o mesmo. Porém, ocorreu a busca por outros solventes ao longo do desenvolvimento do trabalho dessa dissertação. Foram sintetizados os alumoxanos benzoato, oxalato, vinil-acetato e adipato, utilizando-se os ácidos benzóico, oxálico, vinil-acético e adípico, respectivamente. O aparato utilizado para as sínteses pode ser observado na Figura 3.1 e na Tabela 3.1 são mostradas as informações a respeito de cada síntese.

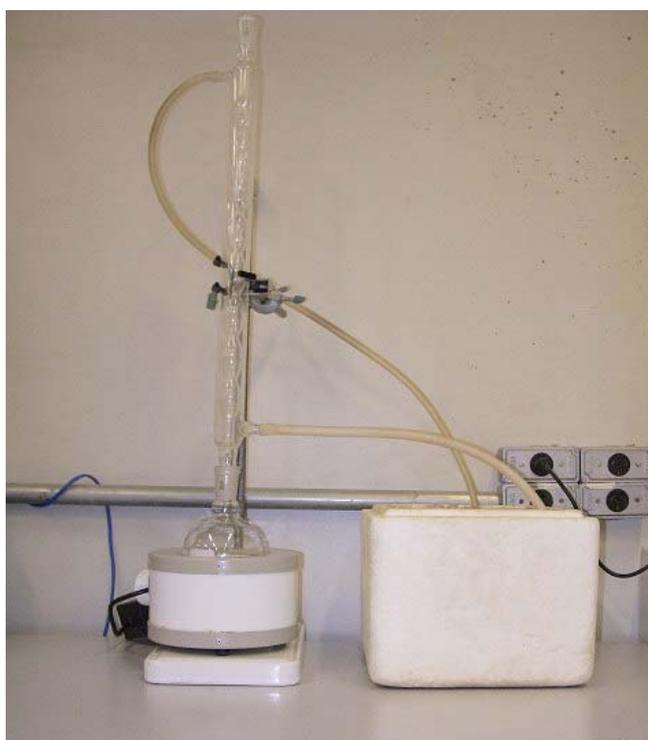


Figura 3.1: Aparato para a síntese dos alumoxanos.

Tabela 3.1: Aluminas e solventes utilizados na síntese de cada alumoxano.

Alumoxano	alumina utilizada	Solvente	m _{ácido} (g)	t _{reação} (h)	T _{refluxo} (°C)
benzoato	γ -alumina alumina comercial	xilol	3,42 e 34,2 ácido benzóico	96	144
oxalato	γ -alumina α -alumina alumina comercial	THF	2,52 e 25,2 ácido oxálico	96	66
vinil-acetato	alumina comercial	THF	2,41 e 24,1 ácido vinil-acético	96	66
adipato	alumina comercial	THF	2,05 e 20,5 ácido adípico	96	66

Após a modificação das superfícies, todos os materiais obtidos foram lavados com etanol por cinco vezes, utilizando-se 25mL em cada lavagem, para eliminar o ácido carboxílico residual e por fim, secados em estufa à 90°C.

Síntese a partir dos discos de alumina

Para realizar a modificação na superfície dos corpos de alumina foram preparados discos a partir do pó de alumina comercial após a reação com solução aquosa de NaOH, prensando-se 100mg desse material para cada disco à 8000psi, utilizando-se uma prensa hidráulica. As dimensões dos discos resultantes eram de 1cm de diâmetro e 2mm de espessura. A modificação da superfície dos discos foi realizada pela reação dos materiais com os ácidos oxálico, succínico e adípico. Para isso, foram preparadas soluções separadas de 0,02M desses ácidos dicarboxílicos em etanol. Cada solução foi mantida à 70°C em frascos de vidro fechados, imergindo-se pastilhas de alumina em cada um deles durante oito horas, conforme reportado por Bertran e colaboradores [12]. Após o término da síntese, os discos foram imersos em etanol por cinco vezes, para que os ácidos dicarboxílicos residuais pudessem ser removidos, e secados à temperatura ambiente. Foram preparadas cem pastilhas de cada alumoxano.

3.3. Caracterização dos Materiais

Para a caracterização dos materiais foram empregadas as seguintes técnicas:

- espectroscopia na região do infravermelho (FTIR): os pós das aluminas, dos alumoxanos e de seus respectivos ácidos carboxílicos foram analisados utilizando-se pastilha de KBr, exceto o ácido vinil-acético, cujo espectro foi obtido utilizando-se uma cela de líquidos, no intervalo espectral entre 4000 e 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans;
- análise elementar (CHN), com as análises sendo realizadas em triplicata para cada amostra;
- área superficial (ASAP), com tratamento térmico prévio das amostras à 110°C para eliminação de umidade. Utilizou-se o N_2 como adsorbato à 77K e as análises foram realizadas em duplicata para cada amostra;
- microscopia eletrônica de varredura (SEM): para as microscopias, alguns miligramas do pó de cada material foram colocados em erlenmeyers e adicionaram-se 10mL de isopropanol em cada um deles. Cada amostra foi submetida a ultra-som durante vinte e cinco minutos e em seguida uma gota foi depositada em cima do porta-amostra de microscopia, deixando-se o isopropanol evaporar à temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram recobertas com carbono. Essa análise foi realizada em duplicata para cada amostra;
- difratometria de raios-X (DRX): para as amostras de γ -alumina calcinada à 300°C e tratada com etanol à 70°C antes e após as calcinações à 950°C durante três e setenta e duas horas, foram realizadas análises com voltagem de 40kV e 30mA de corrente, utilizando-se a radiação do alvo de cobre (1,5418Å) e velocidade de aquisição de 2°/min, em um intervalo de 2θ entre 5 e 65°.
- análise termogravimétrica (TGA): amostras de γ -alumina calcinada à 300°C e tratada com etanol à 70°C, alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH e dos alumoxanos sintetizados a partir desse óxido de alumínio foram analisadas sob atmosfera inerte e taxa de aquecimento de 10°C/min. Também foram analisadas as misturas mecânicas de alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH com cada um dos ácidos carboxílicos, mantendo-se a mesma porcentagem em massa de carbono na amostra que foi obtida por CHN para cada alumoxano.

3.4. Aplicações dos Alumoxanos

3.4.1. Superfícies Hidrofóbicas

Para os estudos das superfícies hidrofóbicas dos alumoxanos, foram realizadas medidas de ângulo de contato das superfícies dos alumoxanos benzoato e adipato sintetizados a partir da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH. Para isso, foram preparados discos a partir dos pós desses materiais, através do mesmo procedimento relatado no item 3.2.1 para os discos de alumina. Como o alumoxano adipato foi sintetizado tanto pela modificação do pó como pela modificação dos discos de alumina, vale ressaltar que para as medidas de ângulo de contato os discos foram confeccionados a partir do pó desse alumoxano. Discos de alumina comercial tratada com NaOH também foram confeccionados para que os valores de ângulo de contato antes e após a modificação da superfície com os ácidos carboxílicos pudessem ser comparados.

Os discos dos materiais foram colocados em um suporte que se encontrava em frente ao microscópio óptico, o qual fora colocado na posição horizontal para a obtenção das imagens. O líquido utilizado no experimento foi água deionizada, a qual foi gotejada na superfície dos discos. Com o auxílio de uma máquina fotográfica digital, foram obtidas imagens do sistema e o ângulo de contato do líquido na superfície foi obtido com o auxílio do programa Image Pro Plus instalado no computador acoplado à câmera digital. Para uma melhor visualização por parte do leitor, uma foto do aparato descrito é mostrada na Figura 3.2. Esse procedimento foi realizado medindo-se o ângulo de contato das superfícies de cinco discos de cada um desses materiais.

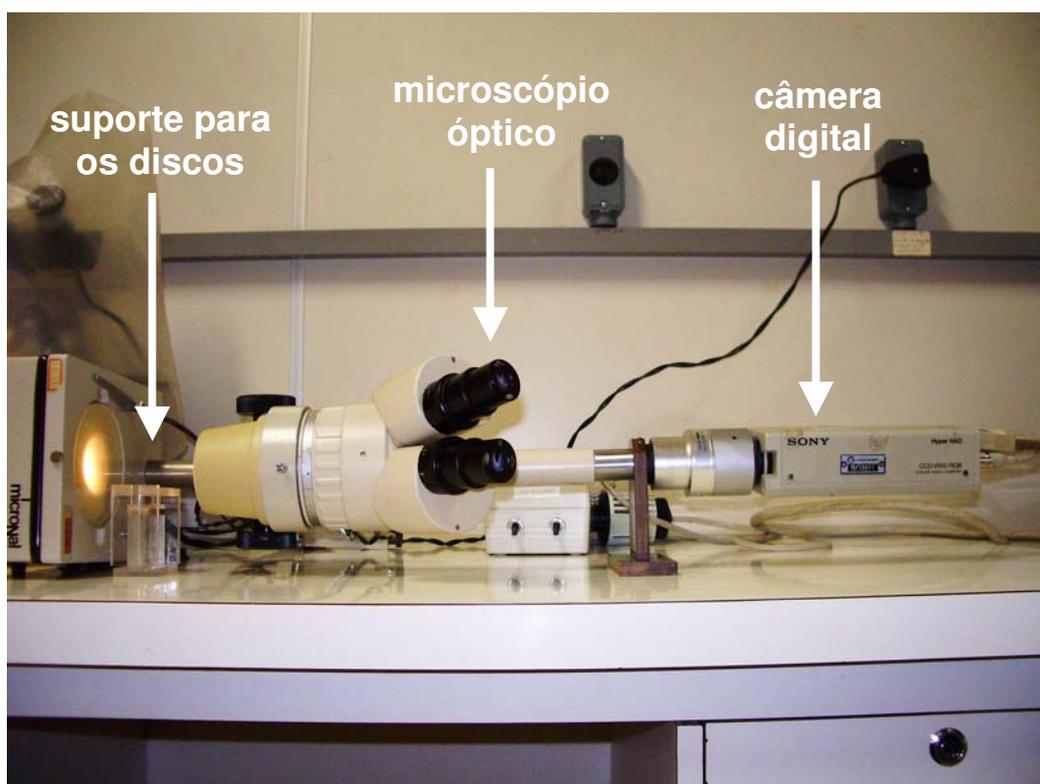


Figura 3.2: Aparato para a determinação de ângulo de contato.

3.4.2. Testes de Biomimética

Para os testes de biomimética, utilizaram-se discos de alumoxano oxalato, succinato e adipato. Os discos dos alumoxanos foram obtidos de duas formas diferentes. A primeira delas, pela modificação da superfície dos discos de alumina e a segunda, pela prensagem dos pós dos alumoxanos. Na Tabela 3.2 são mostrados quais alumoxanos foram obtidos por cada um desses procedimentos.

O procedimento para os testes de biomimética foi a imersão em SBF dos discos de alumoxano oxalato, succinato e adipato e das aluminas com e sem tratamento com NaOH. Os discos foram imersos em SBF à 37°C durante oito horas. Após isso, as amostras foram lavadas com água deionizada e secadas realizando-se o mesmo procedimento descrito no item 3.2.2 para a modificação da superfície das pastilhas.

Todas essas superfícies foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) e por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para se obter o mapeamento elementar das superfícies, com as análises sendo realizadas em triplicata.

Os resultados de precipitação de fosfato de cálcio após imersão em SBF serviram de base para a escolha das amostras para os testes de biocompatibilidade.

Tabela 3.2: Obtenção dos discos para os testes de biocompatibilidade.

Obtenção	Alumoxano
prensagem do pó dos alumoxanos	oxalato
modificação da superfície dos discos de alumina	oxalato succinato adipato

3.4.3. Testes de Biocompatibilidade

3.4.3.1. Testes *in vitro*

Para os testes de biocompatibilidade *in vitro* foram realizados experimentos de adesão celular. Para isso, foram realizados experimentos de redução do MTT [32]. Nesse experimento, foram utilizadas células de pré-osteoblastos de camundongo MC3T3-E1, cuja cultura foi feita em meio α MEM sem ácido ascórbico, contendo 10% de FBS, 100 unidades/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina à 37°C em um incubador umidificado com atmosfera de 5% de CO₂. O procedimento foi realizado no Laboratório de Sinalização Celular, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, com a colaboração da Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira e de seu aluno de doutorado Willian Fernando Zambuzzi.

Os osteoblastos foram plaqueados em placas de 24 poços (4x10⁴ células/poço) sobre os discos de: alumina comercial tratada com NaOH, alumoxano oxalato sintetizado a partir da alumina comercial tratada com NaOH e esse mesmo alumoxano oxalato recoberto com fosfato de cálcio, após imersão em SBF. Foram utilizados dezesseis discos de cada material.

Nesse experimento de adesão e crescimento celular, após cada período de tempo (seis, doze e vinte e quatro horas) para cada tipo de disco, o meio de cultura foi gentilmente removido e adicionou-se 1mL de meio de cultura contendo solução de 1mg/mL de MTT. Depois de quatro horas de incubação, à 37°C, esse meio foi

totalmente removido e os cristais de formazano formados foram solubilizados em 1mL de DMSO. As soluções foram homogeneizadas em um agitador de placas e as absorbâncias à 570nm foram lidas em um leitor de placas.

3.4.3.2. Testes *in vivo*

O procedimento foi realizado com a colaboração do Prof. Dr. José Angelo Camilli do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP e de seu aluno de doutorado Wilson Romero Nakagaki, implantando-se em ratos Wistar o alumoxano oxalato sintetizado a partir da alumina comercial tratada com NaOH na forma de pó e após o experimento de imersão em SBF. Como controle, também foi implantado o pó de alumina comercial tratada com NaOH. Todo o procedimento empregado foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP, mostrado no Capítulo 7 dessa dissertação.

A primeira etapa do experimento consistiu no procedimento cirúrgico, o qual pode ser brevemente detalhado da seguinte maneira: os animais foram anestesiados utilizando-se uma solução 1:1 de cloridato de xilazina e cloridato de cetamina, administrada por via intramuscular na dose de 5mg/kg e 10mg/kg, respectivamente, e as suas cabeças foram tricotomizadas e desinfetadas. Em seguida foram feitas incisões longitudinais na pele da calota craniana e o perióstio foi rebatido para expor a superfície do osso parietal direito. Com um *punch*, foi produzida uma falha (defeito) óssea, com 5mm de diâmetro, que atravessou por completo a espessura da parede do osso. Para cada falha utilizou-se um material diferente para preenchê-la, ou seja, em uma delas, utilizou-se alumina e na outra, alumoxano oxalato recoberto com fosfato de cálcio. Uma das falhas permaneceu vazia. Por último, os animais foram suturados.

