

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE TECIDOS VÍTREOS
FLEXÍVEIS ALTAMENTE BIOATIVOS**

Marina Trevelin Souza

São Carlos
2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE TECIDOS VÍTREOS
FLEXÍVEIS ALTAMENTE BIOATIVOS**

Marina Trevelin Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Orientador: Dr. Edgar Dutra Zanotto

Coorientador: Dr. Oscar Peitl

Agência Financiadora: FAPESP

São Carlos
2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S729d Souza, Marina Trevelin
Desenvolvimento e caracterização de tecidos vítreos flexíveis altamente bioativos / Marina Trevelin Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
218 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Vidros. 2. Vidro bioativo. 3. Fibra de vidro bioativo. 4. Regeneração tecidual. 5. Engenharia de tecidos. I. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família e amigos pelo apoio, amor e incentivo demonstrados todos esses anos.

VITAE DO CANDIDATO

Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de São Carlos (2011). Graduada em Odontologia pela Universidade Estadual de Campinas – SP (2008).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Marina Trevelin Souza, realizada em 26/10/2015:

Prof. Dr. Edgar Dutra Zanotto
UFSCar

Prof. Dr. Anselmo Ortega Boschi
UFSCar

Profa. Dra. Dulcina Maria Pinatti Ferreira de Souza
UFSCar

Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo
USP

Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Junior,
USP

AGRACEDIMENTOS

Agradeço ao Prof. Edgar Dutra Zanotto pela confiança depositada em mim para seguir em frente com este trabalho.

Ao Prof. Oscar Peitl pelo seu trabalho de coorientação e apoio durante todo este período.

Agradeço a todos os amigos do LaMaV com quem tive o prazer de trabalhar durante o desenvolvimento deste projeto, não vou enumerá-los para não correr o risco de esquecer algum, mas todos sabem o quanto foram importante para a realização deste trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV – UFSCar) José Rodrigues Silva, pela valiosa colaboração nos experimentos desenvolvidos.

À Laurie e Ligia, pela paciência e ajuda com os muitos trâmites burocráticos do projeto.

À minha família pelo apoio e compreensão durante todo este período.

Ao Caio Cesar pela paciência, compreensão e incentivo em todos os momentos.

A todos os colaboradores que confiaram em nosso trabalho e ajudaram imensamente na conclusão do mesmo com os ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPG-CEM) e a banca de professores que tem contribuído de forma valiosa desde o projeto de mestrado.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram de alguma maneira à concretização deste projeto.

RESUMO

Os vidros bioativos foram desenvolvidos por Hench, em 1969, e são amplamente conhecidos por ter a capacidade de formar rapidamente uma ligação química com tecidos vivos duros e moles. Atualmente, estes vidros vêm sendo utilizados clinicamente como biomateriais que auxiliam na regeneração óssea em aplicações odontológicas e ortopédicas. Entretanto, sua utilização ainda é restrita devido à sua fragilidade e também à limitação de suas formas disponibilizadas comercialmente, como pós e grânulos. Portanto, a busca por um processo que viabilize sua conformação em fibras e tecidos (malhas) é bastante promissora, já que este formato poderá expandir de forma significativa o espectro de utilização deste excelente biomaterial. Deste modo, este projeto teve como objetivo desenvolver e aprimorar a produção de fibras de vidros altamente bioativas pelo método de *downdrawing*, assim como otimizar a produção de tecidos vítreos a partir destas fibras e caracterizá-los em relação as suas propriedades físico-químicas e biológicas. Para tanto, foi utilizada uma nova composição vítrea bioativa previamente desenvolvida no Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV - UFSCar) que possui rápida interação com os fluidos corpóreos para promoção acelerada do processo de regeneração e diminuída tendência de cristalização durante seu processamento em fibras, já que a formação de cristais dificulta ou até impede a obtenção das mesmas. Os resultados obtidos evidenciaram que esta nova composição vítrea bioativa está mais apta a passar por processos de conformação que envolvam altas temperaturas do que outros vidros bioativos atualmente conhecidos, sendo portanto, possível a obtenção de tecidos e malhas altamente flexíveis pelo processo de *downdrawing*. Concomitantemente, este novo material apresenta propriedades físico-químicas e biológicas semelhantes as do biovidro *gold standard* 45S5, tornando possível a utilização deste biomaterial em diversas aplicações para regeneração tecidual *in situ*.

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF FLEXIBLE AND HIGHLY BIOACTIVE GLASS FIBERS MESHES

ABSTRACT

Bioactive glasses were developed by Hench in 1969, and are widely known to have the ability to rapidly form a chemical bond with hard and soft living tissues. Currently, these glasses have been used clinically as biomaterials that act in bone regeneration in dental and orthopedic applications. However, their use is still very limited due to their fragility and also the limited commercially available forms, such as powders and granules. Therefore, the development of processes that make possible their conformation in fibers and fabrics (meshes) is indeed promising and highly desired, as this new shape could significantly expand the usage spectrum of this excellent biomaterial. Thus, this project aimed to develop and improve the production of highly bioactive glass fibers by the downdrawing process, as well as optimize the production of unwoven fabrics and characterize them in relation to their physicochemical and biological properties. Therefore, a new bioactive glass composition previously developed at the Vitreous Materials Laboratory was used (LaMaV - UFSCar). This new bioactive glass presents a fast interaction with the body fluids to rapidly promote the healing process and reduced crystallization tendency for its processing into fibers, as crystal formation difficult or even impossible to obtain the same. The obtained results showed that this new bioactive glass composition is more suitable to undergo through working processes involving high temperatures than other currently known bioactive glasses, being then, possible to produce highly flexible fabrics and meshes by the downdrawing process. Concurrently, this new biomaterial presents similar physical-chemical and biological properties to gold standard bioglass 45S5, making this new biomaterial suitable for several applications aiming *in situ* tissue regeneration.

PUBLICAÇÕES

1. Souza, M.T., Peitl, O., Zanotto, E.D. Fibrous scaffolds from a new highly bioactive glass. *Dental Materials*, v. 28, p. 40, 2012.
2. Gabbai Armelin, P.R., Souza, M.T., Kido, H.W. et al. Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (accepted paper).
3. Crovace, M.C.; Souza, M.T.; Chinaglia, C.R.; Peitl, O., Zanotto, E.D. Biosilicate® — A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. In vitro, in vivo and clinical trials. *Journal of Non-Crystalline Solids* (accepted paper) DOI: 10.1016/j.jnoncrysol.2015.03.022.
4. Barros, A.C.P., Rastelli, A.N.S., Nicodelli, G., Trevelin, M., Zanotto, E.D. Remineralização do esmalte dental após clareamento dental aplicando-se vidro bioativo. *Rev. Odontol. UNESP*, vol.42, n. Especial, 2013.
5. Gabbai Armelin, P.R., Souza, M.T., Kido, H.W. et al. *In vivo* and *in vitro* biocompatibility of a new fibrous glassy scaffold. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 8, p. 326, 2014.

Patentes Depositadas

1. Souza, M.T., Peitl, O., Zanotto, E.D. "Conduíte tubular à base de fibras de vidro bioativo e biorreabsorvível para regeneração de tecido nervoso periférico e processo de obtenção do mesmo". BR 10 2014 032548 4 (2014).
2. Souza, M.T., Peitl, O., Zanotto, E.D. "Equipamento e Método para a Obtenção de Fibras por Downdrawing a partir de Composições de Baixa Estabilidade Vítreas". BR 10 2014 023349 0 (2014).
3. Souza, M.T., Peitl, O., Zanotto, E.D. "Composição Vítreas, Fibras e Tecidos Vítreos Bioativos e Artigos" BR 10 2013 020961 9, PCT: BR2014/000275 (2013).

Capítulo de Livro

1. Ding Y., Souza M.T., Li W., W. Schubert D., Boccaccini A. R., Roether J. Bioactive glass - Biopolymer Composites for Applications in Tissue Engineering. In: Handbook of Bioceramics and Biocomposites. Publicado pela Springer (capítulo aceito para publicação).

Resumos Publicados em Anais de Congressos

1. Souza, M.T.; Peitl, O.; OLIVEIRA, P. T.; Zanotto, E.D. New Bioactive Glass with Low Devitrifying Tendency. In: Innovations in Biomedical Materials, 2012, Raleigh, NC. - The American Ceramic Society, 2012. v. 01.
2. Souza, M.T.; Peitl, O.; OLIVEIRA, P.T.; Zanotto, E.D. Fibrous Scaffolds from a New Highly Bioactive Glass, Academy of Dental Materials, 2012, Orlando, FL.
3. Souza, M. T.; Peitl, O.; Zanotto, E.D. Crystallization Tendency of a New Bioactive Glass In Internacional Congress on Glass, 2013, Praga, República Tcheca. - The American Ceramic Society, 2012. v. 01.
4. Souza, M.T.; Peitl, O.; Zanotto, E.D. New Highly Bioactive Glass Fibers for Skin Care. In: 1st Joint Meeting of DGG – ACerS GOMD, 2013, Aachen, DE.
5. Souza, M.T.; Peitl, O; Zanotto, E.D. New Highly Bioactive Glass Fibers for Soft Tissue Regeneration. In: Glass & Optical Materials Division and Deutsche Glastechnische Gesellschaft Joint Annual Meeting, 2015, Miami, EUA.

SUMÁRIO

	Pág.
FOLHA DE APROVAÇÃO.....	i
AGRACEDIMENTOS	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
PUBLICAÇÕES.....	ix
SUMÁRIO.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xix
SÍMBOLOS E ABREVIACIONES.....	xxix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Biomateriais	3
2.1.1 Biomateriais de Primeira Geração.....	5
2.1.2 Biomateriais de Segunda Geração	6
2.1.3 Biomateriais de Terceira Geração	6
2.1.4 Classes de Bioatividade	8
2.1.5 Vidros Bioativos	9
2.1.5.1 Composições.....	11
2.1.5.2 Cascata de Reações dos Vidros Bioativos	13
2.1.5.2.1 Mecanismo de reação dos vidros bioativos em meio aquoso ou em fluido corpóreo.....	14
2.1.5.2.2 Mecanismo de Interação Celular	17
2.1.5.2.3 Ligação com Tecidos Moles.....	19
2.1.5.2.4 Controle Genético do Ciclo Celular Osteoblástico.....	20
2.1.5.3 Aplicações.....	22
2.2 Fibras de Vidro.....	25

2.2.1 Princípios de Formação dos Fundidos e Fibras de Vidro	25
2.2.2 Processo de Obtenção de Fibras.....	26
2.2.2.1 <i>Downdrawing</i>	27
2.2.2.1.1 Princípios para o Design de Novas Formulações.....	28
2.2.2.1.2 Fundamentos das Propriedades Vítreas para a Obtenção de Fibras.....	29
2.2.2.1.2.1 Devitrificação e Crescimento de Cristais	31
2.2.3 Fibras de Vidro Bioativo	33
2.2.3.1 Propriedades Relacionadas às Fibras de Vidro Bioativo.....	36
2.2.3.1.1 Aplicações das Fibras de Vidro Bioativo.....	37
2.3 Ensaio <i>In Vitro</i> e <i>In Vivo</i>	38
3 OBJETIVOS.....	41
4 ORIGINALIDADE DO ESTUDO.....	43
5 MATERIAIS E MÉTODOS	45
5.1 Nova Composição de Vidro Bioativo	45
5.2 Obtenção das Fibras e Tecidos	45
5.2.1 Microscopia Ótica.....	47
5.2.2 Escolha do <i>Coating</i> e suas Características.....	47
5.3 Caracterização do Novo Vidro Bioativo	48
5.3.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	48
5.3.2 Difração de raios X.....	49
5.3.3 Dilatometria Ótica.....	50
5.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	50
5.3.5 Ensaio de Viscosidade	51
5.3.6 Outras Propriedades	51
5.3.7 Ensaio <i>In Vitro</i> Inorgânicos (Acelulares)	52

5.3.7.1 Ensaio de Bioatividade (SBF-K9).....	52
5.3.7.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	55
5.3.7.2 Ensaio de Degradação	56
5.3.7.2.1 Solução de Degradação	56
5.3.7.2.2 Amostras monolíticas	57
5.3.7.2.3 Amostras em Pó	57
5.3.7.2.4 Fibras Bioativas e do Tecido Vítreo	58
5.3.7.3 Ensaio para Remineralização Dental.....	59
5.3.8 Ensaio <i>In Vitro</i> Celulares.....	59
5.3.8.1 Ensaio de Viabilidade Celular	60
5.3.8.2 Ensaio de Citotoxicidade <i>In Vitro</i>	61
5.3.8.3 Avaliação das Propriedades Antimicrobianas.....	61
5.3.8.3.1 Atividade Anti-Biofilme	62
5.3.8.4 Ensaio em Células Imunológicas	64
5.3.8.5 Ensaio com Fibroblastos Humanos	64
5.3.9 Ensaio <i>In Vivo</i>	65
5.3.9.1 Ensaio para Regeneração do Tecido Ósseo	65
5.3.9.1.1 Tecido Ósseo da Calvária.....	65
5.3.9.1.2 Tecido Ósseo de Tíbia.....	66
5.3.9.2 Ensaio para Tecidos Tegumentares	67
5.3.9.2.1 Ensaio para Regeneração de Queimaduras.....	67
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
6.1 Manutenção e Aprimoramento da Máquina de <i>Downdrawing</i>	69
6.2 Caracterização do Novo Vidro Bioativo	71
6.2.1 Calorimetria Diferencial de Varredura.....	71

6.2.2 Difração de Raios-X	76
6.2.3 Dilatometria Ótica.....	79
6.2.4 Viscosidade.....	81
6.2.5 Outros Parâmetros de Processamento	86
6.2.6 Propriedades Gerais	91
6.2.6.1 Dureza.....	92
6.3 Ensaio <i>In Vitro</i> Acelulares	93
6.3.1 Ensaio de Bioatividade com Solução de SBF-K9.....	93
6.3.2 Ensaio de Degradação.....	99
6.3.2.1 Estudo do Coating Biorreabsorvível	99
6.3.2.2 Estudo de Degradação do Vidro F18	103
6.3.2.2.1 Amostras Monolíticas	104
6.3.2.2.1.1 Espectroscopia de Infravermelho e MEV - Pastilhas.....	106
6.3.2.2.2 Amostras em Pó	109
6.3.2.2.3 Amostras na Forma de Fibras	116
6.3.2.2.3.1 Espectroscopia de Infravermelho e Microscopia eletrônica de varredura.....	121
6.3.2.2.3.2 Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma (ICP-OES).....	132
6.3.2.2.4 Tecido Vítreo.....	138
6.3.2.2.4.1 Espectroscopia de Infravermelho e Microscopia Eletrônica de Varredura.....	140
6.4 Ensaio <i>In Vitro</i>	146
6.4.1 Ensaio Acelulares.....	146
6.4.1.1 Ensaio de Remineralização Dental	146
6.4.2 Ensaio Celulares	148
6.4.2.1 Ensaio de Adesão e Viabilidade.....	148

6.4.2.2 Ensaio de Viabilidade e Genotoxicidade.....	152
6.4.2.3 Ensaio de Citotoxicidade em Fibroblastos Humanos.....	154
6.4.2.4 Propriedades Antibacterianas	157
6.4.2.4.1 Atividade Anti-Biofilme	162
6.4.2.5 Ensaio Imunológico	165
6.5 Ensaio In Vivo	168
6.5.1 Biocompatibilidade.....	168
6.5.2 Regeneração Óssea.....	171
6.5.2.1 Regeneração de Lesões em Calvária.....	171
6.5.2.2 Regeneração de Lesões em Tíbia.....	177
6.5.3 Ensaio para Tecidos Tegumentares	185
6.5.3.1 Ensaio para Regeneração de Queimaduras	185
7 CONCLUSÕES.....	191
8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	193
9 REFERÊNCIAS.....	195
ANEXO I.....	207
ANEXO II.....	213

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 2.1 – Vantagens e desvantagens no uso clínico dos vidros bioativos e de outros biomateriais [Adaptado de 28].....	24
Tabela 2.2 – Designações e Características dos vidros inertes para produção de fibras [Adaptado de 29].....	28
Tabela 2.3 – Composições de diferentes vidros com diferentes comportamentos viscosos em relação à temperatura [Adaptado de 49].....	35
Tabela 5.1 – Reagentes envolvidos na preparação de 1 litro da solução de SBF-K9.....	53
Tabela 6.1 – Parâmetros de processamento após a manutenção, ajuste dos fornos e desenvolvimento de novos dispositivos para a máquina de puxamento.....	71
Tabela 6.2 – Valores de K_2 para as composições analisadas para amostras monolíticas e em pó.....	73
Tabela 6.3 – Valores de $T_{2,5}$ a T_3 para formulação F18.....	76
Tabela 6.4 – Valores de PCT encontrados para os vidros 45S5, 13-93 e F18.....	79
Tabela 6.5 – Índice de fragilidade calculado para diversos vidros.....	83
Tabela 6.6 – Valores para os índices industriais de processamento WRI e D para diferentes vidros.....	84
Tabela 6.7 - Novos parâmetros encontrados depois dos resultados de viscosidade de vidro F18.....	86
Tabela 6.8 – Novos parâmetros de processamento para vidro F18.....	87
Tabela 6.9 – Valores para algumas propriedades do novo vidro bioativo F18 e o 45S5.....	91
Tabela 6.10 – Médias para a perda de massa por dia para os vidros F18 e 45S5.....	142
Tabela 6.11 - Resultados obtidos a partir dos ensaios baseados na norma JIZ Z 2801:2010 através do contato do pó do vidro bioativo F18 com diferentes cepas bacterianas [81]	155

Tabela 6.12 – Resultados obtidos a partir dos ensaios baseados na norma JIZ Z 2801:2010 através do contato de mantas do vidro bioativo F18 com diferentes cepas bacterianas [81].....	156
Tabela 6.13 – Percentual e desvio padrão da densidade óssea neoformada nos grupos G1 e G2 para os tempos de 2, 4, 8 e 16 semanas [57].....	172

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1 - Evolução dos biomateriais [Adaptado de 6].....	8
Figura 2.2 - Diagrama do sistema $\text{Na}_2\text{O}\cdot\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot\text{SiO}_2$ com uma concentração fixa de 6%-p de P_2O_5 para os materiais na região A. [Adaptado de 11].....	10
Figura 2.3 - Esquema simplificado das cinco reações relacionadas à interação química dos vidros bioativos [18].	15
Figura 2.4 - Tempo de reação para formação de HCA, em diferentes meios, em relação à quantidade de sílica em cada composição [Adaptado de 1].....	16
Figura 2.5 - Esquema simplificado das reações relacionadas à interação celular dos vidros bioativos [15].....	18
Figura 2.6 - Sequência de reações interfaciais dos vidros bioativos com os tecidos vivos [Adaptado de 11].	18
Figura 2.7 - Esquema do ciclo celular de um osteoblasto quando exposto a um vidro bioativo [Adaptado de 25].....	21
Figura 2.8 - Métodos de obtenção de fibras de vidro [Adaptado de 36].....	27
Figura 2.9 - Curva de viscosidade para o vidro de janela [Adaptado de 34]. ...	30
Figura 5.1 - Esquema simplificado da máquina de puxamento de fibras desenvolvida e instalada no LaMaV.....	46
Figura 5.2 - Esquema de adaptação da amostra no ensaio de bioatividade [Adaptado de 32].....	55
Figura 5.3 - Dispositivo projetado e confeccionado para o estudo da habilidade redução de biofilmes.	63
Figura 6.1 - Forno da máquina de <i>downdrawing</i> localizada no Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV).....	69
Figura 6.2 - Esquema simplificado do novo dispositivo desenvolvido para o processamento de composições de baixa estabilidade vítrea [69].	70
Figura 6.3 - Gráfico obtido por meio do ensaio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) de amostras monolíticas para formulações 45S5, F18 e 13-93.	72
Figura 6.4 - Gráfico obtido por meio do ensaio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) de amostras monolíticas para formulações 45S5 e 13-93. ...	75

Figura 6.5 - Gráfico obtido por meio do ensaio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) das amostras de formulação F18 após tratamento térmico de 7 e 28 dias.	75
Figura 6.6 - Difratoograma de raios-X da formulação 18 utilizando-se o tratamento térmico para crescimento dos cristais a 800°C por 7 dias.	77
Figura 6.7 - Difratoograma de raios-X da formulação 18 utilizando-se o tratamento térmico para crescimento dos cristais a 800°C por 28 dias.	77
Figura 6.8 - Ensaio de microscopia de aquecimento para uma amostra sólida (bulk) do vidro bioativo F18. As temperaturas encontradas foram: Sinterização - 708°C; Amolecimento - 712°C; Esfera - 722°C; Meia Esfera - 820°C e Fusão - 859°C.	79
Figura 6.9 - Ensaio de microscopia de aquecimento para amostras em pó (25-75m) do vidro bioativo F18 (a) e do vidro Bioglass 45S5 (b). As temperaturas encontradas para o vidro F18 foram: Sinterização - 575°C; Amolecimento - 576°C; Esfera - 709°C; Meia Esfera - 802°C e Fusão - 838°C.	80
Figura 6.10 - Curva de viscosidade em alta temperatura do vidro bioativo F18, 45S5 e 13-93.	82
Figura 6.11 - Curva de viscosidade em alta temperatura do vidro bioativo F18, E-glass, Fiber Wool Glass, Soda-Lime Glass e 13-93 [Adaptado de 36,72]. ...	82
Figura 6.12 - Curva de viscosidade em alta temperatura do vidro bioativo F18, 45S5 e 13-93 com os dados obtidos nos ensaios de baixa temperatura.	85
Figura 6.13 – Cadinhos de ZAS utilizados para o processo de puxamento.	87
Figura 6.14 - Formação da gota de F18 durante seu processamento em fibras.	89
Figura 6.15 – Tecidos obtidos com a) velocidade de puxamento de 10,5 Hz e b) velocidade de puxamento de 15 Hz.	90
Figura 6.16 - Tecidos obtidos com velocidade de puxamento de 20 Hz.	91
Figura 6.17 - Dureza dos vidros F18 e 45S5.	93
Figura 6.18 - Espectroscopia de Infravermelho após ensaios de imersão em SBF-K9 para períodos de 0 a 16h.	94

Figura 6.19 - Espectroscopia de Infravermelho após ensaios de imersão em SBF-K9 para períodos de 24 a 168h.....	95
Figura 6.20 – Micrografias de amostras monolíticas do vidro bioativo F18 após a imersão em solução SBF-K9 por a) 24 horas, b) 72 horas e c) 168 horas. ..	96
Figura 6.21 - Análise da taxa de lixiviação dos íons Ca, P, Na, K e Si do vidro F18 em solução de SBF-K9.	97
Figura 6.22 - Espectroscopia para amostras monolíticas de F18 com e sem recobrimento por colágeno.	101
Figura 6.23 - Espectroscopia de Infravermelho para amostras imersas em SBF-K9 por diferentes períodos.	102
Figura 6.24 – Fibras do vidro F18 totalmente cobertas com o <i>coating</i> bioreabsorvível, aumento de 500x.	102
Figura 6.25 - Fibras do vidro F18 totalmente cobertas com o <i>coating</i> bioreabsorvível aumentos de a) 2000x e b) 5000x.	103
Figura 6.26– Taxa de degradação para amostras monolíticas dos vidros 45S5 e F18 (nova composição).....	104
Figura 6.27 - Ensaio de degradação para amostras monolíticas dos vidros 45S5 e F18 (nova composição).....	106
Figura 6.28 - Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em disco 45S5 nos períodos de 0, 1, 3 e 5 dias.	107
Figura 6.29 – Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em disco da nova composição vítrea nos períodos de 0, 1, 3 e 5 dias.	107
Figura 6.30 – Imagens de MEV das amostras monolíticas com 24 horas de ensaio a) 45S5 e b) F18.....	108
Figura 6.31 – Imagens de MEV das amostras monolíticas com 168 horas de ensaio a) 45S5 e b) F18.....	108
Figura 6.32 – Imagens de MEV das amostras em pó com 24 horas de ensaio a) 45S5 e b) F18.	110
Figura 6.33 – Imagens de MEV das amostras em pó com 168 horas de ensaio a) 45S5 e b) F18.	111

Figura 6.34 - Ensaio de degradação para amostras em pó a) para o vidro 45S5 e b) para o vidro F18, utilizando-se a nova metodologia.	112
Figura 6.35 – Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em pó com nova metodologia para os vidros 45S5 e F18 nos períodos de 8,24, 72,120 e 168 horas.....	113
Figura 6.36 – Imagens de MEV das amostras em pó de 500µm com 8 horas de ensaio em de degradação da norma ISO 10993-14 a) F18 e b) 45S5.	114
Figura 6.37– Imagens de MEV das amostras em pó de 675 µm com 8 horas de ensaio em de degradação da norma ISO 10993-14 a) F18 e b) 45S5.	115
Figura 6.38 - Perda de massa das amostras de fibra 25µm em solução de SBF-K9 e pH em relação ao tempo de ensaio.	117
Figura 6.39- Perda de massa das amostras de fibra 25µm em solução normatizada de degradação (ISO 10993-14) e pH em relação ao tempo de ensaio.....	117
Figura 6.40 - Perda de massa das amostras de fibra 45µm em solução de SBF-K9 e pH em relação ao tempo de ensaio.	118
Figura 6.41 - Perda de massa das amostras de fibra 45µm em solução normatizada de degradação (ISO 10993-14) e pH em relação ao tempo de ensaio.....	118
Figura 6.42 - Perda de massa das amostras de fibra de 25µm em solução de SBF e das amostras de fibra de 25µm em solução normatizada de degradação (ISO 10993-14).....	119
Figura 6.43 - Perda de massa das amostras de fibra de 45µm em solução de SBF e das amostras de fibra de 45µm em solução normatizada de degradação (ISO 10993-14).....	120
Figura 6.44 – Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em fibra de 25 µm em solução normatizada de degradação ISO 10993-14 nos períodos de 4, 8 e 16h, 1, 3, 5 e 7 dias.	122
Figura 6.45 – Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em fibra de 25 µm em solução normatizada de SBF nos períodos de 4, 8 e 16h, 1, 3, 5 e 7 dias.	122

Figura 6.46 – Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em fibra de 45 μm em solução normatizada de degradação ISO 10993-14 nos períodos de 4, 8 e 16h, 1, 3, 5 e 7 dias.	123
Figura 6.47 – Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em fibra de 45 μm em solução de SBF nos períodos de 4, 8 e 16h, 1, 3, 5 e 7 dias.	123
Figura 6.48 - Micrografia da amostra em fibra 25 μm em solução de degradação ISO 10993-14 por 4 horas (a) aumento de 10000x e (b) aumento de 5000x.	124
Figura 6.49- Micrografia da amostra em fibra 25 μm em solução de SBF por 4 horas (a) aumento de 2500 e (b) aumento de 5000x (seta – HCA).	125
Figura 6.50 - Micrografia da amostra em fibra 45 μm em solução de degradação ISO 10993-14 por 4 horas (a) aumento de 5050x e (b) aumento de 5000x (seta – HCA).	125
Figura 6.51 - Micrografia da amostra em fibra 45 μm em solução de SBF por 4 horas (a) aumento de 5000x e (b) aumento de 6500x (seta – HCA).	126
Figura 6.52 - Micrografia da amostra em fibra 25 μm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 e (b) em solução de SBF por 8 horas (aumento de 2500x).	127
Figura 6.53 - Micrografia da amostra em fibra 45 μm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 e (b) em solução de SBF por 8 horas (aumento de 2500x).	127
Figura 6.54 - Micrografia da amostra em fibra 25 μm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 (aumento de 2500x) e (b) em solução de SBF por 24 horas (aumento de 2500x).	128
Figura 6.55 - Micrografia da amostra em fibra 45 μm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 (aumento de 5000x) e (b) em solução de SBF por 24 horas (aumento de 2500x).	128
Figura 6.56 - Micrografia da amostra em fibra 25 μm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 (aumento de 5000x) e (b) em solução de SBF por 5 dias (aumento de 5000x).	129

Figura 6.57 - Micrografia da amostra em fibra 45µm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 (aumento de 5000x) e (b) em solução de SBF por 5 dias (aumento de 5000x).....	129
Figura 6.58 - Micrografia da amostra em fibra 25µm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 (aumento de 2500x) e (b) em solução de SBF por 7 dias (aumento de 2500x).....	130
Figura 6.59 - Micrografia da amostra em fibra 45µm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 (aumento de 2500x) e (b) em solução de SBF por 7 dias (aumento de 2500x).....	130
Figura 6.60 – Quantificação iônica de cálcio nas soluções de degradação ISO 10993-14 e SBF para fibras de 25 e 45 µm de diâmetro.....	132
Figura 6.61 - Quantificação iônica de sódio na solução de degradação durante o ensaio com fibras de 25 e 45 µm de diâmetro.....	134
Figura 6.62 - Quantificação iônica de sódio na solução de SBF durante o ensaio com fibras de 25 e 45 µm de diâmetro.....	134
Figura 6.63 – Quantificação iônica de potássio nas soluções de degradação e SBF durante o ensaio de degradação das fibras de 25 e 45 µm de diâmetro.....	135
Figura 6.64 – Quantificação iônica de fósforo nas soluções de degradação e SBF durante o ensaio de degradação das fibras de 25 e 45 µm de diâmetro.....	136
Figura 6.65 – Quantificação iônica de silício nas soluções de degradação e SBF durante o ensaio de degradação das fibras de 25 e 45 µm de diâmetro.....	137
Figura 6.66 - Perda de massa das amostras de tecido vítreo em solução de SBF e pH em relação ao tempo de ensaio.....	139
Figura 6.67 - Perda de massa das amostras de tecido vítreo em solução normatizada de degradação e pH em relação ao tempo de ensaio.	139
Figura 6.68 – Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra de tecido vítreo em solução normatizada de degradação ISO 10993-14 (a) e SBF-K (b) nos períodos de 4, 8 e 16h, 1, 3, 5 e 7 dias.	140
Figura 6.69 - Micrografia da amostra de tecido vítreo em solução de degradação por (a) 4 horas, (b) 16 horas e (c) 24 horas.....	141

Figura 6.70 - Micrografia da amostra de tecido vítreo em solução de degradação por (a) 3 dias, (b) 5 dias e (c) 7 dias.....	142
Figura 6.71 - Micrografia da amostra de tecido vítreo em solução de SBF por (a) 4 horas, (b) 16 horas e (c) 24 horas.	143
Figura 6.72 - Micrografia da amostra de tecido vítreo em solução de degradação por (a) 3 dias, (b) 5 dias e (c) 7 dias.....	144
Figura 6.73 – Análise da faixa granulométrica para o pó do vidro bioativo F18	147
Figura 6.74 – Micrografias das amostras recoberta com o gel de HPMC e o pó do vidro F18 antes e depois dos ensaios de imersão em solução SBF-K9. ...	147
Figura 6.75 - Análise microscópica da viabilidade celular de osteoblastos em amostras monolíticas de vidro F18 em a) 1 dia, b) 3 dias e c) 5 dias.	149
Figura 6.76 - Análise microscópica da viabilidade celular de osteoblastos em amostras monolíticas de vidro 45S5 em a) 1 dia, b) 3 dias e c) 5 dias.	150
Figura 6.77 - Gráfico da viabilidade celular para 1, 3 e 5 dias para amostras de F18 e 45S5.....	151
Figura 6.78 – Proliferação de fibroblastos em diferentes concentrações do extrato com as fibras de vidro F18 (100%, 50%, 25% e 12.5%) em diferentes tempos de cultivo (24, 72 e 144 h). (#) $p \leq 0.05$ vs. CG, (\neq) $p \leq 0.05$ vs. CG, e (*) $p \leq 0.05$ vs. 50%, 25%, e 12.5% [Adaptado de 64].	152
Figura 6.79– Proliferação de osteoblastos em diferentes concentrações do extrato com as fibras de vidro F18 (100%, 50%, 25% e 12.5%) em diferentes tempos de cultivo (24, 72 e 144 h). (#) $p \leq 0.05$ vs. CG, (*) $p \leq 0.05$ vs. 12.5%, (a) $p \leq 0.05$ vs. CG, (\neq) $p \leq 0.05$ vs. 25% e 12.5%, (b) $p \leq 0.05$ vs. CG, (\dagger) $p \leq 0.05$ vs. 50%, 25% e 12.5%, e (**) $p \leq 0.05$ vs. 25% e 12.5% [Adaptado de 64]. ...	153
Figura 6.80 - Imagens de MEV das amostras controle (seta – fibroblastos)..	155
Figura 6.81 - Imagens de MEV do poço das amostras com o biomaterial (seta – fibroblastos).....	155
Figura 6.82 - Imagens de MEV das fibras após os ensaios de citotoxicidade (seta – fibroblastos).....	156

Figura 6.83 - Efeito bactericida do vidro F18 sobre quatro cepas de bactérias: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [Adaptado de 94].	157
Figura 6.84 - Placas de Petri inoculadas com 3 ^a (a e c) e 4 ^a diluição (b e d) nas amostras controle e com o biomaterial [Adaptado de 94].	158
Figura 6.85 - Resultados obtidos a partir dos ensaios baseados na norma JIZ Z 2801:2010 através do contato da manta do vidro bioativo F18 com diferentes cepas bacterianas [Adaptado de 94].	160
Figura 6.86 - Gráfico da quantidade de unidades formadoras de colônia encontradas para amostras dos vidros de janela, 45S5 e F18.	163
Figura 6.87 - Placas de Petri inoculadas com as 5 diluições das amostras dos vidros de janela, 45S5, e F18.	163
Figura 6.88 – Imagens de MEV para as superfícies de a) vidro de janela (alta quantidade de bactérias) e b) vidro F18 (poucas bactérias encontradas).	164
Figura 6.89 - Ensaio de burst oxidativo, com diferentes concentrações do pó do vidro bioativo F18 para os sistemas com luminol e lucigenina (e zymozan).	166
Figura 6.90 - Ensaio de burst oxidativo com diferentes tamanhos de malha do vidro bioativo F18 para os sistemas com luminol e lucigenina (e zymozan).	167
Figura 6.91 - <i>Scaffold</i> de 10 mm de diâmetro desenvolvido a partir de fibras de vidro do F18.	169
Figura 6.92- Micrografias dos <i>scaffolds</i> de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.	169
Figura 6.93 - Análise histológica dos implantes subcutâneos para os períodos de A e B) 15 dias; C e D) 30 dias e E e F) 60 dias. IN = células inflamatórias; G = tecido de granulação; S = fibras de vidro bioativas; F = cápsula fibrosa; Setas = células multinucleadas. Tecido corado em H&E [Adaptado de 64]. A, C e E com magnificação de 12,5x. B, D e F com magnificação de 200x.	170
Figura 6.94 - Procedimento cirúrgico com a confecção de defeito crítico na calota craniana de ratos Wistar [57].	172
Figura 6.95 – Análise histológica para o grupo controle sem enxerto (a) e para o grupo tratado (b) após 8 semanas. Amostra corada em hematoxilina-eosina.	173

- Figura 6.96 - Fotomicrografia da periferia da área cirúrgica do grupo controle (G1), sacrificado nos tempos de 2(A, B), 4(C, D), 8(E, F) e 16(G, H) semanas pós-operatório. Observou-se a expressão e a organização das fibras colágenas na área cirúrgica na luz polarizada. Coloração Picrosirius Red sem luz polarizada (A, C, E, G) e com luz polarizada (B, D, F, H). Indicados: Tecido conectivo na área cirúrgica (TC), Osso original (O), Osso neoformado (*) [Adaptado de 57]..... 174
- Figura 6.97 - Fotomicrografia da área periférica da falha óssea do grupo implantado G2, sacrificado nos tempos de 2(A, B); 4(C, D); 8(E, F) e 16(G, H) de pós-operatório. Observou-se a expressão óptica e a organização estratigráfica das fibras colágenas e a predominância de fibras mais espessas, fibras do tipo I e II na área cirúrgica. Indicados: malha de vidro bioativa (seta), osso original (O), osso neoformado (*). Coloração Picrosirius Red [Adaptado de 57]..... 175
- Figura 6.98 - Estereologia da densidade da neoformação óssea da área cirúrgica dos grupos G1 e G2 nos períodos estudados de 2, 4, 8 e 16 semanas [67]..... 176
- Figura 6.99 - *Scaffold* de 3mm de diâmetro desenvolvido a partir da fibras de vidro do F18..... 178
- Figura 6.100 - Micrografias do *scaffolds* de 3mm de diâmetro e 1 mm de espessura..... 179
- Figura 6.101 - Processo de determinação da porosidade dos *scaffolds* desenvolvidos..... 179
- Figura 6.102 – Defeitos na tíbia com aplicação dos *scaffolds* fibrosos em três períodos experimentais A) 15 dias, B) 30 dias e C) 60 dias. A barra representa 200µm. Amostra corada em hematoxilina-eosina. Magnificação de 12,5x. S = *scaffolds* fibroso; B = osso neoformado; D = linha do defeito [Adaptado de 68]. 180
- Figura 6.103 – Análise histológica das amostras controle GC e com enxerto BG nos períodos experimentais 15, 30 e 60 dias. GC: 15 dias (A), 30 (C) e 60 (E). BG: 15 dias (B), 30 (D) e 60 (F). Foram encontrados tecidos granular (G); Fibras provenientes dos *scaffolds* (S); Neoformação óssea (B) e a Linha do

defeito (D). A barra representa 100 µm. Amostra corada em hematoxilina-eosina. Magnificação de 200x. [Adaptado de 68].	181
Figura 6.104 – Análise histomorfométrica do grupo controle e do grupo com o enxerto após os períodos de 15, 30 e 60 dias. Valores de $p < 0,05$ estão marcados com “*” [Adaptado de 68].	183
Figura 6.105 – Valores Médios e desvio-padrão para a análise imunohistoquímica para os fatores a) RUNX-2, b) RANK-L e c) COL-1 [Adaptado de 68].	184
Figura 6.106 – Animais pós implantação da malha de fibras de vidro bioativas após a confecção das lesões de queimadura de terceiro grau.	186
Figura 6.107 – Análises histológicas para os grupos controle e tratado após 7 dias da lesão para o grupo controle e tratado. Magnificação de 200x.	187
Figura 6.108 – Análise imunohistoquímica para os fatores VEGF e TGF- β após 7 dias da lesão. Magnificação de 400x.	188

SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

DSC	: Calorimetria Diferencial de Varredura
DRX	: Difração de raios X
EDS	: Espectroscopia de Dispersão por Energia
FTIR	: Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
HCA	: Hidroxicarbonatoapatita
HA	: Hidroxiapatita
Hz	: Hertz
I _B	: Índice de Bioatividade
MEV	: Microscopia eletrônica de varredura
PA	: Pureza Analítica
SBF – K9	: Simulated Body Fluid K-9 (Plasma sanguíneo artificial)
T _g	: Temperatura de transição vítrea
T _x	: Temperatura do Início da Cristalização
T _c	: Temperatura de Cristalização
T _m	: Temperatura de fusão
Ufc/ml	: Unidades formadoras de colônia por mililitro

1 INTRODUÇÃO

Durante os últimos 45 anos vem ocorrendo uma revolução na área de materiais cerâmicos no sentido de aplicá-los na substituição e regeneração de tecidos corpóreos, em busca de uma melhor qualidade de vida. Essa evolução foi obtida com o desenvolvimento de materiais e componentes especialmente projetados e fabricados para reparar e reconstruir partes do corpo que sofreram algum trauma ou injúria devido a processos patológicos¹ ou desgastes [1, 2]. Estes materiais têm sido amplamente estudados devido a sua alta biocompatibilidade¹ e propriedades osteocondutivas¹.

Atualmente, existe uma grande diversidade de materiais vítreos ou cerâmicos bioativos ou biocompatíveis, tais como cerâmicas odontológicas, enxertos ósseos granulados ou em forma de *scaffolds*¹ para substituição óssea, etc. Suas aplicações clínicas incluem reparação de tecidos duros como ossos, articulações, dentes e eventualmente, tecidos moles [1].