Após 14 dias, os animais foram sacrificados e as suas calotas cranianas foram fixadas em solução de formalina a 10% em solução de tampão fosfato 0,1M pH 7, por um período de setenta e duas horas à temperatura ambiente, e em seguida foram imersas em solução de EDTA para a descalcificação. As amostras foram desidratadas em gradiente de álcool, diafanizados em xilol e embebidas em parafina líquida à 60°C para confecção dos blocos de parafina. Foram obtidos cortes transversais (6µm de espessura) que foram corados com hematoxilina-eosina. Os cortes histológicos foram analisados por microscopia óptica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira parte desse capítulo, serão mostradas as caracterizações dos óxidos de alumínio que serviram como material de partida para a síntese dos alumoxanos, resultando na modificação das superfícies desses óxidos, assim como as caracterizações dos alumoxanos carboxilatos formados. Na segunda parte, serão mostradas as aplicações dos alumoxanos. Nessa segunda parte, serão discutidos inicialmente os resultados envolvendo os estudos de ângulo de contato da superfície dos alumoxanos benzoato e adipato em comparação com a superfície da alumina sem modificação com esses ácidos. Serão apresentados também os resultados dos testes de biomimética e de biocompatibilidade para os alumoxanos oxalato, succinato e adipato e será feita uma discussão da diferença de comportamento nesses testes das superfícies modificadas das aluminas em relação às mesmas superfícies sem modificação.

4.1. Caracterização dos Materiais

4.1.1. Alumina

Após a síntese da γ -alumina, a caracterização espectroscópica do material foi obtida por espectroscopia na região do infravermelho. Na Figura 4.1 é mostrado o espectro desse material após a calcinação à 300°C e tratamento térmico à 70°C com etanol, assim como o espectro de uma amostra de alumina comercial após o tratamento com solução aquosa de NaOH 1M descrito no item 3.2.1.3. No espectro de FTIR para a γ -alumina, mesmo após a calcinação à 300°C e tratamento térmico com etanol, ainda é possível observar bandas reduzidas na região de 3200 e 1100 cm^{-1} que indicam ainda a presença de uma pequena quantidade residual de uréia [33] na γ -alumina. A Figura 4.1 mostra ainda que os espectros de FTIR de ambas as aluminas apresentam bandas intensas na região entre 600 e 800 cm^{-1} que podem ser atribuídas à presença de íons alumínio com coordenação tetraédrica e octaédrica, respectivamente [31].

A presença de uréia na γ -alumina após a calcinação à 300°C e tratamento térmico com etanol à 70°C também pode ser comprovada pela quantidade média de carbono

obtida por análise elementar. Os resultados obtidos para esse material indicaram que a porcentagem média em massa de carbono nas amostras foi $10,0 \pm 0,2\%$, enquanto que para as amostras de alumina comercial após tratamento com NaOH esse valor foi de $0,3 \pm 0,1\%$.

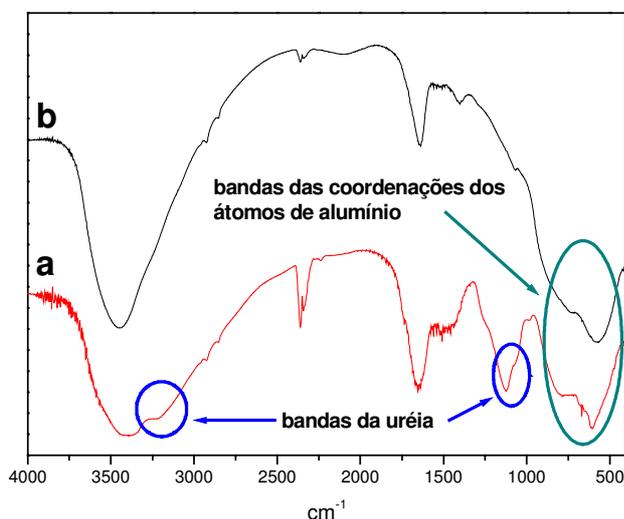


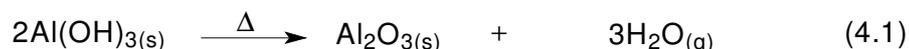
Figura 4.1: Espectros na região do infravermelho obtidos a partir de pastilha de KBr da γ -alumina após calcinação à 300°C e tratamento térmico com etanol à 70°C (a) e da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH 1M (b).

O tratamento térmico com etanol à 70°C da γ -alumina calcinada à 300°C foi eficaz para a remoção do nitrato residual do material, proveniente da sua síntese. Por outro lado, foi ineficiente para a eliminação completa da uréia. Em consequência desse fato, buscou-se a eliminação da uréia através de procedimentos de calcinação a temperaturas mais elevadas. Porém, era necessária a obtenção de uma faixa de temperatura de calcinação em que a uréia pudesse ser eliminada sem que houvesse uma diminuição da quantidade de grupos OH na superfície do material, os quais eram essenciais para a síntese dos alumoxanos carboxilatos. Dessa forma, empregou-se a análise termogravimétrica para esse estudo.

As análises por termogravimetria das amostras da γ -alumina calcinada à 300°C e tratada com etanol à 70°C e da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH 1M mostradas, respectivamente, nas Figuras 4.2a e 4.2b mostram diferenças quanto a perda de massa ao longo do aquecimento. Para a alumina comercial, a perda de massa é contínua enquanto que para a γ -alumina há uma perda abrupta de massa a

partir de 250°C. Como as aluminas contêm uma quantidade significativa de água adsorvida, os termogramas não mostram uma indicação direta da transformação dos grupos Al-OH em Al₂O₃, através da perda de água. Portanto, a estimativa da faixa de temperatura em que essa transformação ocorreu foi feita utilizando-se as seguintes considerações:

- a temperaturas acima de 1000°C, as amostras estão na forma de α-alumina. Sendo assim, considerou-se a fórmula Al₂O₃ para representar essa forma.
- a temperaturas inferiores à faixa de temperatura em que ocorreu a perda de massa correspondente aos grupos OH da superfície dos materiais, considerou-se a fórmula Al(OH)₃ para essas aluminas.
- a partir dessas duas considerações, com o valor da massa da amostra no final da análise, que correspondia apenas à Al₂O₃, foi possível obter o número de mols de α-alumina.
- considerou-se que a diminuição dos grupos OH da superfície da amostra ocorreu através da reação química mostrada na Equação 4.1:



- utilizando-se a estequiometria da reação, com o número de mols de α-alumina, obteve-se o número de mols de Al(OH)₃, e conseqüentemente, a sua massa. Com esse valor de massa foi possível determinar a região do termograma em que a reação da Equação 4.1 ocorreu.

Tanto para a alumina comercial quanto para a γ-alumina, ao se confrontarem os resultados obtidos pelos cálculos com os termogramas da Figura 4.2, a faixa de temperatura em que o processo mostrado na Equação 4.1 ocorre está entre 450 e 500°C. Esses valores encontram-se próximos aos reportados na literatura para a perda de massa relativa à diminuição dos grupos OH em compostos de alumínio [34,35].

Após a obtenção desse resultado, era necessário que se determinasse a temperatura em que ocorreu a eliminação da uréia na γ-alumina calcinada à 300°C e tratada com etanol à 70°C. Por comparação entre as Figuras 4.2a e 4.2b, atribui-se à região de máximo da curva da derivada da perda de massa em função da temperatura na amostra de γ-alumina ocorrida na região de 350°C a perda de massa proveniente da uréia residual, visto que não é observado nenhuma variação significativa de massa na amostra de alumina comercial após tratamento com solução aquosa de NaOH para

essa mesma faixa de temperatura. Com a perda de uréia ocorrendo em torno de 300°C e a diminuição dos grupos OH na superfície da γ -alumina em torno de 450°C, tentou-se calcinar esse material à 400°C para promover a eliminação da uréia. Entretanto, a porcentagem média em massa de carbono para as amostras calcinadas a essa temperatura não apresentou uma redução significativa no seu valor mesmo após essa nova tentativa de calcinação.

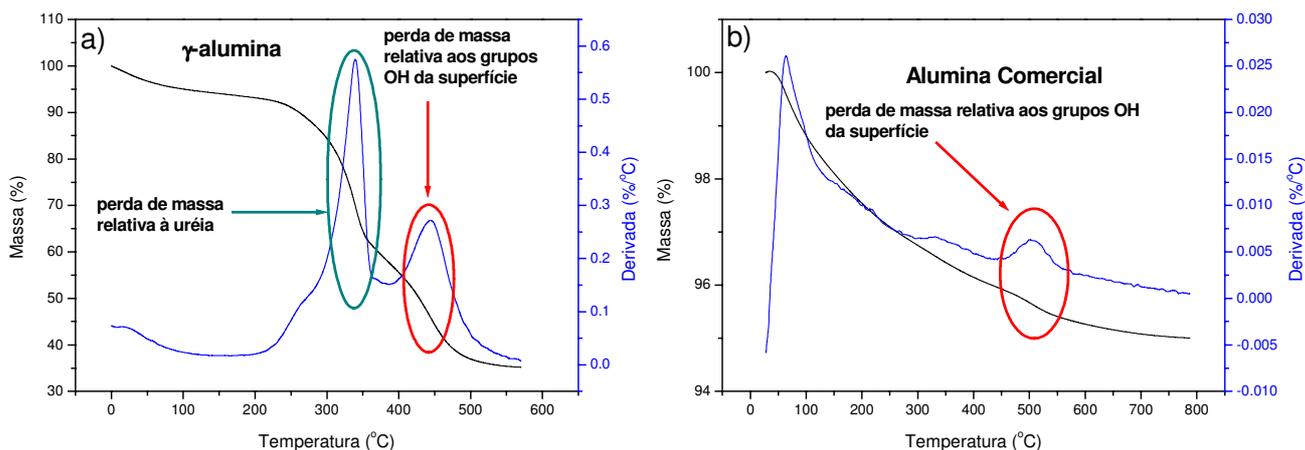


Figura 4.2: Termogramas das análises termogravimétricas da γ -alumina após calcinação à 300°C e tratamento térmico com etanol à 70°C (a) e da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH 1M (b).

Em todos os procedimentos de calcinação da γ -alumina havia a preocupação com um aquecimento excessivo do material. Isso provocaria a perda dos grupos OH na superfície. Entretanto, em virtude dos resultados apresentados no parágrafo anterior, após a calcinação para a formação do material à 300°C, assim como à 400°C e o tratamento com etanol para a eliminação do nitrato residual, partiu-se para a tentativa de eliminação da uréia com a calcinação da γ -alumina à 950°C. Conforme relatado anteriormente, esse procedimento também provocaria a perda dos grupos funcionais da superfície do material, havendo a necessidade de um procedimento para a formação dos grupos OH na sua superfície. A formação desses grupos ocorreu da mesma forma que na alumina comercial, através da reação química de oxidação [36] entre a solução aquosa de NaOH e a superfície da alumina calcinada à 950°C.

Para avaliar a transformação da γ -alumina à forma α , pela calcinação do material durante três e setenta e duas horas à 950°C, na Figura 4.3 são mostrados os

difratogramas de raios-X antes e após as calcinações e para se fazer uma comparação entre as porcentagens em massa de carbono residual antes e após o experimento, foram feitas determinações por CHN e os resultados são mostrados na Tabela 4.1.

Ao se analisarem os difratogramas da Figura 4.3, é possível notar que após três horas de calcinação, a γ -alumina não é inteiramente convertida para a forma α , embora haja a presença de picos relativos a essa última forma [37]. Porém, os picos referentes à α -alumina após três horas de calcinação são muito menores que os picos apresentados pelo difratograma da amostra calcinada durante setenta e duas horas. Entretanto, mesmo sem a conversão total para a forma α , a calcinação à 950°C durante três horas foi suficiente para a eliminação do carbono residual da amostra, conforme é mostrado na Tabela 4.1, não havendo uma variação significativa no valor da porcentagem mássica de carbono em função do tempo de calcinação.

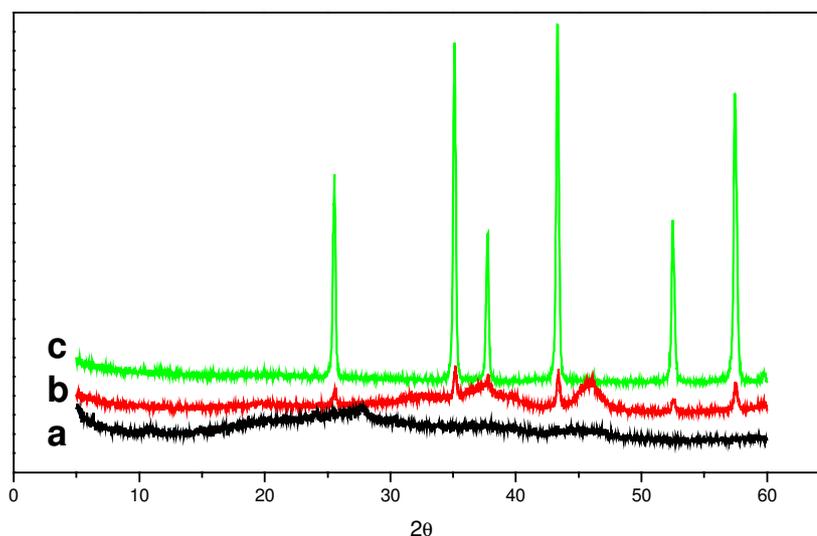


Figura 4.3: Difratogramas de raios-X da γ -alumina após calcinação à 300°C e tratamento térmico com etanol à 70°C antes de ser calcinada à 950°C (a), após 3 horas de calcinação à 950°C (b) e após 72 horas de calcinação à 950°C (c).

Tabela 4.1: Porcentagens médias de massa de carbono na γ -alumina antes e após à calcinação à 950°C.

Alumina	γ -alumina antes da calcinação	γ -alumina calcinada 950°C/3h	γ -alumina calcinada 950°C/72h
% em massa de C	10,0±0,2%	0,3±0,1%	0,2±0,1%

Para reforçar os resultados discutidos anteriormente, na Tabela 4.2 são mostrados os valores das áreas sob os picos dos difratogramas das amostras de γ -alumina calcinadas à 950°C. Pelos valores obtidos na integração dos picos é possível notar que a amostra calcinada durante setenta e duas horas apresentou uma maior conversão para a forma α (podendo-se afirmar que a conversão foi total) do que a amostra calcinada durante três horas. Ao se analisarem as razões entre as áreas sob os picos para essas duas amostras, nota-se que o menor valor de A_{72h}/A_{3h} é 4, tornando mais evidente essa conclusão. Vale destacar aqui que a escala utilizada nos difratogramas é a mesma e que o deslocamento ao longo do eixo y das amostras calcinadas em relação à original foi feito meramente para uma melhor visualização dos difratogramas pelo leitor.

Tabela 4.2: Áreas dos picos das amostras calcinadas de γ -alumina.

2θ	A_{3h}	A_{72h}	A_{72h}/A_{3h}
25	62	308	5
35	107	496	5
38	61	218	4
43	97	554	6
52	42	270	6
57	80	538	7

O emprego das aluminas utilizadas como material de partida deveu-se ao conhecimento acumulado do grupo de pesquisa no qual esse trabalho foi desenvolvido, em função de outros trabalhos realizados com esses materiais. A γ -alumina sintetizada via sol-gel foi utilizada inicialmente devido à presença de grupos OH na superfície desse material. O aspecto novo e que não havia sido tratado até o momento nos trabalhos desse grupo de pesquisa foi a presença de uréia residual mesmo após a calcinação à 400°C. Considerando-se a temperatura de calcinação, é provável que as bandas atribuídas à uréia sejam, na verdade, características de biureto, substância formada pelo aquecimento da uréia a temperaturas elevadas.

Embora as presenças de uréia ou biureto não sejam empecílios para a síntese dos alumoxanos, a presença desses compostos não era conveniente para os testes do alumoxano oxalato em relação à biocompatibilidade desse material, devido à toxicidade desses compostos para os pré-osteoblastos usados nesses testes. Dessa

maneira, fez-se necessária a utilização de outros tipos de alumina como reagentes para as sínteses dos alumoxanos carboxilatos no decorrer do desenvolvimento deste trabalho. Com isso, enquanto eram feitos os experimentos para a elaboração de um procedimento para eliminação da uréia da γ -alumina, eram feitas as sínteses dos alumoxanos utilizando-se alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH.

Em relação à α -alumina, o seu emprego nesse trabalho deveu-se ao sucesso dos experimentos de biomimética para o alumoxano oxalato sintetizado a partir da γ -alumina após calcinação à 300°C e tratamento térmico com etanol e dos experimentos de biomimética e biocompatibilidade para esse alumoxano sintetizado a partir da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH, conforme será mostrado nos próximos itens desse capítulo. Esses resultados abriram a perspectiva de se tentar repetir esses experimentos para a α -alumina. Vale destacar que nas próteses de alumina é a forma α que é utilizada, já que o processo de confecção de uma prótese desse material envolve a sua sinterização, que acontece em temperaturas superiores à conversão para a forma α . Portanto, a obtenção de um biomaterial a partir de uma superfície modificada de α -alumina em pó com ácido oxálico seria um primeiro passo para a possibilidade de modificação de superfície de um corpo sinterizado de α -alumina.

4.1.2. Alumoxanos

4.1.2.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho

Da mesma forma que para as aluminas, a primeira caracterização dos alumoxanos foi realizada utilizando-se a espectroscopia na região do infravermelho. Na Figura 4.4 são mostrados os espectros de FTIR do alumoxano benzoato sintetizado a partir da γ -alumina calcinada à 300°C e tratada com etanol e também a partir da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH em comparação com o espectro do ácido benzóico.

Pode-se visualizar nos espectros dos alumoxanos benzoatos que a banda referente ao grupo carboxila [33] (região 1) está deslocada e desdobrada em 1610 e 1570 cm^{-1} , em relação à mesma banda no ácido benzóico (região 2). As bandas dessa

região, assim como as da região de 1460cm^{-1} (região 3), também são reportadas como provenientes da ligação bidentada entre a alumina e o ácido carboxílico [1], nesse caso, representada na Figura 2.1a, resultado espectroscópico que mostra o sucesso da síntese. No espectro do alumoxano benzoato sintetizado a partir da γ -alumina, nota-se a presença de bandas reduzidas provenientes da uréia (regiões 4 e 5), da mesma forma e nas mesmas regiões do espectro que a γ -alumina utilizada como reagente, conforme já indicado na Figura 4.1. Dessa maneira, a presença de uréia nesse alumoxano não atrapalhou a caracterização desse material.

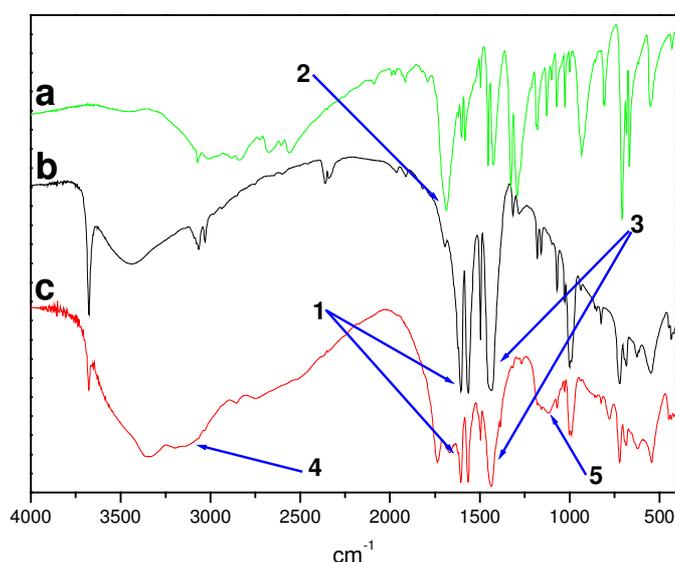


Figura 4.4: Espectros na região do infravermelho obtidos em pastilha de KBr para o ácido benzóico (a) e para os alumoxanos benzoatos sintetizados a partir da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH (b) e da γ -alumina após calcinação à 300°C e tratamento térmico com etanol (c). Região 1: banda referente ao grupo carboxila dos alumoxanos benzoatos. Região 2: banda referente ao grupo carboxila do ácido benzóico. Região 3: banda proveniente da ligação bidentada entre a alumina e o ácido carboxílico. Regiões 4 e 5: bandas provenientes da uréia residual.

A comparação do espectro na região do infravermelho do alumoxano oxalato (Figura 4.5) com o alumoxano benzoato indica similaridades e diferenças entre os dois espectros no que se refere às principais bandas de absorção desses materiais. A banda atribuída à ligação bidentada do ácido carboxílico com a superfície da alumina, que no alumoxano benzoato situa-se na região de 1460cm^{-1} , encontra-se deslocada para um

menor número de onda no alumoxano oxalato, em 1420cm^{-1} (região 6). Já em relação à banda na região de 1600cm^{-1} no alumoxano benzoato, no alumoxano oxalato a sua presença ocorre em uma região de número de onda maior, em 1680cm^{-1} (região 7), não havendo o desdobramento da mesma, como ocorreu no alumoxano benzoato. Esse valor de 1680cm^{-1} corresponde ao mesmo número de onda da banda desse grupo do ácido oxálico (região 8), visto que no alumoxano oxalato há também um grupo carboxila livre. Comparando-se o espectro do alumoxano com o de seu respectivo ácido, há uma pequena banda em 1640cm^{-1} (região 9), proveniente do grupo carboxila ligado à superfície da alumina.

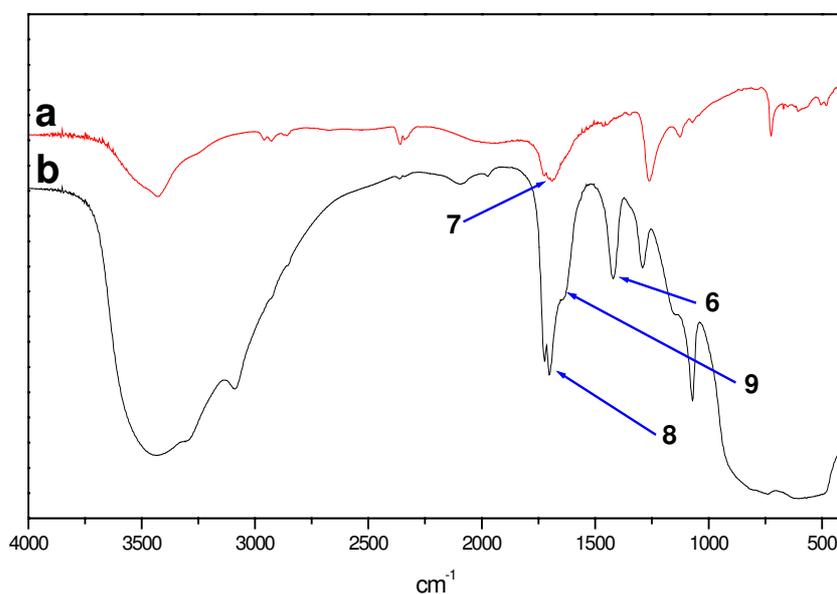


Figura 4.5: Espectros na região do infravermelho obtidos em pastilha de KBr do ácido oxálico (a) e do alumoxano oxalato sintetizado a partir da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH. Região 6: banda proveniente da ligação bidentada entre a alumina e o ácido carboxílico. Região 7: banda referente ao grupo carboxila do ácido oxálico. Região 8: banda referente ao grupo carboxila livre do alumoxano oxalato. Região 9: banda referente ao grupo carboxila ligado à superfície da alumina.

Os espectros do ácido vinil-acético e do alumoxano vinil-acetato sintetizado à partir da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH são mostrados na Figura 4.6, na qual é possível notar que, da mesma forma que no espectro do alumoxano benzoato, a banda proveniente do grupo carboxila do ácido vinil-acético, inicialmente em 1720cm^{-1} (região 10), encontra-se deslocada para menores números de onda (1650cm^{-1} , região 11). No espectro do alumoxano vinil-acetato, também há a

presença da banda proveniente da estrutura bidentada mostrada na Figura 2.1c, em 1460cm^{-1} (região 12).

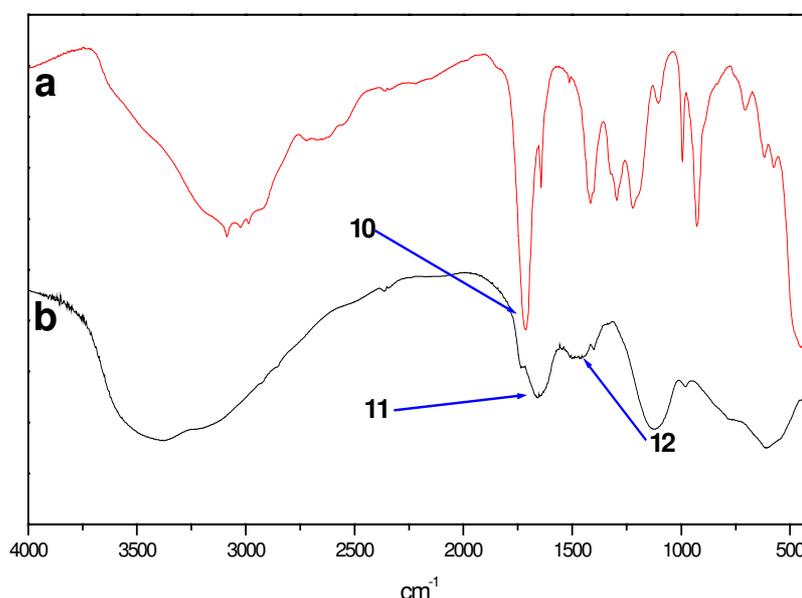


Figura 4.6: Espectros na região do infravermelho do ácido vinil-acético obtido em cela de líquidos (a) e do alumoxano vinil-acetato sintetizado a partir da alumina comercial após tratamento com solução aquosa de NaOH obtido em pastilha de KBr (b). Região 10: banda proveniente do grupo carboxila do ácido vinil-acético. Região 11: banda proveniente do grupo carboxila do alumoxano vinil-acetato. Região 12: banda proveniente da ligação bidentada entre a alumina e o ácido carboxílico.

Finalmente, comparando-se os espectros do ácido adípico com o alumoxano adipato sintetizado a partir da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH, mostrados na Figura 4.7, também é perceptível o deslocamento da banda proveniente da carboxila do ácido adípico, originalmente em 1690cm^{-1} (região 13) para números de onda menores (1630cm^{-1} , região 14). Também é possível notar a presença de uma banda em 1590cm^{-1} (região 15), proveniente do outro grupo carboxila da molécula de ácido adípico, visto que, da mesma forma que o alumoxano oxalato, o alumoxano adipato também possui um grupo carboxila livre.

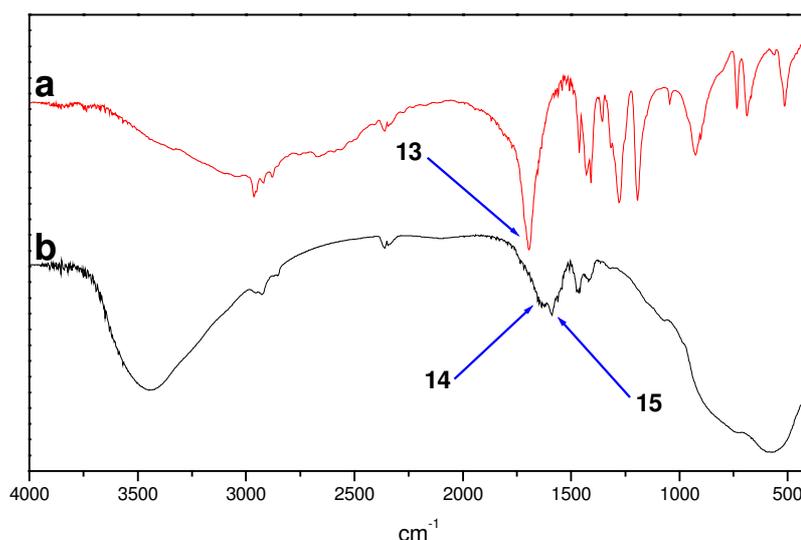


Figura 4.7: Espectros na região do infravermelho obtidos em pastilha de KBr do ácido adípico (a) e do alumoxano adipato sintetizado a partir da alumina comercial após tratamento com solução aquosa de NaOH (b). Região 13: banda proveniente do grupo carboxila do ácido adípico. Regiões 14 e 15: bandas provenientes das carboxilas do alumoxano adipato.

4.1.2.2. Análise Termogravimétrica

A realização dos experimentos de análise termogravimétrica teve como principal objetivo a comparação das amostras dos alumoxanos benzoato, oxalato e vinil-acetato com amostras de misturas mecânicas dos reagentes de cada um desses alumoxanos. Para isso, tomou-se o cuidado de se manter a mesma porcentagem mássica de carbono para as misturas que os valores obtidos por análise elementar para os alumoxanos. Dessa maneira, a análise termogravimétrica poderia mostrar deslocamentos na temperatura de decomposição dos alumoxanos em relação aos ácidos carboxílicos das misturas mecânicas, indicando de forma clara a formação dos alumoxanos, permitindo comprovar a intensidade da ligação química entre os ácidos carboxílicos e a superfície da alumina.

Primeiramente, analisando-se os resultados referentes ao ácido benzóico, mostrados na Figura 4.8, a perda de massa desse composto ocorre na região de 150°C.