Dentre os materiais mais comumente utilizados para as aplicações citadas, os vidros bioativos têm se tornado cada vez mais requisitados, pois possuem maior bioatividade e, portanto, são vantajosos quando comparados a outros materiais, tais como enxertos sintéticos (também conhecidos como enxertos aloplásticos¹).

Estes vidros fazem parte de uma classe de biomateriais baseados em compostos vítreos de silicatos [2], que possuem excelentes propriedades osteoindutoras¹ e bioativas [3]. Eles foram desenvolvidos por Hench e colaboradores no início década de 1970 [1] e, desde então, o comportamento bioativo desses materiais e diversas possíveis composições bioativas vêm sendo estudadas.

Entretanto, para aplicações *in vivo*, este material tem se limitado a pequenas peças monolíticas, à forma particulada ou granulada, o que impossibilita sua utilização em todos os casos clínicos, já que a escolha do enxerto ósseo a ser utilizado depende de muitos fatores como tamanho do defeito, número de paredes circundantes, etc. Portanto, a averiguação e pesquisa de seu processamento para a obtenção de fibras, que podem dar

origem a tecidos vítreos ou curativos bioativos, se apresentam bastante promissoras, alargando o espectro de utilização dos vidros bioativos e possibilitando seu uso em casos que necessitem de um ou mais tipos de material osteocondutor e/ou regenerador.

O desenvolvimento de fibras, mantas ou tecidos vítreos a partir deste biomaterial possibilitaria a criação de enxertos extremamente reativos com os fluidos corpóreos, de mais fácil manipulação, ajuste a loja óssea e de boas propriedades mecânicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomateriais

Os biomateriais indubitavelmente são desenvolvidos em busca da melhoria da qualidade de vida e são cada vez mais requisitados clinicamente devido a uma população que vem crescendo e aumentando a expectativa de vida. Estes materiais são quaisquer substâncias sintéticas ou naturais que podem ser utilizadas para o tratamento e/ou substituição total ou parcial de tecidos ou órgãos do corpo humano.

Os biomateriais são normalmente classificados com relação à resposta tecidual que provocam, portanto, eles podem ser [4]:

- Biologicamente Não Ativos (quase inertes): ao serem implantados estes materiais são encapsulados por um tecido fibroso não aderente; esta cápsula é tão mais espessa quanto menos inerte for o material, como exemplos podem-se citar a alumina, zircônia e platina.

- Biologicamente Ativos: são materiais capazes de formar uma ligação interfacial com o tecido vivo circundante. Como exemplos podem-se citar os vidros bioativos, fosfatos de cálcio e hidroxiapatita. Estes materiais serão abordados de maneira mais profunda na seção 2.1.4.

- Reabsorvíveis: estes materiais são degradados pelos fluídos corpóreos e/ou digeridos pelas células, gerando produtos que são facilmente expelidos pelo corpo. Apresentam alta taxa de reação na interface tecido-implante, para que este seja paulatinamente substituído pelo tecido hospedeiro conforme o mesmo vai sendo regenerado. Alguns exemplos são vidros originados pelo processo de sol-gel, composições do sistema $\text{Na}_2\text{O}\cdot\text{CaO}\cdot\text{Si}_2\text{O}$ ricas em Na_2O e também alguns polímeros como o poli (ácido L-lático) (PLLA) e o ácido poliglicólico (PGA) [5].

Com relação ao mercado atual de biomateriais, em 2005 esta indústria movimentava cerca de 28 bilhões de dólares e apresentava um crescimento anual de 15%; Atualmente, espera-se que até 2015 o mercado mundial atinja um valor de 88 bilhões de dólares [6].

No Brasil, temos atualmente um mercado de biomateriais movimentando 550.2 milhões de dólares e espera-se que o mesmo alcance 1.7 bilhões de dólares em 2015 [7].

Em 2009, somente o mercado nacional de biomateriais ortopédicos bateu recordes movimentando 236.5 milhões, o que corresponde a 37.5% da produção total de biomateriais ortopédicos do mundo. E ainda espera-se que este mercado tenha um crescimento de 17.2% de 2010 a 2015 [7].

Já para o mercado de biomateriais voltados à regeneração de feridas ("*wound care products*") espera-se um crescimento de 24.3% de 2010 a 2015.

De todas as diversas áreas de aplicação de biomateriais, a área de dispositivos e suprimento cirúrgicos abrange a maior porção de produção, sendo de 39% do mercado [7].

Este drástico avanço e altos investimentos na área devem-se principalmente ao envelhecimento da população mundial (espera-se que cerca de 20% da população mundial tenha acima de 60 anos em 2050), uma maior expectativa de vida e o aumento da incidência de doenças crônicas que levam a substituição/regeneração de tecidos diversos [7]. Portanto, este é um campo em plena expansão, que visa o desenvolvimento de tecnologias com alto valor agregado e que, para isso, engloba e necessita da interação de profissionais de diferentes áreas de atuação.

Quando tentamos entender a evolução dos biomateriais nos últimos 60 anos conseguimos observar três gerações distintas [8]. A primeira sendo basicamente composta pelo uso e desenvolvimento de materiais inertes, a segunda com materiais bioativos e biodegradáveis e a terceira com materiais que são capazes de combinar bioatividade e degradação gerando respostas celulares específicas a nível molecular. Nas seções a seguir, serão abordadas de maneira mais específica as diferenças e particularidades destas três gerações de biomateriais.

2.1.1 Biomateriais de Primeira Geração

Durante as décadas de 60 e 70 foi desenvolvida a primeira geração de biomateriais. Os dispositivos e implantes desenvolvidos eram geralmente voltados para a área ortopédica e odontológica, porém os mesmos não eram confeccionados levando-se em conta a biocompatibilidade e sim, visando uma combinação de propriedades químicas e mecânicas que induzissem a mínima interação com os tecidos do hospedeiro [6].

Conceitos como reações de rejeição a um corpo estranho, presença de debris, *stress shielding* e, conseqüentemente, biocompatibilidade e osteoindução não faziam parte do desenvolvimento destes biomateriais de primeira geração.

A resistência mecânica e a resistência a corrosão por outro lado, eram bastante visadas, e por isso, os materiais mais utilizados eram ligas metálicas de cobalto-cromo, níquel-titânio e aço inox.

Os materiais cerâmicos que se enquadram nesta geração são: alumina e zircônia. E os polímeros são: polietileno (PE), resinas acrílicas, polipropileno e polimetilmetacrilato (PMMA) [9].

Já no início dos anos 80, o espectro de materiais utilizados para a confecção de implantes e biomateriais aumentou consideravelmente, registra-se o uso de mais de 30 diferentes materiais. Porém, ainda se almejava uma resposta “inerte” destes biomateriais, esperando-se uma resposta imune mínima para prevenção das reações de rejeição biológica. Esta “estratégia” ainda é usada atualmente para muitos tipos de implantes [6].

Entretanto, a utilização clínica destes materiais de primeira geração leva a adsorção de diversas proteínas inespecíficas à sua superfície depois de implantados. O que resulta em uma sinalização celular não específica, levando a formação de um tecido fibroso envolta do material. O desejo de se evitar a formação desta cápsula fibrosa foi a força motriz para o desenvolvimento de interfaces e materiais bioativos.

2.1.2 Biomateriais de Segunda Geração

A segunda geração de biomateriais apareceu entre 1980 e 2000 e foi caracterizada pelo desenvolvimento de materiais que pudessem interagir com os tecidos corpóreos, isto é, os materiais bioativos e também materiais biodegradáveis [9].

O termo bioatividade refere-se a qualquer interação ou efeito que um material exerce sob uma célula com o objetivo de guiar ou ativar uma resposta ou um comportamento específico [9].

Nesta época, os avanços das técnicas cirúrgicas, o maior entendimento dos processos teciduais e a crescente variedade de casos clínicos que demandavam o uso de diversos biomateriais, guiaram a criação do conceito de superfícies multifuncionais e implantes porosos que permitem o crescimento tecidual em seu interior. E estes dispositivos ainda vêm sendo largamente estudados [6].

As cerâmicas mais conhecidas nesta categoria são: os vidros bioativos, fosfatos de cálcio e hidroxiapatita. Já os polímeros que se enquadram nesta geração são: poliácido glicólico (PGA), poliácido láctico (PLA), poli ϵ -caprolactano (PCL) e alguns hidrogéis.

2.1.3 Biomateriais de Terceira Geração

A ideia de desenvolver novos biomateriais que combinassem as suas propriedades bioativas e as propriedades de bioreabsorção e/ou biodegradação gerou um novo conceito: biomateriais de terceira geração.

Estes biomateriais são geralmente compósitos que possuem alta interação celular, propiciando sua diferenciação, proliferação, produção de matriz extracelular e geração de um tecido organizado. Portanto, são capazes de estimular respostas celulares específicas (Figura 2.1) [8, 9].

Atualmente existem dois métodos principais de utilização destes biomateriais:

- Na engenharia de tecidos: com a deposição e crescimento de células progenitoras na superfície destes biomateriais, que em seguida são implantados nos pacientes para regeneração do tecido perdido. Normalmente são materiais na forma de scaffolds.
- Na regeneração tecidual *in-situ*: este método pode envolver diferentes formas de diferentes biomateriais que podem ser aplicados diretamente no tecido do paciente. E com o controle de liberação de íons, a presença de moléculas orgânicas de sinalização e até mesmo compostos que levem a ativação genética, estes biomateriais estimulam e controlam a regeneração tecidual [10].

As fibras bioativas desenvolvidas neste projeto, assim como o tecido vítreo delas originado, são caracterizadas como materiais de terceira geração, pois possibilitam o estímulo celular e favorecem a regeneração dos tecidos, assim como são reabsorvíveis.

Esta nova forma possibilita a regeneração tecidual pelos dois métodos citados acima e amplia ainda mais os campos de utilização dos vidros bioativos.

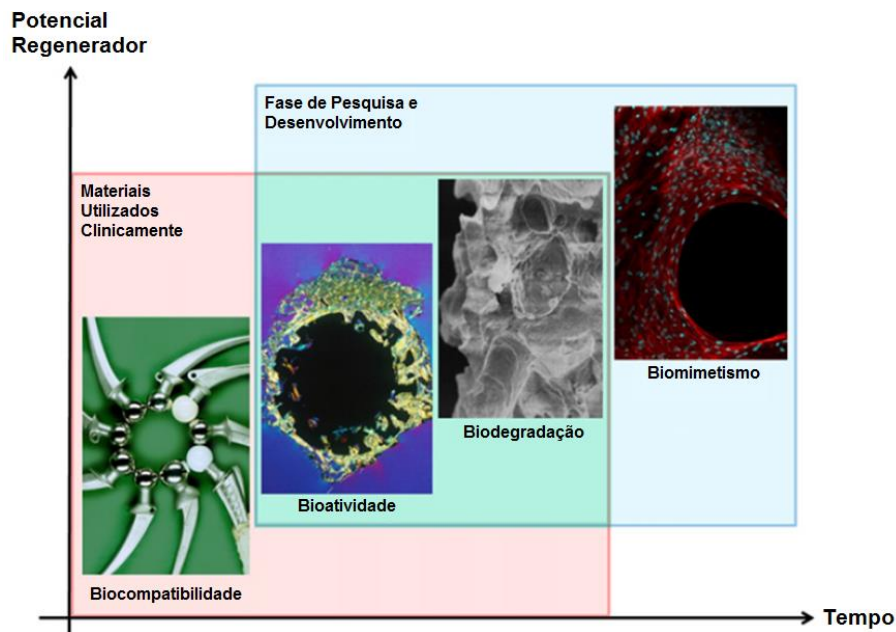


Figura 2.1 - Evolução dos biomateriais [Adaptado de 6].

2.1.4 Classes de Bioatividade

Materiais bioativos para regeneração ou substituição tecidual devem possuir um controle cinético de lixiviação química que se sincronize com a sequência de reações celulares que ocorrem durante o reparo de uma lesão tecidual.

Se as reações de dissolução forem extremamente rápidas a concentração iônica será muito alta para ser eficiente. Porém, se forem muito lentas não estimularão a diferenciação e proliferação celular [10].

Estudos realizados anteriormente levaram a autores como Hench e Onishi proporem duas diferentes classes de biomateriais, sendo as mesmas relacionadas com a bioatividade dos mesmos, podendo ser biomateriais Classe A ou B.

Biomateriais com bioatividade classe A referem-se a materiais que possuem tanto a propriedade de osteocondução quanto a osteoindução. Estas características surgem como uma consequência da rápida interação da superfície do material com os tecidos, levando a dissolução e concentração

ideal de íons como Si, Ca, Na e P ao meio, induzindo a respostas intra e extracelulares [10].

Já os materiais de classe B são aqueles que apresentam somente a propriedade de osteoindução (que seria a regeneração óssea somente ao longo da interface material/tecido). Nestes, apenas uma resposta extracelular irá ocorrer na interface material/tecido [10].

2.1.5 Vidros Bioativos

Em 1969, Hench e colaboradores, visando o desenvolvimento de materiais que se assemelhassem em composição química ao osso, deram origem a certas formulações vítreas que apresentavam a capacidade de formar uma ligação química com tecidos vivos, especialmente os tecidos duros. A partir deste momento, esta classe de vidros passou a ser classificada como biovidros ou vidros bioativos.

O primeiro material bioativo reportado foi o biovidro 45S5, que possui uma composição de apenas quatro componentes SiO_2 , Na_2O , CaO e P_2O_5 , e este é ainda hoje o vidro de maior bioatividade conhecida. Esse material é capaz de formar, depois de implantado, uma camada de HCA (hidroxicarbonatoapatita) que promove sua ligação com o tecido ósseo.

Segundo Hench, cada composição ou material bioativo tem uma taxa diferente de ligação com o tecido ósseo, ou seja, um nível ou índice de bioatividade diferente. Este índice pode ser definido como o inverso do tempo necessário para que mais de 50% da interface do material esteja ligada ao tecido ósseo ($t_{0,5bb}$) onde [4]:

$$I_B = 100/t_{0,5bb} \quad (2.1)$$

Nesta equação, o índice de bioatividade (I_B) tem relação com o tempo em dias.

Na Figura 2.2, observa-se o diagrama que indica o nível de bioatividade dos vidros do sistema $\text{Na}_2\text{O}\cdot\text{CaO}\cdot\text{P}_2\text{O}_5\cdot\text{SiO}_2$ com uma concentração em peso

fixa de 6% de P_2O_5 [3]. A figura indica que dentro dos limites da região A, os materiais obtidos são bioativos e formam a camada de HCA (hidroxicarbonatoapatita) se ligando rapidamente com o osso. Já os materiais obtidos da região C são reabsorvíveis e se dissolvem entre 10 a 30 dias após a implantação. A região B corresponde a materiais que seriam bioinertes e, portanto, levam a formação de uma cápsula fibrosa. E na região D são materiais que não seriam tecnologicamente interessantes para a aplicação como biomateriais [4,11].

A área tracejada no diagrama corresponde a um nível de bioatividade igual ou superior a 8. As células responsáveis pela formação de colágeno, constituintes dos tecidos moles, podem aderir fortemente aos vidros bioativos que apresentem $I_B > 8$. Nestes casos, as fibrilas colágenas entremeiam a interface pelo crescimento da camada de hidroxicarbonatoapatita. Estes aglomerados de hidroxicarbonatoapatita-colágeno mimetizam a natureza da ligação entre os tendões, ligamentos, compostos inteiramente por fibrilas colágenas e o osso, que é composto por cristais de hidroxiapatita e colágeno [4, 11].

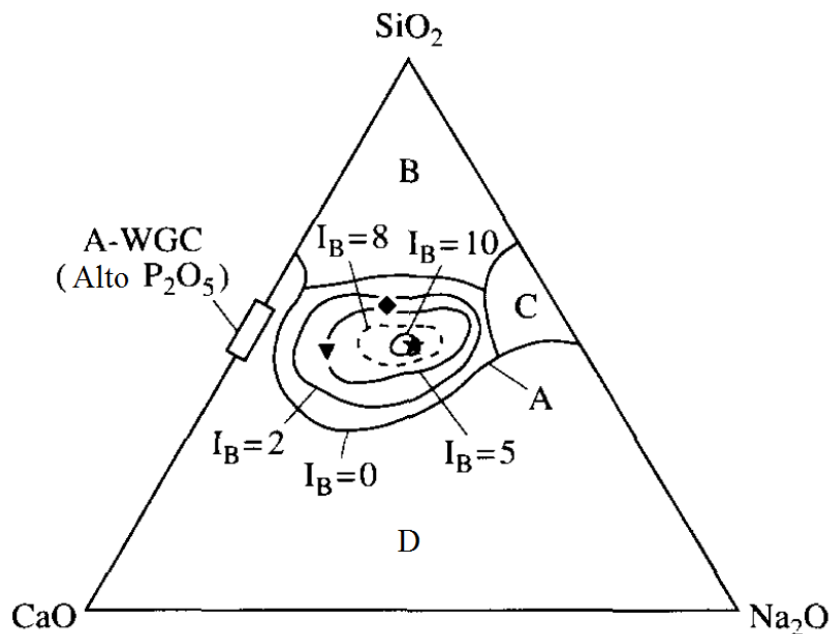


Figura 2.2 - Diagrama do sistema $Na_2O \cdot CaO \cdot P_2O_5 \cdot SiO_2$ com uma concentração fixa de 6%-p de P_2O_5 para os materiais na região A. [Adaptado de 11].

Portanto, cada composição vítrea apresentará uma taxa de reação com os fluidos corpóreos distinta.

Na secção 2.1.5.1 será abordado de maneira mais específica as diferenças entre as composições vítreas bioativas desenvolvidas até o momento.

2.1.5.1 Composições

A maior parte dos vidros bioativos está centrada em sistemas à base de sílica, sendo, portanto, compostos normalmente por SiO_2 , Na_2O , CaO e P_2O_5 . Porém, outros compostos podem ser introduzidos, tais como CaF_2 , K_2O , MgO e B_2O_3 . Existem também outros sistemas como vidros boratos e fosfatos que têm demonstrado boas propriedades bioativas.

- Silicatos

O primeiro vidro bioativo disponibilizado comercialmente foi um material desenvolvido em 1969 por Hench e colaboradores, denominado Bioglass[®] 45S5. Esse material apresenta uma composição aproximada de 45%-p SiO_2 , 24,5%-p Na_2O , 24,5%-p CaO e 6%-p P_2O_5 [1].

Com esta formulação, Hench *et al.* [1] observaram que a interface do material desenvolvia uma ligação com o osso de forma bastante rápida, principalmente quando os níveis de sílica estão na faixa de 42 - 53% em peso. Vidros com esta faixa de porcentagem de sílica possuem não só a capacidade de criar uma ligação química com tecido ósseo, mas também com os tecidos moles. Vidros contendo sílica entre 54 - 60% em peso reagem mais lentamente e requerem de duas a quatro semanas para que haja esta união, e apresentam bioatividade, entretanto, não proporcionam uma ligação química com tecidos moles [12]. Já para vidros contendo mais de 60% em peso de sílica não se observa uma união direta ao osso [4]. Portanto, percebe-se que um aspecto crítico para que o vidro apresente bioatividade é o seu teor de SiO_2 , e este deve ser menor que 60% em peso.

Contudo, para a composição de Hench, 45S5, foi observado que o material demonstrava uma alta tendência à cristalização quando se empregava elevadas temperaturas. A fim de se contornar estes fatores negativos foram desenvolvidos vidros bioativos baseados no sistema $\text{Na}_2\text{O} - \text{K}_2\text{O} - \text{MgO} - \text{CaO} - \text{B}_2\text{O}_3 - \text{P}_2\text{O}_5 - \text{SiO}_2$, permitindo assim, a produção de biovidros com diferentes formas: micro-esferas, grânulos e scaffolds porosos, o que tornou a utilização desse material mais vantajosa na prática clínica contemporânea [12].

Outro vidro bioativo a base de silicato, é o vidro 13-93, que tem sua composição modificada em relação ao 45S5, possuindo melhores propriedades em relação ao escoamento viscoso e menor tendência a cristalização quando comparado ao vidro 45S5. O vidro 13-93 já é aprovado para a utilização *in vivo* na Europa, e recentes estudos estão conseguindo com grande sucesso a obtenção de pequenas fibras, por meio do processo de *meltspinning*, e *scaffolds* porosos [13].

Estes *scaffolds* já comprovaram sua eficiência *in vitro* para o crescimento e diferenciação de MC3T3-E1 pre-osteoblastos [13]. Mensurações quantitativas de DNA não mostraram diferença significativa na proliferação celular entre as amostras de vidro 45S5 e 13-93 [13].

Atualmente, buscam-se cada vez mais composições vítreas que comportem processos de aquecimento/resfriamento sem que isto leve a cristalização descontrolada dos vidros bioativos.

- Boratos

Estudos mais recentes têm demonstrado que certas composições também possuem bioatividade mesmo em outros sistemas formadores de vidro.

Alguns vidros boratos, devido sua baixa durabilidade química, se degradam mais rapidamente e por isso, convertem-se mais facilmente em HCA. Para estes vidros, os estágios para a precipitação de HCA aparentam ser similares aos descritos pelo biovidro 45S5, porém, sem a formação da camada de sílica-gel [14,15]. Vidros bioativos a base de boro têm se mostrado bons

biomateriais para o suporte da diferenciação e proliferação celular *in vitro* [14,16].

Entretanto, uma grande preocupação no uso de boratos é sua toxicidade. A lixiviação de íons $(\text{BO}_3)^{3-}$, principalmente em condições estáticas, é tóxica para células a partir de certa quantidade. Mas, em processos dinâmicos, como aplicações *in vivo*, esse fenômeno já é diminuído [14].

- Fosfatos

Vidros bioativos a base de P_2O_5 também estão sendo largamente estudados para aplicações de reparo ósseo, já que seus componentes principais (fósforo, cálcio e sódio) estão presentes na porção inorgânica do tecido ósseo e por isso possui uma grande afinidade com o mesmo.

Estes vidros geralmente são bastante solúveis, e sua taxa de degradação é controlada pelo ajuste de sua composição [14].

2.1.5.2 Cascata de Reações dos Vidros Bioativos

A ligação com o tecido ósseo ocorre como um resultado da sequência rápida das reações químicas na superfície dos vidros bioativos quando implantados nos tecidos vivos.

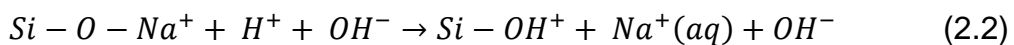
Assim que colocados em contato com os fluidos corpóreos dá-se início aos cinco primeiros estágios desta interação vidro bioativo-tecido, ocorrendo uma rápida lixiviação dos íons para o meio e formação de uma camada de sílica-gel e posteriormente, uma camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) na superfície do material.

Nas seções 2.1.5.2.1 e 2.1.5.2.2, os mecanismos associados à formação desta ligação dos vidros bioativos com o tecido ósseo serão abordados com mais especificidade.

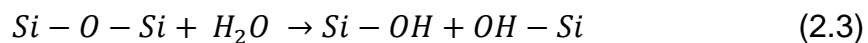
2.1.5.2.1 Mecanismo de reação dos vidros bioativos em meio aquoso ou em fluido corpóreo

Vários mecanismos foram propostos para explicar a sequência de reações que ocorre entre o organismo e os materiais bioativos. Os primeiros a detalhar o número de passos sequenciais na reatividade *in vitro* e *in vivo* destes vidros foram os pesquisadores Clark e Hench [1,17]. Segundo eles esta sequência pode ser resumida em cinco estágios principais:

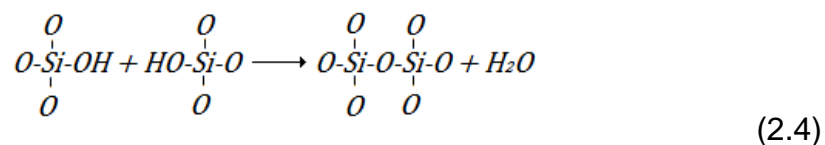
O primeiro estágio se baseia na troca iônica entre a solução e a superfície do vidro, ocorrendo uma lixiviação dos cátions Na^+ ou K^+ e sua substituição na estrutura do vidro por íons H^+ ou H_3O^+ , também se observa nesta etapa a formação de grupos silanóis (Si-OH). Este estágio é controlado pelos processos de difusão e exibe uma dependência temporal na forma de $t^{1/2}$. O esquema da reação da Etapa 1 é apresentada na equação 2.2:



No segundo estágio, devido ao aumento de pH local, ocorre a liberação de sílica solúvel do material vítreo, por consequência da quebra das ligações Si-O-Si, sendo assim liberada na solução a sílica na forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$. Esse estágio é geralmente controlado pelas reações interfaciais e mostra uma dependência do tempo na forma de $t^{1.0}$. O esquema da reação da Etapa 2 é apresentada na equação 2.3:



O terceiro estágio é caracterizado pela condensação do $\text{Si}(\text{OH})_4$ e sua repolimerização na superfície do vidro, formando uma camada porosa e rica em sílica-gel. Como vemos na equação 2.4:



No quarto estágio, há a migração de grupos Ca^+ e PO_4^- para a superfície do vidro, e devido à estrutura aberta da sílica-gel as trocas iônicas entre vidro e a solução continuam ocorrendo, assim, estes íons se difundem a partir do vidro por esta camada de sílica-gel, formando sobre a superfície do vidro uma camada de fosfato de cálcio amorfo. Neste estágio, a alta área superficial da camada de sílica-gel age como uma fonte de sítios para a nucleação heterogênea do filme de fosfato de cálcio amorfo.

Após o aumento da espessura das camadas amorfas de sílica-gel e fosfato de cálcio, temos o quinto estágio, onde estas passam a incorporar íons hidroxila, carbonato e, às vezes, flúor da solução, iniciando a cristalização de uma camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA).

Na Figura 2.3, observa-se um esquema simples das cinco reações citadas acima.

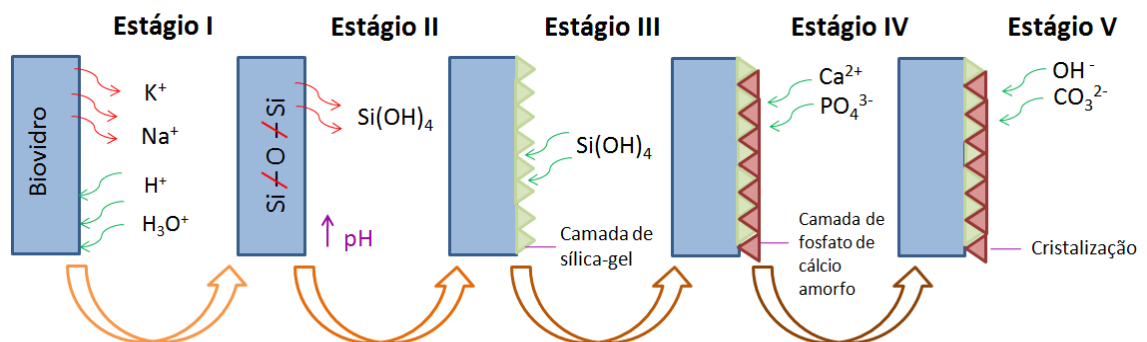


Figura 2.3 - Esquema simplificado das cinco reações relacionadas à interação química dos vidros bioativos [18].

A fase HCA é química e estruturalmente similar à fase mineral do osso e desta forma permite a união direta por imbricamento do tecido hospedeiro com os implantes [4].

Dependendo da bioatividade do material, estas reações ocorrem em poucos minutos após o contato da interface do biovidro e o fluido corpóreo. O papel da sílica nesta propriedade é muito significativo. A sílica é considerada responsável pelo crescimento da HCA e consequente formação óssea [4].

Entretanto, existe uma quantidade ótima deste reagente na composição do vidro para que se alcance o máximo da bioatividade e da bioreatividade. Na Figura 2.4, é possível observar o tempo de reação para formação de HCA, em diferentes meios, em relação à quantidade de sílica presente em distintas composições de vidros bioativos.

Como já mencionado anteriormente (na seção 2.1.5.1), a Figura 2.4 demonstra a formação de HCA em um tempo menor para composições com quantidades de sílica na faixa de 42-53% mesmo em diferentes meios.

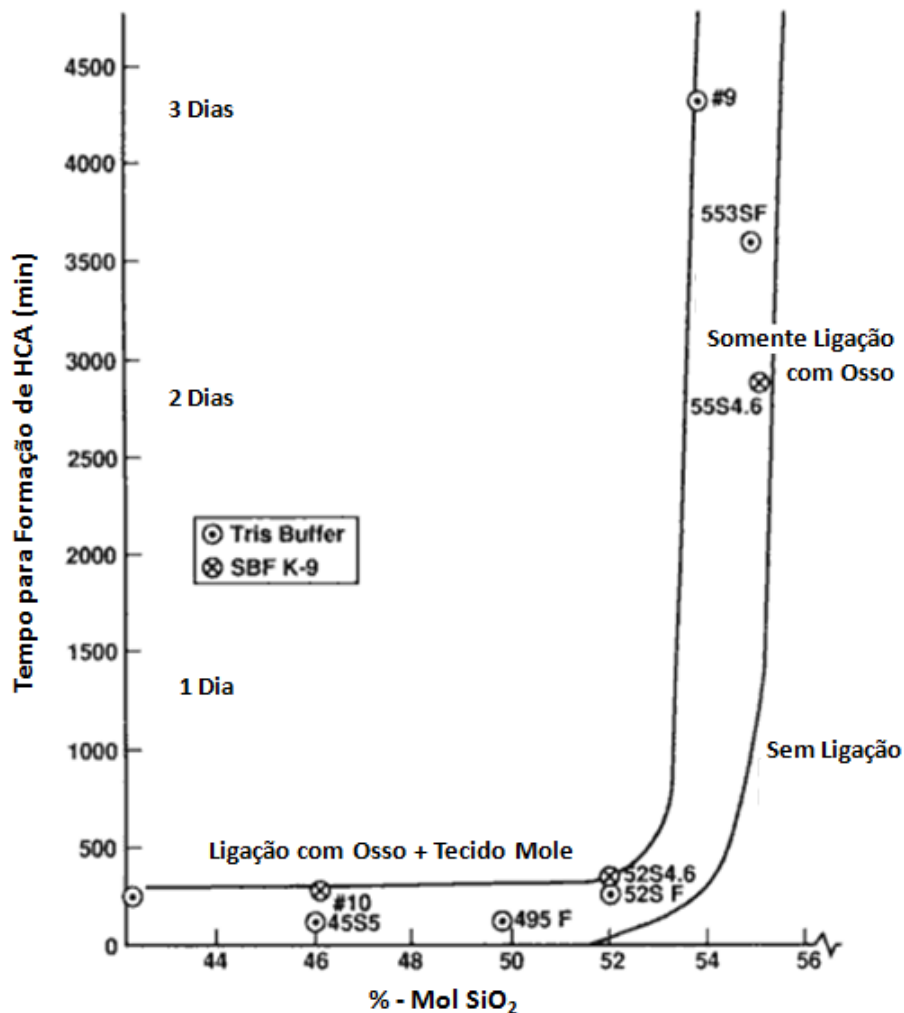


Figura 2.4 - Tempo de reação para formação de HCA, em diferentes meios, em relação à quantidade de sílica em cada composição [Adaptado de 1].

2.1.5.2.2 Mecanismo de Interação Celular

Os mecanismos envolvidos na interação celular dos vidros bioativos ainda se encontram em intensa pesquisa. A capacidade dos mesmos em atrair as células responsáveis pela neoformação óssea tem chamado muita atenção dos pesquisadores. Inúmeros estudos *in vitro* têm demonstrado que este biomaterial estimula o crescimento e acelera a maturação dos osteoblastos bem como promovem a expressão do fenótipo osteoblástico [19].

Com relação ao mecanismo de interação, é conhecido que a formação da camada rica em sílica é um estágio fundamental para a ligação do vidro bioativo com o tecido ósseo, pois esta funciona como um material temporário para a precipitação de fosfatos de cálcio. Essa camada por sua vez, juntamente com as proteínas adsorvidas do meio, controla a formação de um novo tecido ósseo na superfície do biomaterial [20].

Também se apontam relatos de que os vidros bioativos estimulam as funções de células multipotentes do estroma medular ósseo tanto por mecanismos mediados por superfície quanto por mecanismos mediados por solução [21]. As proteínas extracelulares, principalmente a fibronectina, atraem células responsáveis pela fagocitose, os macrófagos, células tronco-mesenquimais e células osteoprogenitoras [22]. E logo após, as células osteoprogenitoras proliferam e se diferenciam em osteoblastos que então iniciam a produção e deposição de matriz orgânica. A matriz depositada sofrerá, então, um processo gradual de mineralização que é mediado pelas células osteoblásticas.

Na Figura 2.5, observa-se um esquema simples das reações citadas anteriormente.

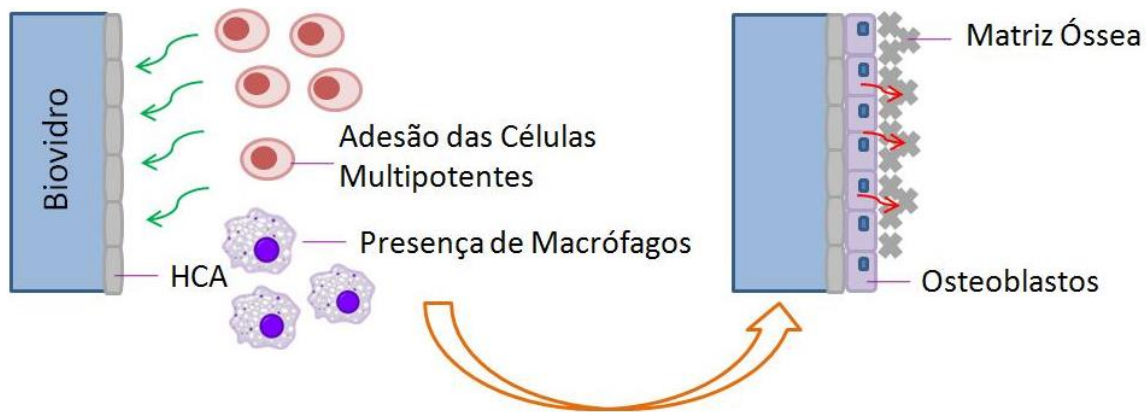


Figura 2.5 - Esquema simplificado das reações relacionadas à interação celular dos vidros bioativos [15].

Na Figura 2.6, pode-se observar um resumo dos principais estágios envolvidos na interação dos vidros bioativos com o organismo; as reações interfaciais estão em relação ao *log t* do tempo.

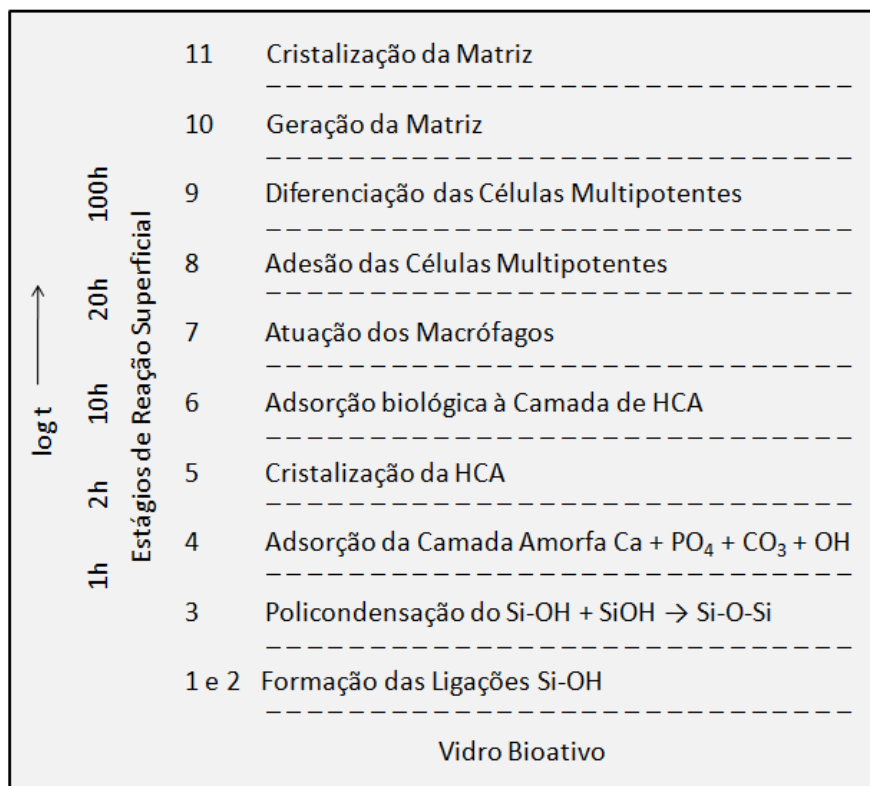


Figura 2.6 - Sequência de reações interfaciais dos vidros bioativos com os tecidos vivos [Adaptado de 11].

Resumindo-se o gráfico anterior (Figura 2.6) temos que:

- Estágio 6 – Após a formação da camada de HCA, tem-se início a adsorção de moléculas orgânicas, como os fatores de crescimento, na superfície de porosidade nanométrica ou nas partes ainda expostas da camada de sílica-gel negativamente carregada.
- Estágio 7 – A presença dos fatores de crescimento acelera a ação dos macrófagos.
- Estágio 8 – Nesta, tem-se início a adesão de células mesenquimais que começarão o processo de osteogênese.
- Estágio 9 – Nesta etapa dá-se início a proliferação e diferenciação dos osteoblastos.
- Estágio 10 – Os osteoblastos secretam a matriz extracelular, porém, o tecido ósseo ainda não está totalmente mineralizado.
- Estágio 11 – A partir de processos de nucleação e crescimento da hidroxiapatita ocorre a mineralização da matriz extracelular.

2.1.5.2.3 Ligação com Tecidos Moles

Até 1981 era assumido que somente tecidos calcificados, isto é, tecidos duros, se ligariam com os vidros bioativos. Porém, um estudo realizado por Wilson *et al.* [23] mostrou que o vidro bioativo Bioglass 45S5 conseguia se ligar com tecidos moles, se as interfaces material-tecidos estivessem imóveis.

Posteriormente, Wilson e Nolleti [24] relataram a dependência composicional para os vidros bioativos se ligarem aos tecidos moles, comprovando que somente vidros com rápidas taxas da sequência de reações são capazes de fazer tal ligação. E estas composições estão compreendidas na região de onde $I_B > 8$ (região tracejada indicada na Figura 2 da seção 2.1.5.).

Portanto, quando a composição vítrea excede 52% em peso de SiO_2 o vidro bioativo se ligará somente aos tecidos duros.

2.1.5.2.4 Controle Genético do Ciclo Celular Osteoblástico

Por muitos anos pensou-se que somente com a formação da camada de HCA um material teria um comportamento bioativo. Porém, estudos mais recentes indicam que o controle de dissolução dos íons provenientes da degradação do material é a chave para uma resposta biológica eficiente, principalmente íons cálcio e de sílica solúvel [10].

Para que um novo tecido ósseo se forme, as células responsáveis pela produção destes tecidos, os osteoblastos, devem entrar em mitose. E para isto, os sinalizadores, ou agentes químicos locais, devem ser capazes de criar este estímulo.

Na Figura 2.7 podemos ver o ciclo celular de uma célula osteoblástica progenitora quando exposta a um vidro bioativo e aos íons lixiviados por este material.

No estágio G_0 a célula se encontra em repouso, mas se o meio em sua volta a estimula quimicamente, esta passa para a fase 1, que chamamos de G_1 , no qual a célula produz inúmeras proteínas necessárias a sua diferenciação. Seguindo seu processo de crescimento, a célula entra em síntese, "S", neste estágio há a síntese de seu código genético. Na fase "S" portanto, há a duplicação do seu DNA e a célula entra em mitose, "M", iniciando-se a fase 2 (G_2). Na fase 2 a célula se prepara para sua divisão e também produz algumas proteínas importantes para esta etapa [25].