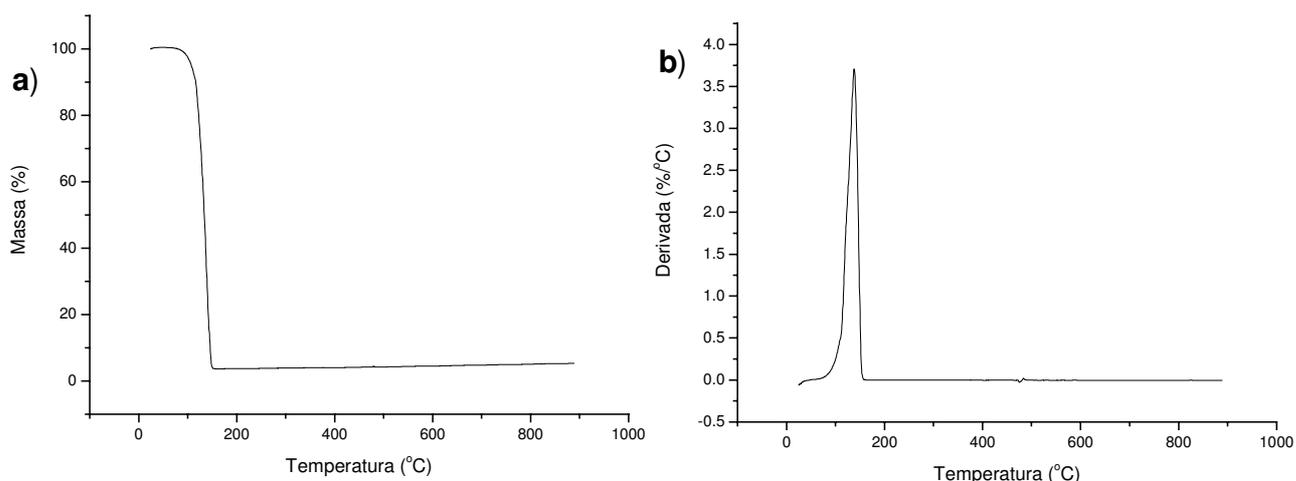


Figura 4.8: Termogramas de análise termogravimétrica do ácido benzóico. Perda de massa em função da temperatura (a) e derivada da perda de massa em função da temperatura (b).

Com esse resultado, ao se analisar a Figura 4.9, em que são mostrados os termogramas provenientes do alumoxano benzoato e da mistura mecânica entre a alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH e do ácido benzóico, percebe-se a presença de um ponto de máximo na curva de derivada da massa em função da temperatura (Figura 4.9b) nessa mesma região na curva da mistura mecânica.

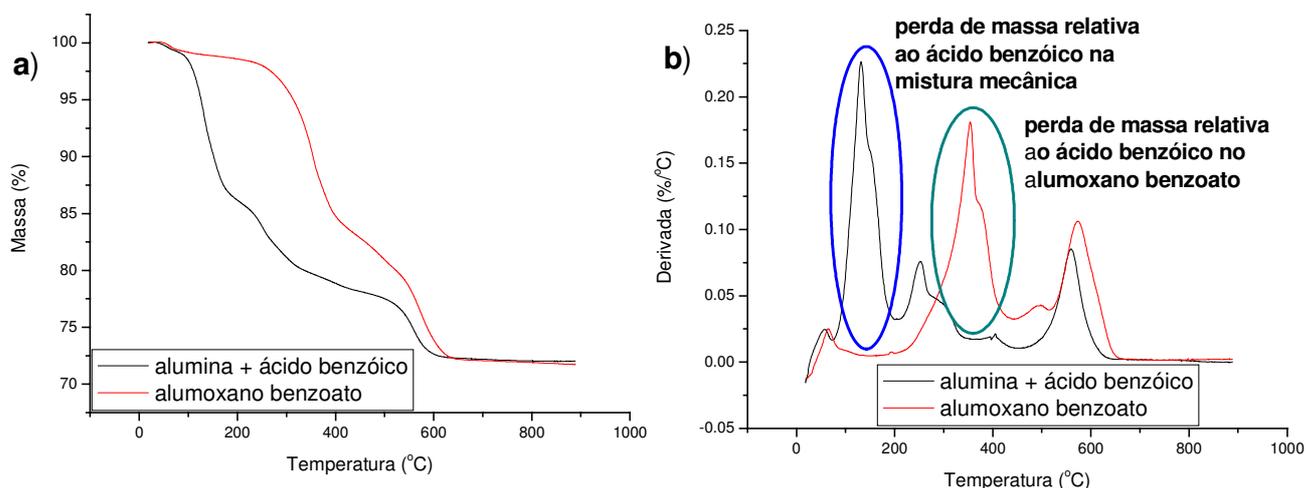


Figura 4.9: Termogramas de análise termogravimétrica do alumoxano benzoato e da mistura mecânica de alumina com ácido benzóico. Perda de massa em função da temperatura (a) e derivada da perda de massa em função da temperatura (b).

Entretanto, para o alumoxano benzoato a perda de massa proveniente do ácido benzóico ocorre em temperaturas em torno de 350°C. Como a reação de formação do alumoxano ocorre na superfície do material, não há como essa diferença de temperatura na perda do ácido benzóico nas duas amostras ser por diferenças na difusão do ácido ao ser eliminado, mas sim que na amostra de alumoxano benzoato a interação do ácido com a alumina é mais forte, proveniente de uma ligação química.

Em relação aos resultados para a alumina comercial modificada com ácido oxálico (alumoxano oxalato), os perfis das curvas termogravimétricas são um pouco diferentes. Pela Figura 4.10, em que é mostrado o termograma do ácido oxálico, notam-se duas perdas de massa, em 90 e 180°C.

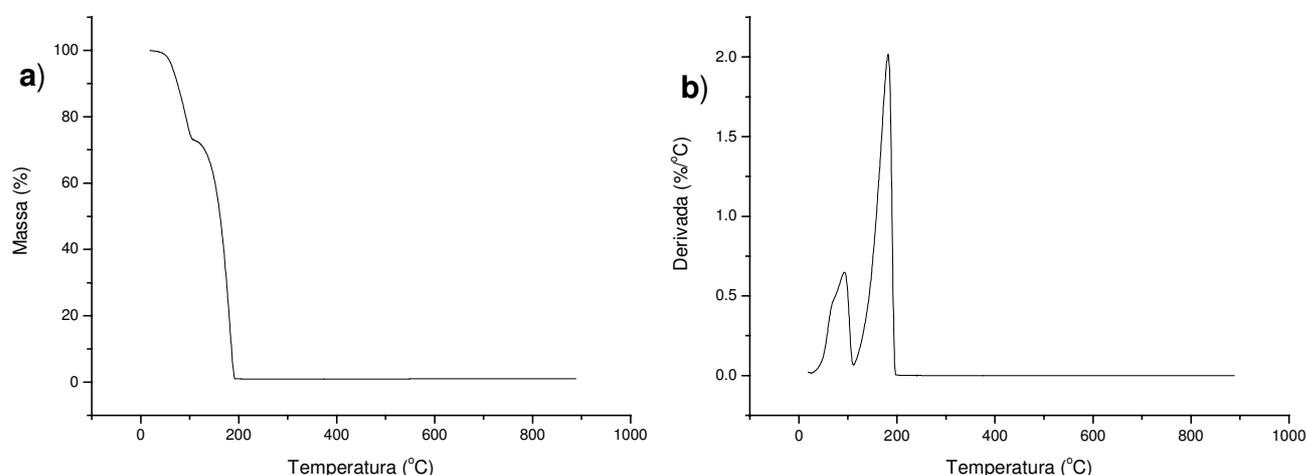


Figura 4.10: Termogramas de análise termogravimétrica do ácido oxálico. Perda de massa em função da temperatura (a) e derivada da perda de massa em função da temperatura (b).

Embora haja perdas de massa nessa região dos termogramas do alumoxano oxalato e da mistura mecânica de seus reagentes, mostrados na Figura 4.11, os perfis dos pontos de máximo nas curvas de derivada da massa em função da temperatura não são os mesmos. Na mistura mecânica, há um perfil semelhante em pontos de máximo na região de 260 e 340°C. Nessa região há uma diferença nos perfis das curvas da mistura mecânica e do alumoxano oxalato. O alumoxano apresenta uma perda menos brusca de ácido oxálico do que a mistura mecânica por causa da maior interação do ácido com a superfície da alumina.

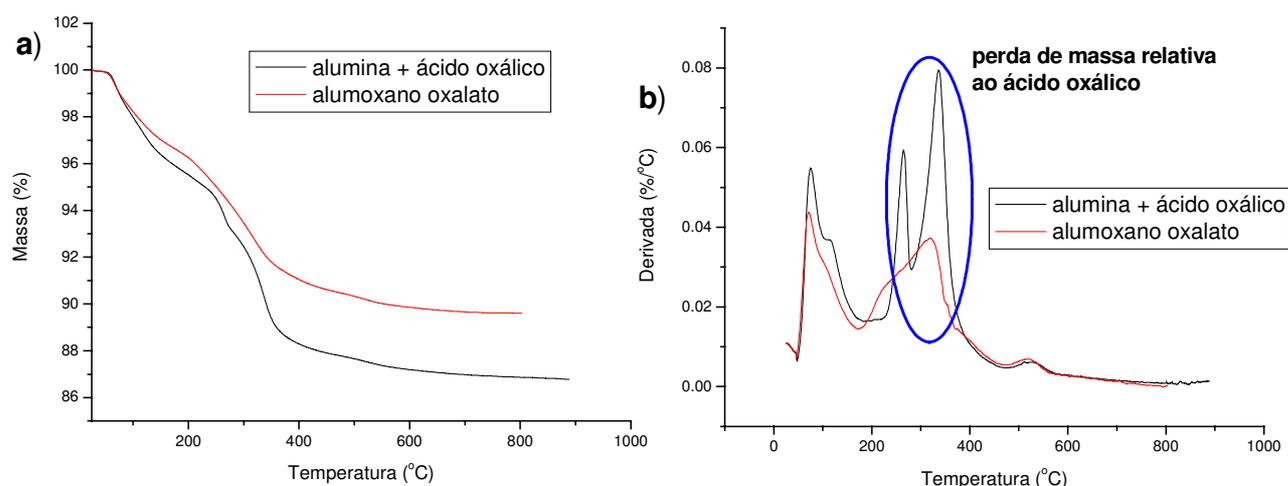


Figura 4.11: Termogramas de análise termogravimétrica do alumoxano oxalato e da mistura mecânica de alumina com ácido oxálico. Perda de massa em função da temperatura (a) e derivada da perda de massa em função da temperatura (b).

Por último, na Figura 4.12 são mostrados os termogramas para o alumoxano vinil-acetato e a mistura mecânica dos seus reagentes.

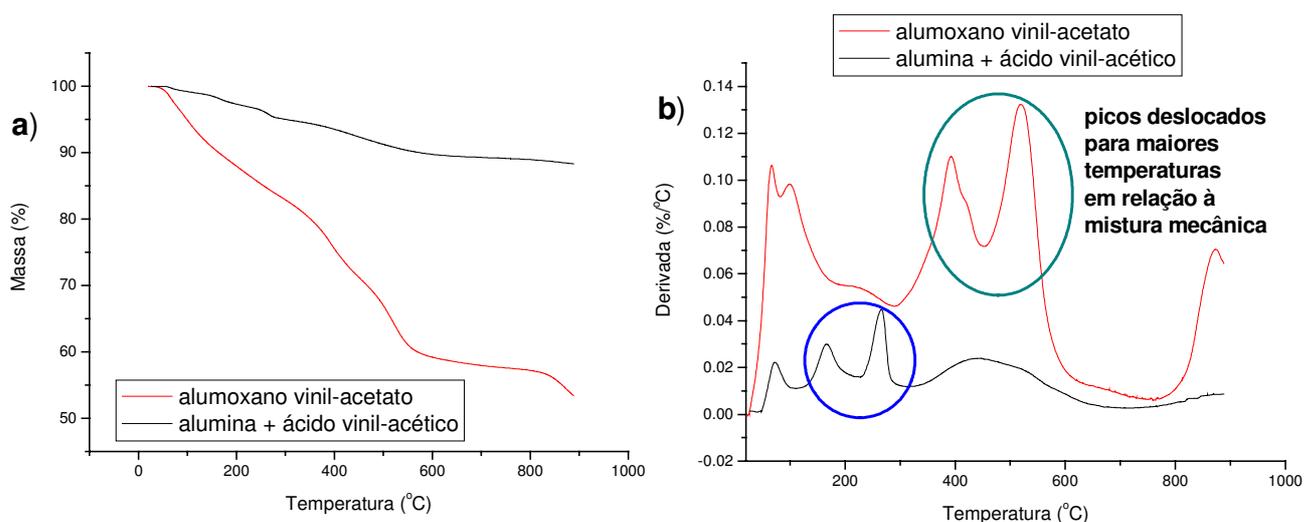


Figura 4.12: Termogramas de análise termogravimétrica do alumoxano vinil-acetato e da mistura mecânica de alumina com ácido vinil-acético. Perda de massa em função da temperatura (a) e derivada da perda de massa em função da temperatura (b).

Analisando-se a Figura 4.12, percebe-se uma diferença nos perfis das curvas, embora os mesmos picos estejam presentes, só que em diferentes temperaturas. Os pontos de máximo na região entre 150 e 300°C na curva da derivada perda de massa

em função da temperatura na mistura mecânica aparecem entre 400 e 600°C na curva do alumoxano vinil-acetato. Conforme explicada para os outros alumoxanos, essa variação ocorre devido a uma maior interação entre o ácido e a superfície da alumina, proveniente de uma ligação química.

Analisados em conjunto, as diferenças dos valores de temperatura de decomposição dos alumoxanos em relação às respectivas misturas mecânicas de seus ácidos carboxílicos de origem e alumina mostram que há uma maior variação na temperatura de decomposição quanto maior é o pK_a do ácido, conforme mostra a Tabela 4.3. Esses resultados indicam uma tendência de alumoxanos provenientes de ácidos fortes serem decompostos a menores temperaturas que alumoxanos provenientes de ácidos fracos, havendo a necessidade do estudo de um número maior de alumoxanos carboxilatos para a comprovação dessa hipótese e também da realização de replicatas das análises para esses alumoxanos.

Tabela 4.3: Variação da temperatura de decomposição dos alumoxanos em relação à mistura mecânica de seus respectivos ácidos carboxílicos com a alumina e valores de pK_a para seus respectivos ácidos carboxílicos [38].

Alumoxano	Benzoato	Oxalato	Vinil-Acetato
Varição de temperatura (°C)	200	-	250
pK_a do seu respectivo ácido	4,19	1,23	4,34

4.1.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Na Figura 4.13 são mostradas as micrografias eletrônicas de varredura dos pós de alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH e dos pós de seus respectivos alumoxanos: benzoato, oxalato e vinil-acetato. Nessa figura, é possível perceber que não há uma diferença na morfologia das partículas de alumina por causa da modificação da sua superfície com ácidos carboxílicos. As partículas de alumoxano apresentam formato esférico, assim como as do material de partida. O tamanho das partículas aparentemente também é o mesmo para todas as amostras. Sendo assim, esses resultados indicam que as sínteses dos alumoxanos só provocaram alterações na superfície da alumina em nível molecular e que não houve peptização da alumina

por parte dos ácidos carboxílicos utilizados na síntese. Mesmo em nível microscópico não é possível distinguir as superfícies antes e depois da modificação.