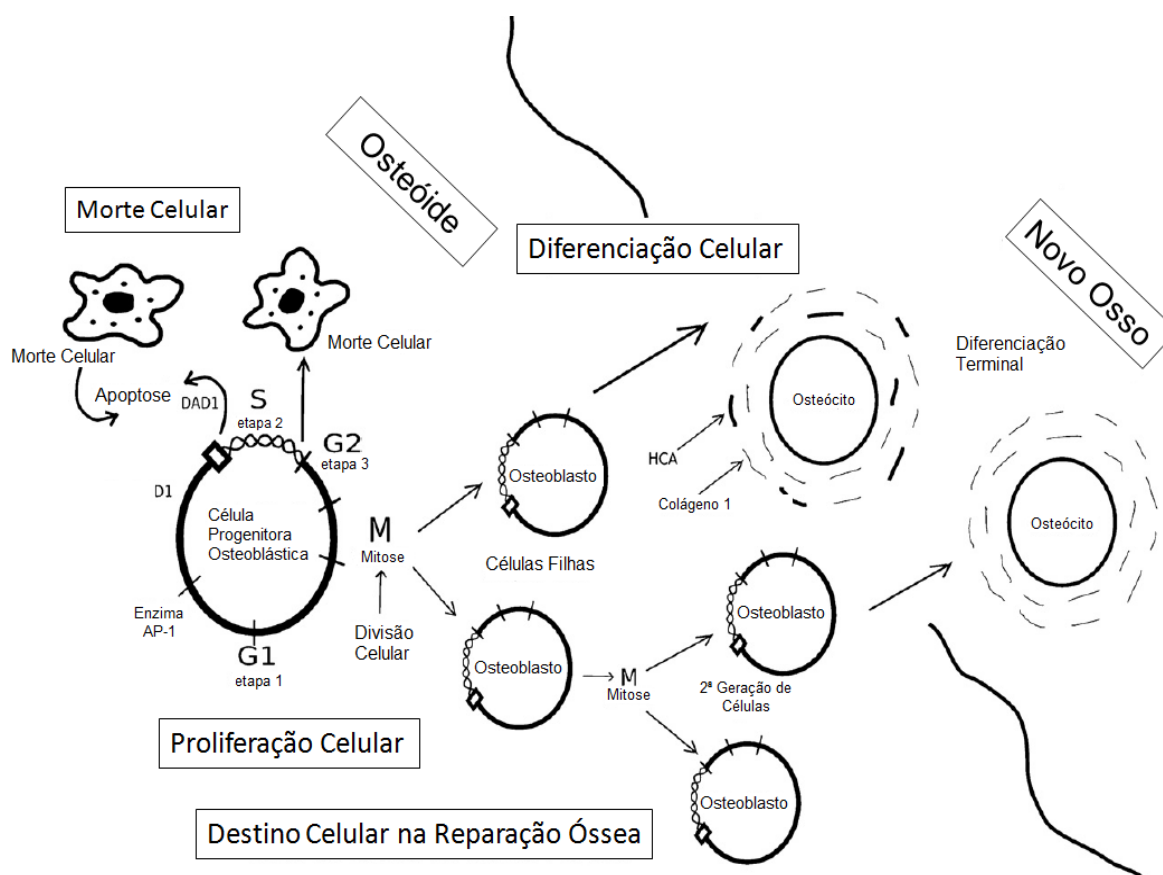


Figura 2.7 - Esquema do ciclo celular de um osteoblasto quando exposto a um vidro bioativo [Adaptado de 25].

Se o meio não fornecer o estímulo químico-físico necessário a uma divisão celular o osteoblasto para em G1 ou em G2 e a célula se prepara para um processo de morte programada, isto é, a apoptose. Este processo é importante para prevenir a formação de células com erros em seu código genético.

Segundo Hench [25], apenas materiais bioativos Classe A são capazes de induzir uma rápida neoformação do tecido ósseo, isto é, estes são osteoprodutores, devido sua atuação direta na regulação de genes que controlam ciclo celular.

Os íons provenientes da dissolução controlada dos vidros bioativos são então responsáveis pela diferenciação e proliferação celular. A quantidade necessária para o estímulo dos osteoblastos é de aproximadamente 17 a 20 ppm de silício e 88 a 100 ppm de cálcio.

Estudos realizados por Xynos *et al.* mostraram que quando o biovidro 45S5 é utilizado, sete famílias de genes são ativadas e reguladas devido a estas quantidades de Si e Ca presentes no meio [26].

Com esta faixa de íons presentes vê-se um aumento de 200 a 500% na expressão gênica dessas várias famílias de genes e por consequência vários fatores de crescimento e diversas proteínas [10].

2.1.5.3 Aplicações

Em meados de 1980, a grande quantidade de dados coletados para os vidros bioativos, especialmente o Bioglass 45S5, permitiram o início de sua aplicação clínica.

Porém, o emprego clínico dos biovidros inicialmente enfrentou certa resistência devido as suas características frágeis, podendo quebrar-se ou fraturar-se acidentalmente quando implantado, dando origem a partículas ou pedaços que poderiam migrar e danificar tecidos e vasos sanguíneos adjacentes. Entretanto, devido a fatores positivos bastante valiosos na neoformação óssea, este biomaterial vem sendo aplicado clinicamente tanto na medicina quanto na odontologia, em uma grande variedade de formas como placas, grânulos, blocos e pós desde os anos 80 [27].

O primeiro relato da utilização, com sucesso, do *45S5 Bioglass*[®] na forma sólida, foi na substituição de ossículos do ouvido médio, no tratamento de perda auditiva condutiva [28].

Outro procedimento documentado foi a utilização deste mesmo vidro em cirurgias orais. Dispositivos de *45S5 Bioglass*[®] em forma de cone foram utilizados para preencher defeitos ósseos na mandíbula originados após exodontias, ou seja, extrações dentárias.

Desde então, os vidros bioativos vêm sendo largamente utilizados nas cirurgias de cabeça e pescoço, para reconstruções de fraturas de soalho de órbita, preenchimento de defeitos da face, cirurgias de levantamento de seio maxilar, preenchimento dos seios da face e enxertos periodontais.

As distintas aplicações citadas requerem diferentes formas do material,

entre elas formas sólidas, grânulos com várias granulometrias, grânulos combinados com partículas de osso autógeno e grânulos na forma de pasta que podem ser injetados [28].

Vidros bioativos na forma de grânulos maiores do que 100 µm têm sido usados no tratamento de doença periodontal [29]. Partículas com tamanho menores do que 100 µm têm se mostrado efetivas na redução da inflamação gengival [30,31] e também para o tratamento de hipersensibilidade dentinária [32].

A mistura de grânulos de vidro bioativo com fragmentos de osso autógeno também tem sido usada em situações onde a quantidade de osso é insuficiente para colocação de implantes dentais, principalmente na região posterior da maxila, em casos de levantamento do seio maxilar [28,33].

Portanto, os vidros bioativos têm sido usados para o preenchimento de defeitos ósseos; e o reparo destes defeitos é melhorado não só pelas propriedades osteocondutivas do material, como também por seu efeito osteoindutor.

Os vidros bioativos também podem ser usados em situações que dependam da adesão do material com tecido mole.

Porém, para ampliação do espectro de utilização deste material, pesquisadores estão focando na produção de fibras e mantas a partir destes biovidros. Isto possibilitaria que o uso do material abrangesse um número ainda maior de casos, já que, além de manter as propriedades bioativas, a reatividade do material será drasticamente aumentada devido à imensa área superficial das fibras.

Na Tabela 2.1, é possível observar alguns fatores positivos e negativos no uso clínico de alguns biomateriais.

Tabela 2.1 - Vantagens e desvantagens no uso clínico dos vidros bioativos e de outros biomateriais [Adaptado de 33].

Biomaterial	Fatores Positivos	Fatores Negativos
Hidroxiapatita	<ol style="list-style-type: none"> 1) Excelente Biocompatibilidade 2) Boa Osteocondutividade 3) Gera atividade celular 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Frágil 2) Geralmente biodegrada muito devagar.
Vidros Bioativos	<ol style="list-style-type: none"> 1) Excelente Biocompatibilidade 2) Boa Osteocondutividade 3) Gera atividade celular 4) Melhoram a vascularização 5) Controle da expressão genética dos osteoblastos 6) Controle da taxa de degradação 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Mecanicamente frágil.
Vitro-cerâmicas bioativas	<ol style="list-style-type: none"> 1) Excelente Biocompatibilidade 2) Boa Osteocondutividade 3) Gera atividade celular 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Frágil 2) Geralmente biodegradam muito devagar (exceção do 45S5 cristalizado)
Compósitos bioativos	<ol style="list-style-type: none"> 1) Excelente Biocompatibilidade 2) Boa Osteocondutividade 3) Gera atividade celular 4) Controle da taxa de degradação 5) Melhores propriedades mecânicas 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Técnicas de processamento complexas

2.2 Fibras de Vidro

Atualmente, as fibras de vidro são consideradas produtos extremamente versáteis. Este material apresenta transparência, boa resistência mecânica, flexibilidade e estabilidade [34]. E as mesmas vêm sendo utilizadas na fabricação de compósitos estruturais, placas de circuito impresso e uma vasta gama de produtos para fins especiais [34]. Devido a estas e outras características, tanto os processos quanto as composições vítreas que dão origem as fibras são de extremo interesse acadêmico e industrial.

2.2.1 Princípios de Formação dos Fundidos e Fibras de Vidro

Fibras de vidro contínuas podem ser obtidas a partir de diferentes composições de vidro com distintas viscosidades. No caso de vidros a base de sílica, a variação da viscosidade com a temperatura será intimamente relacionada com a quantidade deste reagente na composição vítrea.

O modo como a viscosidade de um vidro muda com a temperatura é um fator crucial para a determinação da escolha de quais processos de conformação serão utilizados para a fabricação dos dispositivos ou artigos vítreos. Tanto processos como sinterização ou os de manufatura de fibras necessitam de um controle rigoroso da viscosidade.

Durante os processos de aquecimento e resfriamento a viscosidade de um vidro pode ter fortes variações com a mudança da temperatura. Uma composição vítrea que apresente uma curva viscosidade vs. temperatura íngreme é denominada uma composição “curta” ou um vidro “frágil”. Mas, se a mudança na viscosidade com a temperatura se apresentar mais moderada, este vidro é conhecido como um vidro “longo” [35]. Fundidos longos geralmente apresentam entre 50-100% em peso de SiO_2 .

Segundo esta teoria, fundidos frágeis são caracterizados por estarem na viscosidade para puxamento de fibras somente em condições de super-resfriados.

Os parâmetros mais importantes no processo de manufatura de fibras são: viscosidade, a temperatura na qual as fibras são formadas, a temperatura *liquidus*, na qual acima dela nenhum cristal será formado, e a diferença entre essas duas temperaturas.

Com a tecnologia utilizada atualmente, indica-se que para a obtenção de fibras contínuas o fundido esteja em uma viscosidade de log 2.5 a 3.0 poise (ou dPa.s), porém, dependendo do diâmetro da fibra que se deseja obter, a viscosidade pode ser ajustada para log 2.0 a 2.5 poise.

2.2.2 Processo de Obtenção de Fibras

Atualmente, os métodos mais conhecidos para a fabricação de fibras são cinco: *downdrawing* (de uma massa vítrea fundida – Fig. 2.8 A - ou de uma pré-forma Fig. 2.8 B), *updrawing* (Fig. 2.8 C), *meltspinning*, *electrospinning* e *dry spinning* sendo que os dois últimos processamentos são feitos a partir de soluções ou processos de sol-gel.

Para vidros longos os processos mais utilizados são *downdrawing*, *meltspinning* ou *dry spinning*. Já vidros curtos ou frágeis podem ser conformados em fibras por meio de processos como *updrawing* de fundidos super-resfriados.

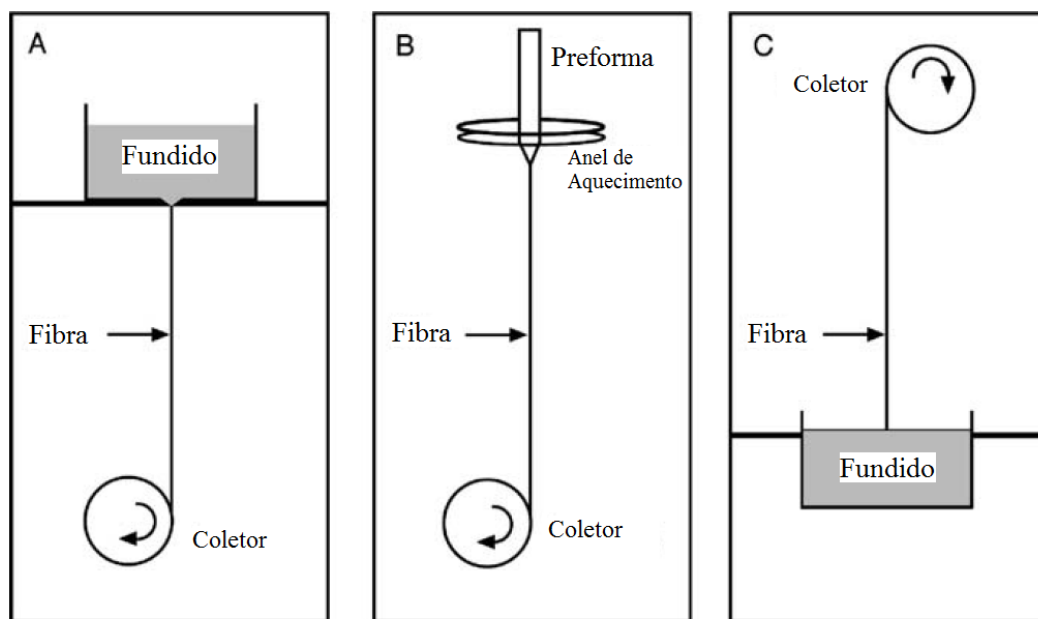


Figura 2.8 - Métodos de obtenção de fibras de vidro [Adaptado de 36].

2.2.2.1 Downdrawing

Quase toda a quantidade de fibras de vidro contínuas e inertes é produzida atualmente pelo processo de puxamento ou *downdrawing*, no qual a composição vítrea é levada a fusão e a massa vítrea obtida é extrudada por orifícios nos containers ou dispositivos de platina que podem ter de 0,8 a 3,2 mm de diâmetro [34,36,37].

Depois de puxada, a fibra resfria-se rapidamente, o controle do seu diâmetro é feito pela velocidade do coletor, variando comercialmente entre 3 a 20 μm , com velocidades de aproximadamente 60 m/s.

Em seguida, os filamentos individuais são coletados e passam por dispositivos para a aplicação de *coatings*. Posteriormente, estes filamentos são combinados em cordões que são levados para a secagem e subsequente empacotamento [34].

Atualmente, o vidro mais utilizado para obtenção de fibras contínuas de uso comum é o E-glass, que pode conter ou não boro em sua composição. Seu vasto uso deve-se ao seu baixo custo e suas propriedades de baixa condução elétrica. Existem outras composições bastante utilizadas com aplicações mais

especiais, que geralmente são vidros silicatos que recebem uma letra em seu nome de acordo com sua propriedade mais evidente. A Tabela 2.2 é composta com estas diversas composições e suas características.

Tabela 2.2 - Designações e Características dos vidros inertes para produção de fibras [Adaptado de 34].

Letra de Designação	Propriedade ou Característica
E	Baixa condutividade elétrica
S	Alta resistência mecânica
C	Alta durabilidade química
M	Alta dureza
A	Vidro alcalino
D	Baixa constante dielétrica

2.2.2.1.1 Princípios para o Design de Novas Formulações

O desenvolvimento de novas composições vítreas que permitam seu processamento em fibras e ao mesmo tempo sejam resistentes à cristalização e utilizem menos energia em sua manufatura é, hoje em dia, uma tecnologia extremamente visada.

O delta de temperatura entre $T_{\log 3.0}$ poise (temperatura de puxamento) e a temperatura *liquidus* é uma característica chave para a manufatura de fibras, principalmente por processos simples como o *downdrawing*. Se a temperatura *liquidus* for menor que a temperatura para formação de fibras ($T_{\log 3.0}$ poise) o fenômeno de cristalização ocorrerá em minutos ou algumas horas, dificultando e até impedindo a obtenção das fibras.

Um delta adequado para este tipo de processamento é necessário. Para fibras de vidro comerciais este delta é de no mínimo 50°C, variando entre 50 a 85°C no processo industrial para fibras inertes [36].

2.2.2.1.2 Fundamentos das Propriedades Vítreas para a Obtenção de Fibras

Para que uma nova composição vítrea possua as propriedades necessárias à fabricação de fibras eficientemente, é preciso entender alguns parâmetros e características do vidro fundido e algumas propriedades relacionadas.

Para otimização do design e uso de novas composições há alguns modelos que preveem os fatores-chaves ao processo de manufatura de fibras.

Existem diversos modelos, alguns mais precisos que outros e normalmente eles se baseiam na composição química do vidro.

- Relação Temperatura-Viscosidade

A relação temperatura-viscosidade é um fator determinante na escolha da temperatura do fundido durante o seu processamento em fibras. A temperatura de fusão para vidros do sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO}$ tem viscosidade de 10^2 poise (P) ou dPa.s. A temperatura de formação de fibras (T_F) corresponde a viscosidade de $10^{2.5}$ a 10^3 P. A temperatura de trabalho (T_W) está relacionada a viscosidade de 10^4 P, nesta o vidro pode ser conformado em diversas peças e formas, por exemplo garrafas e potes. A temperatura ou ponto de amolecimento, T_S , corresponde à viscosidade $10^{7.65}$, a qual permite que o vidro se deforme em uma taxa específica com seu próprio peso. Na temperatura de recozimento, T_A , a viscosidade apresenta-se em 10^{13} P [36].

Na Figura 2.9 é possível ver estas temperaturas para o vidro de janela (sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO}$).

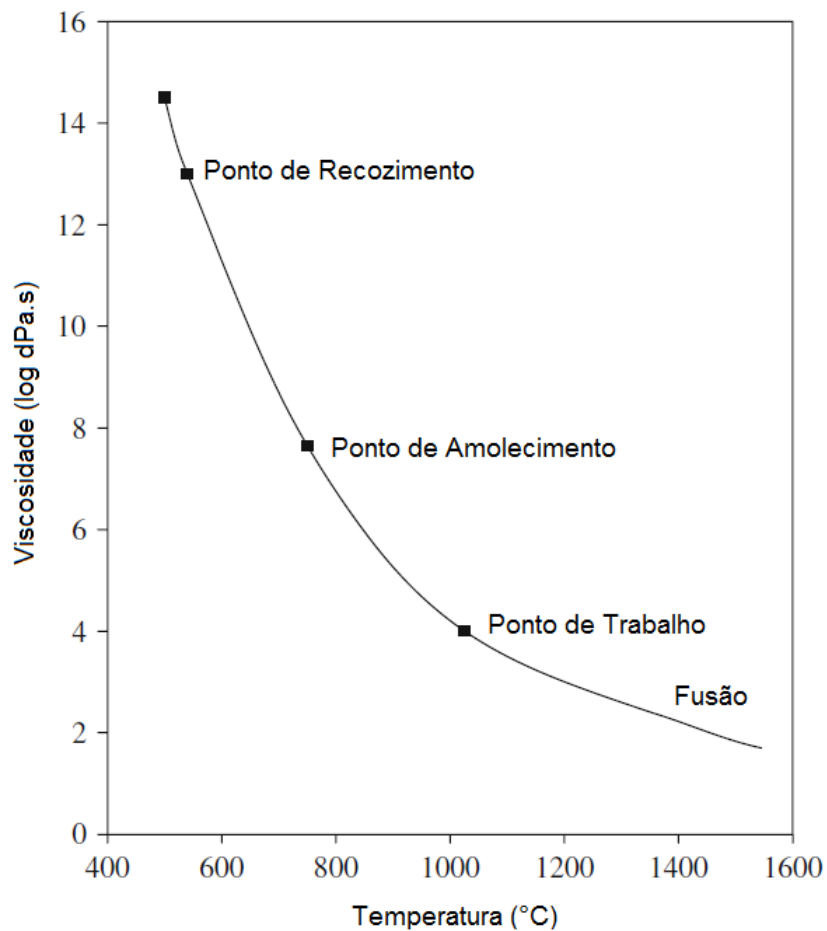


Figura 2.9 - Curva de viscosidade para o vidro de janela [Adaptado de 34].

A partir destas temperaturas, é possível utilizar alguns métodos de previsão de comportamento da composição vítrea durante seu processamento. Na produção industrial de fibras, duas características são bastante analisadas:

Velocidade Relativa da Máquina (RMS) - é a velocidade relativa na qual as fibras podem ser produzidas por uma composição de vidro em particular.

Sendo,

$$RMS = \frac{S-450}{(S-A)+80} \quad (2.5)$$

Onde S é a temperatura de amolecimento (T_S) em log (viscosidade em dPa.s) e A é a temperatura de recozimento em log (viscosidade em dPa.s) [36].

Índice da Faixa de Trabalho (WIR) – é a diferença entre a temperatura de amolecimento e de recozimento. Serve somente como parâmetro para faixa de trabalho do vidro, mas não é referente à temperatura de trabalho (T_w).

Sendo,

$$WIR = (S - A) \quad (2.5)$$

2.2.2.1.2.1 Devitrificação e Crescimento de Cristais

Se durante a conformação do vidro em fibras o mesmo for exposto a uma temperatura e tempo suficiente para causar sua devitrificação, seu processamento pode ser dificultado ou até mesmo impedido [36].

A taxa de cristalização de um vidro está intimamente ligada a sua composição. Vidros bioativos possuem altas e descontroladas taxas de cristalização, o que impede seu processamento em fibras por processo simples como *downdrawing*.

Para o melhor controle durante a fabricação de fibras, o ideal seria conhecer a T_{liq} do material e também analisar o diagrama de fases para o sistema que se deseja utilizar. Entretanto, os vidros bioativos apresentam composições complexas e não estequiométricas, com adição de muitos elementos modificadores de rede, o que impossibilita o uso de um diagrama.

- Métodos de Evitar a Devitrificação

Recomenda-se que para evitar a devitrificação a T_{liq} do vidro utilizado seja pelo menos de 10 a 20°C abaixo da temperatura de trabalho (T_w), isto minimizaria a possibilidade de formação e crescimento de cristais durante seu processamento [38].

O índice de devitrificação (D) é bastante utilizado na indústria para estimar a liberdade de trabalho e a tendência a devitrificação de uma composição vítrea.

Um índice de devitrificação (D) positivo indica uma relativa liberdade de trabalho e uma composição com baixa tendência a cristalização, já um D negativo indica uma composição com grande tendência a devitrificação.

Sendo, portanto,

$$D = WRI - 160^{\circ}C \quad (2.6)$$

Para vidros do sistema $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO}$ este índice varia entre +29 a +39°C.

Outro fator bastante importante é a diferença entre a T_F e a T_{liq} do vidro (ΔT_{FL}) que se pretende conformar em fibras. Se este ΔT_{FL} for negativo a probabilidade de cristalização do vidro é alta. Indica-se que esta diferença esteja entre 40 a 50°C para produção industrial de fibras. Mas, deve-se lembrar que o processo de devitrificação também depende de outras condições como o forno e seu controle de temperatura, as operações de trabalho e manufatura etc.

Segundo Wallenberger [36] existem alguns casos onde se é possível trabalhar e obter fibras com ΔT_{FL} próximos a zero.

- Modelos de Previsão da Temperatura Liquidus

Segundo Hrma *et al.* [39], o melhor método para inferir a T_{liq} de uma composição é primeiramente utilizar um modelo global e em seguida, usar um modelo mais específico e apropriado à composição que se deseja estudar.

Eles afirmam que um modelo global de relativa boa precisão é o modelo de Cuartas [40], já que este modelo cobre uma grande faixa de variação de elementos, incluindo SiO_2 , Na_2O , CaO , BaO , K_2O , B_2O_3 , Al_2O_3 , Fe_2O_3 , MgO , MnO , Cr_2O_3 e SO_3 . Onde se tem que:

$$T_{liq} = [(1170.87 \times \text{SiO}_2) + (1848.99 \times \text{Al}_2\text{O}_3) + (897.33 \times \text{Fe}_2\text{O}_3) + (1503.91 \times \text{CaO}) + (652.96 \times \text{MgO}) - (2011.99 \times \text{Na}_2\text{O}) - (1606.03 \times \text{K}_2\text{O}) - (500.61 \times \text{BaO}) - (756.77 \times \text{B}_2\text{O}_3) - (1148.21 \times \text{MnO}) - (3473.44 \times \text{Cr}_2\text{O}_3) + (1832.68 \times \text{SO}_3)] / \text{SiO}_2 \quad (2.8)$$

Outro modelo existente é o de Lakatos e Johansson [36] onde se tem que:

$$T_{liq} = 1002.0 + (14.54 \times Al_2O_3) - (17.11 \times Na_2O) - (8.73 \times K_2O) + (22.51 \times CaO) + (7.58 \times MgO) \quad (2.9)$$

No entanto, este e a maioria dos modelos existentes não levam em consideração o uso de P_2O_5 e Li_2O . Portanto, seu uso para composições vítreas bioativas se limita a somente um guia para definição deste parâmetro.

2.2.3 Fibras de Vidro Bioativo

A busca por composições vítreas bioativas que possam ser conformadas em fibras é de extremo interesse tecnológico. Porém, a grande maioria delas tem uma grande tendência a cristalizarem-se rapidamente e possuem uma faixa de trabalho bastante estreita [41].

Estes materiais geralmente não podem ser manufaturados por meio dos métodos convencionais, como o processo de *downdrawing*, pois apresentam uma curva de viscosidade-temperatura muito íngreme, ou seja, são vidros muito curtos e por este motivo, as fibras obtidas com composições vítreas bioativas são atualmente conformadas, na maioria dos casos, por processos caros como o *melt spinning* ou *eletrospinning*. Contudo, a técnica de *melt spinning* só é capaz de produzir pequenas fibras ou amostras em forma de fita bastante finas [42] e a técnica de *eletrospinning* necessita de um precursor sol-gel.

As composições vítreas mais conhecidas pela obtenção de fibras por *melt spinning* são: os vidros 13-93 e o 9-93, e isto se faz possível, pois ambas as formulações possuem uma quantidade significativamente maior de sílica em relação às composições vítreas bioativas tradicionais, sendo de 53%-p e 54%-p respectivamente; enquanto o Bioglass[®] 45S5 possui aproximadamente 45%-p [43,44]. Isto representa um grande ganho de estabilidade frente ao fenômeno de cristalização, já que a sílica é considerada um formador de vidro e seu

aumento representa um ganho de estabilidade vítrea.

Entretanto, essa maior faixa de trabalho do vidro bioativo 13-93, que o permite ser processado em fibras, leva-o a ter uma degradação mais lenta que o vidro Bioglass 45S5. Este vidro demora, em ensaios *in vitro*, até 7 dias em solução de SBF-K9 para que a camada de HCA se forme em sua superfície, enquanto que para o Bioglass isto acontece em apenas de 6 a 8 horas, implicando, portanto, em uma drástica queda de sua bioatividade [4,43].

Como citado, o outro processo de conformação de fibras que vem sendo estudado é o *eletrospinning*. Esta técnica necessita da utilização do processo de sol-gel para obtenção do material vítreo na forma de fibras e, portanto, é muito mais dispendiosa e complexa do que a técnica de *downdrawing*, além de ser utilizada preferencialmente para obtenção de fibras submicrométricas para conformação de *scaffolds* porosos [45,46].

Com relação às formulações de vidros bioativos, estas normalmente possuem grandes quantidades de alcalinos e alcalinos terrosos, como pode ser observado na seção 2.1.5.1, que são considerados elementos modificadores de rede, pois rompem as ligações Si-O-Si, e isto, deixa estas composições vítreas mais susceptíveis à cristalização, já que a energia provinda do aquecimento durante os processos de manufatura é suficiente para causar o rompimento das ligações químicas, que são mais fracas do que as ligações de Si-O-Si, possibilitando assim, o rearranjo dos átomos e consequente devitrificação [47].

Outro comportamento deste tipo de formulação vítrea (bioativas) que tende a dificultar a obtenção de fibras pela técnica de *downdrawing* é seu comportamento viscoso caracterizado pela rápida mudança com pequenas variações de temperatura, isto é, esses vidros formam fundidos frágeis [47].

Alguns destes materiais têm a tendência de cristalizar mesmo em baixas temperaturas, dificultando assim, a obtenção de fibras e sua sinterização. O vidro Bioglass[®] 45S5 também é conhecido pela dificuldade que apresenta para a produção de fibras devido a sua fácil cristalização [48].

Brink *et al.*, em 1997, estudaram diferentes sistemas de vidro e apontaram alguns que apresentavam uma ampla faixa de trabalho, o que

permitiria a produção de fibras [49]. A Tabela 2.3 identifica e classifica alguns vidros em relação ao seu comportamento viscoso e sua ação biológica com a quantidade de álcalis e alcalinos terrosos em cada vidro.

Tabela 2.3 - Composições de diferentes vidros com diferentes comportamentos viscosos em relação à temperatura [Adaptado de 49].

Comportamento Viscosidade- Temperatura	Vidro	Sílica mol %	Alcalinos mol %	Alcalinos Terrosos mol %
Larga Faixa de Trabalho (Vidros Inertes)	7-92; 23-93; 18-92; 13-92; 4-92; 10-92; 11-93; 25-93	58.8 - 70.7	10-15	14 – 25
Larga Faixa de Trabalho (Vidros Bioativos)	13-93; 6-94; 9-93; 1-94; 19-93; 17-93; 2-94; 5-94	54.4 – 61.7	19 - 27	11 – 23
Curta Faixa de Trabalho (Vidros Bioativos)	5-92; 14-93; 18-93; 12-92; 11-92; 3-92; 2-92; 14-92; 20-92	40.5 – 55.6	21 - 28	18 – 30

Na Tabela 2.3 é possível perceber a presença dos vidros 13-93 e 9-93. Estes são classificados como vidros bioativos que possuem uma larga faixa de trabalho e que podem ser compatíveis com o processo de puxamento de fibras.

Os vidros bioativos com larga faixa de trabalho permitem que o processo de fusão seja mais fácil e também torna possível a obtenção de fibras e os produtos provenientes delas [50].

No entanto, a produção de fibras depende do uso de composições vítreas de larga faixa de trabalho, que sejam estáveis por longos períodos de tempo para que não ocorra a cristalização da mesma, o que impossibilitaria o puxamento de forma correta. Concomitantemente, esta mesma composição deve possuir alta bioatividade, preferencialmente com capacidade de interação

com tecidos duros e moles, o que exige um intenso estudo de composições e sistemas vítreos e ensaios biológicos *in vitro*.

A produção de fibras por meio do método de *downdrawing* traz vantagens como: a produção de fibras contínuas de variados diâmetros, sendo possível o controle do mesmo, e ser menos onerosa e mais simples que as técnicas acima citadas.

Portanto, este estudo buscou viabilizar a obtenção de fibras pelo processo de *downdrawing* mediante o desenvolvimento e uso de uma nova formulação vítrea que consegue combinar propriedades como alta bioatividade, permitindo uma rápida interação com os fluidos corpóreos para promoção acelerada do processo de cura do tecido ósseo, propriedades mecânicas adequadas à aplicação desejada, ser passível de esterilização sem que haja qualquer mudança em sua estrutura e principalmente e possui alta estabilidade vítrea quando comparada as composições bioativas tradicionais, o que diminui bastante a tendência a cristalização deste vidro durante o processo de puxamento das fibras. Esta formulação é provisoriamente denominada F18 e foi desenvolvida no Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV – UFSCar) [18].

A obtenção de todas essas características é conseguida com a adição de certos reagentes, como óxido de potássio, óxido de magnésio entre outros e também o ajuste fino dos reagentes tradicionais (sílica, cálcio e sódio). Com estes compostos, o vidro aumentou sua faixa de trabalho, diminuiu sua tendência à cristalização e ainda sim, manteve sua alta bioatividade [18].

2.2.3.1 Propriedades Relacionadas às Fibras de Vidro Bioativo

Com relação à interação e resposta celular, uma grande variedade de células pode ser cultivada sobre fibras ou sobre mantas, pois suas estruturas abertas facilitam o crescimento do tecido orgânico desejado e melhoram o processo de difusão de nutrientes e excretas provenientes destas células [48], o que possibilita uma cura rápida às injúrias e defeitos ósseos.

Em seu estudo, Clupper *et al.* [48], observaram uma rápida interação entre células ósseas (osteoblastos) e a superfície das fibras do vidro 45S5,

após quinze minutos as células já haviam se aderido ao material, e seu número crescia com o passar do tempo.

Brown *et al.* [13] comprovaram em seu estudo que *scaffolds* obtidos por meio de fibras do vidro 13-93 combinaram propriedades que melhoram a deposição, ligação, diferenciação e crescimento de osteoblastos no material.

Moimas *et al.* [51] verificaram, em um estudo preliminar, que *scaffolds* feitos de fibras obtidas por *melt spinning* a partir de um vidro do sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{K}_2\text{O}-\text{MgO}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$, quando implantados em defeitos fabricados em ossos de coelho mostraram sua total reabsorção em 6 meses e obtiveram bons resultados quanto a reparação e remodelação do defeito ósseo.

Quanto as propriedades mecânicas das fibras, Clupper *et al.* [48], demonstraram que a resistência a tração de fibras do vidro 45S5 com diâmetro médio de $79 \mu\text{m}$ foi de $340 \pm 140 \text{ MPa}$, o que é compatível com outros estudos, como o de De Diego *et al.* [52], que encontraram uma resistência de 200 e 150 MPa para fibras do 45S5 de 200 e 300 μm , respectivamente. Indicando, que a resistência da fibra é função do seu diâmetro, e, portanto, quanto menor o diâmetro da fibra, mais resistente ela será.

2.2.3.1.1 Aplicações das Fibras de Vidro Bioativo

Os vidros bioativos podem encontrar um campo de aplicação bastante vasto na medicina e odontologia quando apresentados como fibras, mantas ou tecidos vítreos.

Na odontologia, estes tecidos de fibra vítrea poderiam ser utilizados como reforços em cirurgias periodontais, procedimentos cirúrgicos de aumento do volume ósseo do rebordo alveolar, para possibilitar a reabilitação com implantes, cirurgias dos seios maxilares etc.; e na medicina estes tecidos poderiam ser utilizados em cirurgias ortopédicas em geral, fraturas e deformidades craniofaciais etc.

Os tecidos de fibra de vidro bioativo também poderiam vir a substituir as malhas de titânio, que vêm sendo bastante utilizadas atualmente em cirurgias de fraturas que envolvem assoalho orbitário (fraturas na região ocular,

tipo blow-out) [53] e também em associação a enxertos ósseos autógenos ou alógenos particulados para a manutenção e estabilização dos mesmos no local desejado [54].

O uso destas malhas metálicas traz algumas desvantagens intrínsecas à técnica, tais como a possibilidade de exposição precoce da malha, o que pode gerar riscos de infecção e conseqüentemente perda parcial ou total do enxerto, e também, em alguns casos clínicos, há a necessidade de remoção da malha após a integração do enxerto ósseo com o tecido local, o que representa mais um passo cirúrgico, trazendo riscos e desconforto aos pacientes [54]. Portanto, o uso de um material que pudesse permanecer no local e que promovesse a neoformação óssea de forma rápida, como o tecido de vidro bioativo, seria mais próximo ao ideal.

Outro campo de aplicação recentemente descoberto para fibras bioativas é sua utilização em feridas e ulcerações dermatológicas, como úlceras varicosas e/ou lesões de pele devido a doenças crônicas, como a diabetes, que demoram a cicatrizar ou até mesmo não conseguem sua regeneração sozinhas.

Jung e Day mostraram recentemente que nanofibras obtidas a partir do vidro 13-93B (nesta composição toda a sílica é substituída por boro) apresentaram, tanto em ensaios *in vivo* quanto clínicos, resultados muito satisfatórios quando aplicadas em feridas cutâneas crônicas de pacientes diabéticos [55], já que mimetizam a formação das fibrilas colágenas durante o processo de reparação tecidual.

2.3 Ensaios In Vitro e In Vivo

Atualmente, existem vários métodos e ensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliar o potencial reparador ou uma possível toxicidade dos novos biomateriais desenvolvidos.

Para uma avaliação mais precisa destes novos biomateriais, foi criada a norma ISO 10993:2009 [56], que permeia diversos tipos de ensaios que visam avaliar a biocompatibilidade, bioatividade, degradação, entre outras propriedades e características dos novos materiais voltados à aplicação clínica.

Nesta norma, estipula-se que o primeiro ensaio a ser realizado é o de citotoxicidade *in vitro* e depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais.

Pretendeu-se neste estudo conduzir tanto ensaios *in vitro* quanto ensaios *in vivo* para avaliação da interação desta nova composição vítrea bioativa, assim como averiguar o comportamento das fibras e tecidos vítreos quanto aplicados nas lesões teciduais.

3 OBJETIVOS

Este projeto de doutorado teve como objetivo otimizar o processamento de uma nova formulação vítrea bioativa (F18) usada para produzir tecidos vítreos altamente reativos e flexíveis, assim como caracterizar essa nova formulação e os novos formatos obtidos em relação as suas propriedades físico-químicas e biológicas, visando, principalmente, a constatação do aumento de espectro de utilização deste novo biomaterial. Para isso, este trabalho buscou:

- i) Aperfeiçoar o equipamento "*home-made*" (o único em escala laboratorial do Brasil) e a técnica de *downdrawing* visando a obtenção mais eficiente de fibras bioativas com a nova formulação vítrea desenvolvida recentemente no LaMaV – UFSCar (F18).
- ii) Otimizar a produção de tecidos vítreos bioativos e flexíveis por meio das fibras obtidas com a utilização de um *coating* bioreabsorvível.
- iii) Caracterizar o vidro desenvolvido, assim como as fibras e tecidos obtidos em relação a suas propriedades físico-químicas.
- iv) Caracterizar e analisar o processo de interação das fibras e tecidos vítreos bioativos com células e tecidos vivos por meio de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

4 ORIGINALIDADE DO ESTUDO

Existem várias razões para o desenvolvimento de alternativas para a engenharia tecidual, sejam elas voltadas para regeneração do tecido ósseo ou para os tecidos moles.

A engenharia de tecidos é uma nova área médica que se apresenta em pleno crescimento, demonstrando um enorme potencial. No entanto, é de senso comum que ainda existem muitos desafios e, o desenvolvimento contínuo neste campo exige interação e colaboração interdisciplinar entre vários profissionais.

A obtenção de fibras bioativas contínuas, pelo processo de *downdrawing*, assim como sua manufatura em tecidos bioativos é um processo inédito que pode levar a um grande avanço no campo da engenharia tecidual, já que este material, a princípio, pode ser aplicado como enxerto para auxílio do processo de cicatrização e regeneração de diferentes tecidos do corpo humano.

O desenvolvimento de tecidos ou *wound pads* a partir de fibras de vidros bioativos é um conceito novo e a produção das mesmas está cada vez mais em evidência devido ao grande ganho que esta conformação pode trazer ao uso clínico dos vidros bioativos.

Sua aplicação e manipulação também apresentam uma vantagem em relação a outros materiais aloplásticos, pois, por possuir flexibilidade, se ajustam a diferentes contornos de fratura, loja óssea ou lesão de variados tecidos.

Seu uso em procedimentos de enxertia óssea ou de outros tecidos também poderia levar a diminuição de passos cirúrgicos já que este material é reabsorvível e, portanto não necessita de remoção posterior, diminuindo assim o desconforto do paciente, risco de contaminação e custo total do procedimento.