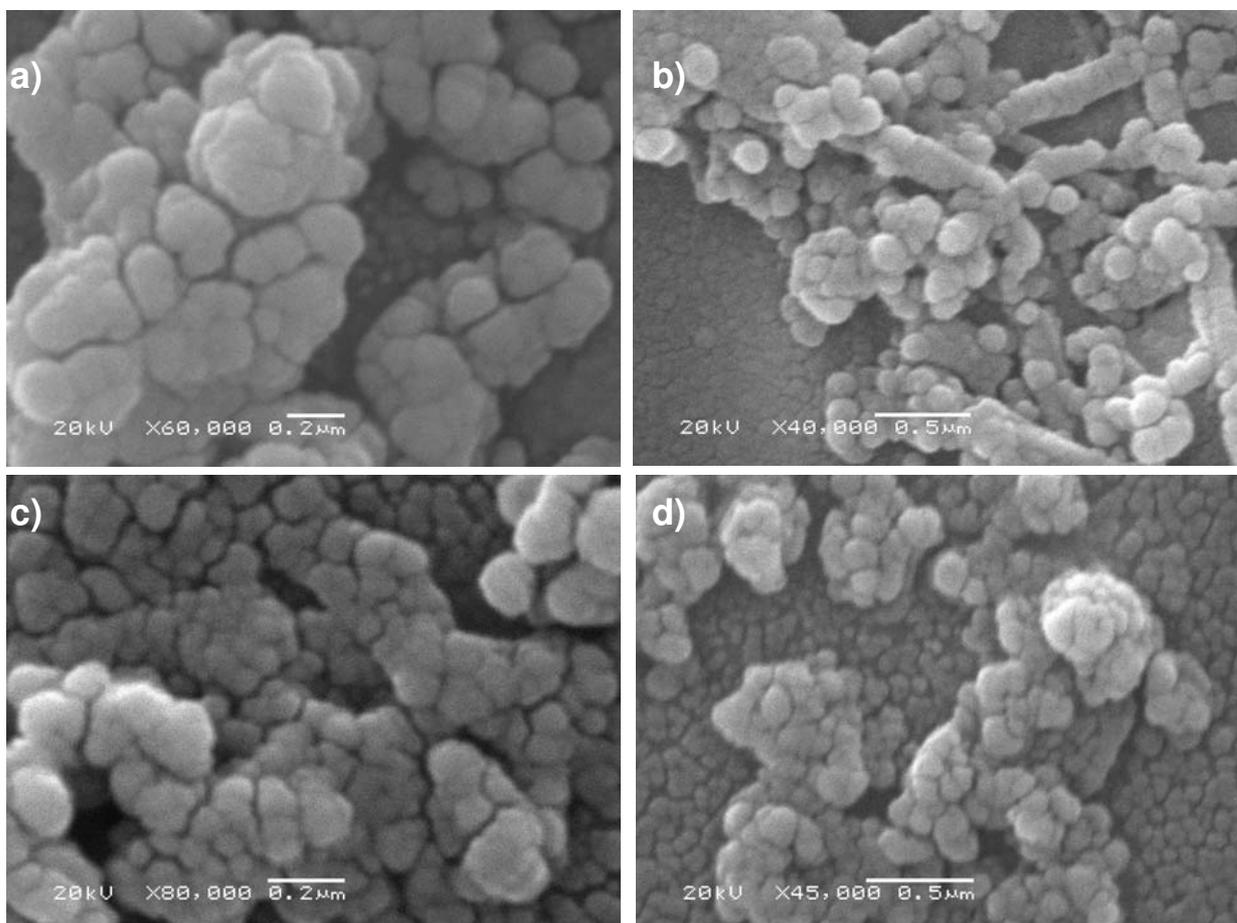


Figura 4.13: Micrografias eletrônicas da superfície da alumina comercial tratada com solução de NaOH com aumento de 60 mil vezes (a); do alumoxano benzoato com aumento de 40 mil vezes (b); do alumoxano oxalato com aumento de 80 mil vezes e do alumoxano vinil-acetato com aumento de 45 mil vezes.

4.1.2.3. Avaliação do Grau de Modificação das Superfícies de Alumina

Pelos resultados obtidos por ASAP e CHN para os alumoxanos, foi possível fazer uma estimativa de quanto a superfície de alumina foi modificada pelos grupos provenientes dos ácidos carboxílicos. A partir da obtenção da porcentagem em massa de carbono, por CHN, de um alumoxano carboxilato, é possível, conhecendo-se a massa total da amostra, determinar a massa de ácido carboxílico na superfície,

proveniente da reação química com a superfície da alumina. Dessa forma, com a massa de ácido carboxílico, a partir da sua massa molar e do número de Avogadro, pode-se obter o número de unidades representativas de um alumoxano presentes na superfície modificada da alumina.

A livre rotação em torno do eixo do carbono da carboxila ligada à alumina faz com que a máxima área ocupada por uma unidade representativa do alumoxano seja um círculo de raio r , sendo esse raio a distância entre o carbono ligado à carboxila e a extremidade do grupo orgânico, conforme é mostrado na Figura 4.14. Para se obter os valores de r empregados nos cálculos para cada alumoxano, levou-se em consideração os comprimentos de ligação entre os átomos dos grupos orgânicos de cada composto, e os seus respectivos ângulos de ligação [30].

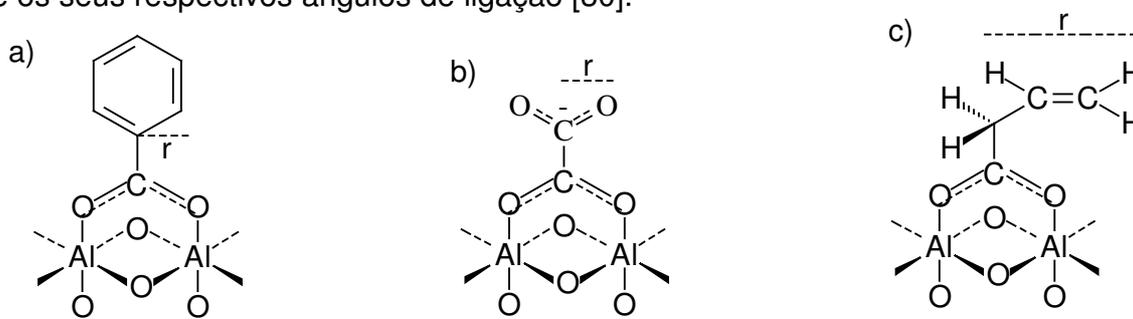


Figura 4.14: Unidades representativas do alumoxano benzoato (a), oxalato (b) e vinilacetato (c) e seus respectivos raios.

Os cálculos de empacotamento das unidades na superfície da alumina foram feitos levando-se em conta o empacotamento hexagonal, em que sete círculos estão contidos dentro de um hexágono, conforme é mostrado na Figura 4.15. Ao se fazer uma comparação entre as áreas do hexágono com a soma das áreas dos sete círculos, a diferença é de apenas 6%, a menor entre todas as aproximações utilizadas.

Calculando-se a área total ocupada pelas unidades representativas dos alumoxanos e conhecendo-se o valor da área total obtida por ASAP, determinou-se a porcentagem da superfície de alumina que foi modificada. Nessas considerações, foram utilizados os valores obtidos para a alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH e de seus respectivos alumoxanos. Na Tabela 4.4 são mostrados os resultados das análises de ASAP e CHN (para carbono), dos raios dos círculos e porcentagem de recobrimento das superfícies de cada alumoxano.

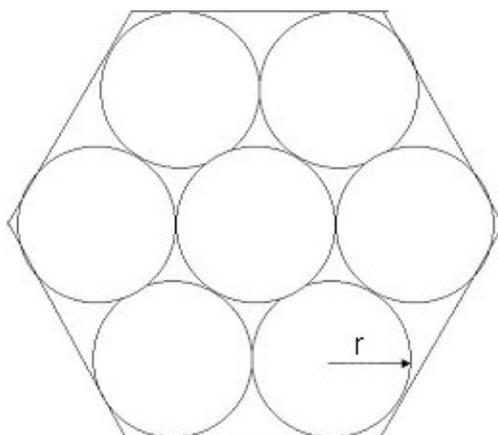


Figura 4.15: Modelo proposto de empacotamento hexagonal das unidades representativas dos alumoxanos.

Tabela 4.4: Área superficial, porcentagem em massa de carbono, raio do círculo e porcentagem de recobrimento da superfície dos alumoxanos sintetizados a partir da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH.

Material	Área (m ² /g)	% de C	r (10 ⁻¹⁰ m)	Recobrimento Superficial (%)
alumina	137	-	-	-
alumoxano benzoato	110	18,0±0,1	1,21	57±1
alumoxano oxalato	127	1,6±0,1	1,08	12±1
alumoxano vinil-acetato	120	1,9±0,1	2,69	48±3

Na Tabela 4.4 não são mostrados os desvios dos valores de área para cada alumoxano em virtude do experimento ter sido realizado em duplicata. A diferença entre os dois valores para o mesmo alumoxano foi de 10 m²/g. Percebe-se que para as mesmas condições experimentais o alumoxano oxalato apresenta uma área ocupada pelos grupos orgânicos bem menor do que os outros dois alumoxanos, que apresentam em torno da metade da sua superfície recoberta.

Pelos resultados dos espectros na região do infravermelho dos alumoxanos era esperado realmente que não houvesse um recobrimento total das superfícies, em virtude da presença de bandas relativas aos grupos OH da alumina.

4.2. Aplicações dos Alumoxanos

4.2.1. Superfícies Hidrofóbicas

Ao se modificar a superfície da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH, a qual continha originalmente grupos OH, ou seja, uma superfície hidrofílica, através da reação com ácido benzóico, foi possível obter uma superfície hidrofóbica, contendo grupos fenila na sua superfície. Na Figura 4.16 são mostradas duas representações esquemáticas da superfície da alumina, antes e após a sua modificação com ácido benzóico.

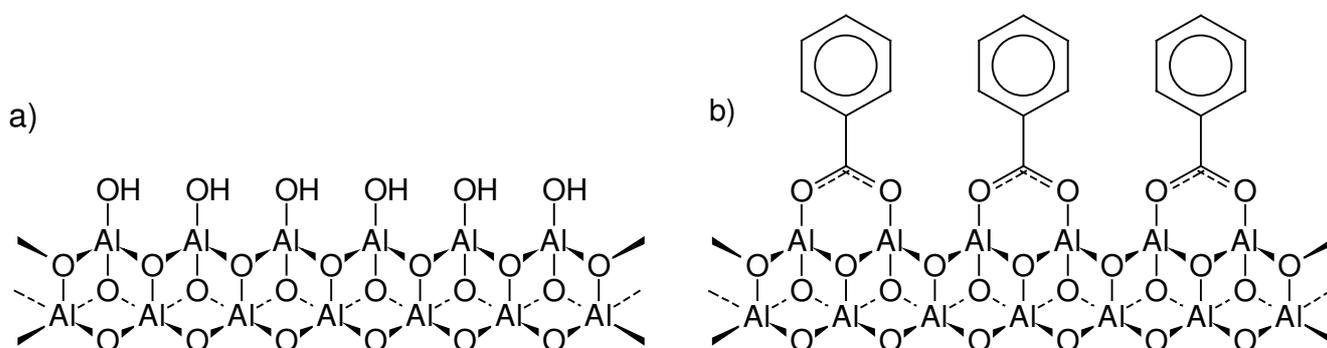


Figura 4.16: Superfície da alumina antes (a) e depois (b) da modificação com ácido benzóico.

Não foi possível a obtenção de nenhuma foto de uma gota de água sobre a superfície da alumina sem modificação visto que o espalhamento da água sobre a superfície desse material foi completo e ocorreu de modo instantâneo. Portanto, conforme foi relatado no parágrafo anterior, os grupos OH da sua superfície a tornam hidrofílica, sendo totalmente molhável pela água. Porém, ao se realizar o mesmo experimento com a alumina modificada com ácido benzóico, o resultado pode ser conferido na Figura 4.17, onde é mostrada uma foto de uma gota de água sobre a superfície de um disco de alumoxano benzoato.

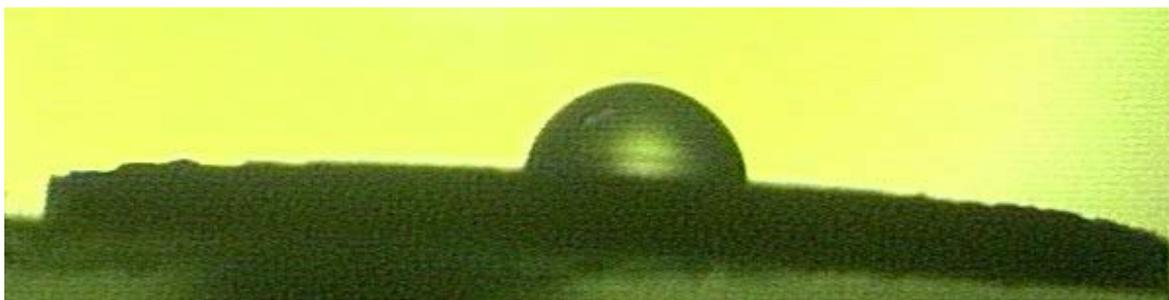


Figura 4.17: Gota de água sobre a superfície de um disco de alumoxano benzoato.

Antes de se iniciar uma discussão mais elaborada a respeito desses resultados, deve ficar claro ao leitor que apenas uma foto de uma pastilha de alumoxano benzoato é mostrada nesse trabalho em virtude da reprodutibilidade dos resultados. A variação do valor de ângulo de contato para o alumoxano benzoato foi de $\pm 3^\circ$. Após a obtenção da foto, o programa computacional Image Pro Plus permitiu a obtenção do ângulo entre a gota e a superfície, porém cabe ao usuário traçar as retas mostradas na Figura 1.3. Em seguida, é fornecido o valor do ângulo entre elas.

A respeito dos resultados, o valor obtido de ângulo de contato para a superfície de alumoxano benzoato foi de $70 \pm 3^\circ$. Através da Equação 1.10 foi possível estabelecer o quanto a modificação da superfície da alumina pela reação com ácido benzóico diminuiu o valor do trabalho de adesão da água à superfície do material. Considerando-se o termo $A\sigma_{LV}$ constante, o trabalho de adesão da água à superfície do alumoxano benzoato corresponde à 67% do valor do trabalho de adesão da água à superfície da alumina. Ou seja, a modificação de superfície causou uma diminuição do trabalho de adesão em 1/3 do seu valor original.

O valor do ângulo de contato para a gota de água sobre a superfície do alumoxano benzoato corresponde ao ângulo de contato aparente, ou seja, θ . Portanto, faz-se necessária a retomada de conceitos abordados no item 1.3.1 dessa dissertação, mais precisamente em relação à maneira com que a rugosidade da superfície de um material influencia o valor do ângulo de contato. Uma superfície rugosa, como a do disco da Figura 4.17, apresenta $\theta < \theta'$ [14]. Sendo assim, para uma superfície polida desse alumoxano, o valor do ângulo de contato será superior aos obtidos nesse trabalho e o valor do trabalho de adesão será ainda menor.