Portanto, o desenvolvimento e estudo destes novos tecidos vítreos bioativos permite, a princípio, um aumento no espectro de utilização dos vidros

bioativos e traz um significativo progresso para os processos de cicatrização e regeneração tecidual.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Nova Composição de Vidro Bioativo

A nova composição foi desenvolvida no Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

O vidro foi obtido via fusão em cadinho de platina, em forno elétrico (CM – Bloomfield), empregando-se quantidades adequadas dos reagentes de pureza analítica Na_2CO_3 , K_2CO_3 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , MgO , CaCO_3 , SiO_2 , Al_2O_3 , ZnO , SrCO_3 e B_2O_3 .

A nova formulação obtida foi denominada de F18. Informações mais detalhadas são descritas em Souza *et al.* [57].

5.2 Obtenção das Fibras e Tecidos

As fibras de vidro foram obtidas utilizando o método de puxamento, conhecido como *downdrawing*.

Neste processo uma amostra de aproximadamente 500g de vidro é colocada em um cadinho de ZAS no interior do forno onde é aquecida até uma temperatura, normalmente acima de 1250°C , pelo período de aproximadamente trinta minutos ou o tempo necessário para que fique totalmente fundido e homogêneo.

A temperatura do forno é então ajustada para a massa vítrea alcançar a viscosidade adequada para o processo de puxamento de fibras, que esta entre $10^{2.5}$ a 10^3 dPas [36].

Na Figura 5.1 é mostrado um esquema simplificado da máquina utilizada neste trabalho.

Visando o aprimoramento do processo de obtenção de fibras, alterações no equipamento como: ajuste do isolamento térmico, substituição da parte elétrica e adição de termopar no interior do forno e o desenvolvimento de um

dispositivo com um conjunto de cadinhos em zonas de temperatura diferentes foram realizados.

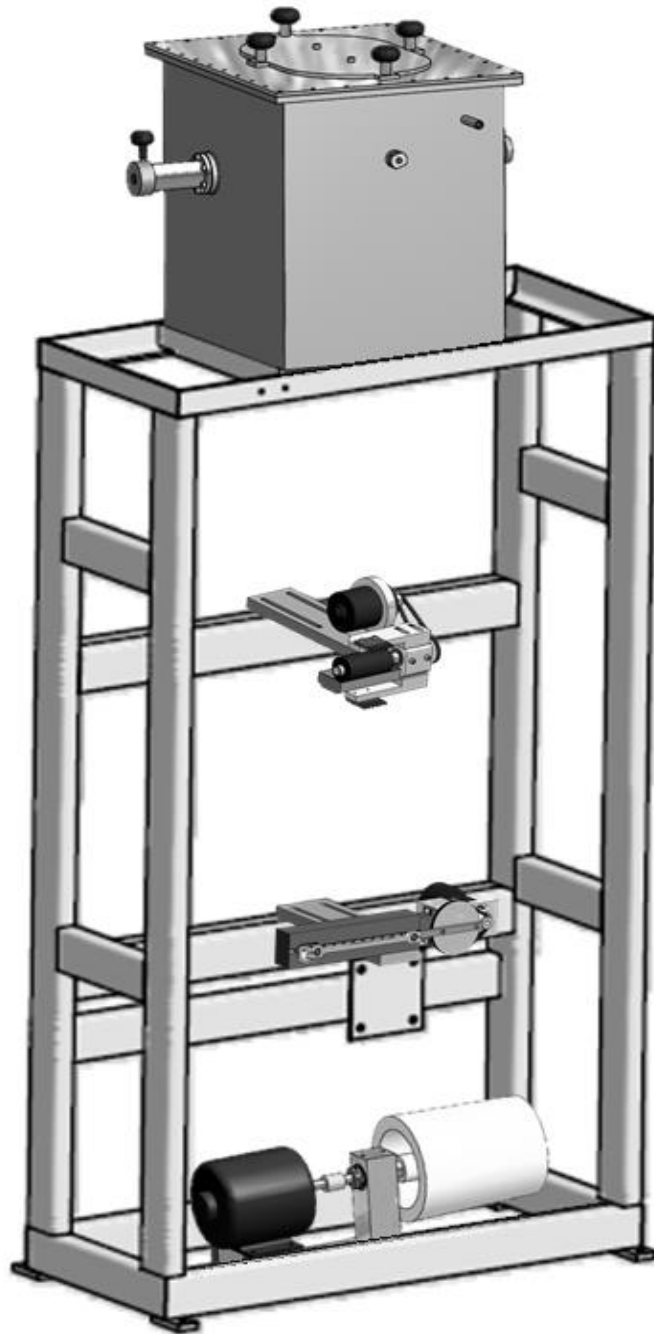


Figura 5.1 - Esquema simplificado da máquina de puxamento de fibras desenvolvida e instalada no LaMaV.

Para obtenção do tecido vítreo bioativo optou-se pelo seguinte procedimento: assim que puxadas, as fibras foram submetidas a um banho com um *coating* bioreabsorvível para que ficassem unidas formando um tecido, a escolha e estudo deste *coating* serão abordados mais especificamente na seção 5.2.2.

5.2.1 Microscopia Ótica

A mensuração do diâmetro das fibras obtidas foi realizada da seguinte forma: um pequeno feixe de fibras paralelas alinhadas entre si é colocado em uma lâmina de vidro e então, aderido a esta lâmina por suas extremidades com resina epóxi (Araldite Hobby – Brascola, Brasil). As amostras foram então examinadas sob um microscópio ótico (Carl Zeiss, modelo Axio, GE), sendo também analisadas com um sistema digital de imagem devidamente calibrado (Axio Vision, GE). A média dos valores apresentados e os erros foram calculados a partir de 100 medições.

5.2.2 Escolha do *Coating* e suas Características

Para a confecção dos tecidos vítreos optou-se pela utilização de um *coating* bioreabsorvível de colágeno tipo I (comercial). Este polímero orgânico foi selecionado já que é a proteína mais abundante no corpo humano, participa de várias etapas da regeneração de diversos tecidos corpóreos e também é relativamente de fácil obtenção animal.

Porém, se fez necessário um estudo da influência da utilização deste biomaterial como *coating* do novo vidro bioativo. Questões como a taxa de degradação e dissolução deste biomaterial e se sua presença influenciaria a taxa de formação e qualidade da camada de HCA formada foram respondidas.

Para tanto, se utilizou a técnica de Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a detecção da presença do biopolímero e para determinação de quanto tempo o mesmo

levava para não mais estar presente na superfície de amostras monolíticas recobertas. Estes ensaios também foram realizados para verificação da influencia deste nas etapas de formação da HCA.

Os ensaios de MEV foram realizados também, para verificação da capacidade e qualidade do recobrimento das fibras obtidas.

5.3 Caracterização do Novo Vidro Bioativo

5.3.1 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Para a verificação da tendência à cristalização da nova composição vítrea F18, assim como a determinação de temperatura *liquidus*, ensaios de calorimetria exploratória diferencial foram realizados.

A Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é uma técnica capaz de analisar transições térmicas em amostras monolíticas (bulk) ou em pó. As mesmas são posicionadas em um porta-amostras com parâmetros controlados, sendo estes: taxas de aquecimento e resfriamento, condutividade térmica do porta-amostras, da amostra e do porta-referência e a composição e fluxo de atmosfera. Uma célula de ensaio é composta de um porta-amostras e um porta-referência de Chromel, apoiados em um disco termoelétrico de Constatam, ligados a termopares de Chromel-Alumel em uma câmara, com fluxo de gás de limpeza, situada dentro de um bloco de aquecimento [32].

Foram realizados ensaios de DSC de aquecimento no equipamento NETZSCH DSC 404 e no equipamento Jupiter STA 449 (NETZSCH - DE), tanto para amostras monolíticas quanto para amostras em forma de pó. As amostras foram ensaiadas a uma taxa de aquecimento e resfriamento de 10°C/min até 1250°C (para amostras monolíticas) e 1200°C (para as amostras em pó), para determinação das temperaturas de transição vítrea (T_g), observação de possíveis picos relativos à cristalização do vidro estudado e também para determinação de T_{liq} (temperatura *liquidus*).

Para amostras monolíticas, pequenas porções de vidro foram cortadas

em cubos de dimensão aproximada de 2 x 2 x 2 mm e em seguida higienizadas em solução de álcool isopropílico P.A. (Quemis - BR) em um aparelho de vibração ultrassônica durante 15 minutos. As amostras em forma de pó foram confeccionadas a partir de porções de vidro previamente higienizadas (por meio do mesmo procedimento utilizado para as amostras monolíticas) que foram trituradas em almofariz e pistilo de ágata e, em seguida, peneiradas em malhas metálicas, obtendo assim, um pó com partículas de diâmetros entre 25 e 38 μm .

5.3.2 Difração de raios X

Esta técnica foi empregada na identificação de fases cristalinas que porventura surgiram durante o processo de puxamento de fibras e também após o tratamento térmico de uma porção do vidro F18.

A técnica de difração de raios X se baseia na lei de Bragg, a qual descreve as interações entre um feixe de raios X monocromático de certa incidência sobre um material cristalino. Este ensaio produz interações destrutivas e construtivas quando os raios X são difratados pelos planos cristalinos, estas últimas seguem a seguinte equação [58]:

$$n.\lambda = 2.d.\text{sen}.\vartheta \quad (5.1)$$

Onde, n é o número inteiro correspondente à ordem de difração; d é a distância interplanar e ϑ é o ângulo de incidência.

Assim, as informações obtidas referentes às distâncias interplanares e a intensidade de reflexão torna viável a caracterização da fase sólida e ordenada reticularmente [32].

O equipamento utilizado foi um difratômetro Rigaku Corporation (Ultima IV – JP), os pós analisados foram obtidos por moagem em almofariz de ágata e depois de peneirados foi obtido um pó na faixa granulométrica entre 25 e 38 μm .

Os dados obtidos foram analisados por meio do software Crystallographica – Search Match, versão 2.1.1.1 (Oxford Cryosystems).

5.3.3 Dilatometria Ótica

Neste ensaio é observada a retração linear característica da amostra em função da temperatura e do tempo de sinterização, sendo confiável e eficiente na definição de parâmetros para a sinterização do material.

Amostras monolíticas e também amostras provindas do pó compactado com dimensões de 3 x 3 x 3 mm foram submetidas a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min até aproximadamente 1200°C, em atmosfera ambiente. O equipamento utilizado foi o microscópio de aquecimento Misura, modelo HSM ODHT 1600.

5.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Diversas amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Company, modelo PhenomTM - NLD). A análise buscou a avaliação da degradação sofrida e a formação dos cristais de HCA após imersão de pastilhas de vidro na solução de SBF-K9 pelos períodos de 0 a 168 horas.

A avaliação da presença e morfologia dos cristais após o puxamento de fibras e após o tratamento térmico de amostras do vidro F18 também foi verificada por meio das imagens de MEV.

A técnica utilizada no microscópio eletrônico de varredura se baseia na aceleração de elétrons ao longo de uma coluna por tensões de 1 a 30 kV, sendo que este feixe passa por duas ou três lentes eletromagnéticas. Estas lentes levam este feixe colimado a atingir a superfície da amostra e bobinas de varredura fazem com que o mesmo varra esta superfície. A corrente que passa por meio da bobina de varredura, sincronizada com as correspondentes bobinas de deflexão de um tubo de raios catódicos, produzem a imagem

aumentada. Os elétrons emitidos atingem um coletor e a corrente resultante é amplificada e utilizada para modular o brilho do tubo de raios catódicos. Diversos fenômenos podem ocorrer durante a interação dos elétrons com a matéria e estes, refletidos ou absorvidos, fornecem informações variadas sobre a amostra [32].

5.3.5 Ensaio de Viscosidade

Para a obtenção da curva viscosidade-temperatura, o novo vidro bioativo F18 foi analisado em dois diferentes viscosímetros. Foram utilizados os equipamentos: viscosímetro (Brookfield, modelo DV-III) e o viscosímetro de baixa temperatura, pelo método de penetração (este equipamento foi desenvolvido no LaMaV-DEMa-UFSCar).

Amostras de 60g foram analisadas nas faixas de temperatura de 750 a 1200°C e 500 a 700°C.

Para o método de menor temperatura, um pequeno indentador cilíndrico de aço de 2 mm de diâmetro é posicionado sobre uma amostra de vidro de 6 mm de espessura. Uma carga é aplicada sobre o indentador e mede-se sua velocidade de penetração na amostra a uma temperatura constante. Para cada temperatura a viscosidade da amostra é dada por:

$$\eta = \frac{0,96 * F}{[4 * (\pi^{0,5}) * r_i * V_p]} \quad (5.2)$$

onde F é a carga aplicada (N), r_i é o raio do indentador e V_p é a velocidade (m/s) com que o indentador penetra na amostra.

5.3.6 Outras Propriedades

Outras propriedades como densidade, dureza, tensão superficial e expansão térmica foram verificadas. A densidade foi averiguada pela técnica

de imersão utilizando o princípio de Arquimedes. Neste experimento, foi utilizada a balança analítica Mettler Toledo, AX204 e uma amostra em forma de pastilha com dimensões de 11 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.

Para a averiguação da dureza foi utilizado o equipamento Microdurômetro Future-Tech F-7e, esta propriedade foi definida com o auxílio do software LAS versão 3.7.0 Leica Microsystem.

Para estimativa da expansão térmica e da tensão superficial foi utilizado o software SciGlass - Glass Property Information System (SciMatics).

5.3.7 Ensaios *In Vitro* Inorgânicos (Acelulares)

5.3.7.1 Ensaios de Bioatividade (SBF-K9)

Os ensaios *in vitro* envolvendo a utilização da solução SBF-K9 (*Simulated Body Fluid*), foram realizados no LaMaV – UFSCar. Estes ensaios almejam o acompanhamento e mensuração da degradação do vidro e velocidade de formação da camada de HCA (hidroxicarbonatoapatita) na superfície do biomaterial. Estes, foram realizados baseando-se e adaptando-se a norma ISO 23317:14 [59] e no estudo de Kokubo *et al.* [60].

O ensaio se baseia na exposição do material a uma solução que mimetiza as condições dos fluidos corpóreos, o SBF- K9. Este fluido contém determinados íons em concentrações bastante semelhantes ao encontrado no plasma sanguíneo.

Para melhor simulação das condições corpóreas, o ensaio é realizado à temperatura de aproximadamente 37°C, com auxílio de um banho termostatizado (Nova Técnica - modelo CT 269). Sendo assim possível a verificação da cinética das reações de formação de HCA na superfície do material bioativo que está em contato com a solução SBF-K9.

A preparação deste fluido superconcentrado desenvolvido por Kokubo [60], é um processo bastante delicado, demandando precisão e seguimento exato de sua metodologia, caso contrário pode-se ter a precipitação de sais na

solução, o que inviabiliza seu uso.

A sua preparação deve seguir então os seguintes passos:

1 – Lavagem dos frascos e utensílios em:

- Detergente Neutro
- Solução 1N de HCl
- Água deionizada
- Secagem em estufa

2 – Colocar 500 ml de água deionizada em um béquer de capacidade de um litro e cobrir com vidro de relógio.

3 – Agitar o conteúdo do béquer com um agitador magnético e adicionar cuidadosamente os reagentes indicados na Tabela 5.1, um a um, na ordem disposta na tabela abaixo.

Tabela 5.1 - Reagentes envolvidos na preparação de 1 litro da solução de SBF-K9.

Ordem	Reagentes	Quantidade (g)
1	NaCl	7,996
2	NaHCO ₃	0,35
3	KCl	0,224
4	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,228
5	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,305
		40 ml
		(aproximadamente
6	HCl 1N	90% da quantidade
		total de HCl a ser
		adicionada)
7	CaCl ₂	0,278
8	Na ₂ SO ₄	0,071
9	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	6,057

4 – Ajustar a temperatura da solução em 36,5°C, em banho aquecido e

então ajustar o pH da solução para 7,25 adicionando pequenas quantidades de solução de HCl 1N. Remover os eletrodos e adicionar a água deionizada empregada na lavagem ao béquer.

5 – Transferir a solução do béquer, após seu resfriamento a temperatura ambiente, para um balão volumétrico de 1 litro. Adicionar então, a água utilizada na lavagem do béquer.

6 – Ajustar o volume total da solução em um litro, adicionando água deionizada.

7 – Transferir a solução para um frasco de polietileno ou polipropileno, armazenando-o em refrigerador entre 5 e 10°C. Caso algum sal precipite na solução durante seu armazenamento esta deverá ser descartada juntamente com o recipiente utilizado.

Para a realização destes ensaios foram confeccionadas pastilhas de tamanho aproximado de 2 x 12 mm. Estas pastilhas foram polidas em lixas de carbetto de silício de grana de 200 e, em seguida, 400. Logo após, as mesmas sofreram dois entalhes em lados opostos ao longo de sua circunferência, estes funcionam como guias para inserção de fios de nylon de 0,10 mm. Após serem limpas com acetona e temporizador ultrassônico, elas foram secas e em seguida suspensas no interior de um recipiente de polipropileno (passível de vedação) preenchido com a solução SBF-K9. O volume da solução foi calculado de acordo com a relação área superficial da pastilha/ volume da solução igual a $0,1 \text{ cm}^{-1}$. A Figura 5.2 mostra um esquema do modo de realização deste ensaio.

Após a realização destes experimentos, as pastilhas foram mergulhadas em acetona, para paralisação das reações com o fluido e então levadas ao equipamento de espectroscopia de infravermelho para ensaios por refletância difusa.

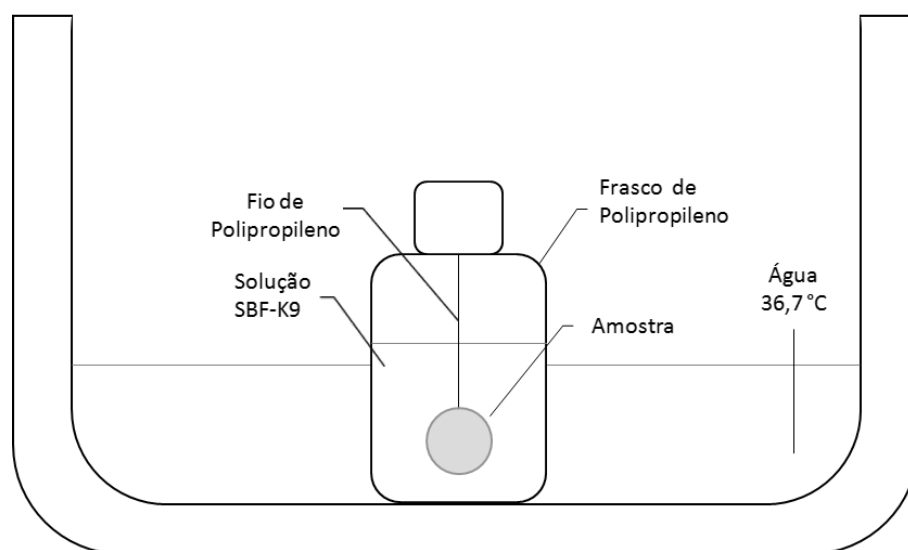


Figura 5.2 - Esquema de adaptação da amostra no ensaio de bioatividade [Adaptado de 32].

5.3.7.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica possibilita a identificação e acompanhamento das transformações superficiais ocorrida no vidro bioativo estudado.

A técnica de espectroscopia de infravermelho por refletância difusa foi aplicada para o acompanhamento das reações nas amostras em forma de pastilhas. Esta técnica é baseada na identificação das vibrações dos átomos e moléculas.

Durante o ensaio, um feixe de radiação infravermelha incide sobre a amostra e o feixe transmitido ou refletido é analisado. Determinando-se assim, qual fração da radiação incidente é absorvida em um determinado comprimento de onda. O comprimento de onda no qual surge um pico de absorção corresponde à frequência de vibração de uma parte da molécula [61]. As pastilhas foram analisadas pelo equipamento de infravermelho Perkin Elmer, modelo Spectrum GX-DE.

5.3.7.2 Ensaios de Degradação

Para melhor compreensão das reações de dissolução do novo biomaterial vítreo, assim como uma previsão mais bem sucedida a respeito de sua interação *in vivo*, foram realizados ensaios para verificação de sua taxa de degradação seguindo e adaptando as orientações da norma ISO 10993: 14 – “*Biological evaluation of medical devices - Identification and quantification of degradation products from ceramics*” [56].

Esta norma indica que a amostra seja imersa em uma solução tampão e que este conjunto seja mantido a 37°C em 2 Hz de agitação longitudinal em um banho termostaticado pelo período de 120 horas.

Indica-se que cada amostra seja pesada seis vezes e a média de suas massas seja registrada para posterior comparação de perda de massa em relação ao tempo de exposição à condição acima citada.

Após o período de análise, as amostras são filtradas e pesadas também por 6 vezes. A diferença entre os pesos do filtro e do filtrado indica a perda de massa em relação ao tempo.

Estes ensaios foram realizados em duplicata para amostras do novo vidro bioativo F18 e também para o 45S5 (formulação adotada como controle).

5.3.7.2.1 Solução de Degradação

Para a preparação da solução indicada na norma ISO 10993-14, foram utilizadas 13,25g de Tris ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) que é dissolvido em 500 ml de água deionizada. Ao alcançar-se 37°C (± 1) o pH da solução é ajustado para 7,4 ($\pm 0,1$) com adição de pequenas quantidades da solução de HCl 1 molar. Em seguida, ajusta-se o volume da solução, totalizando 1 litro, adicionando água deionizada. A solução foi armazenada em refrigerador entre 5 e 10°C durante todo o período experimental.

Para a melhor compreensão da taxa de degradação do vidro bioativo F18, optou-se pela realização do teste com diferentes formas de amostras,

como discos, pó, fibras e malhas. Nas seções 5.3.7.2.2 a 5.3.7.2.4 apresentam-se as metodologias utilizadas para cada tipo de amostra. Para estes ensaios a composição *gold standard* 45S5 foi utilizada como controle.

Para o melhor acompanhamento dos fenômenos envolvidos, também se realizou, para todos os tempos e todas as formas de amostra, a averiguação da variação do pH com o tempo, assim como foram realizadas análises em FTIR e MEV para constatação da presença ou não da camada de HCA na superfície das amostras.

5.3.7.2.2 Amostras monolíticas

Foram confeccionadas amostras monolíticas no formato de pastilhas com diâmetro de $12\pm 0,1$ mm e espessura de $2\pm 0,1$ mm provenientes do vidro 45S5 e da composição F18. Tais amostras foram desbastadas usando lixas de carbeto de silício com granulometria de 240 a 400. Após esta padronização, os discos foram imersos em álcool isopropílico (JT Baker) e colocados em um aparelho de ultrassom para higienização.

As amostras em forma de discos foram submetidas ao teste de degradação em períodos de 24, 72, 120 e 168 horas em um recipiente de polipropileno com 100 ± 1 ml de solução, o ensaio foi realizado em duplicata como recomendado na norma ISO 10993-14.

5.3.7.2.3 Amostras em Pó

Para este estudo, o pó dos vidros 45S5 e F18 foram preparados em almofariz de ágata e peneirados em malha metálica para obtenção da faixa granulométrica de 500 e 675 μm .

Após estas etapas, o pó foi higienizado com álcool isopropílico e colocado em estufa para secagem por 24 horas a uma temperatura de 90°C.

Além do período estipulado pela norma (120 horas), outros períodos também foram analisados: 8, 24, 72, 120 e 168 horas, assim, teremos o perfil de degradação sofrido pelo material *in vitro*.

Nestes ensaios, devido ao volume restrito de material e a necessidade de adaptação da norma para materiais mais reativos, optou-se por manter a relação proposta por Jones *et al.* [62,63], onde 0,05g de material são imersos em 50 ml de solução (relação 0,001g/ml), utilizando-se partículas com dois diferentes tamanhos médios, 500 e 675 μm (faixas de 425 a 625 e 500 a 710, respectivamente). Estes estudos foram realizados utilizando-se a solução proposta na norma ISO 10993-14, seguidos de análise por FTIR e MEV.

5.3.7.2.4 Fibras Bioativas e do Tecido Vítreo

A taxa de degradação das fibras e do tecido vítreo bioativo desenvolvido também foi analisada. Tanto com o uso da solução de degradação padrão (indicada pela norma ISO 10993-14) quanto com a solução SBF-K9.

Porém, devido à grande área superficial apresentada por esta amostra, optou-se pela continuidade no procedimento adotado para as amostras em pó, utilizando-se novamente o procedimento experimental proposto por Jones *et al.* [62].

Neste estudo, Jones e colaboradores verificaram que uma relação massa/volume de 0,001 g/ml apresentou resultados mais satisfatórios em relação à taxa de degradação do biomaterial e também na taxa de formação da camada de HCA na superfície do material. Portanto, essa razão foi utilizada para fibras individuais de diâmetro de 25 e 45 μm e também para o tecido vítreo obtido com fibras de 25 μm (estes diâmetros foram selecionados para obtermos uma relação com a área superficial das amostras em pó).

As fibras e o tecido foram cortados com 1 cm de comprimento e em seguida foram testados em períodos de 4, 8, 16, 24, 72, 120 e 168 horas. As amostras foram analisadas em duplicata, utilizando 0,05g de fibra para 50 ml de solução.

5.3.7.3 Ensaios para Remineralização Dental

Este estudo *in vitro* se baseia na averiguação da capacidade do novo biomaterial em remineralizar os tecidos dentais (esmalte preferencialmente) após procedimentos de clareamento. Estes ensaios foram feitos em conjunto com a Profa. Alessandra Nara Rastelli, do Departamento de Dentística da Universidade Estadual de São Paulo em Araraquara.

Neste estudo, foram utilizados pequenos cubos 4 x 4 x 3 mm providos de dentes incisivos bovinos que passaram pelo processo de clareamento com peróxido de hidrogênio (35%) comercial (Whitness HP - FGM, Produtos Odontológicos Ltda, Joinvile, Santa Catarina, Brasil) segundo os protocolos de clareamento dental propostos pelo fabricante e, em seguida, foram cobertos com uma fina camada de um gel composto por HPMC (hidroxicarboximetilcelulose) e partículas do vidro bioativo F18 de 3 μ m de diâmetro médio (na proporção de 25:75 pó:gel, utilizando-se 15 mg do pó). Este conjunto, amostra + gel contendo F18, foi então, acondicionado em água destilada pelo período de 12 horas.

A averiguação da remineralização foi realizada com a técnica LIBS (Laser-induced Breakdown Spectroscopy), LIBS2500 da Ocean Optics, Dunedin, USA.

5.3.8 Ensaios *In Vitro* Celulares

Os ensaios envolvendo material orgânico, isto é, células e meios de cultura celular foram realizados em conjunto com diferentes grupos de pesquisa. Possibilitando a formação de uma extensa rede de colaboradores. Nas seções a seguir têm-se as metodologias e ensaios realizados com o novo vidro bioativo F18 em diferentes formatos.

5.3.8.1 Ensaios de Viabilidade Celular

Ensaios de viabilidade e citotoxicidade celular foram realizados em conjunto com o Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Universidade de São Paulo com o acompanhamento do Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira.

Estes ensaios foram destinados a avaliar o comportamento do novo biomaterial em relação a sua citotoxicidade e capacidade de possibilitar a adesão e viabilidade celular para amostras do novo vidro bioativo em forma monolítica. Para isto, foram realizados ensaios de MTT com células osteoblásticas (UMR 106) pelos períodos de 1, 3 e 5 dias.

Para estes ensaios foram confeccionadas 20 pastilhas do vidro F18 e 20 pastilhas do vidro 45S5 (Bioglass). Estas pastilhas foram cortadas com 2 mm de espessura e 11 mm de diâmetro com o equipamento Buehler modelo IsoMet 5000 e depois lixadas nas granas de 240 e logo após a de 400. Em seguida, as pastilhas foram esterilizadas pela técnica de calor seco e foram levadas ao ensaio de MTT. Depois de coradas para imunofluorescência, as amostras foram analisadas com microscópio confocal Leica DMLB.

Sucintamente, o método de avaliação da viabilidade/proliferação celular (método MTT, ou de oxidação metabólica do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazólio, da empresa Sigma - Saint Louis- MO – USA) se baseia na semeadura e incubação das células em meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified eagle medium – DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina (Gibco®, Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Alemanha). Após a incubação, o sobrenadante de cada amostra foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorbância foi lida a 570 nm com um espectrofotômetro de placa (ASYS Hitec, Expert 96, ASYS Co. Japão). O experimento foi realizado em triplicata.

5.3.8.2 Ensaios de Citotoxicidade *In Vitro*

Os ensaios desenvolvidos em colaboração com a Profa. Ana Claudia Rennó (Departamento de Biociências da UNIFESP) e o doutorando Paulo Gabbai-Armelin (Departamento de Fisioterapia da UFSCar) buscaram avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade deste novo biomaterial já na forma de fibras de vidro.

A avaliação da citotoxicidade das fibras se baseia no estudo dos efeitos dos produtos de lixiviação deste biomaterial na proliferação celular das linhagens de osteoblastos OSTEO-1 e fibroblastos L929 pelos períodos de 24, 72 e 144 horas. Mais detalhes envolvendo a técnica e a metodologia utilizada podem ser encontrados em Gabbai-Armelin *et. al.* [64]. Resumidamente, as linhagens celulares selecionadas foram incubadas em extratos obtidos a partir da imersão das fibras de vidro (aproximadamente 0,2g de material) em meio DMEM. Estes extratos foram utilizados em: 100% concentrado, 50%, 25% e 12,5%. Após os períodos estipulados, ensaios de MTT para a quantificação e análise da proliferação celular.

5.3.8.3 Avaliação das Propriedades Antimicrobianas

Estudos para avaliação da capacidade antimicrobiana deste novo biomaterial foram conduzidos com a colaboração do Prof. Clovis Wesley Oliveira De Souza e a mestrandia Lidiani Campanini, do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos. Para tanto, foram realizados ensaios seguindo as orientações da norma JIS 2801:2010 [65]. Onde o tecido vítreo e o pó do material foram testados. Sendo os mesmos colocados em íntimo contato com uma solução previamente preparada contendo as cepas (bactérias) que se deseja analisar pelo período de 24 horas.

Para a realização destes ensaios foram utilizadas duas cepas de microrganismos estabelecidas pela metodologia da norma: *Escherichia coli* (ATCC 8739P) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). E também foram

selecionadas as cepas *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). A seleção desses microrganismos foi baseada na importância de cada um deles em aplicações comuns pensadas ao novo biomaterial. As cepas utilizadas são da *American Type Culture Collection* (ATCC) procedentes do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde (INCQS) e pertencentes ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Carlos.

A metodologia sugerida pela norma JIS indica que a preparação de uma solução PBS (Phosphate Buffered Saline) com aproximadamente 10^5 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml). Em seguida, 9 corpos de prova foram preparados, sendo os mesmos placas que continham ou não o material bioativo (3 para o controle negativo - placa de vidro, 3 controle positivo - placa com manta de vidro de janela e 3 contendo a manta do vidro bioativo F18).

Alíquotas de 400 μ l do inóculo padrão foram adicionadas sobre a superfície das amostras. Para as amostras em pó, a proporção da quantidade em peso de pó para cada mililitro do inóculo foi de aproximadamente 0,05g/ml.

Os testes foram conduzidos com as amostras em íntimo contato com o inóculo por 24 horas a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ em câmara úmida. Após este período, as amostras eram coletadas, diluídas e plaqueadas para a posterior contagem das unidades formadoras de colônia.

5.3.8.3.1 Atividade Anti-Biofilme

Para a verificação da capacidade do vidro bioativo F18 em reduzir estruturas bacterianas complexas conhecidas como biofilme, estudos baseados na metodologia de Gasik *et al.* [66] foram conduzidos também em colaboração com o Prof. Clovis Wesley Oliveira De Souza, do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos.

Esse ensaio fez uso de um dispositivo especialmente desenvolvido, de modo que discos de titânio fossem utilizados para que uma das superfícies dos mesmos (a com o vidro bioativo) ficasse exposta à suspensão bacteriana inoculada. Esse dispositivo é mostrado na Figura 5.3. O volume do inóculo de

bactérias foi estabelecido como função da área da superfície exposta, reproduzindo a mesma relação área/volume daquela determinada pela norma JIS Z 2801:2010, citada anteriormente – no caso $400\mu\text{L}/16\text{cm}^2$ ($25\mu\text{L}/\text{cm}^2$). Após 24 horas, as suspensões contendo os inóculos de bactérias em contato com as superfícies eram retiradas e imediatamente transferidas para recipientes contendo PBS (solução salina tamponada) compondo diluições seriadas até 10^4 . Cada diluição era então colocada em diferentes placas de Petri, com adição de PCA (Plate Count Agar) a $45\text{-}50^\circ\text{C}$, e homogeneizada delicadamente com auxílio de alças de drigal para dispersão das bactérias. Após esfriamento do ágar as placas eram incubadas a 37°C por 48 horas.

Passado o período de incubação as colônias eram contadas e multiplicadas pelo fator da diluição, de modo a se obter o valor de UFC (unidade formadora de colônias) para cada superfície.

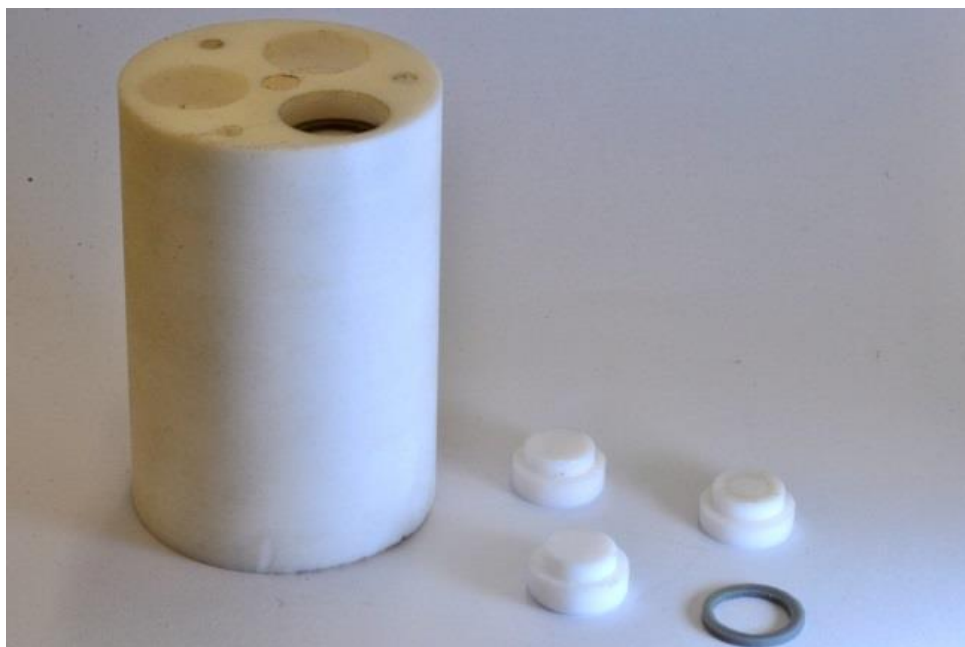


Figura 5.3 - Dispositivo projetado e confeccionado para o estudo da habilidade redução de biofilmes.

5.3.8.4 Ensaios em Células Imunológicas

Ensaios para averiguação dos efeitos e reações causados pelo uso do novo biomaterial em processos imunológicos foram realizados.

Foram analisadas as atividades celulares de neutrófilos *in vitro* por meio da colaboração com a Dra. Miriane da Costa Gileno, Profa. Fernanda Anibal (Departamento de Morfologia e Patologia - Biologia – UFSCar) e o Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca (Departamento de Análises Clínicas - FCF-UNESP).

Para isto, a quantidade de citocinas, referentes ao controle e regulação da duração e intensidade das respostas específicas ao processo inflamatório, foi verificada quando estas células escolhidas foram expostas a determinadas quantidades de pó e da malha do vidro bioativo F18.

Resumidamente, para estes ensaios os neutrófilos foram isolados do sangue periférico de indivíduos normais por gradiente de densidade usando HISTOPAQUE[®]-1119 e HISTOPAQUE[®]-1077 (Sigma), um método que separa as células mononucleares e os polimorfonucleares logo após coleta do sangue. Após a centrifugação e separação das células, fez-se a contagem de leucócitos em Câmara de Neubauer. Posteriormente a contagem, a suspensão celular foi ajustada para a concentração de 5×10^6 células/mL e empregadas nos ensaios na concentração final de 1×10^6 /mL. Para avaliação do *burst* oxidativo foram utilizados ensaios para quantificação do luminol e da lucigenina após a exposição ao pó e malha do vidro F18 em diferentes tamanhos com e sem o estímulo com Zymozan.

5.3.8.5 Ensaios com Fibroblastos Humanos

Para averiguação da capacidade de estímulo ao crescimento e proliferação de fibroblastos humanos foram realizados ensaios em colaboração com a Profa. Maria Beatriz Puzzi (Faculdade de Medicina da UNICAMP).

Nestes ensaios foram utilizadas porções de tecidos vítreos de 3,5 cm de diâmetro que foram incubadas com meio RPMI adicionado de células

fibroblásticas humanas de uma paciente de 63 anos de idade. Primeiramente, foi realizada a contagem das células em microscópio ótico sendo o número de células em cultura inicial de 50.000 células.

Estas células foram mantidas em 37°C pelo período de 7 dias, com a troca do meio a cada dois dias. Em seguida, a quantidade de células foi contabilizada em microscópio ótico e imagens de MEV foram obtidas para a análise da adesão e proliferação celular.

5.3.9 Ensaios *In Vivo*

Os ensaios *in vivo* buscaram analisar os efeitos da utilização deste novo material aloplástico em tecidos duros, como o tecido ósseo e também nos tecidos moles, como tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e tecido tegumentar. Novamente a criação e expansão da rede de colaboradores foram imprescindíveis para a realização destes testes.

5.3.9.1 Ensaios para Regeneração do Tecido Ósseo

5.3.9.1.1 Tecido Ósseo da Calvária

Um dos ensaios envolvendo o tecido ósseo foi realizado em conjunto com a Faculdade de Medicina de Jundiaí com a colaboração do Prof. Dr. Marcelo Cunha e do mestrando César Vecina. Estes testes foram realizados com a utilização de 48 ratos Wistar que foram submetidos a um procedimento cirúrgico para a criação de defeitos críticos em suas calotas cranianas de aproximadamente 6 mm que, em seguida, foram preenchidos com pequenas porções das fibras bioativas provindas da nova composição vítrea F18. Os grupos experimentais foram divididos em dois grupos de 4 animais (totalizando 32 animais):

Grupo 1: Animais com defeito crítico na calota craniana e sem preenchimento de enxerto;

Grupo 2: Animais com defeito crítico na calota craniana e preenchido com as fibras de vidro bioativas;

Após 2, 4, 8 e 16 semanas após a cirurgia, os animais foram sacrificados e as amostras submetidas às análises qualitativas e quantitativas. Incluindo análises clínicas, radiológicas, histológicas com diferentes colorações (Hematoxilina e eosina, Tricrômico de Masson e Picrossírius Red). Mais detalhes sobre a metodologia utilizada podem ser encontrados em Vecina *et al.* [67].

5.3.9.1.2 Tecido Ósseo de Tíbia

Outros ensaios *in vivo* para avaliação dos tecidos vítreos em fraturas ósseas foram conduzidos em colaboração do Laboratório de Eletrotermofototerapia do Departamento de Fisioterapia - UFSCar, em conjunto com a Profa. Dra. Ana Rennó e o doutorando Paulo Gabbai-Armelin. Nestes ensaios foram analisados a biocompatibilidade, genotoxicidade e capacidade de auxílio no processo de regeneração óssea do biomaterial *in vivo*.

Para avaliação da biocompatibilidade pequenas porções de fibras vítreas, na forma de *scaffolds*, foram implantadas no tecido subcutâneo de ratos, como citado por Gabbai-Armelin *et al.* [64]. A genotoxicidade foi avaliada por meio da coleta sanguínea de cada animal através de punção cardíaca e remoção do pulmão, rim e fígado para o teste Cometa.