Por último, esperava-se obter também uma outra superfície hidrofóbica através da síntese do alumoxano adipato. Na Figura 2.1e é mostrada a representação

simplificada da superfície desse alumoxano com um carboxilato livre. Porém, ao se analisar o número de carbonos nesse ácido, a princípio poder-se-ia imaginar a formação de uma estrutura cíclica, em virtude de ser possível que os dois carboxilatos de uma mesma molécula pudessem reagir com a superfície da alumina, formando um ciclo. Em teoria, esse ciclo poderia apresentar estabilidade em virtude da conformação da cadeia ser muito parecida com a de um ciclohexano no seu formato de cadeira, ou seja, com todos os seus carbonos em conformações alternadas. Por essa razão, empregou-se uma solução de ácido adípico com metade da molaridade da solução de ácido benzóico, para que houvesse uma menor competição entre o segundo carboxilato de uma molécula de ácido adípico que já havia reagido com a superfície da alumina e uma carboxila de outra molécula ainda em solução.

Pelo que foi relatado no parágrafo anterior, a superfície de um disco de alumoxano adipato deveria ser hidrofóbica caso ocorresse a formação da estrutura cíclica, da mesma forma que a de alumoxano benzoato, visto que as moléculas de água estariam em contato com a “ponta da cadeira” do ciclo. Entretanto, a única diferença do resultado do experimento de ângulo de contato obtido para a alumina e para o alumoxano adipato é que nesse último a total molhabilidade da superfície ocorreu em poucos segundos. Sendo assim, a hipótese mais aceitável para esse fato é que apenas um dos grupos carboxilatos tenha reagido com a superfície da alumina, formando a estrutura da Figura 2.1e, conforme já havia sido obtido um indicativo que comprovasse essa hipótese através das análises desse material por espectroscopia na região do infravermelho.

4.2.1.1. Influência do Valor de pK_a do Ácido Carboxílico na Síntese de um Alumoxano Carboxilato

O resultado dos experimentos de ângulo de contato para o alumoxano adipato permitiu a abordagem de um outro fator relacionado aos alumoxanos carboxilatos: a influência do valor do pK_a do ácido carboxílico na síntese do alumoxano. Na Tabela 4.5 são mostrados os ácidos utilizados nesse trabalho e seus respectivos pK_a s.

Tabela 4.5: Valores de pK_a dos ácidos carboxílicos empregados nesse trabalho [38].

Ácido	Benzóico	Oxálico	Vinil-Acético	Succínico	Adípico
pK_{a1}	4.19	1.23	4.34	4.16	4.43
pK_{a2}	-	4.19	-	5.61	5.41

Analisando-se os valores de pK_{a1} , percebe-se que, à exceção do ácido oxálico, todos os valores são próximos de 4,0, não excedendo uma unidade. O sucesso da síntese mostrado nos itens 4.1.2.1 e 4.1.2.2 indica que a reação entre a superfície da alumina ocorre com um ácido carboxílico cujo pK_a seja inferior a 5. Sendo assim, para valores mais elevados, como o do pK_{a2} do ácido adípico a reação aparentemente não ocorre, ou então, a cinética de formação do ciclo é muito lenta, havendo a necessidade de um tempo maior para que a reação ocorra. Reforçando a hipótese desse parágrafo, na Tabela 4.6 são mostrados os valores de pK_a para alguns ácidos carboxílicos utilizados nos trabalhos reportados pelo grupo de pesquisa da Rice University discutidos na introdução dessa dissertação.

Tabela 4.6: Valores de pK_a de ácidos carboxílicos empregados nos trabalhos do grupo de pesquisa da Rice University [38].

Ácido	Acético	p-hidróxibenzóico	Metóxi-acético
pK_a	4,75	4,48	3,5

4.2.2. Testes de Biomimética

A avaliação de bioatividade dos alumoxanos sintetizados pela reação com os ácidos dicarboxílicos mostrou resultados muito diferentes entre o alumoxano oxalato e os alumoxanos succinato e adipato. Enquanto que após oito horas de imersão em SBF não houve nenhum indício de precipitação de fosfato de cálcio na superfície dos alumoxanos succinato e adipato, em todos os discos preparados com γ -alumina calcinada à 300°C e tratada com etanol, alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH e α -alumina houve formação de cristais após esse mesmo procedimento para o alumoxano oxalato. Os resultados negativos para os alumoxanos succinato e adipato foram similares aos obtidos com os discos de todas as aluminas utilizadas nesse trabalho sem modificação com ácido oxálico.

Em virtude da aparência e tamanho dos cristais serem os mesmos em todas as superfícies modificadas com ácido oxálico, assim como o fato de não haver nenhuma mudança significativa nas superfícies não modificadas por esse ácido, as micrografias aqui mostradas na Figura 4.18 retratam bem a diferença nos resultados entre as superfícies com e sem modificação com ácido oxálico. Na Figura 4.19, são mostrados o mapeamento elemental de superfície do alumoxano oxalato e o seu respectivo espectro de EDS. Não é mostrada nenhuma micrografia das superfícies dos outros alumoxanos sintetizados a partir de ácidos dicarboxílicos em virtude da similaridade das micrografias das suas superfícies com a Figura 4.18a.

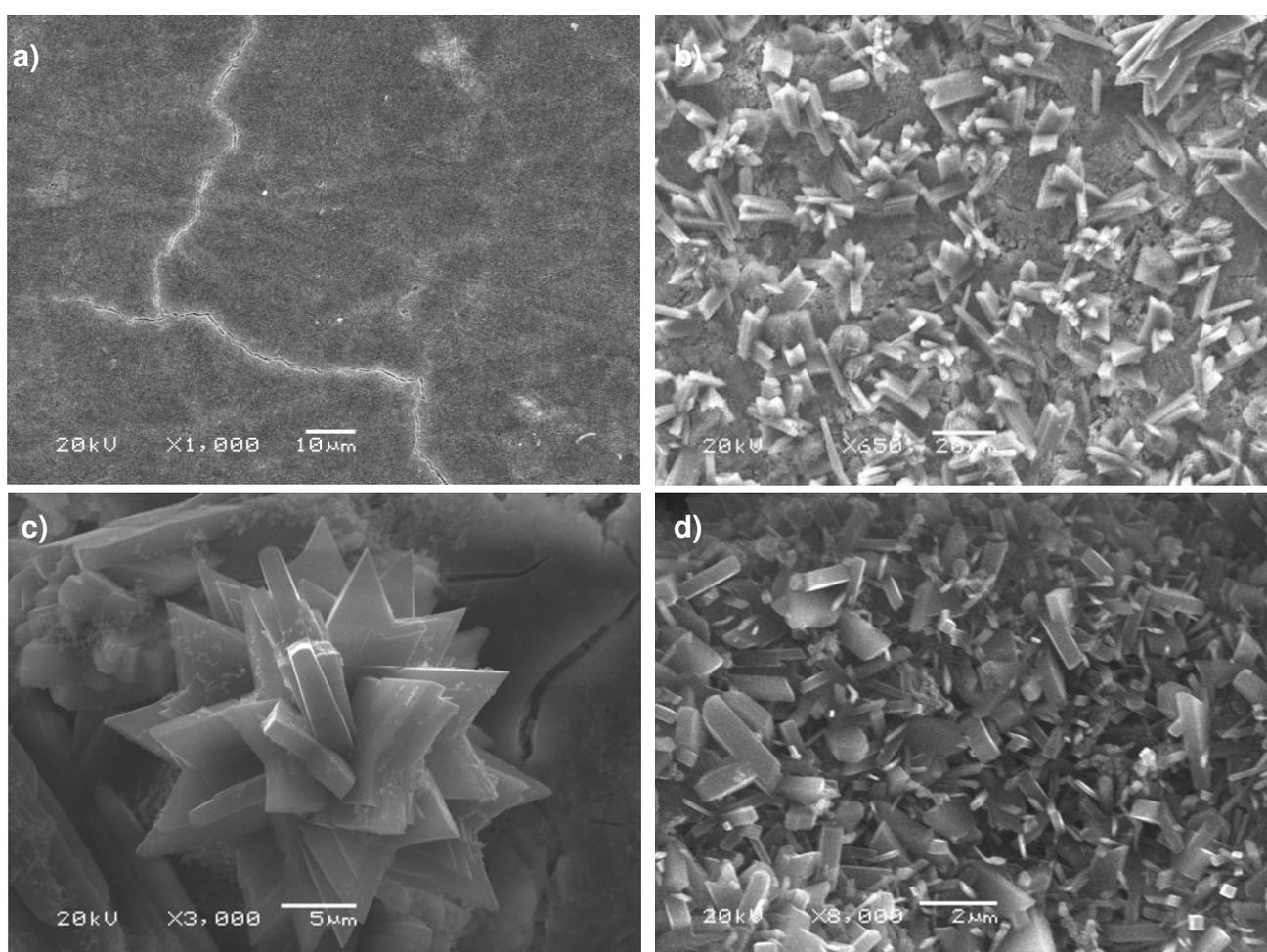


Figura 4.18: Micrografias eletrônicas das superfícies das amostras após 8 horas de imersão em SBF. (a) Alumina sem modificação com ácido oxálico. (b) e (c) e (d) Aluminas modificadas com ácido oxálico.

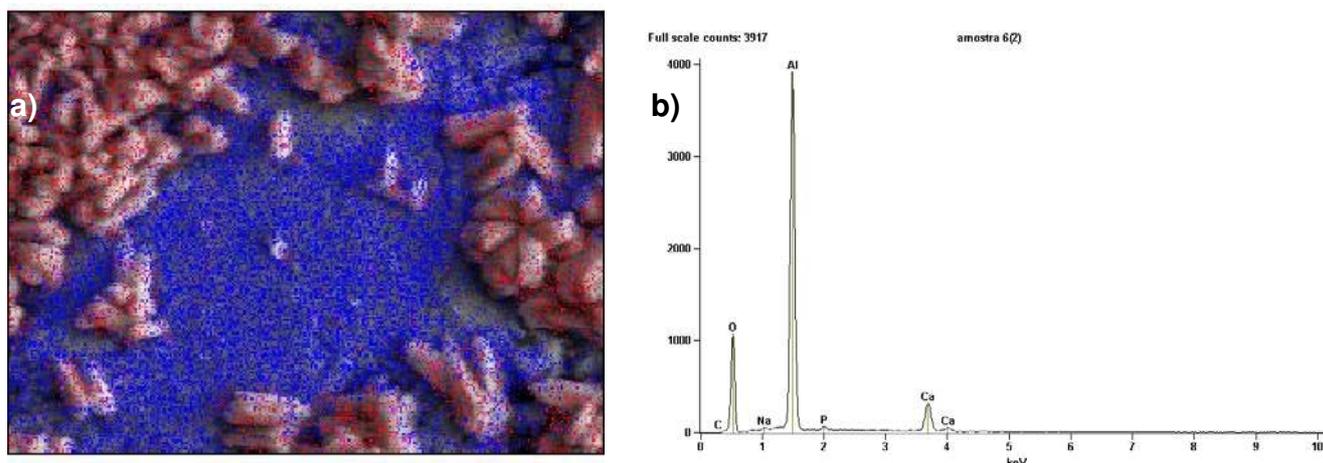


Figura 4.19: (a) Mapeamento elemental de uma superfície de alumoxano oxalato. Em azul, alumínio e em vermelho, cálcio. (b) Espectro de EDS da mesma superfície.

Pelos resultados mostrados na Figuras 4.18 e 4.19, nota-se que os cristais formados na superfície são de fosfato de cálcio e que a formação dos mesmos na superfície da alumina aconteceu pela modificação da mesma com ácido oxálico, visto que não ocorreu nenhum processo aparente de precipitação na superfície não modificada, conforme é possível notar na Figura 4.18a.

Percebe-se pelos resultados previamente mostrados que o alumoxano oxalato parece ser um material especial em relação à sua capacidade de precipitar fosfato de cálcio na sua superfície. A precipitação observada para esse caso se destaca não só pela quantidade de cristais formados e pela forma como eles crescem a partir da superfície, mas também pela velocidade observada na precipitação quando comparada com a velocidade de precipitação normalmente reportada para outros materiais submetidos a esse teste [39].

A precipitação do fosfato de cálcio nas superfícies de alumoxano oxalato após essa ser imersa em SBF pode ser explicada devido ao ácido oxálico ser um ácido dicarboxílico. Sendo assim, ao ocorrer a reação mostrada na Equação 1.7, o grupo R em questão passa a ser um grupo carboxilato. Em SBF, esses grupos complexam os íons cálcio presentes na solução formando sítios de precipitação na superfície. A formação desses sítios nessas superfícies é altamente eficaz na precipitação de fosfato de cálcio uma vez que não há trabalhos reportados na literatura onde a precipitação

desse composto na superfície de um material pela imersão em SBF ocorra em períodos inferiores a doze horas.

Retomando-se a Equação 1.12, a modificação da superfície de aluminas com ácido oxálico propiciou uma variação no termo referente à parte da equação que é função do material imerso na solução ($\sigma_{cl}A_{cl} + (\sigma_{cl} - \sigma_{sl})A_{cs}$) [23]. Tendo em vista que essa equação é válida para processos de precipitação heterogênea, essa modificação de superfície torna o ΔG de precipitação negativo. Dessa forma, o processo torna-se espontâneo. Vale ressaltar que a precipitação de fosfato de cálcio em superfícies de alumina ocorre em tempos superiores aos empregados nesse trabalho e é um processo de precipitação homogênea, ou seja, devido à saturação da solução de SBF em relação ao fosfato de cálcio.

Entretanto, se apenas a presença de um grupo carboxilato na superfície de um material imerso em SBF fosse suficiente para que ocorresse o que ocorreu com o alumoxano oxalato, esperar-se-ia obter os mesmos resultados para os alumoxanos succinato e adipato. De fato, há trabalhos na literatura com superfícies modificadas de titânio de modo a também apresentarem grupos carboxilatos na superfície [28], que consideram que a precipitação ocorre pelo fato dos grupos da superfície possuírem carga negativa e estendem essa possibilidade para quaisquer outros grupos com essa característica. Entretanto, nessa discussão é deixado em segundo plano um fator importante: a solvatação dos grupos da superfície e dos íons cálcio pelas moléculas de água.

Entretanto, através desse trabalho, abre-se à discussão não apenas ao grupo presente na superfície, nesse caso, o carboxilato, mas também ao tamanho da cadeia carbônica, já que os resultados obtidos mostram que ela exerce influência no processo de precipitação. Pela Figura 2.1b percebe-se que os grupos carboxilatos na superfície do alumoxano oxalato não podem efetuar movimentos de translação, apenas de rotação. Por possuírem cadeias maiores, isso não ocorre na superfície dos alumoxanos succinato e adipato, já que a translação é permitida. Sendo assim, a hipótese apresentada consiste que a cinética de precipitação de fosfato de cálcio na superfície do alumoxano oxalato é favorecida, visto que os sítios de complexação de íons cálcio e conseqüentemente, de nucleação de fosfato de cálcio, encontram-se fixos na superfície do material. Ainda levando-se em conta a cinética, não se pode descartar a hipótese da

precipitação nas superfícies desses outros dois alumoxanos, já que se deve estudar se o mesmo efeito ocorrido com o alumoxano oxalato pode ocorrer em escalas de tempo maiores.