Para avaliação do efeito no reparo ósseo, *scaffolds* (estruturas 3D altamente porosas) foram confeccionados a partir de pequenas porções de fibras. Os mesmos foram implantados em defeitos ósseos de 3 mm de diâmetro em tíbias de ratos Wistar. Para análise do desempenho do biomaterial no reparo ósseo os animais foram sacrificados nos períodos de 15, 30 e 60 dias após a implantação do *scaffold*. Mais detalhes sobre a metodologia utilizada podem ser encontrados em Gabbai-Armelin *et al.* [68].

5.3.9.2 Ensaios para Tecidos Tegumentares

5.3.9.2.1 Ensaios para Regeneração de Queimaduras

Para a avaliação da capacidade do biomaterial reagir em lesões provindas de queimaduras, estudos foram conduzidos com a colaboração da Profa. Ana Claudia Rennó (Departamento de Biociências da UNIFESP).

Nestes ensaios foram utilizados porções de tecido vítreo de 6 cm x 6 cm em lesões de queimadura grau 3 no dorso de ratos Wistar machos.

Após o período de 7 dias foram realizados os registros fotográficos e análise clínica e posteriormente análise histológica das lesões.

Foram também realizados ensaios imunohistoquímicos para a avaliação da presença dos fatores VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) e TGF- β (Fator de Transformação de Crescimento Beta).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Manutenção e Aprimoramento da Máquina de *Downdrawing*

Para um melhor desempenho da máquina de *downdrawing*, assim como manutenção do equipamento e melhor obtenção das fibras, foi feita uma reforma total dos fornos. Foram substituídos todos os componentes isolantes (câmara refratária) e também a resistência elétrica em todo seu contorno interno. O forno também recebeu um termopar em sua parte frontal para o melhor controle da temperatura, Figura 6.1.

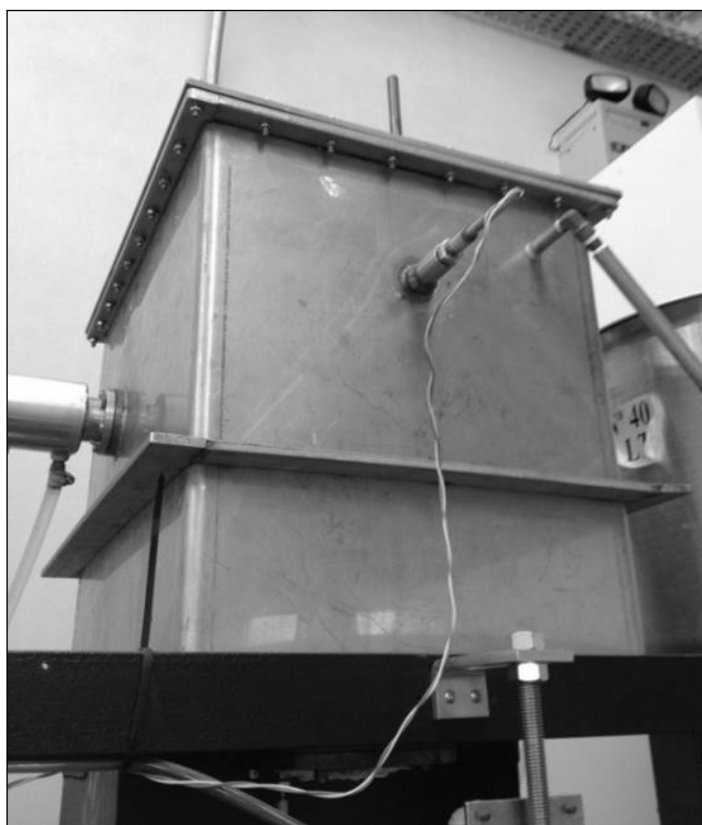


Figura 6.1 - Forno da máquina de *downdrawing* localizada no Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV).

Esta reforma possibilitou uma otimização do processo de obtenção de fibras. Anteriormente a reforma, o forno não conseguia acompanhar a taxa de

aquecimento definida na programação do controlador, o que causava demora no aquecimento e fusão do vidro no seu interior, facilitando o processo de nucleação e crescimento de cristais, que dificultam ou até mesmo impedem a obtenção das fibras.

A inclusão de um termopar frontal possibilitou um melhor controle da temperatura próxima à região do cadinho, facilitando a padronização das temperaturas-chaves ao processo.

O desenvolvimento de um dispositivo interno para manter o conjunto de cadinhos, um sobre o outro, com diferentes temperaturas também foi extremamente relevante para o melhoramento do processo de fabricação das fibras, este dispositivo possibilitou que fibras de vidro de composições com baixa estabilidade vítrea fossem obtidas pelo processo de puxamento (Figura 6.2) [69].

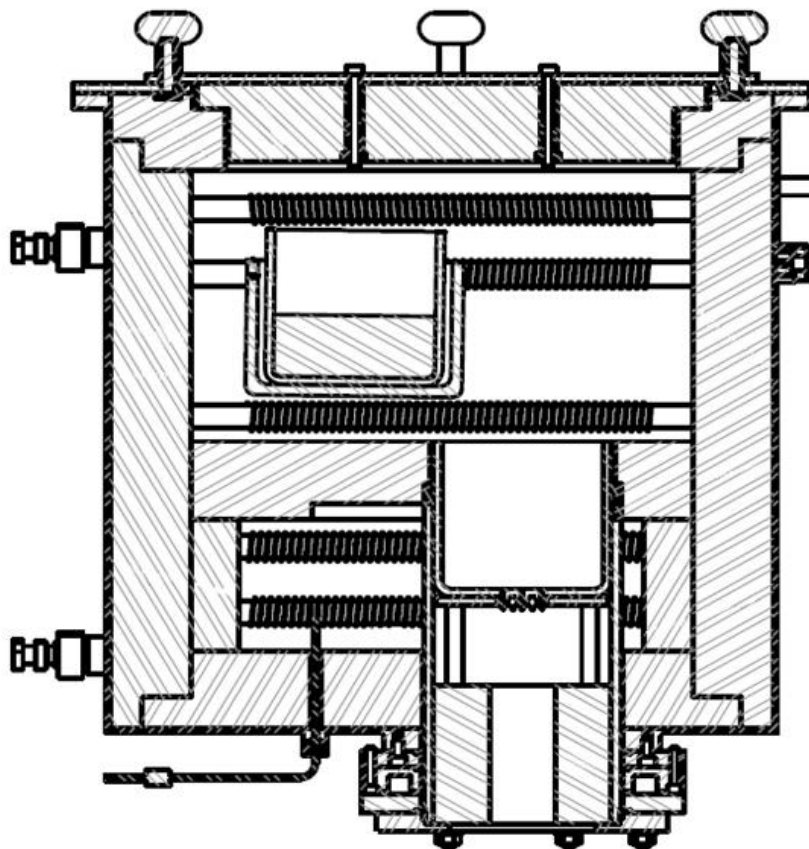


Figura 6.2 - Esquema simplificado do novo dispositivo desenvolvido para o processamento de composições de baixa estabilidade vítrea [69].

Por meio destes ajustes foi possível diminuir o diâmetro das fibras obtidas, e conseqüentemente, aprimorar o produto final. Com esses novos parâmetros de processo, foram obtidas fibras mais flexíveis e resistentes, já que pudemos reduzir em aproximadamente 10% o diâmetro inicial e aumentar consideravelmente o tempo e a velocidade de puxamento. Estes novos parâmetros podem ser observados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1 - Parâmetros de processamento após a manutenção, ajuste dos fornos e desenvolvimento de novos dispositivos para a máquina de puxamento.

Formulação	Tempo de Puxamento (min)	Velocidade Máxima do Tambor (Hz / rpm)	Diâmetro Médio (μm)
F18	180	8,0 / 480	45
F18	240	10.5 / 630	40

Os ajustes dos parâmetros de processamento para este novo biomaterial foram cruciais para a otimização e o aumento da produtividade das fibras de vidro. Porém, a completa caracterização do novo vidro bioativo deveria ser realizada visando um melhor entendimento das suas propriedades e uma produção mais acurada. Nas seções 6.2 a 6.4 encontram-se os resultados obtidos para diversos ensaios de caracterização para o vidro F18.

6.2 Caracterização do Novo Vidro Bioativo

6.2.1 Calorimetria Diferencial de Varredura

Para a averiguação da estabilidade vítrea desta nova formulação optou-se pela realização de ensaios de DSC. Com estes ensaios foi possível a comparação desta nova formulação (F18) com o vidro bioativo “padrão”, o 45S5 e com outro vidro bioativo conhecido pela obtenção de fibras pelo

processo de *meltspinning*, o vidro 13-93 [43]. Na Figura 6.3, é possível observar a drástica redução na tendência à cristalização apresentada pelo vidro F18.

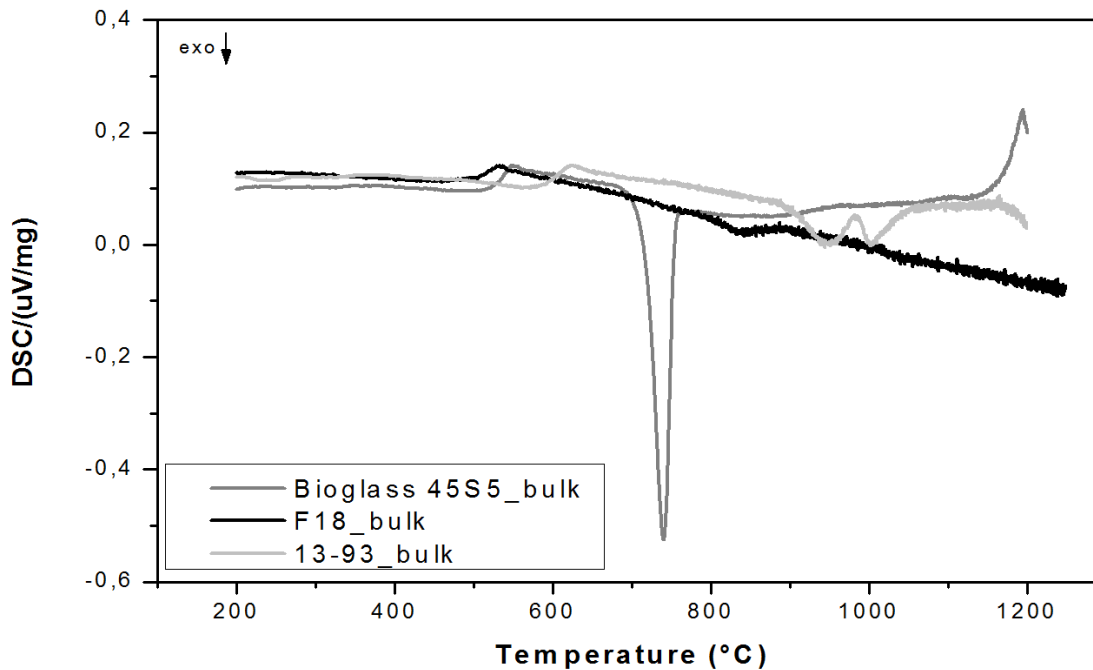


Figura 6.3 - Gráfico obtido por meio do ensaio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) de amostras monolíticas para formulações 45S5, F18 e 13-93.

Com este gráfico é possível observar que a formulação F18 ainda é mais estável e possui menor tendência a cristalização do que a composição 13-93. O que permite seu processamento em fibras sem que haja uma cristalização descontrolada, até mesmo por técnicas mais simples, como o *downdrawing*.

O ganho da estabilidade vítrea pode ser mensurado, entre outras técnicas, pelo cálculo de um parâmetro conhecido como K_2 .

Este parâmetro tem como finalidade indicar por meio comparativo a composição mais estável frente o fenômeno de cristalização e se baseia na subtração da temperatura de cristalização (T_x - adotada como o início do pico de cristalização) da temperatura de transição vítrea (T_g), sendo que quanto

menor o valor obtido, menos estável é o vidro e mais rápido este irá cristalizar [70]. A equação de K_2 é apresentada abaixo:

$$K_2 = T_x - T_g \quad (6.1)$$

Na Tabela 6.2 é possível observar o valor de K_2 das formulações ensaiadas por DSC.

Tabela 6.2 - Valores de K_2 para as composições analisadas para amostras monolíticas e em pó.

Formulação	K_2 (Tx-Tg) Bulk	K_2 (Tx-Tg) Pó
Bioglass 45S5	181	95
13-93	253	230
F18	307	255

Por meio da Tabela 6.2, é possível observar a melhor adaptação desta nova formulação vítrea para o processo de puxamento de fibras, já que quando comparada ao vidro Bioglass[®] 45S5 e ao 13-93, apresenta um valor muito maior de K_2 para ambos os tipos de amostra, indicando um ganho significativo de estabilidade frente à cristalização.

Outro parâmetro verificado por meio dos ensaios de DSC para o melhor controle durante a fabricação de fibras é a T_{liquidus} do material. Recomenda-se que para evitar a devitrificação, durante os processos de conformação, a T_{liq} do vidro utilizado seja pelo menos de 10 a 20°C abaixo da temperatura de trabalho (T_w) [36], isto impede a formação e crescimento de cristais durante seu processamento. Porém, a determinação desta temperatura para vidros bioativos não é simples devido a grande variedade de óxidos presentes nas formulações e as diferentes fases cristalinas formadas durante seu aquecimento [71].

A literatura tem mostrado que os vidros 45S5 e 13-93 possuem T_{liquidus} maiores que 1200°C. Alguns estudos apontaram que os cristais formados durante o aquecimento do biovidro 45S5 começam a se fundir entre 1080 e

1160°C e que o *offset* para a fusão destes é entre 1250 e 1260°C, o que foi também obtido em nossos experimentos, sendo a temperatura T_{liquidus} verificada, para uma taxa de aquecimento de 10°C/min, em 1250°C (Figura 6.4). Já para o vidro bioativo 13-93 a literatura indica que este *offset* se encontra em 1180°C [72,73,74]. Porém, isto não foi observado com as análises realizadas em nosso equipamento até a temperatura de 1200°C (Figura 6.4).

Para o vidro bioativo F18, como não há a formação de um pico definido de cristalização durante os ensaios de DSC, tanto para amostras monolíticas quanto para amostras em pó, a verificação da T_{liquidus} precisou ser aferida de uma forma diferenciada. Primeiramente, realizou-se um tratamento térmico para a nucleação e crescimento de cristais em um forno horizontal e, em seguida, realizou-se as análises em DSC.

Neste tratamento térmico utilizaram-se as mesmas temperaturas e patamares realizados na máquina de puxamento de fibras visando simular o aparecimento de fases cristalinas semelhantes àquelas que eventualmente surgem durante o processamento deste material em fibras. Porém, para que fosse possível a verificação de picos evidentes durante este ensaio, o vidro passou por dois períodos de tratamento: 7 e 28 dias.

Como é possível notar na Figura 6.5, o *offset* para o vidro F18 se encontra em aproximadamente 935°C na curva do vidro tratado por 28 dias.

Sabe-se que para o melhor desempenho da produção, as fibras devem ser obtidas em uma temperatura onde a viscosidade tem valor de 2,5 a 3 Poise, conhecidas como $T_{2,5}$ a T_3 . Porém, esta temperatura deve pelo menos de 40 a 50°C abaixo da T_{liquidus} , para que se garanta a não cristalização do material vítreo e possibilite o processamento ininterrupto [36]. Na Tabela 6.3, observa-se as temperaturas de trabalho possíveis e a sua diferença em relação a T_{liquidus} para os vidros F18 e 13-93.

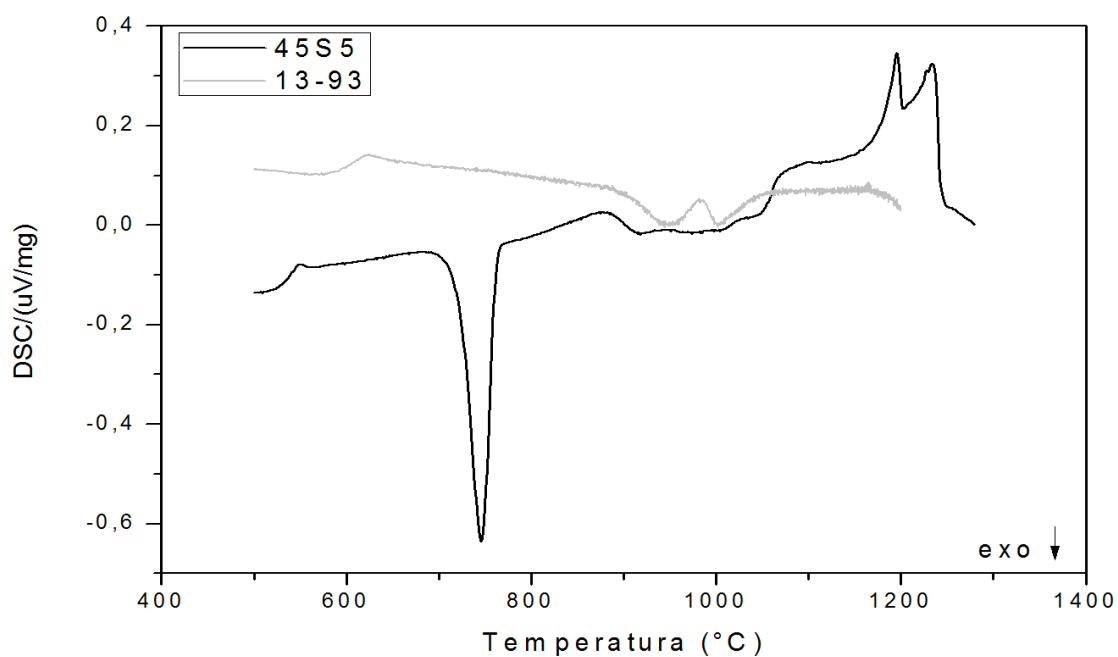


Figura 6.4 - Gráfico obtido por meio do ensaio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) de amostras monolíticas para formulações 45S5 e 13-93.

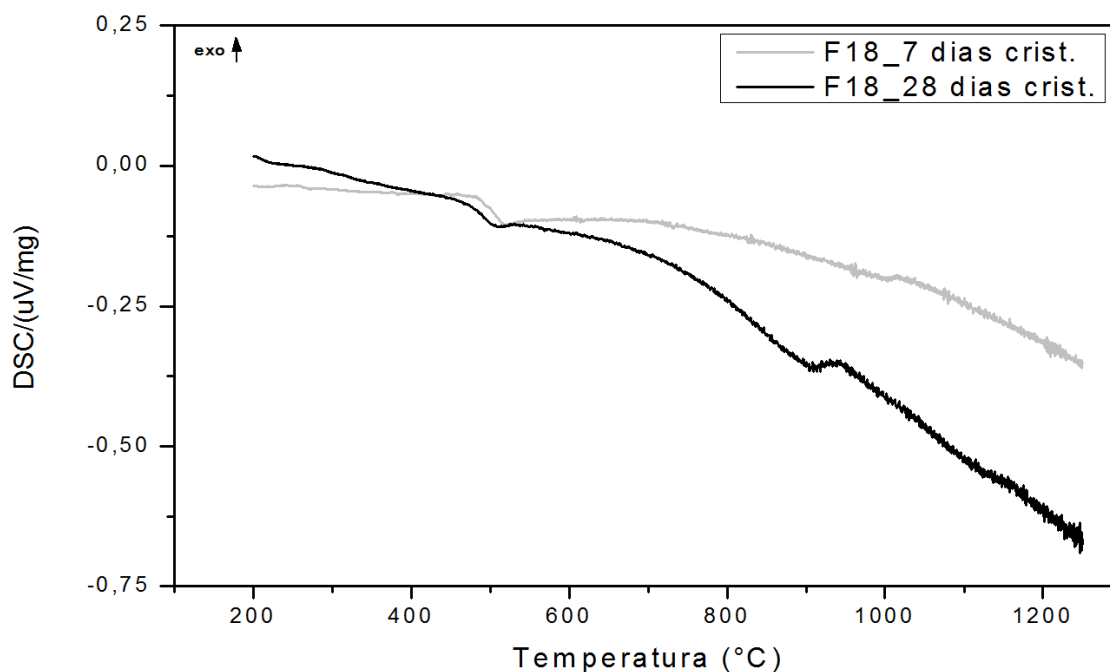


Figura 6.5 - Gráfico obtido por meio do ensaio de calorimetria exploratória diferencial (DSC) das amostras de formulação F18 após tratamento térmico de 7 e 28 dias.

Tabela 6.3 - Valores de $T_{2,5}$ a T_3 para as formulações F18 e 13-93.

T (viscosidade)	Temperatura		T_{Liq}	$T(visc) - T_{Liq}$	$T(visc) - T_{Liq}$
	F18	F18	F18	F18	13-93*
T_3	915	935		-20°C	-194
$T_{2,75}$	946	935		10°C	-160
$T_{2,5}$	986	935		51°C	-100

* Assumindo-se que o offset para o 13-93 é 1250°C.

A partir destes resultados podemos inferir que a nova formulação vítrea F18 é mais adequada ao processamento de fibras em escala industrial do que os outros vidros bioativos apresentados como controle (45S5 e 13-93). As demais formulações vítreas bioativas apresentam uma alta tendência à cristalização e uma faixa de trabalho não compatível com o método de processamento de *downdrawing*.

6.2.2 Difração de Raios X

A partir do material tratado termicamente por diferentes períodos (7 e 28 dias), foi possível a realização de ensaios de difração de raios X. Os difratogramas obtidos encontram-se nas Figuras 6.6 e 6.7.

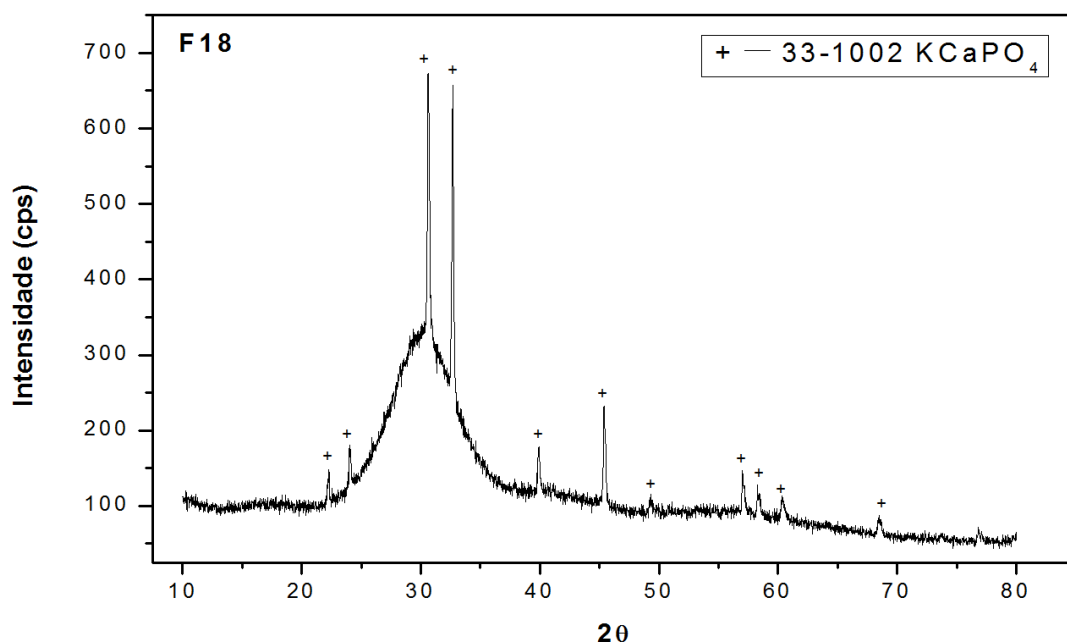


Figura 6.6 - Difratoograma de raios X da formulação F18 utilizando-se um tratamento térmico para crescimento dos cristais a 800°C por 7 dias.

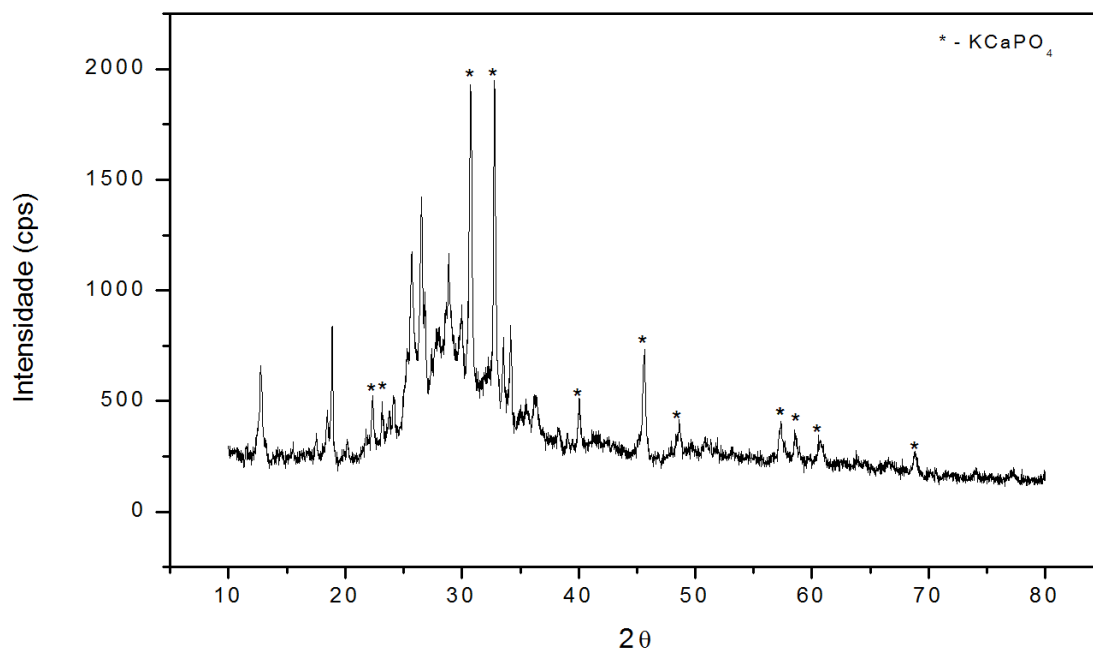


Figura 6.7 - Difratoograma de raios X da formulação F18 utilizando-se um tratamento térmico para crescimento dos cristais a 800°C por 28 dias.

Como pode ser observado, a difração dos planos cristalinos nos permite inferir que, apesar de ainda ser observada uma pequena quantidade de estrutura amorfa, os cristais formados primeiramente nesta composição são de fosfato de cálcio e potássio (KCaPO_4). Identificado pelo software Search-Match com o código de 33-1002. E após 28 dias outras fases cristalinas se formam, porém a identificação das mesmas não foi possível com a base de dados disponível.

Estudos realizados por Arstila *et al.* [75] e Vedel *et al.* [76] mostraram que a primeira fase cristalina a se formar (PCT – sigla em inglês) tem um papel importante na determinação da faixa de trabalho e na janela de processamento dos vidros bioativos. Composições ricas em sódio tendem a cristalizar primeiramente silicatos de cálcio e sódio, por exemplo, $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$, $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$ e $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ são as fases mais frequentemente encontradas durante a cristalização inicial do biovidro 45S5.

Já para composições com menor quantidade de óxido de sódio em suas formulações, cristalizam-se primeiramente silicatos de cálcio e, segundo Vedel *et al.* [76], estas são mais indicadas para processos que envolvam sinterização e o processamento do vidro bioativo em peças complexas ou outras formas como fibras. Isto porque o intervalo entre as temperaturas de transição vítrea e a temperatura de cristalização é maior, possibilitando uma maior faixa de trabalho para o material.

Arstila *et al.* [75] sugeriram um modelo para a classificação e determinação da PCT em função da composição dos vidros bioativos. Sendo este:

$$PCT = 0.018 - 0.107x_{\text{Na}_2\text{O}} + 0.002x_{\text{Na}_2\text{O}}^2 + 0.052x_{\text{MgO}} + 0.032x_{\text{P}_2\text{O}_5}^2 + 0.038x_{\text{SiO}_2} \quad (6.1)$$

Valores de PCT menores que 1,5 indicam que as primeiras fases cristalinas a serem formadas serão silicatos de cálcio e sódio, já para valores acima de 1,5 silicatos de cálcio seriam formados. Na Tabela 6.4, têm-se os valores de PCT para os vidros 45S5, 13-93 e F18.

Tabela 6.4 – Valores de PCT encontrados para os vidros 45S5, 13-93 e F18.

Vidro Bioativo	Valor PCT
45S5	1,5
13-93	2,2
F18	2,11

Como pode ser observado na Tabela 6.4, a formulação F18 apresenta um valor de PCT maior que 1,5 (2,11), porém a primeira fase cristalina formada não é um silicato, mas sim um fosfato de cálcio e potássio. Independentemente da fase formada, o alto valor PCT indica que há uma janela de trabalho maior do que para o vidro bioativo *gold standard* 45S5, se tornando mais um indicador do bom desempenho da nova formulação F18 em processos de conformação que envolvam altas temperaturas.

6.2.3 Dilatometria Ótica

Os ensaios de dilatometria ótica possibilitam mensurar a sinterabilidade de amostras de vidro F18 tanto monolíticas quanto amostras provindas do pó compactado.

Os resultados obtidos para estes ensaios são apresentados nas Figuras 6.8 e 6.9.

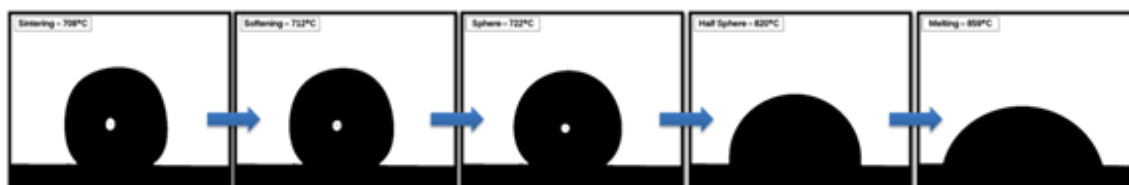


Figura 6.8 - Ensaio de microscopia de aquecimento para uma amostra sólida (bulk) do vidro bioativo F18. As temperaturas encontradas foram: Sinterização - 708°C; Amolecimento - 712°C; Esfera - 722°C; Meia Esfera - 820°C e Fusão - 859°C.

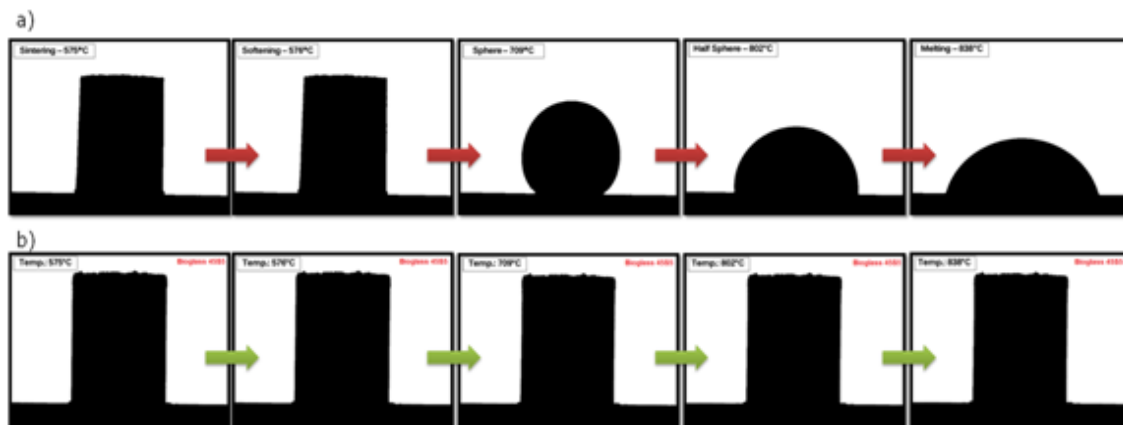


Figura 6.9 - Ensaio de microscopia de aquecimento para amostras em pó (25-75m) do vidro bioativo F18 (a) e do vidro Bioglass 45S5 (b). As temperaturas encontradas para o vidro F18 foram: Sinterização - 575°C; Amolecimento - 576°C; Esfera - 709°C; Meia Esfera - 802°C e Fusão - 838°C.

Para a formulação F18 na forma monolítica (Figura 6.8) pode-se perceber que o processo de sinterização tem início por volta de 700°C, pois nesta temperatura já se tem o arredondamento das arestas da amostra, que era cúbica.

Com estes ensaios também podemos observar a baixa tendência à cristalização que o novo vidro F18 possui, pois durante todo o ensaio não houve a formação de cristais e o vidro pode escoar até o limite permitido pelo equipamento, sendo este fato ocorrido em aproximadamente 860°C (caracterizada pela fusão do material).

Para as amostras em pó, vê-se o mesmo processo, porém de modo mais acelerado, já que se trata de uma amostra com maior área superficial (Figura 6.9). A amostra do vidro F18 tem seu padrão de amolecimento em 576°C e sua fusão em 838°C, sem apresentar sinais de cristalização durante a medida.

Já para a amostra do vidro 45S5 não foi possível a determinação destas temperaturas características, pois as amostras cristalizam-se rapidamente, impedindo o processo de sinterização (já que estes são fenômenos concorrentes).

A averiguação destas temperaturas auxilia na determinação dos parâmetros de processamento do material, tornando mais fácil o desenvolvimento de novas formas de apresentação para o mesmo.

Vedel *et al.* relacionaram os dados obtidos nos ensaios de dilatométrica ótica com a viscosidade apresentadas pelos vidros bioativos, segundo seu modelo, a viscosidade seria igual a 10^{10} dPa.s na temperatura de sinterização, 10^8 dPa.s no amolecimento, 10^6 dPa.s na temperatura de esfera, $10^{4.6}$ dPa.s na temperatura de meia esfera e a fusão em $10^{4.1}$ dPa.s [77]. Estes parâmetros são compatíveis para estimativas da relação temperatura vs. viscosidade, porém ensaios para determinação de toda a curva de viscosidade são essenciais para definição de temperaturas chaves para o processamento do vidro em fibras.

Na seção 6.2.4 encontram-se os dados obtidos com os ensaios de viscosidade para os vidros F18, 13-93 e 45S5.

6.2.4 Viscosidade

A viscosidade em alta temperatura foi aferida para o novo vidro bioativo (F18) assim como para o vidro 13-93, uma formulação famosa por possibilitar a obtenção de fibras pelo método de *meltspinning*.

Já para o vidro Bioglass 45S5, a aferição desta propriedade não foi possível em nossos equipamentos devido à alta tendência a cristalização deste material. Portanto, optou-se pela aquisição destes dados na literatura [78]. Os resultados encontrados são apresentados na Figura 6.10.

As medidas de viscosidade são geralmente difíceis para vidros bioativos devido à sua alta tendência à cristalização quando estes materiais são expostos a temperaturas entre a T_g e $T_{liquidus}$. Em alta temperatura, estes vidros normalmente apresentam baixa viscosidade (geralmente estão fundidos quando apresentam viscosidade entre 10 e 100 dPa.s.), mas em composições como o biovidro 45S5 e o 13-93, assim que a temperatura é diminuída e a viscosidade alcança 10^2 a 10^4 dPa.s estes vidros cristalizam, impedindo a medida de viscosidade [72].

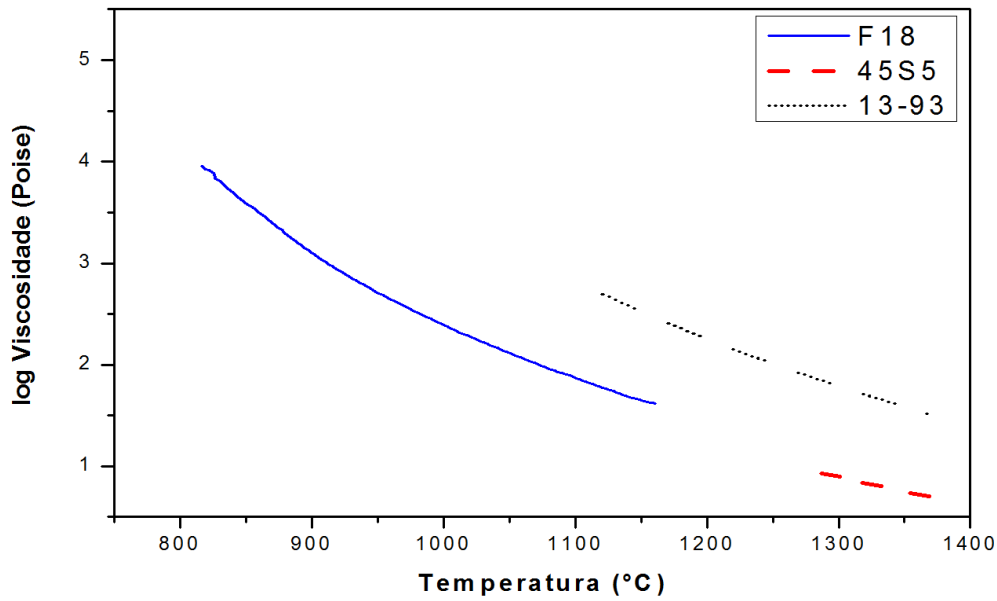


Figura 6.10 - Curva de viscosidade em alta temperatura do vidro bioativo F18, 45S5 e 13-93.

Para a comparação da curva de viscosidade da nova composição F18 com os vidros mais utilizados atualmente no mercado para obtenção de fibras de vidro, tem-se o gráfico apresentado na Figura 6.11.

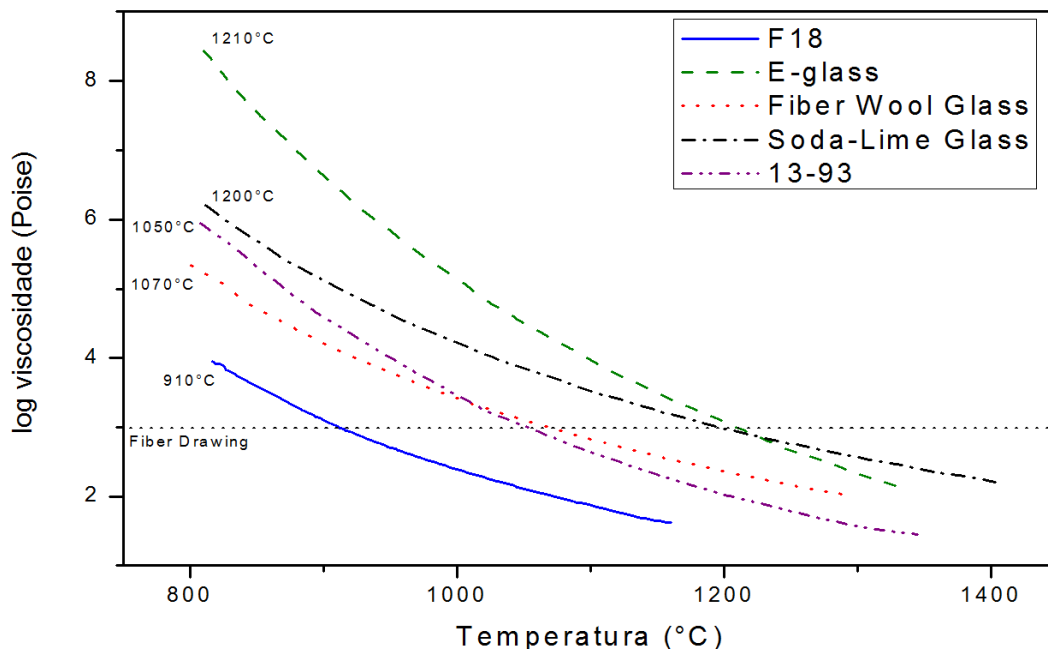


Figura 6.11 - Curva de viscosidade em alta temperatura do vidro bioativo F18, E-glass, Fiber Wool Glass, Soda-Lime Glass e 13-93 [Adaptado de 36,72].

Na Figura 6.11 têm-se os dados de viscosidade para diversos vidros comerciais utilizados para a fabricação de fibras (dados obtidos da literatura) sendo também possível observar a curva completa para o vidro 13-93 [36,72].

Neste gráfico percebe-se que o vidro F18 apresenta baixas viscosidades mesmo em baixas temperaturas, tornando-o um vidro de fácil processamento, já que para se alcançar a viscosidade ideal de puxamento de fibras, que fica em aproximadamente 10^3 Poise, precisa-se aquecê-lo somente até 910°C enquanto para o vidro 13-93 a temperatura para esta viscosidade é de 1050°C e para o E-glass a temperatura é de 1210°C .

O índice de fragilidade, m , determina a sensibilidade do vidro a mudanças de temperatura, classificando-os em vidros longos e frágeis. Vidros longos apresentam menores valores de m em T_g e os vidros frágeis apresentam valores maiores [79]. Pode-se perceber que o vidro F18 é mais frágil do que os vidros que dão origem a fibras inertes (E-glass e SLS, por exemplo), já que a mudança na viscosidade acontece mais rapidamente com uma pequena alteração de temperatura.

Os valores para alguns vidros comerciais e para o F18 podem ser encontrados na Tabela 6.5.

Este índice, m , pode ser calculado por meio da seguinte equação [79]:

$$m = \left. \frac{d(\log_{10} \eta)}{dT_g/T} \right|_{T_g=T} \quad (6.1)$$

Tabela 6.5 – Índice de fragilidade calculado para diversos vidros.

Vidro	Índice de fragilidade (m)
Fiber-wool	44
E-glass	47
F18	62
45S5	92

Observa-se que o valor de m para o vidro F18 é maior do que para os vidros inertes, como o esperado, porém, mostra-se consideravelmente menor quando comparado ao biovidro 45S5, sendo, portanto, a viscosidade do vidro F18 menos sensível a mudanças de temperatura, conseqüentemente, sendo mais apto à processos de conformação.

Outros parâmetros bastante utilizados industrialmente são o índice de faixa de trabalho (WRI) e o índice de devitrificação “D” (abordados na seção 2.2.2.1.2.1). Estes índices foram calculados para os vidros bioativos F18, 45S5 e 13-93, assim como para o vidro de janela (SLS) e para o E-glass (Tabela 6.6).

Tabela 6.6 – Valores para os índices industriais de processamento WRI e D para diferentes vidros.

Vidro	WIR	D
E-glass	195	+35
SLS	185	+25
F18	132	-28
13-93	120	-40
45S5	70	-90

O índice de devitrificação (D) é bastante utilizado na indústria para estimar a liberdade de trabalho e a tendência a devitrificação de uma composição vítrea. Um índice “D” positivo indica uma relativa liberdade de trabalho e uma composição com baixa tendência a cristalização, já um D negativo indica uma composição com grande tendência a devitrificação.

O mesmo ocorre para o índice WIR, pois quanto maior o valor apresentado, maior a faixa de trabalho do vidro e mais fácil é seu processamento.

Como pode ser observado na Tabela 6.6, os valores encontrados pelo vidro bioativo F18 ainda são bastante inferiores aos apresentados pelos vidros inertes E-glass e SLS. Porém, o ganho de estabilidade frente à cristalização quando comparado aos outros vidros bioativos, já o permite passar por

processos de conformação em fibras de maneira mais facilitada. Isso pode ser percebido também, pois o índice de devitrificação para o F18 é aproximadamente 3 vezes menor do que para o vidro bioativo padrão 45S5.

Os dados da viscosidade em baixas temperaturas também foram obtidos, para as formulações F18, 45S5 e 13-93. E podem ser observados na Figura 6.12.

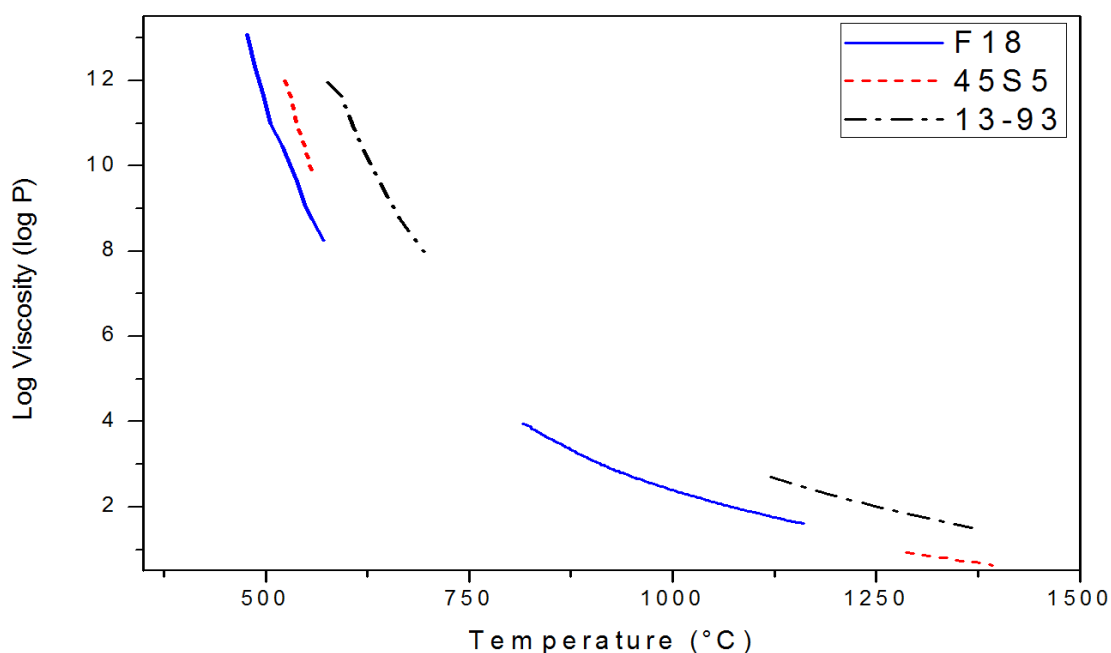


Figura 6.12 - Curva de viscosidade em alta temperatura do vidro bioativo F18, 45S5 e 13-93 com os dados obtidos nos ensaios de baixa temperatura.

Nas medidas de viscosidade em baixa temperatura, os vidros bioativos geralmente cristalizam por volta de 10^9 e 10^8 dPa.s, como é mostrado na Figura 6.12 para os vidros 45S5 e 13-93, indicando a impossibilidade de processos que envolvam a sinterização de partículas ou a obtenção de fibras de vidro sem que haja a cristalização, normalmente descontrolada, do material vítreo [72].

A obtenção de valores para a viscosidade possibilitou uma melhora significativa no processamento do vidro bioativo em fibras, já que a partir destes, conseguiu-se delinear com mais precisão a faixa de trabalho para esta nova composição vítrea.

O ganho em estabilidade possibilitou um aumento brusco na velocidade de puxamento das fibras e, conseqüentemente, uma redução drástica no diâmetro médio das mesmas e também um maior tempo de puxamento, portanto, conseguindo maiores quantidades de fibras. Na Tabela 6.7 têm-se os novos valores para estes parâmetros de processamento (F18_{visc}) após a aplicação prática dos dados de viscosidade obtidos.

Tabela 6.7 - Novos parâmetros de processamento encontrados após a aplicação prática dos resultados de viscosidade de vidro F18.

Formulação	Tempo de Puxamento (min)	Velocidade Máxima do Tambor (Hz/rpm)	Diâmetro Médio (µm)
F18	240	10,6 / 636	40
F18_{visc}	300	16 / 900	25

Como é possível notar (Tabela 6.7), conseguiu-se uma redução no diâmetro médio das fibras bioativas obtidas de 40 para 25 µm, e isto implica em um material mais flexível e mais resistente mecanicamente. Entretanto, a busca por fibras mais finas e mais aptas a obtenção de um tecido flexível aplicável *in vivo*, incitou a aferição de outros parâmetros de processamento, como a variação do orifício do cadinho por onde o vidro escoava durante o seu processamento em fibras. Os resultados obtidos com este estudo são apresentados na seção 6.2.5.

6.2.5 Outros Parâmetros de Processamento

Para a obtenção otimizada das fibras de vidro bioativas outros parâmetros de processamento também foram estudados, como a temperatura e viscosidade durante o processamento com diferentes diâmetros dos orifícios dos cadinhos de ZAS. A Figura 6.13 mostra um cadinho com um orifício de 6 mm de diâmetro em sua base. A faixa selecionada para este estudo foi de 6 a

1,5 mm, isto deveu-se ao tamanho, disponível comercialmente, das brocas para a confecção dos furos na peça a verde.

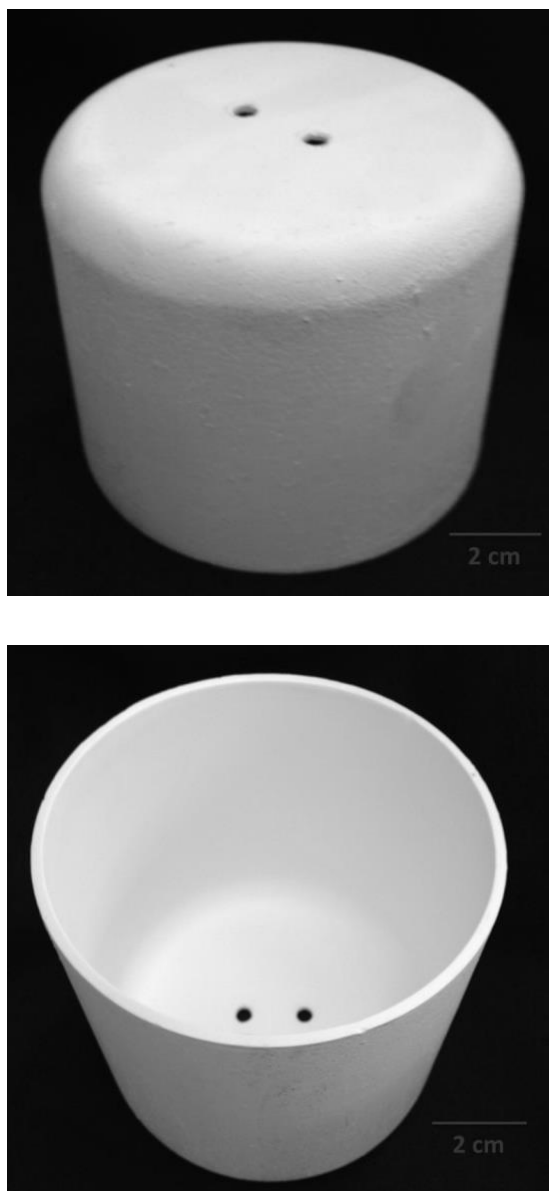


Figura 6.13 – Cadinhos de ZAS utilizados para o processo de puxamento.

Na Tabela 6.8, é possível observar os resultados obtidos com a variação do diâmetro do orifício na base dos cadinhos.

Tabela 6.8 – Novos parâmetros de processamento para vidro F18.

Diâmetro do Cadinho (mm)	Temperatura (°C)	Velocidade Máxima do Tambor (Hz)	Diâmetro Médio (µm)
6	800	15	30
4,5	910	17	20
3,5	930	20	15
2,5	950	25	10
1,5	1000	-	-

A diminuição do diâmetro dos orifícios dos cadinhos de ZAS possibilitou a utilização de maiores temperaturas durante o processamento e, conseqüentemente, menor viscosidade do fundido. Isto levou a obtenção de fibras mais finas e flexíveis, já que a menor viscosidade permitiu uma maior velocidade de puxamento sem o rompimento da fibra de vidro.

Porém, como é possível notar na Tabela 6.8, a partir de 1000°C, mesmo diminuindo-se o furo por onde o vidro escoaria (diâmetro de 1,5 mm), não foi possível a obtenção de fibras, já que o material se encontrava com uma viscosidade muito baixa (aproximadamente 2 P) e o mesmo escoava sem que uma gota fosse formada, como é mostrado na Figura 6.14. Nesta alta temperatura o vidro fluía rapidamente, não possibilitando a formação de um fio que pudesse ser puxado pelo equipamento utilizado.

Entretanto, com o diâmetro de 2,5 mm conseguiu-se fibras extremamente finas (média de 10µm) dando origem a um produto final de mais fácil manipulação e mais resistente e, portanto, mais apto a aplicações na área da saúde.



Figura 6.14 - Formação da gota de F18 durante seu processamento em fibras.

Nas Figuras 6.15 e 6.16 é possível notar a melhora no processamento para a obtenção dos tecidos vítreos.

A Figura 6.15 a) mostra as primeiras malhas obtidas. Nestas, a velocidade de puxamento utilizada era de 10,5 Hz dando origem a fibras de 40 μm de diâmetro. Devido a pouca flexibilidade, o tecido era muito frágil à manipulação, mesmo com a aplicação do *coating*, as fibras não conseguiam manter-se unidas.

Já a Figura 6.15 b) apresenta as malhas obtidas após os ajustes no equipamento de *downdrawing* e a obtenção das curvas de viscosidade. As fibras obtidas ainda apresentavam-se relativamente grossas (25 μm de diâmetro médio), mas houve uma melhora significativa no aspecto do tecido e na trabalhabilidade do material.

Nas Figuras 6.16 a) a d) temos os tecidos obtidos após os estudos dos diversos parâmetros apresentados nas seções anteriores. Vemos então, uma malha extremamente flexível e de mais fácil manipulação.

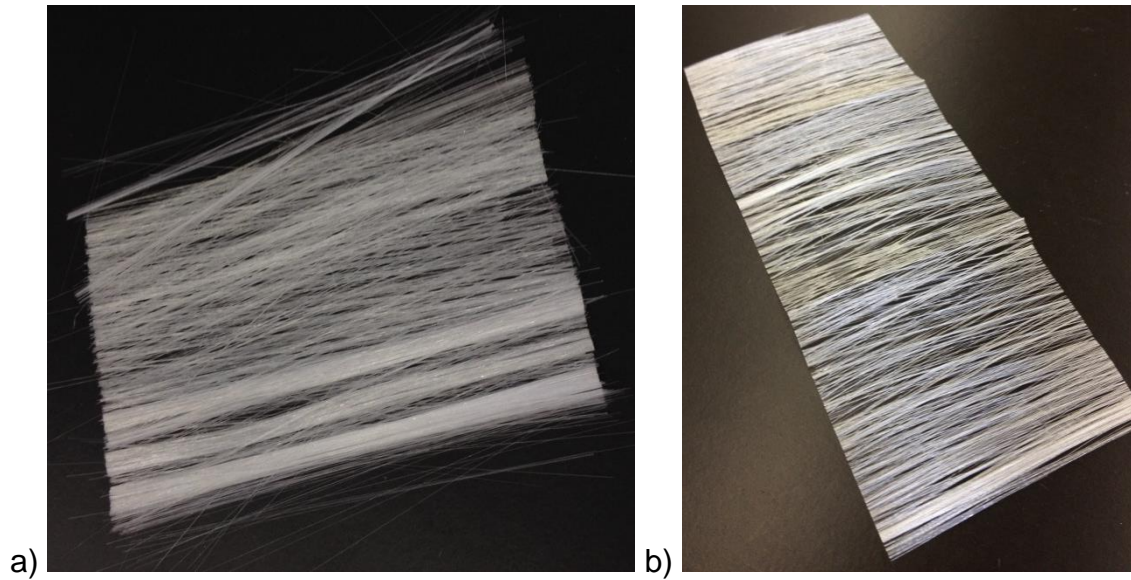
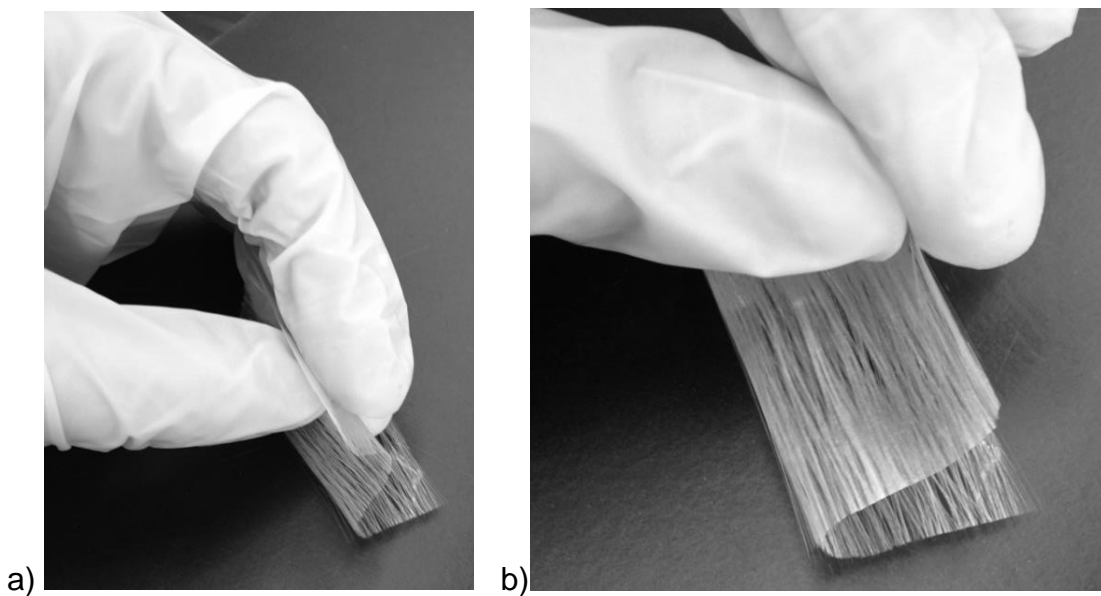


Figura 6.15 – Tecidos obtidos com a) velocidade de puxamento de 10,5 Hz e b) velocidade de puxamento de 15 Hz.



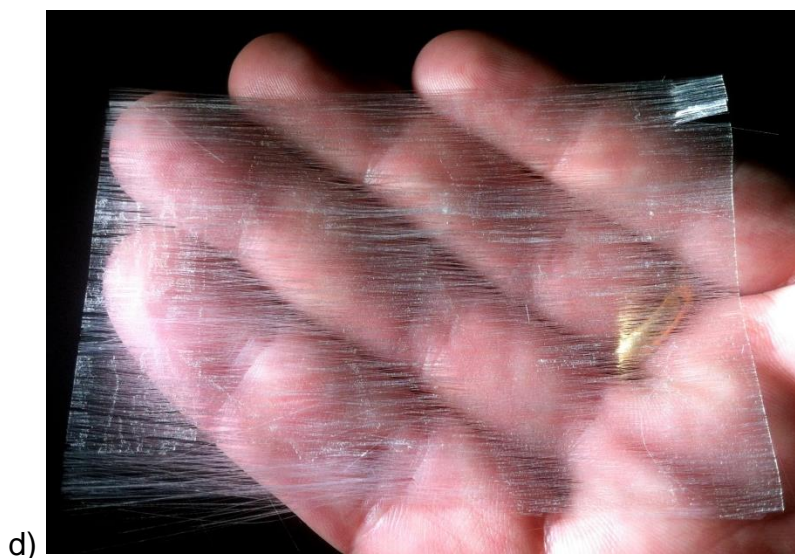
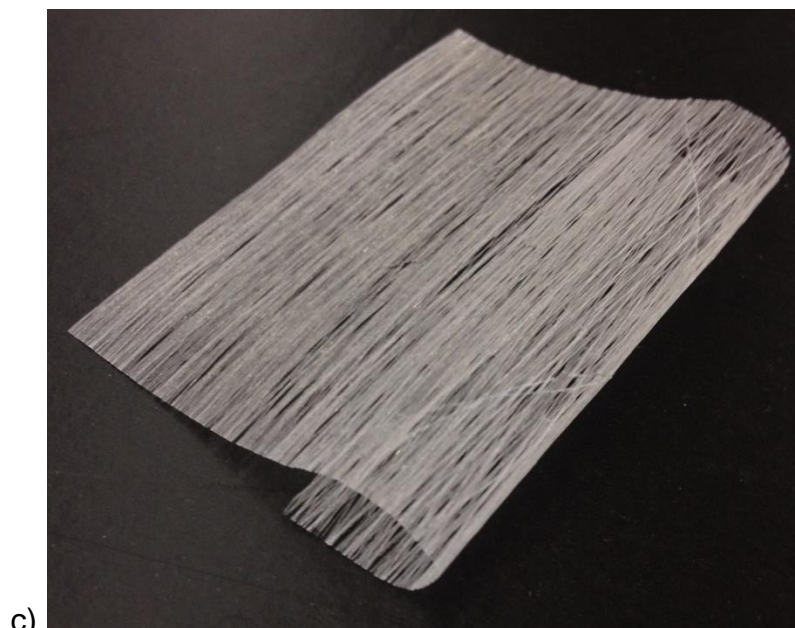


Figura 6.16 - Tecidos obtidos com velocidade de puxamento de 20 Hz.

6.2.6 Propriedades Gerais

Para uma caracterização mais completa do vidro F18 outras propriedades foram aferidas, como a densidade, tensão superficial e expansão térmica.

A densidade deste novo vidro bioativo foi mensurada utilizando-se o método de imersão, utilizando-se o princípio de Arquimedes (com a balança Mettler Toledo, AX204). O valor encontrado foi de $2,60 \text{ g/cm}^3$, o que é bastante semelhante ao vidro padrão 45S5, o qual tem a densidade de $2,70 \text{ g/cm}^3$.

Foram também estimados, utilizando-se o software SciGlass - Glass Property Information System (SciMatics), a tensão superficial e a expansão térmica dos vidros bioativos, os resultados encontram-se na Tabela 6.9.

Tabela 6.9 – Valores para algumas propriedades do novo vidro bioativo F18 e o 45S5 .

Formulação	Densidade	Tensão Superficial	Expansão Térmica
45S5	$2,7 \text{ g/cm}^3$	$318,9 \text{ mN/m}$	$15,1 \text{ mm/mm/K}^{-1}$
F18	$2,6 \text{ g/cm}^3$	$255,8 \text{ mN/m}$	$15,5 \text{ mm/mm/K}^{-1}$

O coeficiente de expansão térmica é uma propriedade importante de ser verificada visando aplicações, tais como o recobrimento de implantes metálicos com os vidros bioativos. A composição do vidro F18 apresenta um coeficiente compatível a estas aplicações, o que permitiu este vidro ser aderido a peças metálicas sem que houvesse a geração de trincas e falhas.

Estes valores foram calculados devido à utilização desta nova formulação em uma nova técnica de recobrimento de implantes odontológicos e ortopédicos, esta nova técnica foi desenvolvida e descrita por Chinaglia [80].

6.2.6.1 Dureza

A dureza das formulações vítreas F18 e 45S5 foi aferida pela técnica de indentação com a carga de 100 gf pelo período de 15 segundos.

Na Figura 6.17 tem-se os valores médios encontrados para a dureza em GPa, assim como o desvio padrão encontrado nas análises.

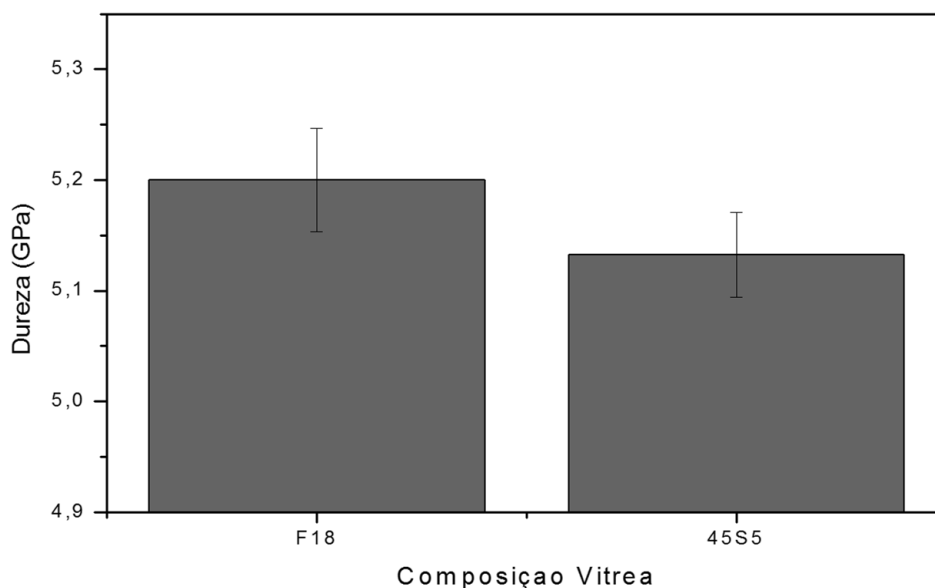


Figura 6.17 - Dureza dos vidros F18 e 45S5.

A partir do valor médio de dureza encontrado foi realizado o teste estatístico T, que demonstrou que não há diferença estatística significativa entre as composições vítreas F18 e 45S5 (p valor encontrado maior que 0,05).

6.3 Ensaios *In Vitro* Acelulares

6.3.1 Ensaios de Bioatividade com Solução de SBF-K9

O ensaio para a averiguação da bioatividade *in vitro* do material foi realizado com a imersão do novo vidro na forma monolítica em solução de SBF-K9 entre os períodos de 0 a 168 horas.

Na Figura 6.18, tem-se as curvas referentes a períodos mais curtos como de 0 a 16 horas de imersão.

Em apenas 12 horas já se vê a formação dos picos que indicam a presença da hidroxicarbonatoapatita (560 e 610 cm^{-1}) [1,81], isto mostra que em apenas 12 horas, em teoria, já se teria a camada que ligaria quimicamente este biomaterial ao tecido ósseo hospedeiro.

Na Figura 6.19, têm-se os espectros obtidos para tempo maiores de exposição. Neles é possível observar a formação e o desaparecimento de um pico em 470 cm^{-1} correspondente às ligações O-P-O de grupos de fosfato de cálcio [82]. Este fenômeno é observado em outras formulações vítreas e vitro-cerâmicas bioativas, porém ainda não é compreendido [81].

O rápido surgimento desta fase HCA indica a alta bioatividade deste novo biomaterial, sendo que o tempo para sua formação é semelhante ao tempo para o vidro 45S5, que leva de 8 a 10 horas para precipitação desta fase em sua superfície [1,4].

Portanto, o novo vidro bioativo F18 consegue combinar e equilibrar propriedades contrárias: estabilidade vítrea e alta bioatividade.

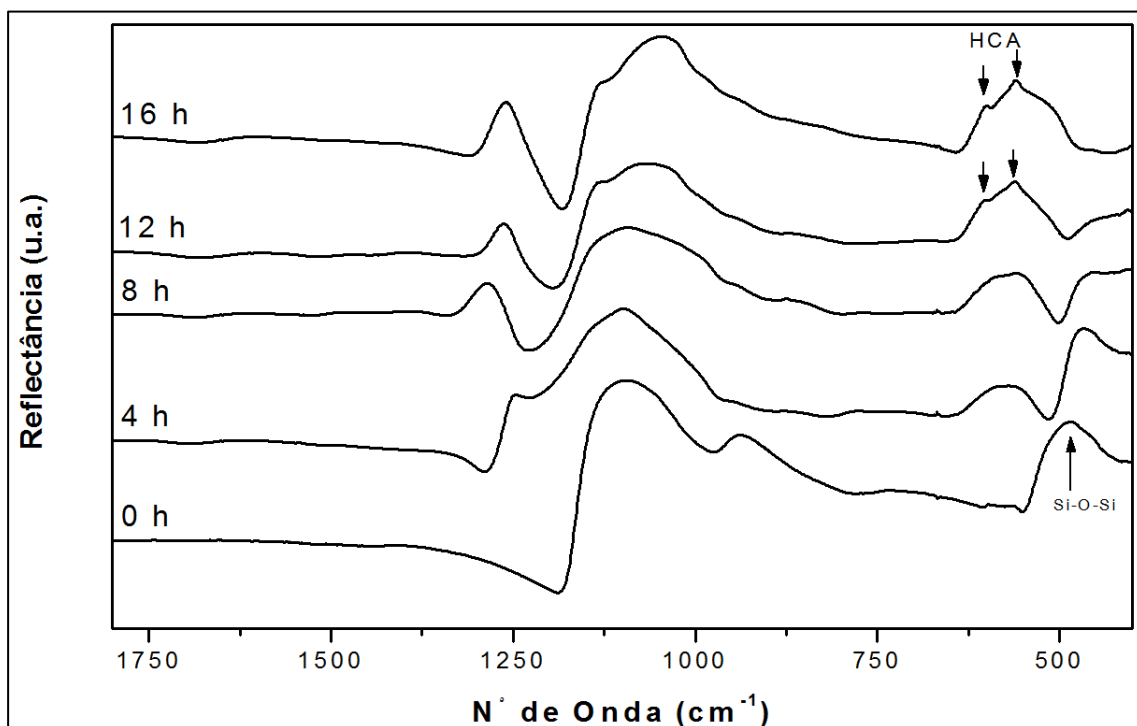


Figura 6.18 - Espectroscopia de Infravermelho após ensaios de imersão em SBF-K9 para períodos de 0 a 16h.

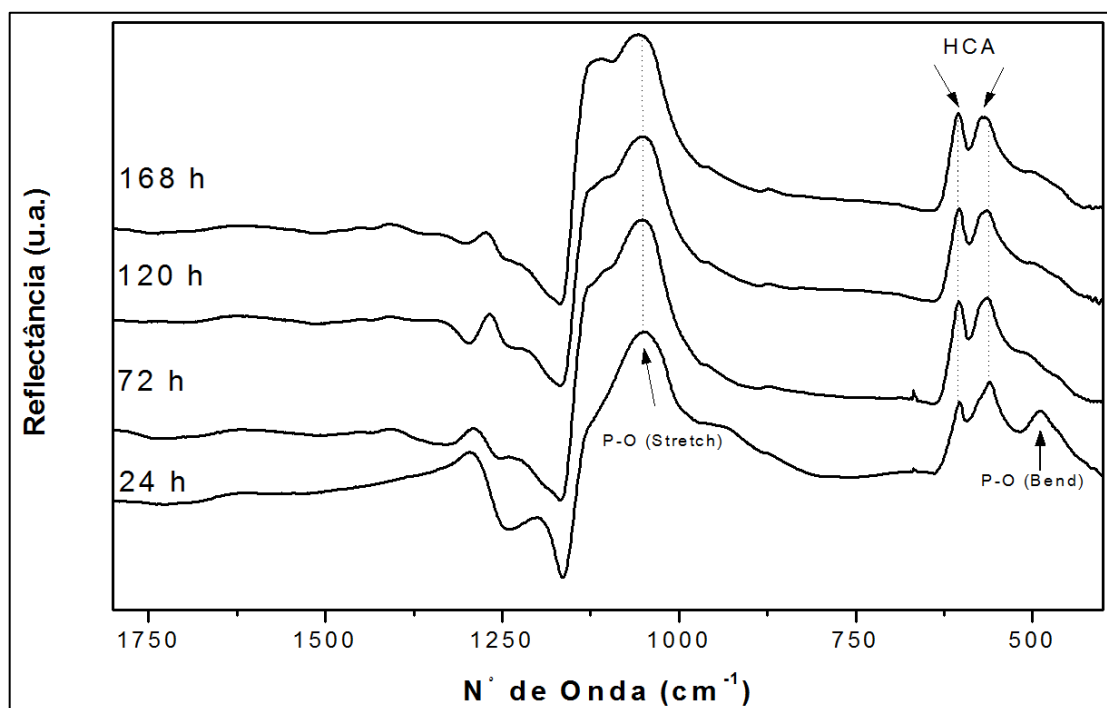


Figura 6.19 - Espectroscopia de Infravermelho após ensaios de imersão em SBF-K9 para períodos de 24 a 168h.

Em todos os espectros a partir de 12 horas a camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) se manteve presente e aumentando de espessura, como pode ser observado nas imagens de MEV (Figura 6.20). Em 24 horas as formações globulares características da fase HCA já estão presentes em um grande volume, sendo que com o aumento do tempo de exposição do novo vidro bioativo à solução de SBF-K9 vê-se o aumento na quantidade desta fase sob a superfície do vidro.

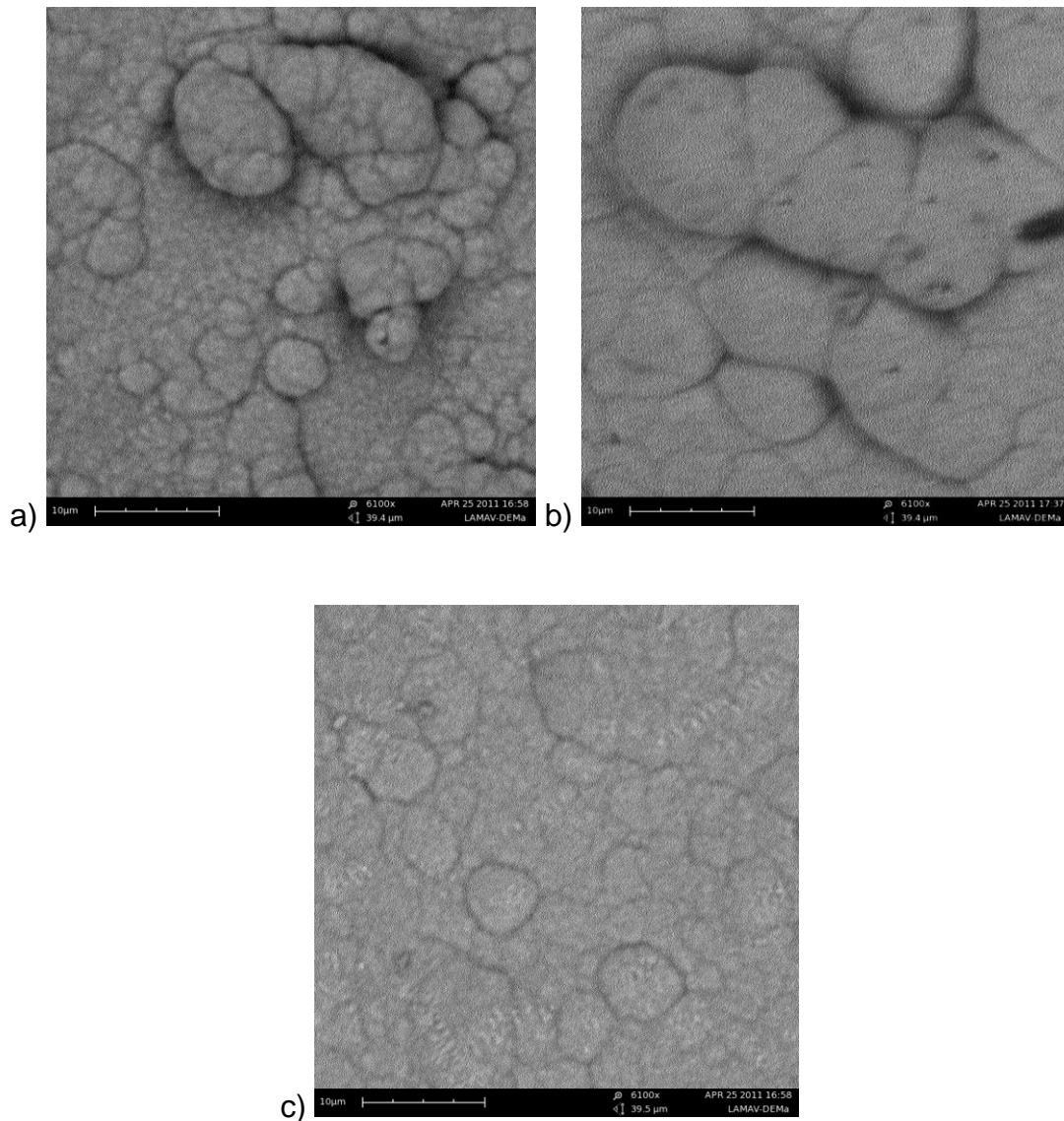


Figura 6.20 – Micrografias de amostras monolíticas do vidro bioativo F18 após a imersão em solução SBF-K9 por a) 24 horas, b) 72 horas e c) 168 horas.

A lixiviação dos íons do material vítreo para solução durante os ensaios de bioatividade foi quantificada por meio de ensaios de ICP-OES. Na Figura 6.21, é possível observar a taxa de lixiviação para os íons Ca, P, Na, K e Si de amostras na forma de pastilhas em solução de SBF-K9.

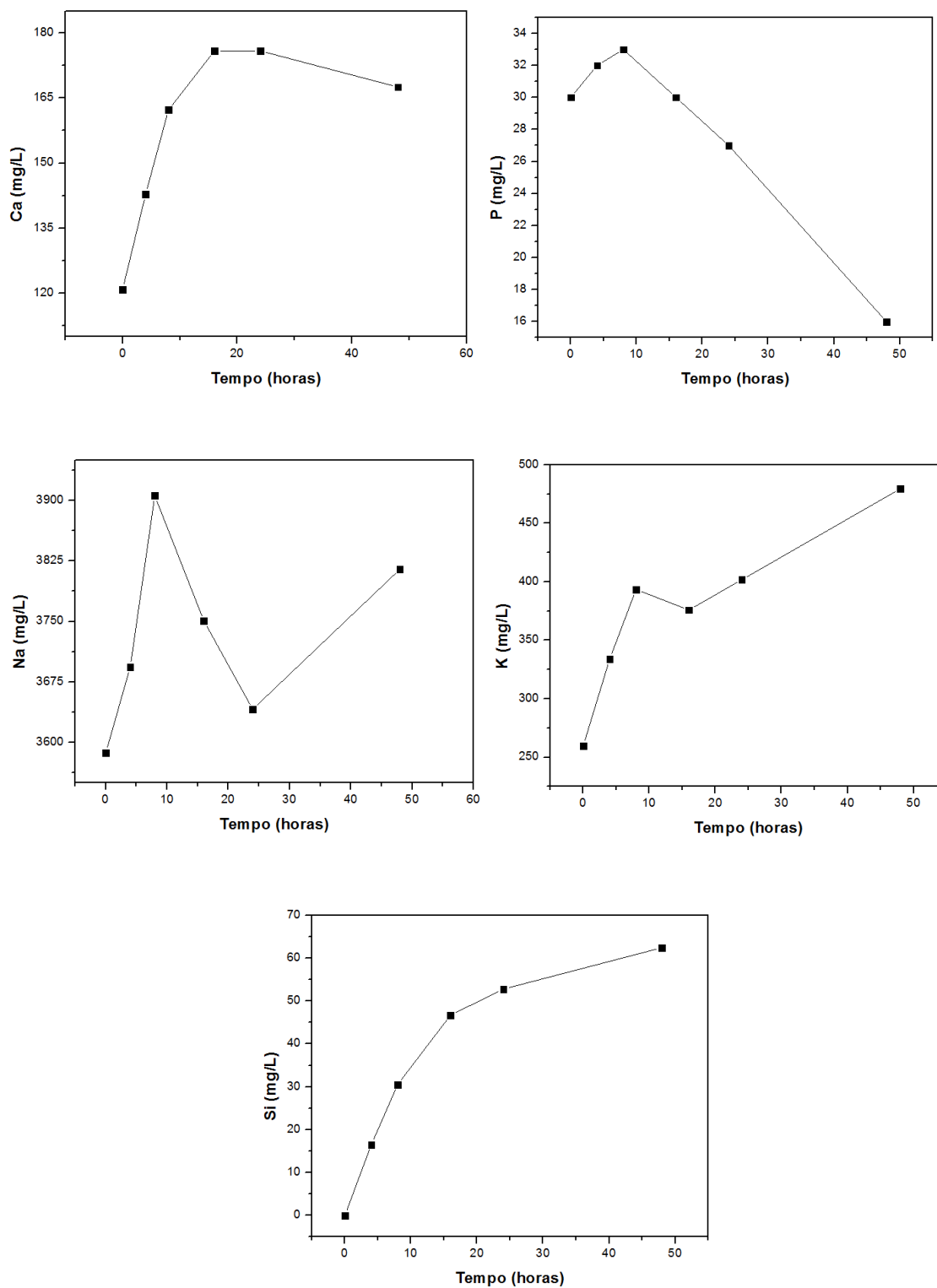


Figura 6.21 - Análise da taxa de lixiviação dos íons Ca, P, Na, K e Si do vidro F18 em solução de SBF-K9.