Os resultados dos testes de biomimética mostrados nessa dissertação sugerem a possibilidade de um novo tipo de recobrimento da superfície de óxidos de alumínio por fosfatos de cálcio através de um procedimento simples, rápido e de baixo custo. Abre-se a perspectiva de utilização do material na área de ortopedia, visto que o recobrimento de aluminas com fosfato de cálcio sempre foi desejável em virtude desse último já ser reconhecidamente um material biocompatível [40] enquanto que a alumina, quando implantada diretamente, é envolvida por tecido fibroso, isolando-a do organismo [41].

Hoje em dia também há outros métodos de recobrimento de superfícies para aumentar a biocompatibilidade de um material. Para que o leitor possa ter uma comparação mais detalhada do método de recobrimento de alumina com fosfato de cálcio elaborado no grupo de pesquisa em que esse trabalho foi desenvolvido, serão citados alguns deles. Nesse caso, os mais utilizados.

Um dos métodos de recobrimento das amostras de alumina mais utilizado é conhecido como plasma spray [42], que utiliza um plasma para fundir e espalhar fosfato de cálcio sobre a superfície da amostra, exigindo, porém, um aparato mais sofisticado do que o apresentado nesse trabalho. Outros processos são baseados na implantação de íons inorgânicos (PO_4^{3-} , Ca^{2+} entre outros) que podem ser realizados ou pelo tratamento da superfície com soluções com altas concentrações dos íons que se pretenda implantar (ao se empregar, por exemplo, ácido fosfórico) ou pela confecção de amostras em que sejam inseridos na sua formulação os íons desejados. Esse método de implantação de íons tem como desvantagem modificar significativamente as propriedades mecânicas das aluminas [43], por se tratar de um método drástico e pelo fato da composição da alumina ser modificada.

Por último e mais recentemente aplicado está o método de “inkjet printing”, em que há a deposição de um material em um substrato da mesma maneira que a tinta é colocada em um papel através do uso de uma impressora. Apesar de mais barato e utilizando-se uma tecnologia mais avançada que os métodos citados no parágrafo anterior, a sua principal desvantagem está na dificuldade de se realizar esse recobrimento de maneira tridimensional [44].

A metodologia de modificação das superfícies de aluminas apresentada neste trabalho é baseada em uma modificação que ocorre apenas na superfície das amostras, e, portanto, não altera de forma alguma as propriedades mecânicas das mesmas. Além desse fato, uma vez que a metodologia necessita apenas da imersão das amostras em uma solução de ácido oxálico, a modificação pode ser realizada em amostras de diferentes geometrias e tamanhos sem maiores dificuldades.

O sucesso no teste de biomimética abriu a possibilidade da realização de testes de biocompatibilidade com as amostras de alumoxano oxalato. Dessa forma, apesar do foco desse trabalho não estar centrado na obtenção de um biomaterial, mas sim de estudar processos de modificação e as superfícies modificadas de alumina com ácidos carboxílicos, os resultados obtidos em testes *in vitro* e *in vivo* com esses materiais são muito significativos para serem excluídos dessa dissertação.

4.2.3. Testes de Biocompatibilidade

4.2.3.1. Testes *in vitro*

Para avaliar a biocompatibilidade da alumina, bem como da alumina modificada pelo ácido oxálico, considerando-se os resultados dos testes de biomimética desses materiais, foram realizados testes de adesão celular com pré-osteoblastos de camundongo MC3T3-E1 através do método de redução do MTT. Nesse método, esse composto, um sal tetrazólico de coloração amarela, penetra nas células e é metabolizado na mitocôndria através da desidrogenase mitocondrial, sendo reduzido a formazano, um composto de coloração azul. Pelo fato da reação ocorrer na mitocôndria, a quantidade de formazano presente no meio é proporcional ao número de células em atividade [32]. A reação ocorrida na mitocôndria das células é mostrada na Figura 4.20.

Nesse experimento, após a verificação que a modificação de superfície da alumina proporcionou a precipitação de fosfato de cálcio em fluido biomimético, verificou-se se que essa mesma modificação também era capaz de alterar o metabolismo dos osteoblastos. Outro parâmetro avaliado foi o tempo de adesão celular (6, 12 e 24 horas). Por essas razões, foram utilizadas apenas amostras oriundas da alumina comercial tratada com solução aquosa de NaOH, já que, conforme mostrado no

item 4.1.1, a γ -alumina sintetizada nesse trabalho apresenta uréia na sua composição, que é tóxica para as células, sendo excluída desse experimento. Como controle, foram usados os resultados obtidos com os poços de medição sem nenhum material, aos quais se atribuiu o valor de 100%. Dessa forma, os resultados obtidos com os poços contendo apenas as células e os reagentes serviram de “background” do experimento.

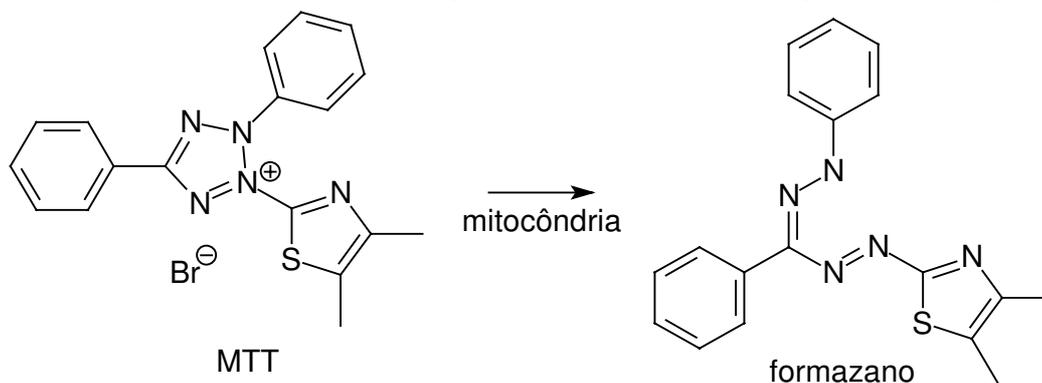


Figura 4.20: Reação de redução do MTT à formazano, ocorrida na mitocôndria das células.

A Figura 4.21 mostra o histograma representativo da atividade celular na redução do MTT à formazano em função do tempo para alumina, alumoxano oxalato e alumoxano oxalato recoberto com fosfato de cálcio.

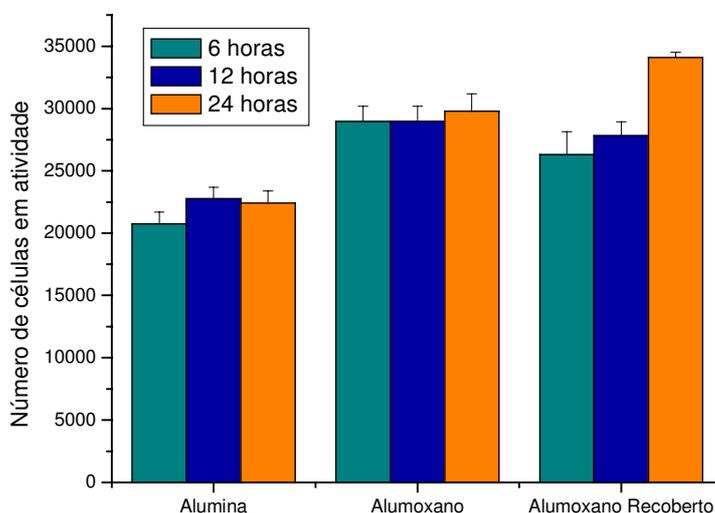


Figura 4.21: Número de células em atividade após 6, 12 e 24h ($p < 0,05$) em contato com as superfícies dos discos de alumina comercial após tratamento com solução aquosa de NaOH, alumoxano oxalato e alumoxano oxalato recoberto com fosfato de cálcio.

A análise dessa figura mostra que a modificação da superfície da alumina também modifica o metabolismo das células. As soluções de formazano em DMSO provenientes da redução do MTT pelos pré-osteoblastos em contato com as superfícies dos discos de alumina foram as que apresentaram os menores valores de absorbância. Esses valores correspondem a aproximadamente metade do número de células originalmente colocadas em contato com essa superfície, o que demonstra que ou houve a morte de metade das células em contato com a superfície desse material ou que ao menos o metabolismo celular tornou-se mais lento sobre essa superfície. Nota-se também que se obtiveram valores parecidos independentemente do tempo do experimento.

Entretanto, ao se modificar a superfície da alumina, há um aumento na atividade celular dos pré-osteoblastos, já que em média, os valores de absorbância obtidos para as soluções sobre os discos de alumoxano oxalato correspondem à atividade celular de 70% da quantidade inicial de células. Esses valores também não foram afetados significativamente pelo tempo do experimento. Comparando-se esses resultados com os do parágrafo anterior, as absorbâncias das soluções de formazano sobre os discos de alumoxano oxalato são 40% maiores do que as sobre as pastilhas de alumina.

Por último, as soluções sobre as pastilhas do alumoxano oxalato recobertas pela precipitação de fosfato de cálcio através da imersão em SBF também apresentaram maior absorbância se comparadas com as da alumina, mas esses valores não são muito diferentes dos obtidos para as amostras desse alumoxano sem precipitação de fosfato de cálcio. Também é possível perceber que o tempo do experimento exerce influência nos resultados obtidos para essa amostra, visto que a absorbância para as soluções após 24h corresponde a cerca de 90% da atividade celular do controle.

No geral, levando-se em conta todos os resultados supracitados, a semelhança nos resultados obtidos para os discos de alumoxano oxalato com e sem recobrimento de fosfato de cálcio indica que a existência de grupos carboxilatos na superfície da alumina já é responsável por uma melhora nas propriedades desse material relativas à sua biocompatibilidade. Esses resultados concordam com o que foi observado nos experimentos de imersão em fluido corpóreo simulado. Dessa maneira, alguns testes *in vivo* foram realizados para que, ainda que de maneira preliminar, fosse possível verificar se essa diferença de comportamento observada para a alumina antes e após a modificação da sua superfície com ácido oxálico se mantinha.

4.2.3.2. Testes *in vivo*

Conforme descrito no procedimento experimental, o alumoxano oxalato na forma de pó foi implantado em ratos Wistar. Assim, é necessário ressaltar que embora os resultados mostrem bons indícios de biocompatibilidade, esses testes prévios precisam ser repetidos e os seus resultados precisam passar por um melhor tratamento estatístico.

As Figuras 4.22 e 4.23 mostram os resultados obtidos da microscopia óptica dos cortes histológicos da região implantada com cada um dos materiais. A Figura 4.22 mostra que o implante de alumina comercial tratada com NaOH sem modificação pelo ácido oxálico (indicado pelas setas vermelhas) causou uma extensiva formação de tecido fibroso ao redor do material (indicado pelas setas azuis).

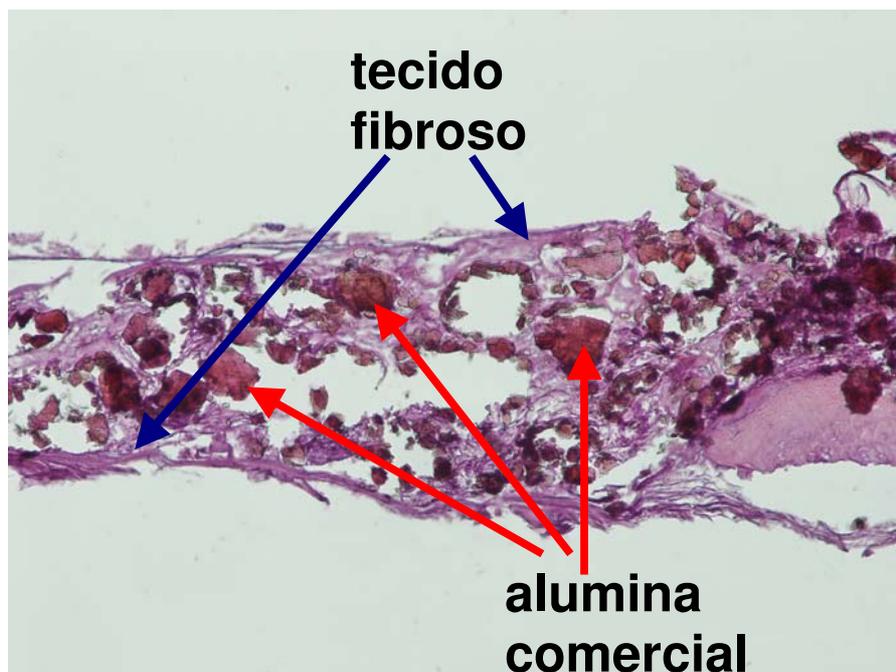


Figura 4.22: Micrografia óptica do implante de alumina sem modificação com ácido oxálico.

Já a Figura 4.23 mostra o resultado obtido para uma amostra de alumoxano oxalato recoberto com fosfato de cálcio, indicado na figura pelas setas vermelhas. Diferentemente da amostra de alumina, o tecido formado ao redor da amostra é ósseo (indicado pelas setas azuis) e não fibroso. Com isso, é possível perceber que todos os

resultados mostrados nos itens 4.2.2 e 4.2.3 são concordantes entre si a respeito da diferença entre a superfície de alumina sem modificação e modificada com ácido oxálico.

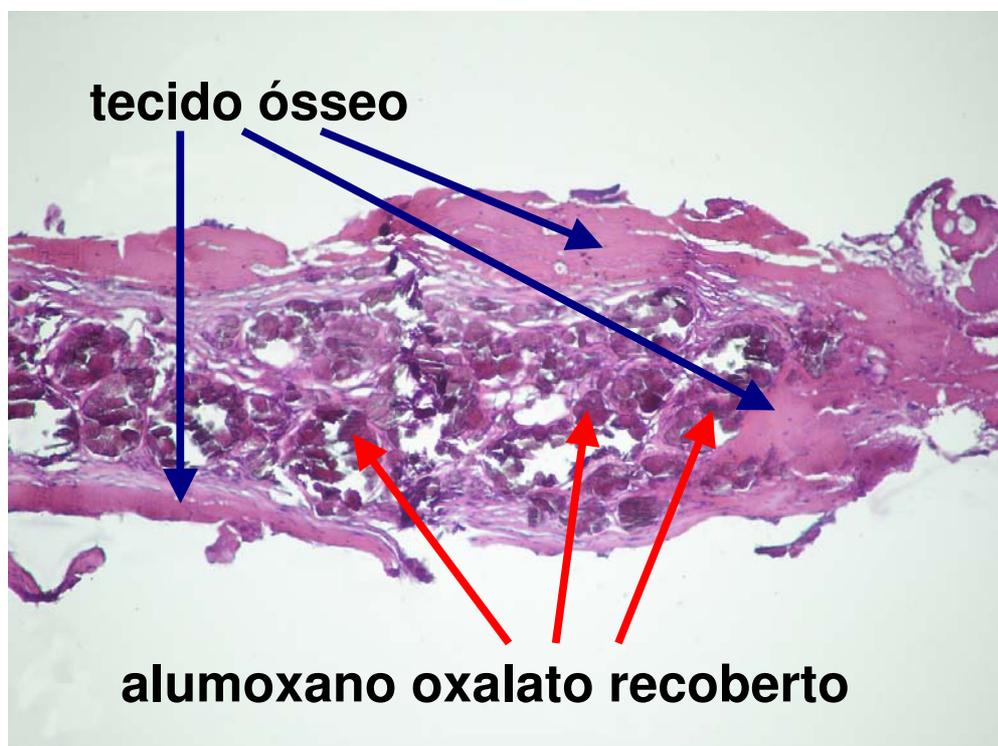


Figura 4.23: Micrografia óptica do implante de alumoxano oxalato recoberto com fosfato de cálcio.