Os resultados apresentados estão em coerência com os dados reportados na literatura para o vidro 45S5 [62,81,83,84].

A concentração de P na solução possui um pico nos estágios iniciais analisados que em seguida, diminui continuamente com o tempo, o que pode ser atribuído ao desenvolvimento da camada de fosfato de cálcio (Ca-P) amorfo e também de HCA. Os valores encontrados para o vidro bioativo 45S5 apresentam a mesma tendência, tendo seu pico em aproximadamente 32 a 34 mg/L nos estágios iniciais e caindo continuamente para 12 a 15 mg/L após 48 horas em imersão na solução de SBF [81,83].

A concentração de Ca aumenta gradualmente até 16 horas e não se altera significativamente até o final do período experimental, essa tendência também é observada para o biovidro 45S5 [81,83]. Esse aumento pode ser atribuído à pouca quantidade de P na solução, pois o mesmo está sendo continuamente consumido para a precipitação de fosfatos de cálcio, sendo este elemento, um fator limitante para a precipitação de HCA na superfície do vidro [81].

Já a concentração de Si aumenta em relação ao tempo, fato também observado em outros estudos com o vidro 45S5 [62,85], já que mesmo após a formação da camada de HCA o material continua seu processo de lixiviação [81].

A concentração de K também se apresenta em crescimento com o aumento do período experimental, já que o mesmo, de maneira geral, não é consumido para a precipitação das camadas de fosfato de cálcio amorfo (Ca-P) e HCA. O íon Na apresentou uma queda nos períodos de 16 e 24 horas que pode ser atribuída a uma possível precipitação de sal na solução entre o intervalo da finalização dos experimentos de bioatividade e análise pela técnica de ICP-OES. Porém, de maneira geral, apresenta uma curva semelhante ao K, já que ambos são lixiviados continuamente, porém não consumidos nas reações para a formação de Ca-P e HCA.

A taxa de dissolução do vidro F18 durante os experimentos e sua tendência bastante similar de lixiviação iônica ao vidro 45S5, reforçam a sua

capacidade de interação com os fluídos e também evidenciam sua alta bioatividade.

6.3.2 Ensaio de Degradação

Visando às futuras aplicações *in vivo* e clínicas do novo biomaterial, o entendimento e verificação de seus processos de degradação são de extrema relevância.

Os processos envolvendo a dissolução e os produtos de lixiviação do biovidro 45S5, entre outros vidros bioativos, já foram explorados na literatura para diferentes tipos de amostras, monolíticas e pós com diversas granulometrias, e utilizando-se diferentes soluções com diversas razões entre área superficial das partículas e volume de líquido [62,84,86].

As reações superficiais dos primeiros vidros bioativos foram estudadas em água e solução tampão TRIS por Clark e Hench [17,87], em meados da década de 70. Porém desde 1990, Kokubo e colaboradores desenvolveram soluções que conseguiam mimetizar a porção iônica do plasma sanguíneo, a mais conhecida foi intitulada de SBF (*Simulated Body Fluid*), e a mesma vem sendo utilizada desde então para a verificação da bioatividade *in vitro* dos materiais vítreos [60].

O entendimento da sequência de reações de dissolução do biovidro e também da taxa de liberação dos íons para o meio é de suma importância para a previsão do comportamento do material quando implantado *in vivo*. Portanto, para o novo vidro bioativo F18 estudos referentes à sua degradação em duas diferentes soluções e para diferentes formas de amostragem foram conduzidos, assim como o estudo da degradação do *coating* biorreabsorvível utilizado.

6.3.2.1 Estudo do Coating Biorreabsorvível

Para a confecção dos tecidos vítreos optou-se pela utilização de um *coating* bioreabsorvível de colágeno tipo I. Este polímero orgânico foi

selecionado já que é a proteína mais abundante no corpo humano, participa de várias etapas da regeneração de diversos tecidos corpóreos e também é relativamente de fácil obtenção a partir de diversos tecidos de origem animal.

Porém, se fez necessário um estudo da influência da utilização deste biomaterial como *coating* do novo vidro bioativo. Questões como a taxa de degradação e dissolução deste biomaterial e se sua presença influenciaria a taxa de formação e qualidade da camada de HCA formada deviam ser respondidas.

Para tanto, utilizou-se da técnica de FTIR para a detecção da presença do biopolímero e para determinação de quanto tempo o mesmo leva para não mais estar presente na superfície de uma amostra monolítica recoberta.

Na Figura 6.22 encontram-se as curvas do ensaio de FTIR para uma amostra vítrea sem recobrimento e uma amostra recoberta por uma camada de colágeno de 50 μ l.

A partir destes espectros foram realizados ensaios nos quais pastilhas de vidro F18 eram imersas em solução de SBF-K9 por períodos de 0 a 24 horas para averiguação da dissolução do biopolímero e também para verificação da influência deste nas etapas de formação da HCA. A Figura 6.23 apresenta os resultados obtidos.

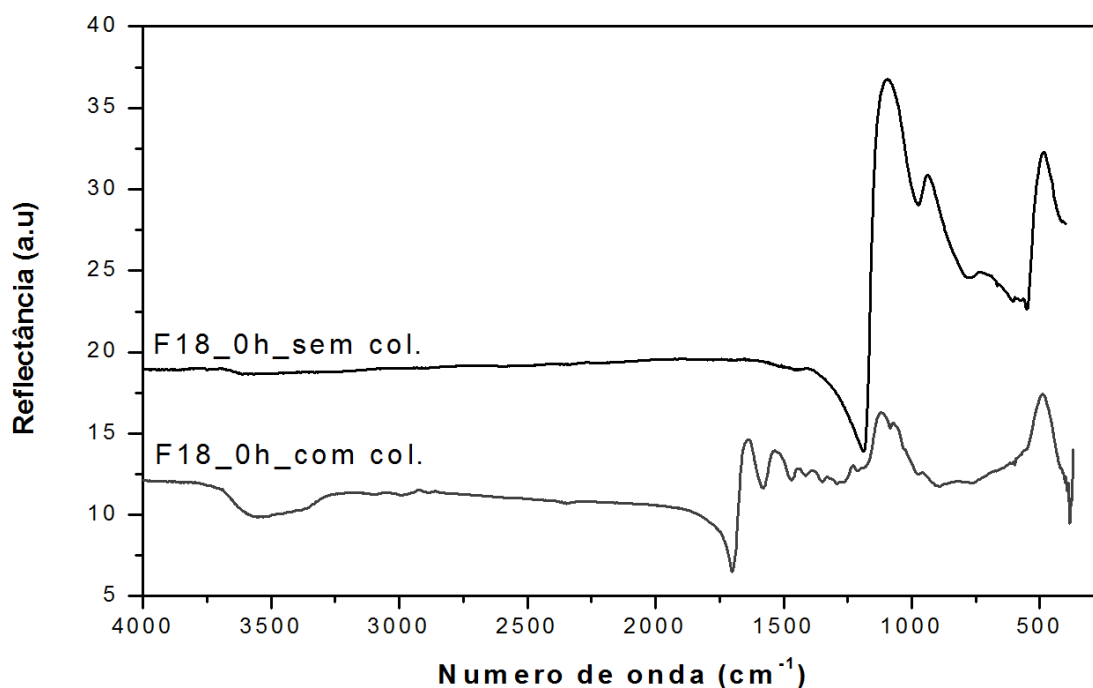


Figura 6.22 - Espectroscopia para amostras monolíticas de F18 com e sem recobrimento por colágeno.

Na Figura 6.23 é possível observar que após uma hora já não se identifica mais a presença do colágeno sobre o vidro, portanto sua dissolução é extremamente rápida, principalmente em temperaturas próximas a 37°C, que é a temperatura corpórea.

Outra informação importante apresentada é a não influência nas reações para formação das camadas de fosfato de cálcio amorfo e da camada de HCA. Já que entre 8 e 16 horas de exposição a solução, vê-se a formação da camada de HCA, como observado em ensaios anteriores (seção 6.3.1).

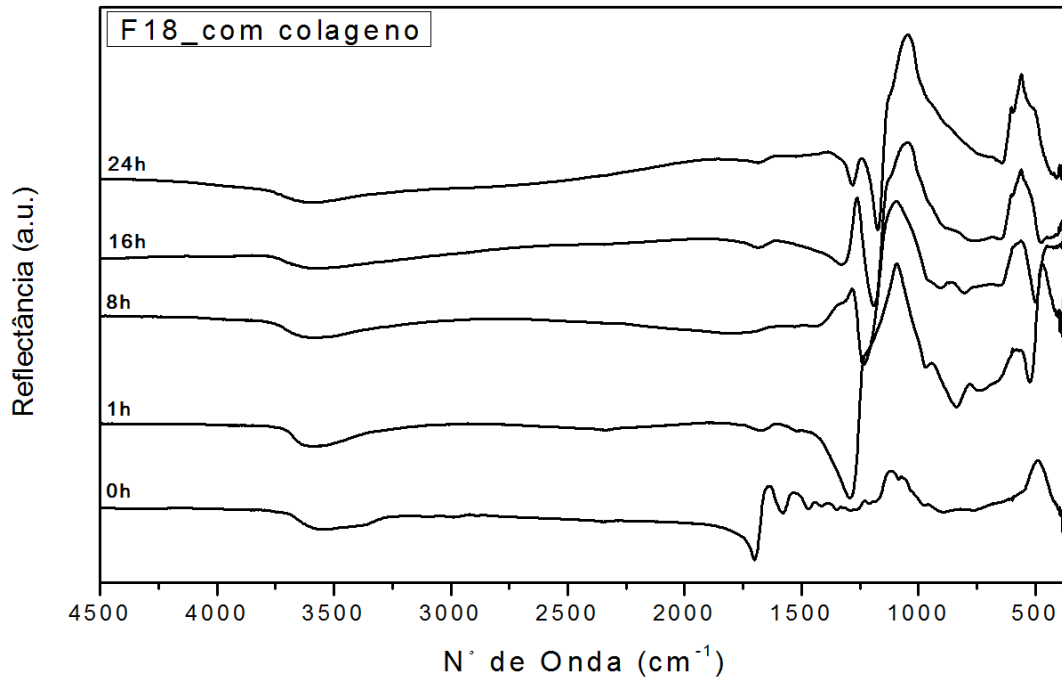


Figura 6.23 - Espectroscopia de Infravermelho para amostras imersas em SBF-K9 por diferentes períodos.

Para análise da qualidade do *coating* obtido, foram realizados ensaios de MEV e as imagens obtidas são apresentadas nas Figuras 6.24 e 6.25.

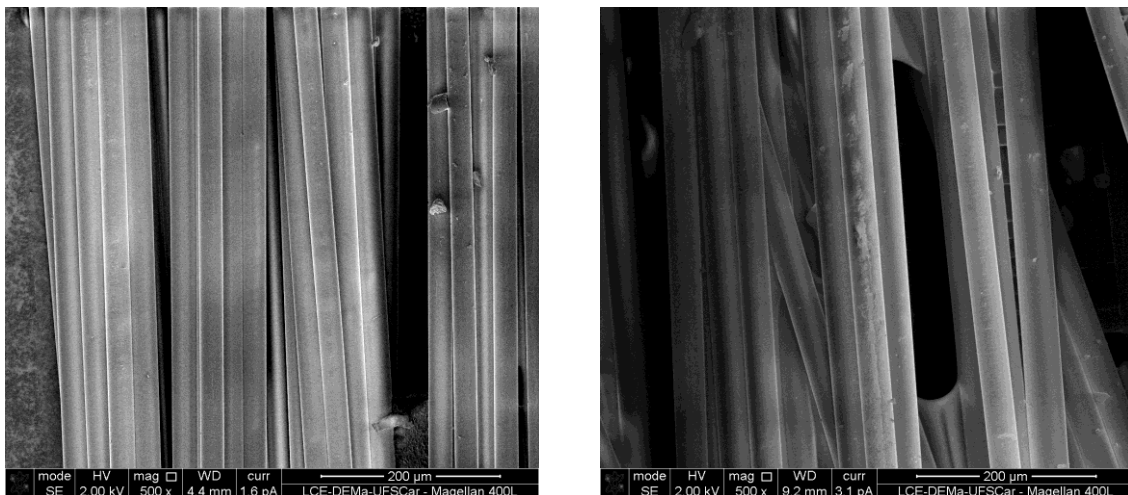


Figura 6.24 – Fibras do vidro F18 totalmente cobertas com o *coating* bioreabsorvível, aumento de 500x.

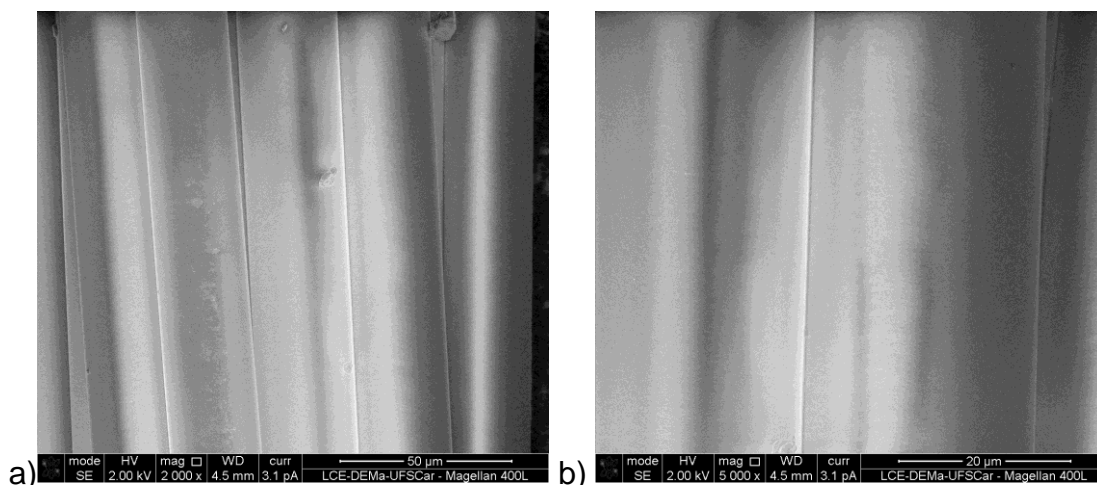


Figura 6.25 - Fibras do vidro F18 totalmente cobertas com o *coating* bioreabsorvível aumentos de a) 2000x e b) 5000x.

As imagens de MEV mostram que as fibras conseguiram ser totalmente cobertas pela solução do *coating*, evidenciando que o processo de deposição escolhido foi suficiente para criar uma camada protetora em toda extensão da fibra de vidro bioativo.

Por meio de técnicas de análise de imagem (utilizando-se o software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, EUA), foi possível obter um valor aproximado da espessura da camada de *coating* obtida, sendo este aproximadamente de 50 nanômetros, é claro que a técnica escolhida não permite precisão para determinação da espessura real do *coating* obtido, mas é suficiente para constatar que seu processo de dissolução seria bastante rápido em aplicações *in vivo* e clínicas, e que seguindo os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, teria pouca influência nos resultados gerais.

6.3.2.2 Estudo de Degradação do Vidro F18

Como esta nova formulação vítrea se destina a utilização extra e intracorpórea é necessário conhecer sua taxa de dissolução e degradação, assim como os íons que são lixiviados com o tempo e suas quantidades para as diversas formas de apresentação deste novo biomaterial. Estes ensaios

foram realizados seguindo e adaptando as orientações da norma ISO 10993: 14 – “Biological evaluation of medical devices - Identification and quantification of degradation products from ceramics”.

Os resultados obtidos para cada forma de amostragem são apresentados nas seções 6.3.2.2.1 a 6.3.2.2.3.

6.3.2.2.1 Amostras Monolíticas

Os resultados para as amostras em forma de pastilha, usando a solução de degradação proposta na norma ISO 10993-14 [56], podem ser observados na Figura 6.26 para os vidros 45S5 e F18.

Na Figura 6.27 tem-se a taxa de degradação apresentada por estas mesmas formulações e a variação de pH com o tempo.

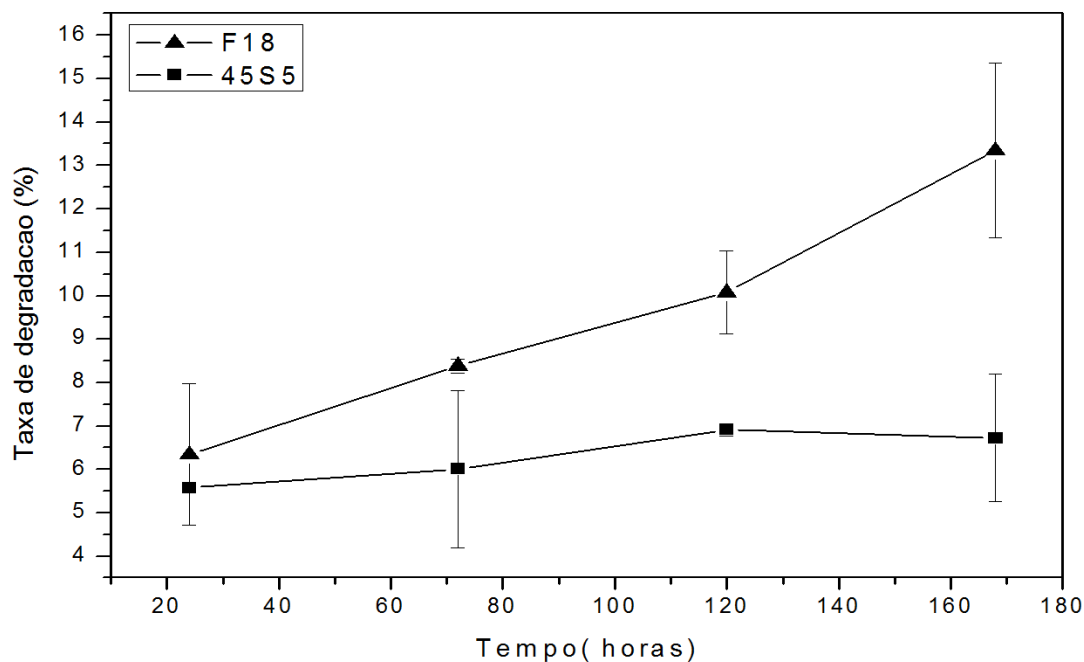


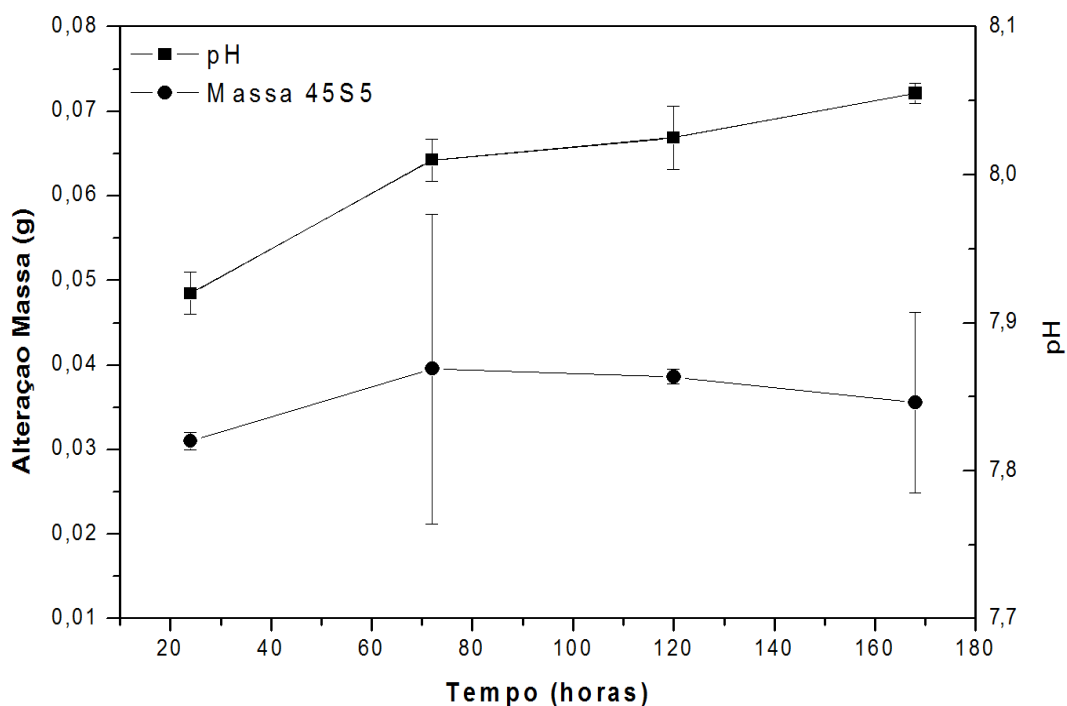
Figura 6.26– Taxa de degradação para amostras monolíticas dos vidros 45S5 e F18.

Como pode ser observada, a taxa de degradação para a formulação F18 é numericamente maior que a do vidro 45S5, porém testes estatísticos (Teste T

de Student) indicam que não há diferença significativa para a taxa de degradação destas composições na forma de pastilhas.

Neste gráfico (Figura 6.26) é possível observar a taxa de degradação percentual que equivale a razão massa perdida/massa inicial. As amostras em discos tiveram uma taxa de perda crescente no intervalo de 6-13% para as amostras da nova composição F18 e de 5-7% para as amostras de vidro 45S5.

A Figura 6.27 mostra uma tendência bastante coerente entre as amostras e o valor de pH para as duas composições vítreas. As amostras em forma de pastilhas degradam-se rapidamente nos primeiros estágios e depois alcançam um possível patamar e estabilizam sua perda de massa. Possivelmente, isto se deva a formação e crescimento da camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) na superfície das amostras.



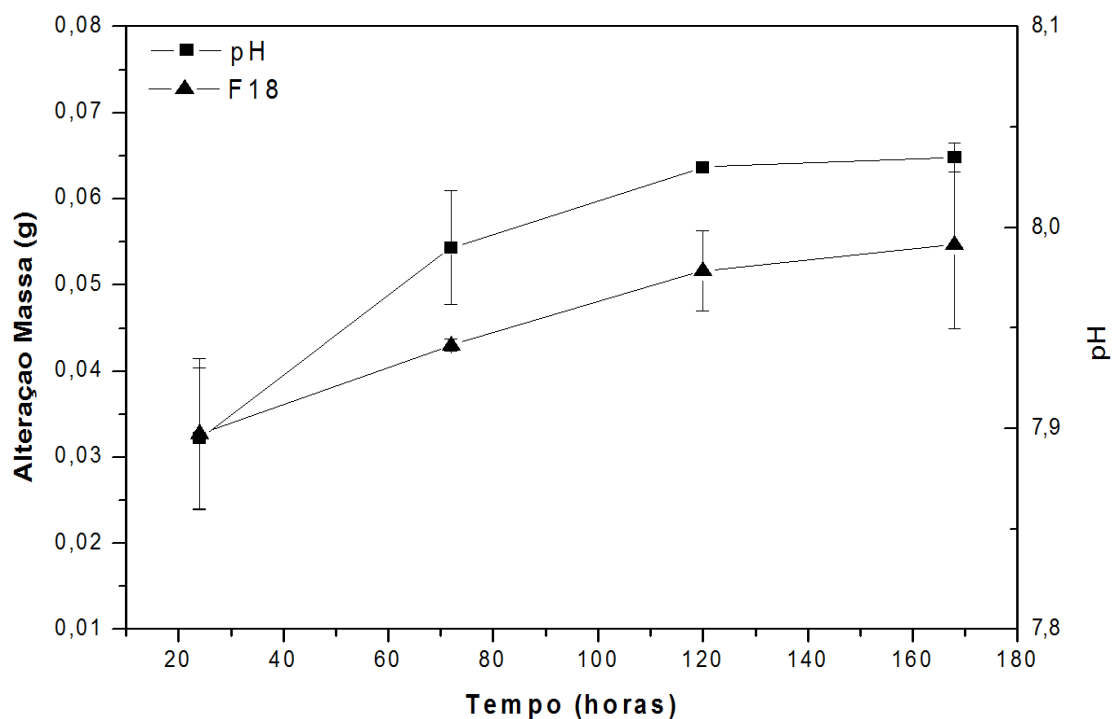


Figura 6.27 - Ensaio de degradação para amostras monolíticas dos vidros 45S5 e F18 (nova composição).

6.3.2.2.1.1 Espectroscopia de Infravermelho e MEV - Pastilhas

Nas Figuras 6.28 e 6.29 tem-se os espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em disco para ambas as composições, assim como as micrografias de suas superfícies (Figuras 6.30 e 6.31).

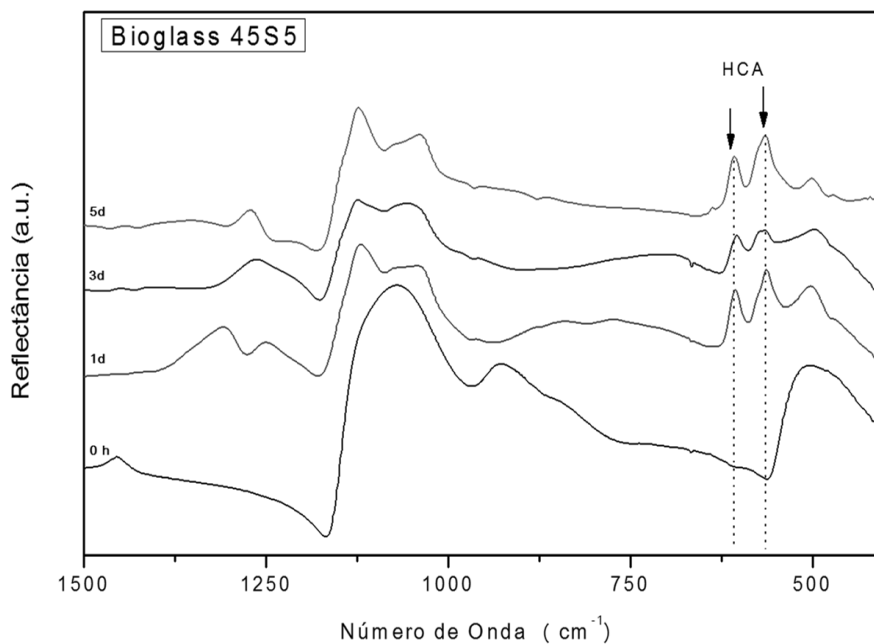


Figura 6.28 - Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em disco 45S5 nos períodos de 0, 1, 3 e 5 dias.

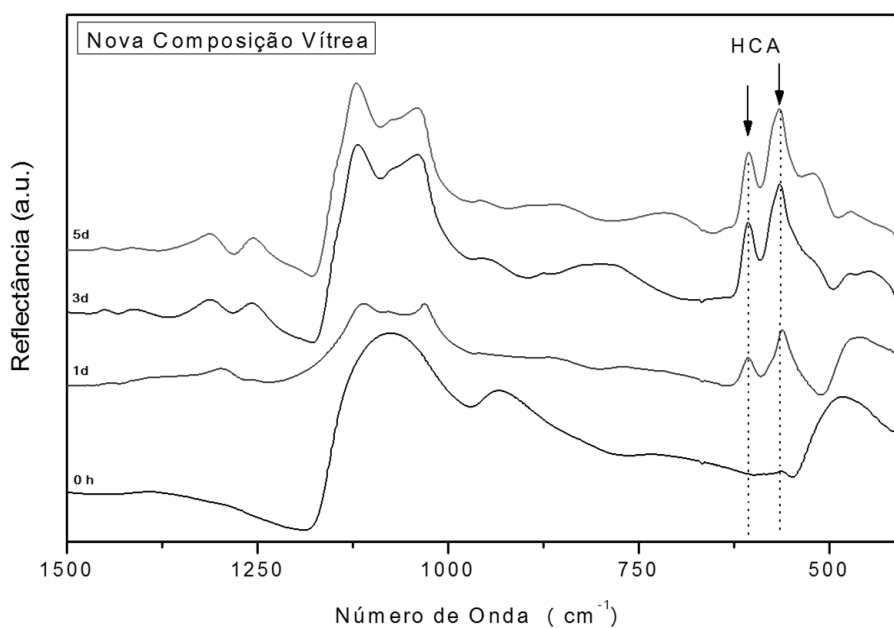


Figura 6.29 – Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em disco da nova composição vítrea nos períodos de 0, 1, 3 e 5 dias.

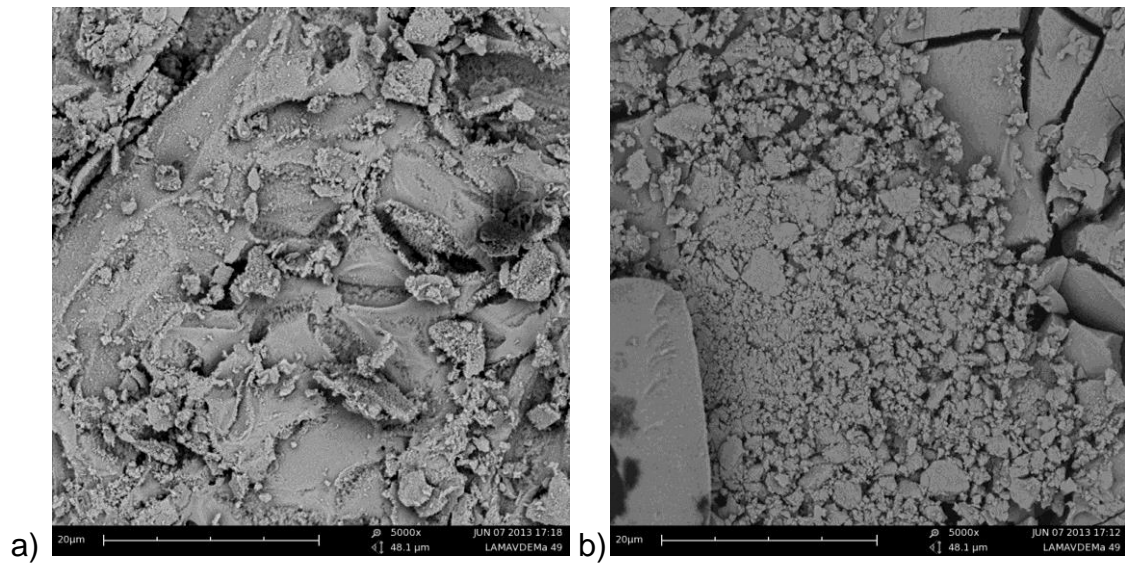


Figura 6.30 – Imagens de MEV das amostras monolíticas com 24 horas de ensaio a) 45S5 e b) F18.

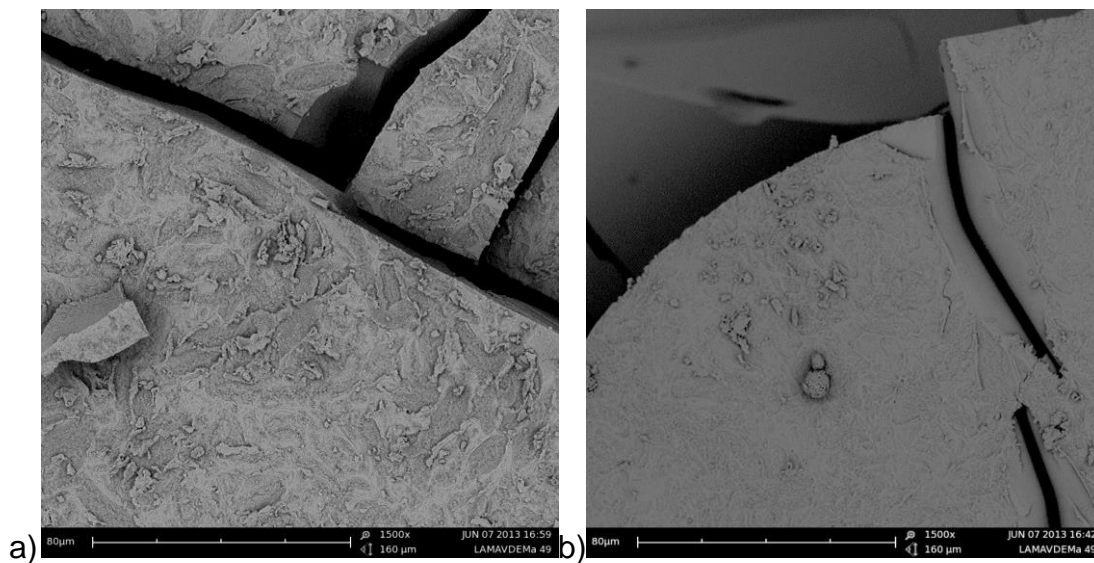


Figura 6.31 – Imagens de MEV das amostras monolíticas com 168 horas de ensaio a) 45S5 e b) F18.

Tanto as curvas de FTIR, mostradas nas Figuras 6.28 e 6.29, quanto as micrografias das superfícies, mostradas nas Figuras 6.30 e 6.31, evidenciam a degradação sofrida na superfície das amostras e a formação da fase HCA. Nos espectros de FTIR observa-se a banda característica na região de 560 e 610 cm^{-1} que é referente à camada biologicamente ativa formada na superfície das

amostras [1,4,81]. Essa camada formada pode ser visualizada nas micrografias da superfície, onde é possível observar a formação de agrupados globulares de HCA sobre essa camada. Não foi possível a obtenção dos espectros de FTIR referentes ao período de 7 dias, pois houve o destacamento da camada de HCA formada já que esta apresentava-se muito espessa (aproximadamente 7 μm de espessura).

Os resultados apresentados foram analisados pelo Teste T, obtendo-se para todos os períodos $p > 0,05$. Portanto, não se tem evidências que demonstrem que há diferença estatística entre a taxa de degradação das composições estudadas para as amostras na forma monolítica. Portanto, pode-se inferir que o novo vidro bioativo F18 possui uma taxa de degradação similar ao Bioglass 45S5.

A partir destes resultados podemos também perceber que para ambas as soluções utilizadas, SBF-K9 e ISO 10993-14, foi possível a formação de todas as etapas de lixiviação e degradação dos vidros bioativos descritas na literatura [4,10,81]. E que mesmo em uma solução pobre iônica (ISO 10993-14), é possível a formação da camada biologicamente ativa de HCA apenas com os íons provenientes da dissolução do vidro bioativo.

Ensaio explorando outra forma de apresentação do vidro F18 são apresentados na seção 6.3.2.2.2.

6.3.2.2.2 Amostras em Pó

Este ensaio foi inicialmente realizado seguindo as recomendações da norma ISO 10993-14, porém os resultados obtidos sugeriram que não houve reação superficial suficiente, provavelmente devido à razão “Massa/Volume de solução” sugerida pela norma. Como esta não prevê a degradação de materiais tão reativos quanto vidros bioativos, a razão sugerida (10g/100ml) foge dos limites necessários a indução das cinco etapas de degradação destes materiais, já extensivamente exploradas na literatura [1,4,81,87], pois esta razão torna o meio saturado, com altos valores de pH, desbalanceando os mecanismos de formação da camada de HCA *in vitro* (a falta de estruturas

globulares característica desta fase pode ser observada nas Figuras 6.32 e 6.33).

Sabe-se que o volume de solução a ser empregado em ensaios de bioatividade e a área superficial da amostra a ser utilizada é determinante para ocorrência dos mecanismos de lixiviação e precipitação ligados à formação da camada de HCA [72,84]. Estudos anteriores mostraram que a razão entre a massa da amostra e o volume da solução do ensaio igual a 0,001 g/ml representa satisfatoriamente ambientes de implantação e favorecem as reações ligadas a formação desta fase cristalina. Portanto, optou-se pela realização da metodologia proposta nos estudos de Jones *et. al.* [62] ainda utilizando-se a solução proposta pela norma ISO 10993:14 [56].

As Figuras 6.34 e 6.35 evidenciam os resultados obtidos por este método para duas faixas granulométricas distintas, 425 a 625 (com diâmetro médio de 500) e 500 a 710 μ m (com diâmetro médio de 675).

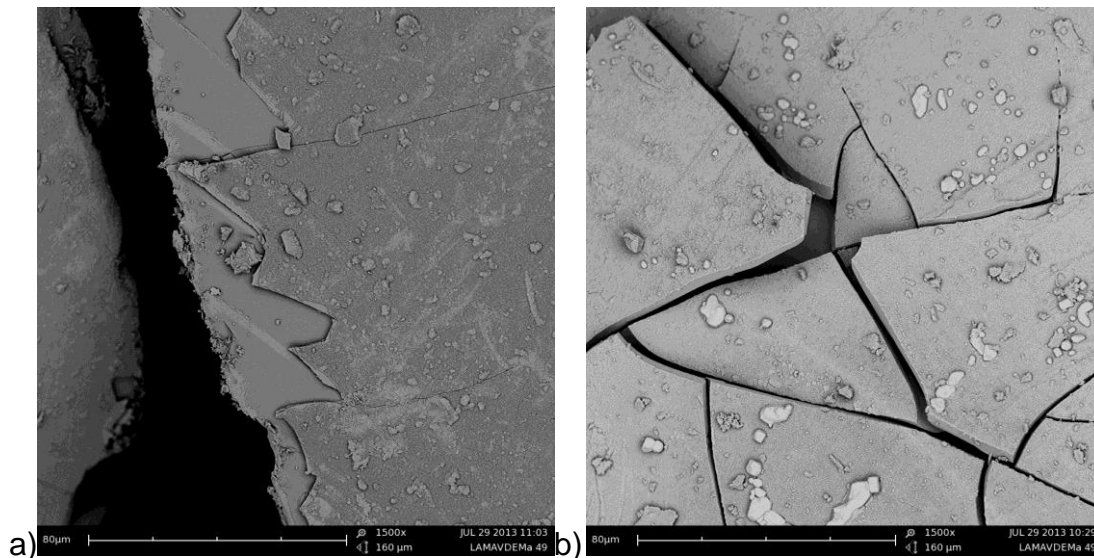


Figura 6.32 – Imagens de MEV das amostras em pó com 24 horas de ensaio a) 45S5 e b) F18.

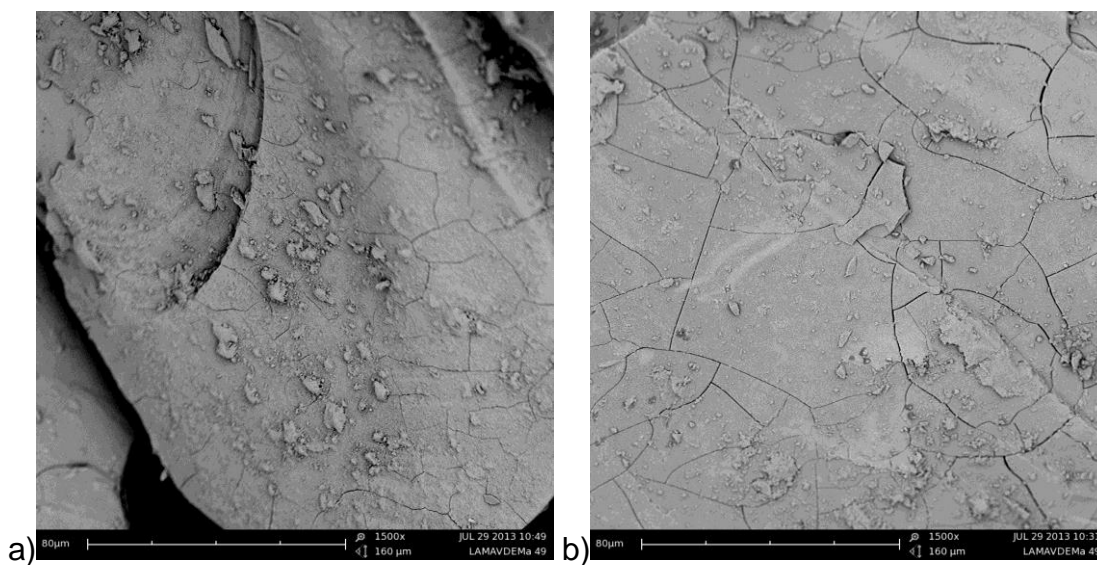
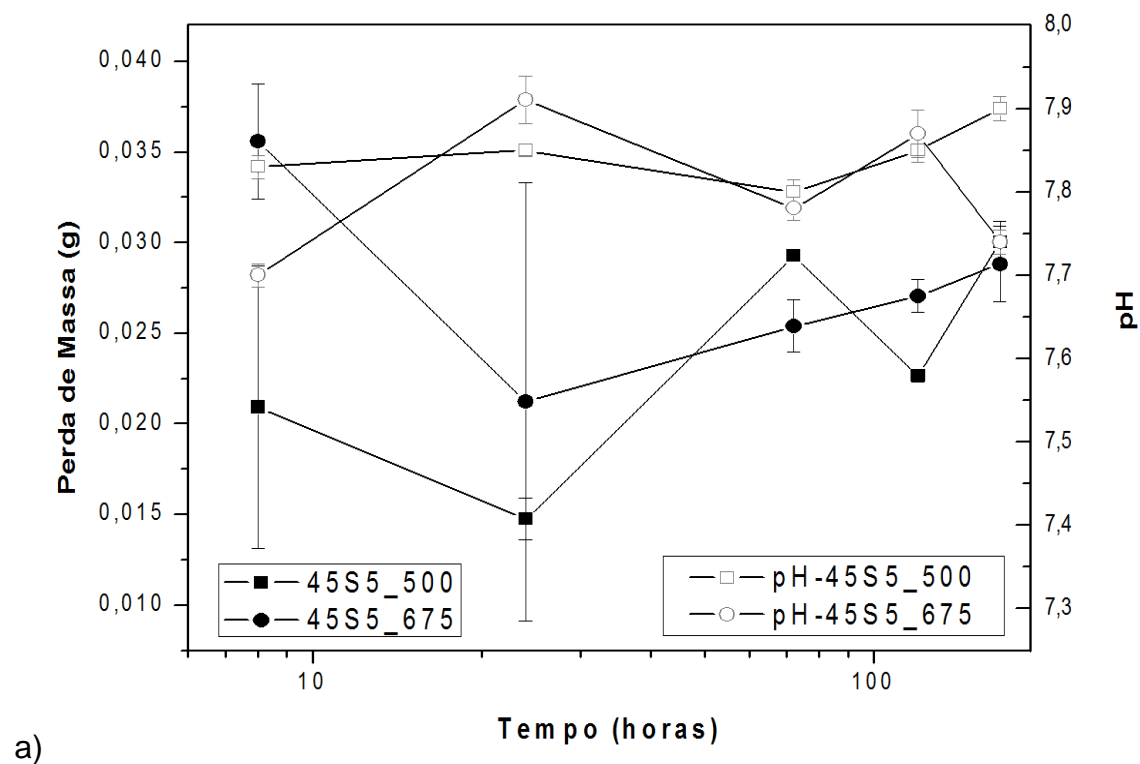
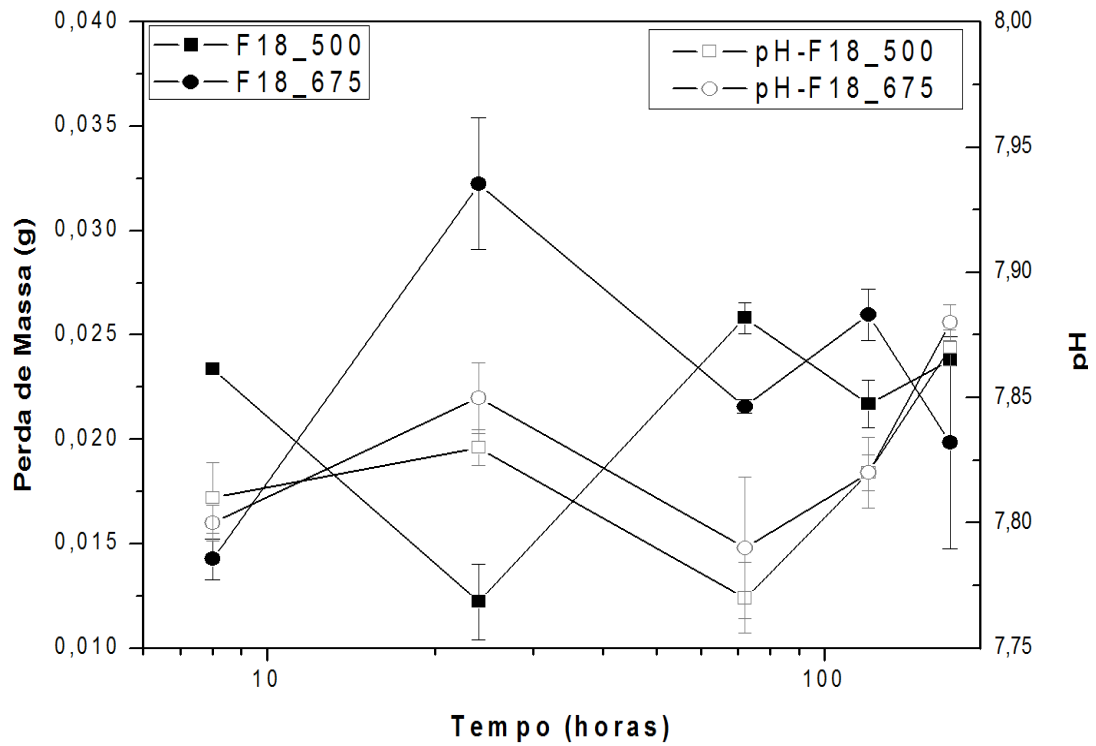


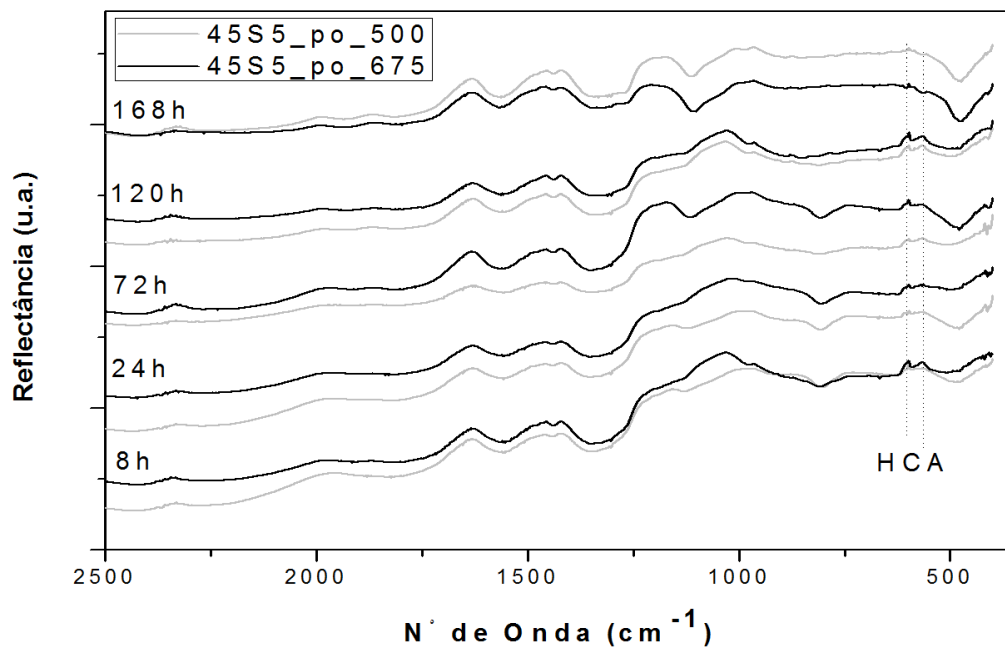
Figura 6.33 – Imagens de MEV das amostras em pó com 168 horas de ensaio a) 45S5 e b) F18.





b)

Figura 6.34 - Ensaio de degradação para amostras em pó a) para o vidro 45S5 e b) para o vidro F18, utilizando-se a nova metodologia.



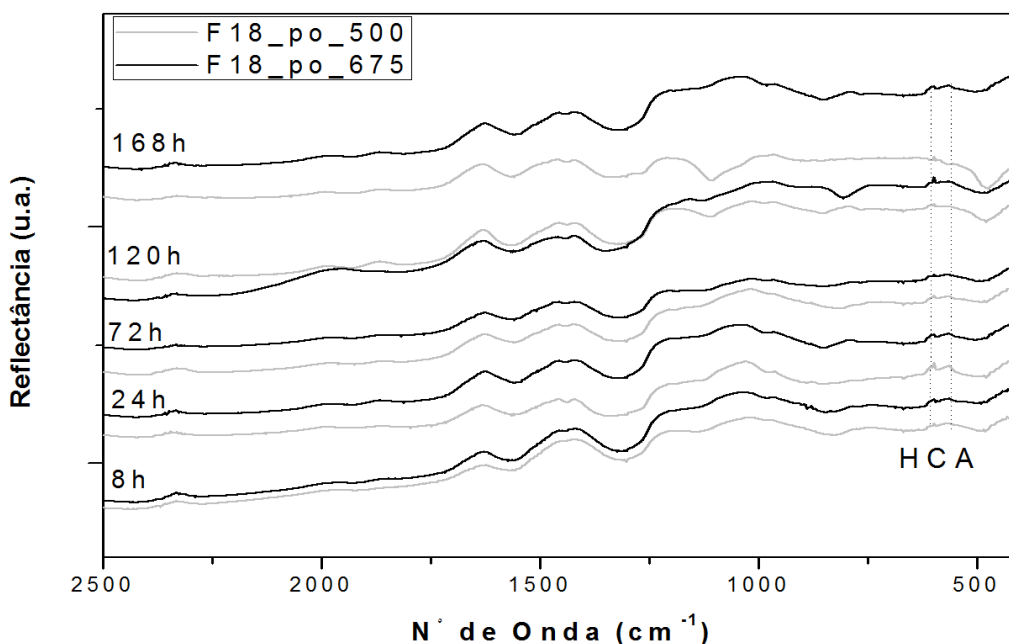


Figura 6.35 – Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em pó com nova metodologia para os vidros 45S5 e F18 nos períodos de 8,24, 72,120 e 168 horas.

Como podem ser observadas, nas Figuras 6.34 e 6.35, as reações de degradação que levam a formação da camada de HCA na superfície do vidro bioativo se realizaram. Sendo possível a detecção dos principais picos da HCA em 560 e 610 cm^{-1} , como demonstrado na literatura a partir do primeiro tempo experimental [1,81,82].

Houve um aumento do pH da solução de 7,25 (0 horas) para 7,9 (168h) para ambas as composições, devido a lixiviação dos íons Ca, Na e K presentes no vidro bioativo para o meio. Após 8 horas de imersão em solução de degradação já foi possível a identificação da fase HCA na superfície das amostras, sendo que a quantidade da mesma foi crescendo com o aumento do tempo experimental. Este fenômeno também pode ser observado nas imagens de MEV (Figuras 6.36 e 6.37) a seguir.

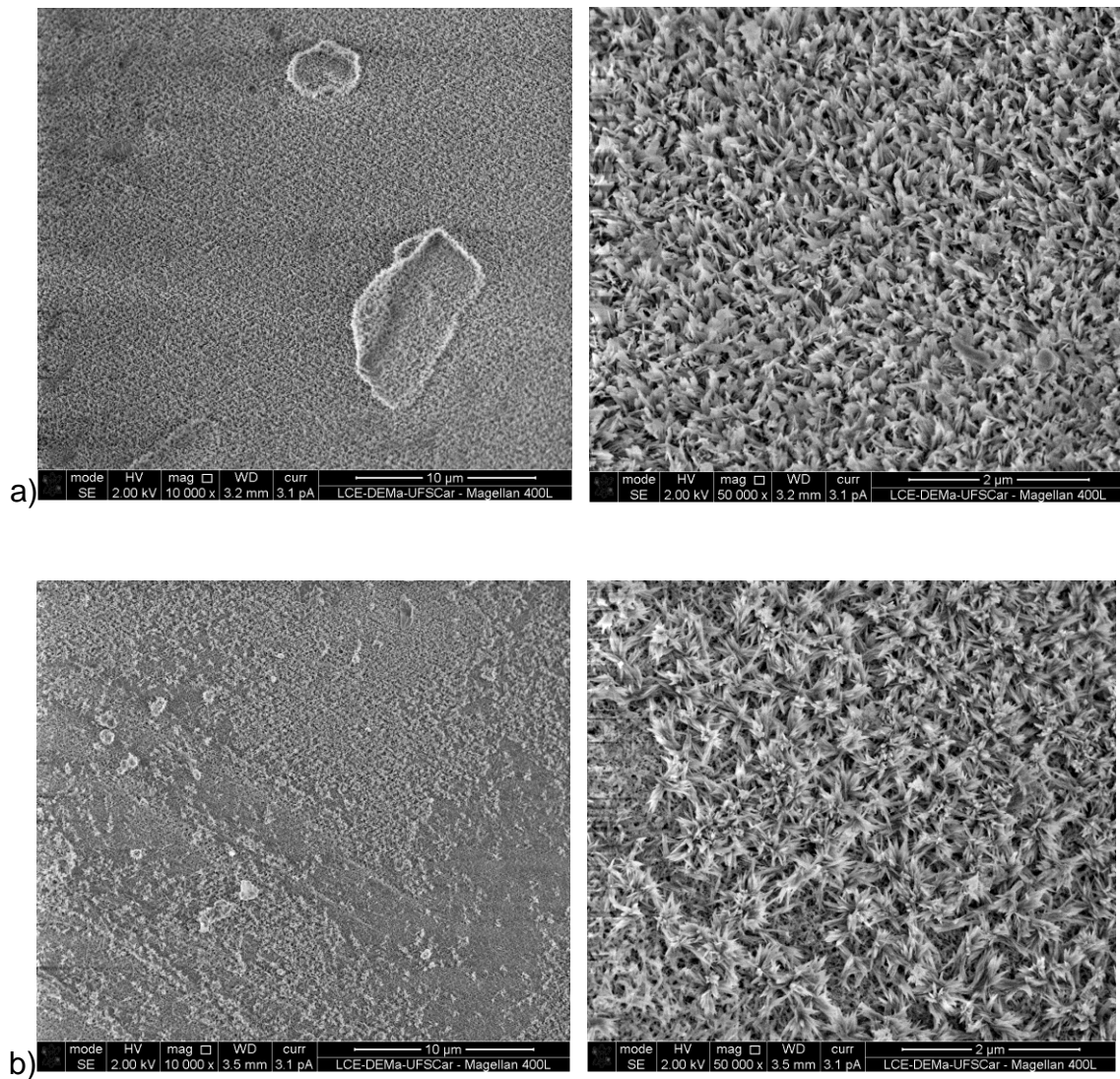


Figura 6.36 – Imagens de MEV das amostras em pó de 500µm com 8 horas de ensaio em de degradação da norma ISO 10993-14 a) F18 e b) 45S5.

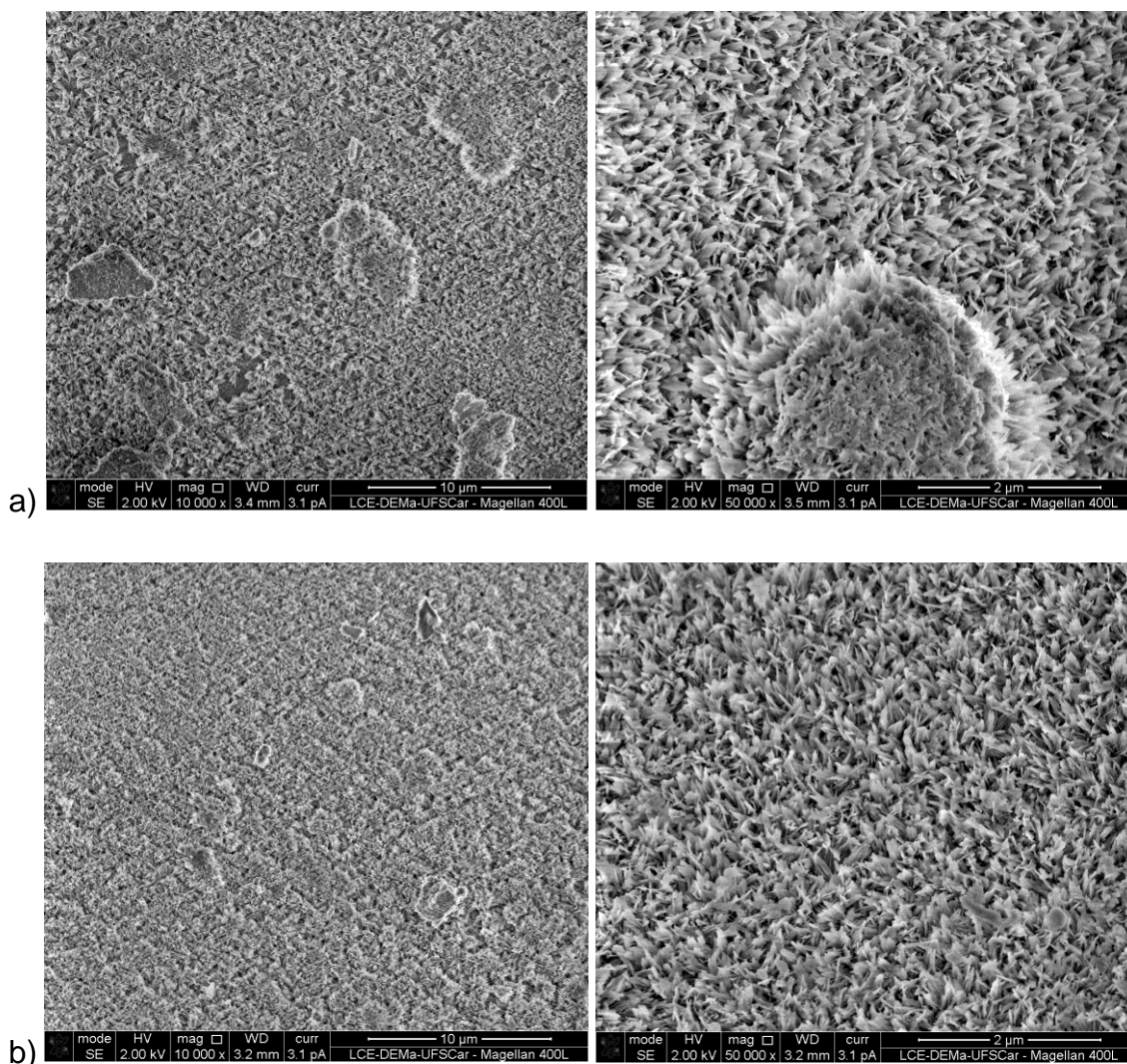


Figura 6.37– Imagens de MEV das amostras em pó de 675 μm com 8 horas de ensaio em de degradação da norma ISO 10993-14 a) F18 e b) 45S5.

Com relação ao comportamento de degradação apresentado pelas amostras, vimos a mesma tendência nas amostras em forma de fibras. O perfil apresentado é formado por picos crescentes e decrescentes e não por uma curva continuamente crescente como aquele apresentado pelas amostras em forma monolítica. Este fenômeno é melhor explorado na seção 6.3.2.2.3. Mas, é importante mencionar que os valores de p encontrados nos testes estatísticos (Teste T) foram consideravelmente maiores que 0,05, indicando que não houve diferença estatística para os grupos para todos os tempos experimentais.

Portanto, a degradação do F18 se assemelha bastante a encontrada para o biovidro 45S5 também nesta forma de apresentação.

A taxa de degradação de um vidro bioativo nos indica o tempo necessário à formação da camada de HCA na superfície do mesmo, o que está intimamente ligado à sua habilidade em apresentar características de osteocondução, osteoindução, propriedades angiogênicas, anti-inflamatórias etc. Estas por sua vez, são características essenciais a um biomaterial o qual visa uma aplicação clínica, não somente de enxertia óssea, mas também para enxertia e regeneração de tecidos moles. No caso do vidro F18, vemos um biomaterial que em dois diferentes formatos (monolítica e pó) e exposto a diferentes soluções conseguem lixiviar íons necessários ao desencadeamento das reações para ligação com os tecidos vivos, o que nos conferiu bons prognósticos para os ensaios *in vivo*.

6.3.2.2.3 Amostras na Forma de Fibras

Nas Figuras 6.38 a 6.41, temos o comportamento encontrado para as amostras na forma de fibras (nos dois diâmetros selecionados, 25 e 45 μ m) em relação à sua taxa de degradação e pH nas soluções de SBF-K9 e na solução de degradação da norma ISO 10993-14. Para esta forma de apresentação, decidiu-se pela análise em ambas as formulações, já que se pretende a utilização do material *in vivo* neste formato e seu estudo com a solução de SBF permite certa comparação com os resultados previamente obtidos. Devido à impossibilidade de obtenção de fibras com o vidro 45S5 pelo método de *downdrawing*, nestes estudos somente foi utilizada a formulação F18.

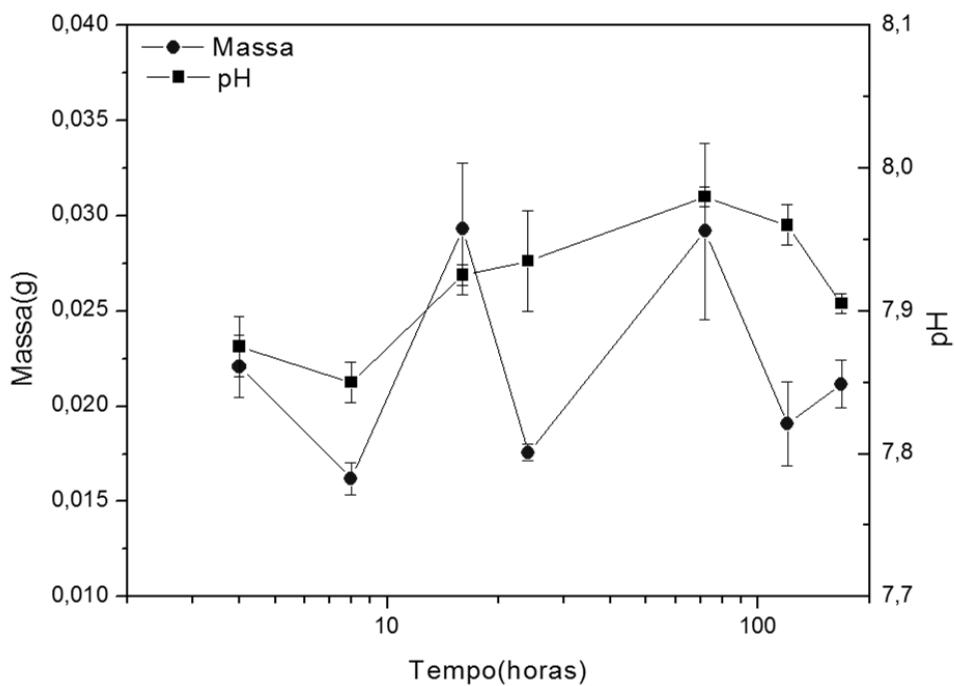


Figura 6.38 - Perda de massa das amostras de fibra 25µm em solução de SBF-K9 e pH em relação ao tempo de ensaio.

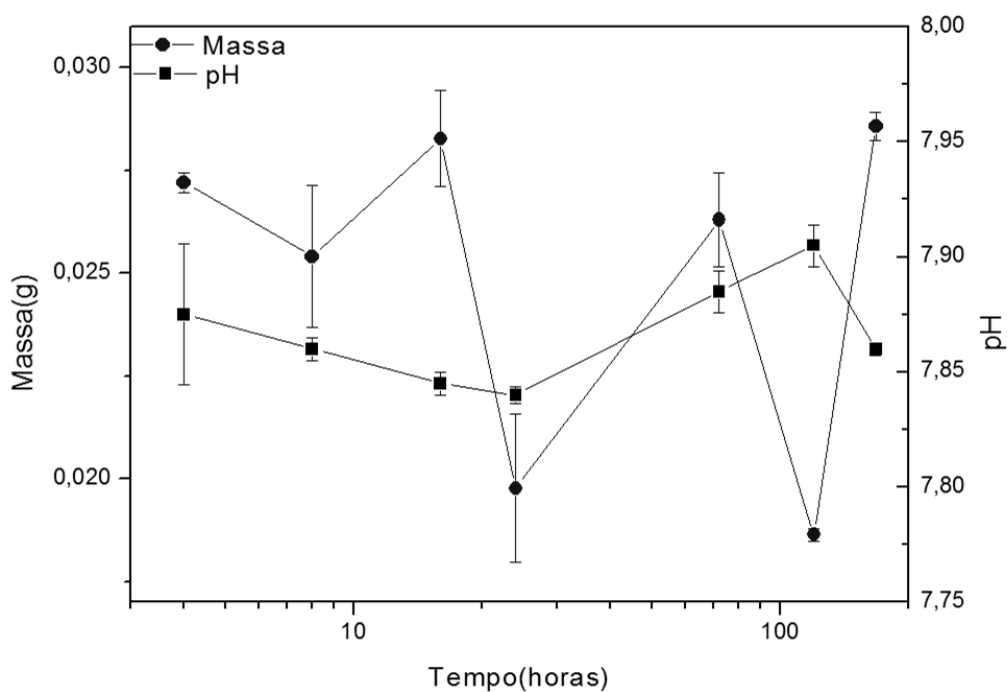


Figura 6.39- Perda de massa das amostras de fibra 25µm em solução normatizada de degradação (ISO 10993-14) e pH em relação ao tempo de ensaio.

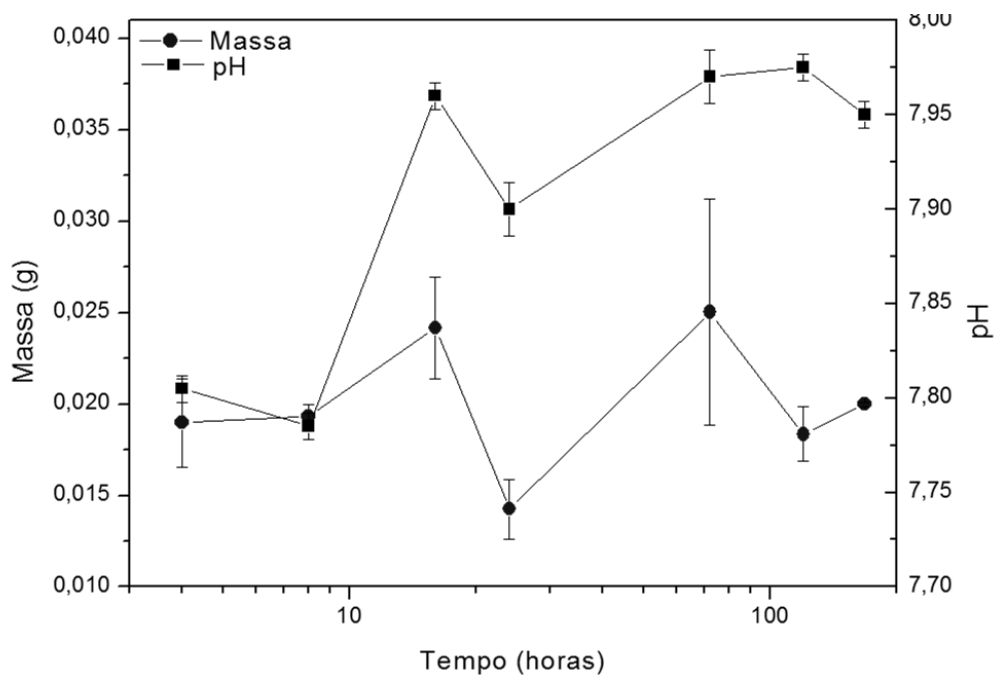


Figura 6.40 - Perda de massa das amostras de fibra 45µm em solução de SBF-K9 e pH em relação ao tempo de ensaio.

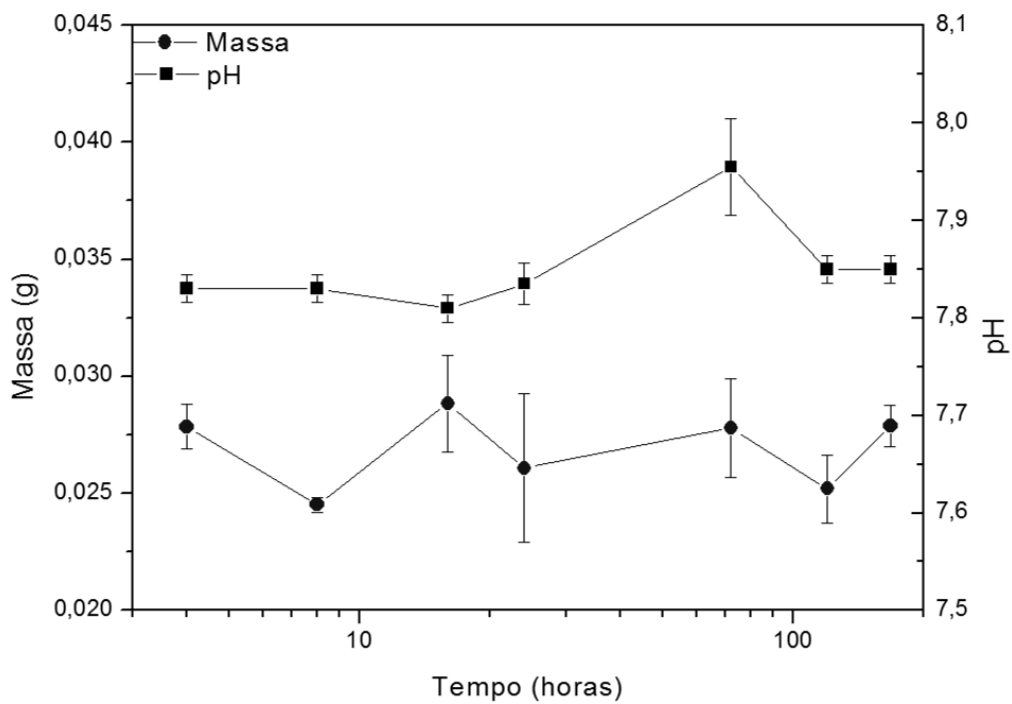


Figura 6.41 - Perda de massa das amostras de fibra 45µm em solução normatizada de degradação (ISO 10993-14) e pH em relação ao tempo de ensaio

Com os resultados dos experimentos de perda de massa comparados aos experimentos de pH pode-se observar um perfil nas curvas de degradação que se repetiu para todas as amostras em forma de fibra (similar ao apresentado para as amostras em pó, mostrados na seção 6.3.2.2.2). Esse perfil característico é formado por picos crescentes e decrescentes e não por uma curva continuamente crescente como aquele apresentado pelas amostras em forma de discos.

As Figuras 6.42 e 6.43 comparam as curvas de degradação entre fibras de mesmo tamanho em solução normatizada de degradação (ISO 10993-14) e em solução de SBF-K9. É interessante notar que o perfil da curva é muito semelhante entre os tamanhos, mesmo as amostras estando em soluções distintas e que a curva de pH acompanha de uma forma geral esse perfil.

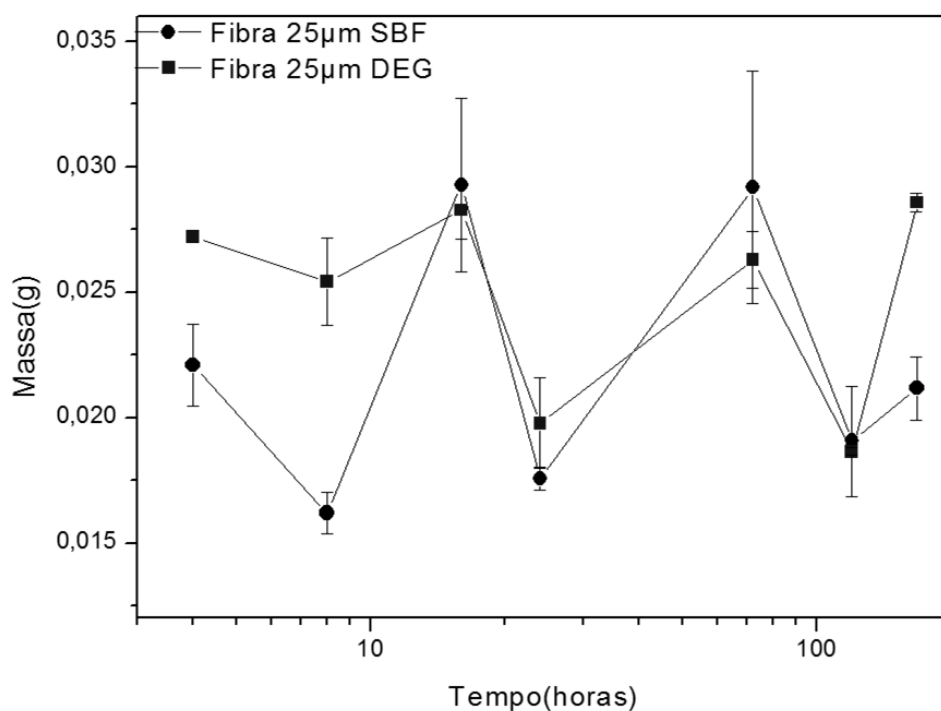


Figura 6.42 - Perda de massa das amostras de fibra de 25µm em solução de SBF e das amostras de fibra de 25µm em solução normatizada de degradação (ISO 10993-14).

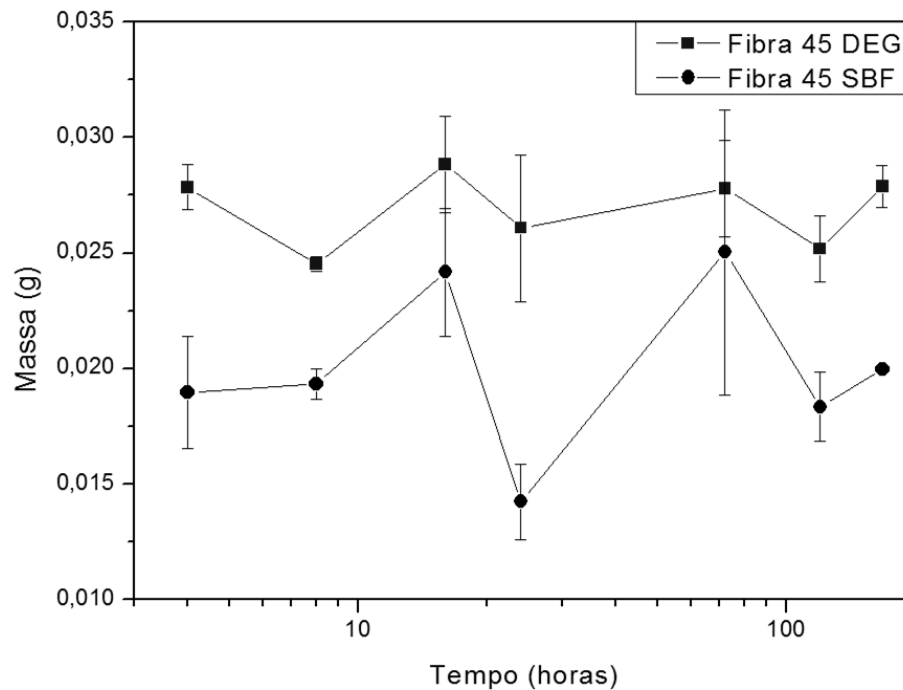


Figura 6.43 - Perda de massa das amostras de fibra de 45µm em solução de SBF e das amostras de fibra de 45µm em solução normatizada de degradação (ISO 10993-14).

Esse comportamento pode sugerir que com o tempo de exposição do vidro à solução, as reações para a formação da camada de HCA vão ocorrendo e a mesma vai se tornando mais espessa. Desta forma, esta camada relativamente espessa funciona então, como uma barreira que reduz a lixiviação do vidro (o que pode ser inferido pela menor perda de massa em alguns horários de ensaio caracterizados por picos descendentes nos gráficos apresentados). No entanto, devido as amostras estarem em agitação durante o ensaio, a camada pode ter se trincado ou, até mesmo, se destacado da superfície do vidro, fazendo com que uma nova camada de vidro seja exposta e abrindo espaço para que ocorra nova lixiviação da sua superfície. Com essa nova superfície livre para o processo de trocas iônicas e mecanismos bioativos, há então a formação da HCA novamente, o seu relativo espessamento de camada, o processo de trinca e/ou fissura e a conseqüente nova lixiviação, caracterizando assim um ciclo de degradação.

Vale ressaltar que esta hipótese é colocada já que este comportamento foi observado repetidamente em diferentes condições e amostras. Mas sabe-se que devido a limitação da técnica de análise, o erro intrínseco e o desvio padrão obtido, esta é apenas uma suposição para explicar o fenômeno ocorrido.

Em relação aos resultados de degradação encontrados para as diferentes soluções é possível observar uma variação mais intensa para a solução SBF-K9, isto provavelmente ocorreu, pois esta solução se encontra supersaturada e pequenas variações na concentração iônica podem levar a precipitação de fases cristalinas, o que aumenta a massa da amostra inicialmente. Mas, seguindo o raciocínio proposto acima, o destacamento desta camada de grande espessura também causa uma perda de massa mais evidente durante a análise da amostra no próximo tempo experimental. Porém, novamente não se observou diferença estatística significativa (por meio do Teste T) entre a degradação das amostras nas diferentes soluções para ambos os diâmetros estudados.

6.3.2.2.3.1 Espectroscopia de Infravermelho e Microscopia eletrônica de varredura

Nas Figuras 6.44 a 6.47 temos os espectros de infravermelho dos ensaios de degradação das amostras na forma de fibra nos tamanhos de 25 e 45 μm , assim como as micrografias de suas superfícies.

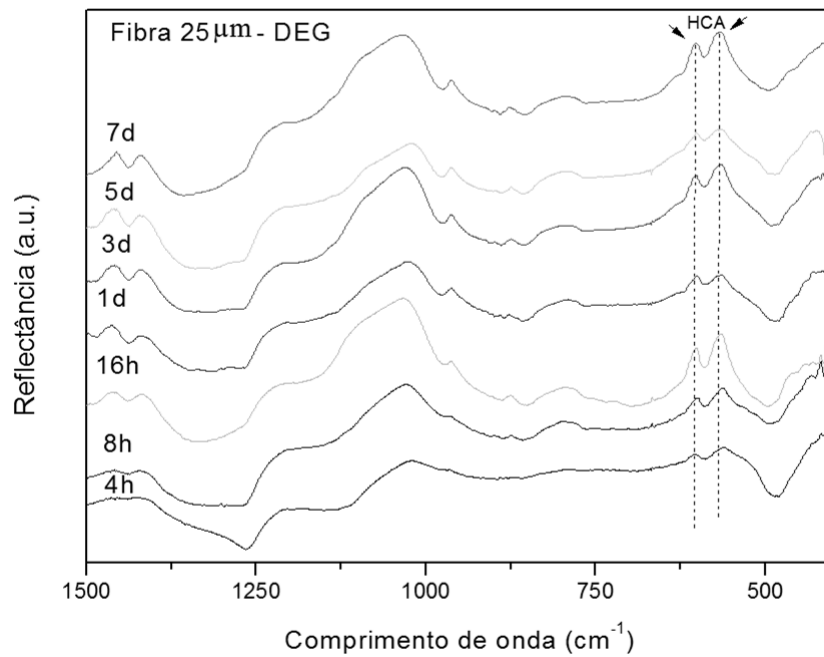


Figura 6.44 – Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em fibra de 25 μm em solução normatizada de degradação ISO 10993-14 nos períodos de 4, 8 e 16h, 1, 3, 5 e 7 dias.