4.3. Trabalhos Futuros

Embora os resultados obtidos nos testes de biomimética e nos testes de adesão celular tenham sido aprovados e serão publicados em breve em um periódico científico, ainda há a necessidade de um refinamento maior dos resultados de adesão celular. Portanto, o próximo passo, dessa vez relacionado com um trabalho na área de biomateriais, será a realização do experimento do cristal violeta para esse alumoxano e para a alumina sem modificação com ácido oxálico, permitindo-se uma contagem de células mais refinada. Também serão realizados testes *in vivo* com um controle estatístico do comportamento de um organismo vivo superior em relação a esses materiais quando nele implantados. Dessa forma será possível confirmar todos os indícios de biocompatibilidade para o alumoxano oxalato mostrados nessa dissertação.

5. CONCLUSÕES

Nesse trabalho, alumoxanos carboxilatos foram sintetizados e o sucesso na obtenção desses compostos pode ser comprovado pela caracterização dos materiais. Por espectroscopia na região do infravermelho, verificou-se que além das bandas características de alumoxanos reportadas na literatura, as bandas provenientes das carboxilas dos ácidos foram deslocadas para números de onda menores. Por análise termogravimétrica, foi possível verificar que há diferenças de comportamento entre os termogramas dos alumoxanos e os termogramas das misturas mecânicas entre seus respectivos ácidos carboxílicos e a alumina. Há um deslocamento na temperatura proveniente à perda do ácido carboxílico para temperaturas maiores que as da mistura mecânica, com uma tendência de aumento nessa diferença conforme a força do ácido diminui. É necessário que se comprove essa tendência através da repetição do experimento utilizando-se um número maior de alumoxanos diferentes.

Através dos experimentos de ângulo de contato, foi possível constatar que a modificação da superfície da alumina com ácido benzóico tornou-a hidrofóbica, visto que a superfície inicialmente apresentava-se totalmente molhável pela água, enquanto que após a sua modificação, a água passou a formar uma gota com um ângulo de $70 \pm 3^\circ$ em relação à superfície modificada. Essa modificação provocou a diminuição em 1/3 do trabalho de adesão na superfície do material. Os experimentos de ângulo de contato também foram de extrema valia para a constatação que deve haver um limite no valor do pK_a de um ácido carboxílico para que possa haver a reação desse composto com a superfície da alumina para a formação de um alumoxano carboxilato. Por esse trabalho, sugere-se que se trabalhe preferencialmente com ácidos cujos valores de pK_a não sejam iguais ou superiores a 5.

A modificação da superfície da alumina com ácido oxálico proporcionou a obtenção de um material com características biocompatíveis. Ao serem comparadas as micrografias eletrônicas da superfície da alumina com e sem modificação com ácido oxálico após os testes de biomimética, a imersão de discos de alumina modificada com ácido oxálico em SBF causou uma intensa precipitação de fosfato de cálcio na superfície desse material, com o mesmo não sendo observado na superfície sem modificação. Nos testes de adesão celular, houve um aumento considerável no metabolismo celular responsável pela redução

do MTT dos pré-osteoblastos em contato com as superfícies dos discos dos materiais ao se realizar essa modificação de superfície da alumina. Nos implantes realizados em ratos Wistar, a modificação da superfície e imersão do material em fluido corpóreo simulado possibilitou a formação de tecido ósseo ao redor do implante. Em trabalhos futuros, deverá ser feito um tratamento estatístico completo sobre os resultados e, em virtude do material já ser propriedade intelectual do grupo de pesquisa onde esse trabalho foi realizado, haverá a necessidade da adequação dos testes à norma ISO 10993.

Embora não explorada nesse trabalho, a modificação da superfície da alumina com o ácido vinil-acético abriu a possibilidade da inserção de grupos funcionais na superfície de aluminas, os quais não poderiam ser inseridos através de uma reação química envolvendo apenas uma etapa. Em trabalhos futuros, buscar-se-á a obtenção de novos materiais através de reações entre as ligações duplas presentes na superfície do alumoxano vinil-acetato e moléculas que possibilitem a formação de novos grupos funcionais na superfície desse material.

De maneira geral, esse trabalho deixa como conclusão principal que a modificação de superfície de um óxido de alumínio é uma possibilidade viável para a obtenção de novos materiais que tenham a necessidade de serem parecidos com as aluminas em relação às suas excelentes propriedades mecânicas, mas que necessitem de propriedades químicas diferentes em relação às suas superfícies.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Landry, C. C.; Pappé, N; Mason, M. R.; Apblett, A. W.; Tyler, A. N.; MacInnes, A. N.; Barron, A. R.; "From minerals to materials: synthesis of alumoxanes from the reaction of boehmite with carboxylic acids." *Mater Chem*, 1995, **5**, 331-341.
- [2] Pasykiewicz, S. "Alumoxanes: synthesis, structure, complexes and reactions." *Polyhedron*, 1990, **9**, 429-453.
- [3] Colclough, R. O.; Gee, G.; Jagger, A. H.; "The polymerization of propylene oxide by trimethyl aluminum." *J Polym Sci*, 1960, **48**, 273-278.
- [4] Colclough, R. O.; Gee, G.; Higginson, W. C. E.; Jackson, J. B.; Litt, M.; "The polymerization of epoxides by metal halide catalysts." *J Polym Sci*, 1959, **34**, 171-179.
- [5] Saegusa, T.; Fuji, Y.; Fuji, H.; Furukawa, J.; "Polymerization of acetaldehyde by triethylaluminum water system." *Makromolekul Chem*, 1962, **55**, 232-235.
- [6] Callender, R. L.; Harlan, C. J.; Saphiro, N. M.; Jones, C. D.; Callahan, D. L.; Wiesner, M. R.; MacQueen, D. B.; Cook, R.; Barron, A. R.; "Aqueous synthesis of water-soluble alumoxanes: environmentally benign precursors to alumina and aluminum-based ceramics." *Chem Mater*, 1997, **9**, 2418-2433.
- [7] Vogelson, C. T.; Koide, Y.; Alemany, L. B.; Barron, A. R.; "Inorganic-organic hybrid and composite resin materials using carboxylate-alumoxanes as fictionalized cross-linking agents" *Chem Mater*, 2000, **12**, 795-804.
- [8] Callender, R. L.; Barron, A. R.; "Novel route to alumina and aluminate interlayer coatings for SiC carbon, and Kevlar fiber-reinforced ceramic matrix composites using carboxylate-alumoxane nanoparticles." *J Mater Res*, 2000, **15**, 2228-2237.
- [9] Jones, C. D.; Fidalgo, M.; Wiesner, M. R.; Barron, A. R.; "Alumina ultrafiltration membranes derived from carboxylate-alumoxane nanoparticles." *J Membrane Sci*, 2001, **193**, 175-184.
- [10] Watanabi, M.; McMahon, C. N.; Harlan, C. J.; Barron, A. R.; "Reaction of trimethylaluminum with $[(t\text{Bu})\text{Al}(\text{O})_3]_6$: hybrid tert-butylmethylalumoxanes as cocatalysts for olefin polymerization." *Organometallics*, 2001, **20**, 460-467.
- [11] Defriend, K. A.; Barron, A. R.; "Surface repair of porous and damaged alumina bodies using carboxylate-alumoxane nanoparticles." *J Mater Sci*, 2002, **37**, 2909-2916.
- [12] Bertran, C. A.; Bertazzo, S.; Almeida, L. L.; Souza Jr, A.V.; "Hydroxyapatite formation on alumina surface modified by aluminoxane." *Key Eng Mat*, 2007, **330-332**, 753-756.
- [13] Fischer, H.; Niedhart, C.; Kaltenborn, N.; Prange, A.; Marx, R.; Niethard, F. U.; Telle, R.; "Bioactivation of inert alumina ceramics by hydroxylation." *Biomaterials*, 2005, **26**, 6151-6157.
- [14] Myers, D.; "Surfaces, interfaces and colloids: principles and applications", Wiley-VCH, 2nd ed. New York, 1999.
- [15] Roura, P.; Fort, J.; "Local thermodynamic derivation of Young's equation." *J Colloid Interf Sci*, 2004, **272**, 420-429.
- [16] Interrante, L. V.; Hampden-Smith, M. J.; "Chemistry of advanced materials", Wiley-VCH, New York, 1998.
- [17] Hench, L. L.; Wilson, J.; "Introduction to bioceramics", World Scientific, River Edge, 1993.
- [18] Minoda, Y.; Kobayashi, A.; Iwaki, H.; Miyaguchi, M.; Kadoya, Y.; Ohashi, H.; Takaoka, T.; "Polyethylene wear particle generation in vivo in an alumina medial pivot total knee prosthesis." *Biomaterials*, 2005; **26**, 6034-6040.

- [19] Minoda, Y.; Kobayashi, A.; Iwaki, H.; Miyaguchi, M.; Kadoya, Y.; Ohashi, H.; Yamano, Y.; Takaoka, K.; "Polyethylene wear particle synovial fluid after total knee arthroplasty." *Clin Orthop Relat R*, 2003, **410**, 165-172.
- [20] Kokubo, T.; Kushitani, H.; Sakka, S.; Kitsugi, T.; Yamamuro, T.; "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure change in bioactive glass-ceramic A-W." *J Biomed Mater Res* 1990, **24**, 721-734.
- [21] Oyane, A.; Kim, H. M.; Furuya, T.; Kokubo, T.; Miyazaki, T.; Nakamura, T.; "Preparation and assessment of revised simulated body fluids." *J Biomed Mater Res*, 1991, **65**, 188-195.
- [22] Kokubo, T.; "Bioactive glass ceramics: properties and applications." *Biomaterials*, 2003, **12**, 155-163.
- [23] Bunker, B. C.; Rieke, P. C.; Tarasevich, B. J.; Campbell, A. A.; Fryxell, G. E.; Graff, G. L.; Song, L.; Liu, J.; Virden, J. W.; McVay, G. L.; "Ceramic thin-film formation on functionalized interfaces through biomimetic processing." *Science*, 1994, **264**, 48-55.
- [24] Anselme, K.; "Osteoblast adhesion on biomaterials." *Biomaterials*, 2000, **21**, 667-681.
- [25] Grzesik, W. J.; Robey, P. G.; "Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro" *J Bone Miner Res*, 1994, **9**, 487-496.
- [26] Boyan, B. D.; Hummert, T. W.; Dean, D. D.; Schwartz, Z.; "Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response." *Biomaterials*, 1996, **17**, 137-146.
- [27] Altanov, G.; Groth, T.; "Reorganization of substratum-bound fibronectin on hydrophilic and hydrophobic materials is related to biocompatibility." *J Mater Sci-Mater M*, 1994, **5**, 732-737.
- [28] Liu, Q.; Ding, J.; Mante, F. K.; Wunder, S. L.; Baran, G. R.; "The role of surface functional groups in calcium phosphate nucleation on titanium foil: a self-assembled monolayer technique." *Biomaterials*, 2002, **23**, 3103-3111.
- [29] Lee, M. H.; Brass, D. A.; Morris, R.; Composto, R. J.; Ducheyne, P.; "The effect of non-specific interactions on cellular adhesion using model surfaces." *Biomaterials*, 2005, **26**, 1721-1730.
- [30] Carey, F. A.; Organic chemistry; 3rd ed, McGraw-Hill, New York, 1996.
- [31] Osawa, C.; Bertran, C.A., "Sol-gel synthesis of transparent alumina gel and pure gamma alumina by urea hydrolysis of aluminum nitrate." *J Sol-Gel Sci Tech*, 2004, **30**, 135-140.
- [32] Mosmann, T.; "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods*, 1983, **65**, 55-63.
- [33] Colthup, N. B.; Wiberley, S. E.; Daly, L. H.; "Introduction to infrared and raman spectroscopy", Academic Press Inc, London, 1964.
- [34] Scwenker, R. F.; "Thermal analysis", Academic Press, New York, 1969.
- [35] Mackenzie, R. J.; "The differential thermal investigation of clays", Mineralogical Society, London, 1957.
- [36] de Lima, P. T.; Bertran, C. A.; Thim, G. P.; "Rotas de síntese e a homogeneidade dos precursores de mulita e cordierita." *Quim Nova*, 1998, **21**, 608-613.
- [37] Clar, C.; Scian, A. N.; Aglietti, E. F.; "Synthesis and characterization of aluminum carboxylate gels." *Thermochim Acta*, 2003, **407**, 33-40.
- [38] Paquette, L. A.; "Encyclopedia of reagents for organic synthesis", John Willey & Sons, New York, 1995.
- [39] Kokubo, T.; Takadama, H.; "How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?" *Biomaterials*, 2006, **27**, 2907-2915.

- [40] Gyorgy, E.; Grigorescu, S.; Socoi, G.; Mifilailescu, I. N.; Janackovic, D.; Dndune, A.; Kanepe, Z.; PalcevskiSe, E.; Zdrentu, E. L.; Petrescu, S. M.; "Bioactive glass and hydroxyapatite thin films obtained by pulsed laser deposition." *Appl Surf Sci*, 2007, **253**, 7981-7986
- [41] Kokubo, T.; "Formation of biologically active bone-like apatite on metals and polymers by a biomimetic process." *Thermochim Acta*, 1996, **280/281**, 479-490.
- [42] Ctibor, P.; Bohác, P.; Stranyánek, M.; Ctvrtlíc, R.; "Structure and mechanical properties of plasma sprayed coatings of titania and alumina." *J Eur Ceram Soc*, 2006, **26**, 3509-3514.
- [43] Murphy, M. E.; Laugier, M. T.; Beake, B. D.; Sutton, D.; Newcomb, S. B.; "The effects of C ion implantation on the near surface microstructure and properties of alpha alumina." *J Mater Sci* 2002, **37**, 2053-2059.
- [44] Xu, T.; Jin, J.; Gregory, C.; Hickman, J.; Boland, T.; "Inkjet printing of viable mammalian cells." *Biomaterials*, 2005, **26**, 93-99.

7. ANEXOS



UNICAMP



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 1709-1, sobre "Síntese e propriedades de alumoxanos: modificações de superfície e aplicações", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran / Helder Augusto da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 18 de novembro de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1709-1, entitled "Synthesis and properties of alumoxanes: surface modifications and applications", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on November 18, 2008.

Campinas, 18 de novembro de 2008.

Prof. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo
Vice-Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva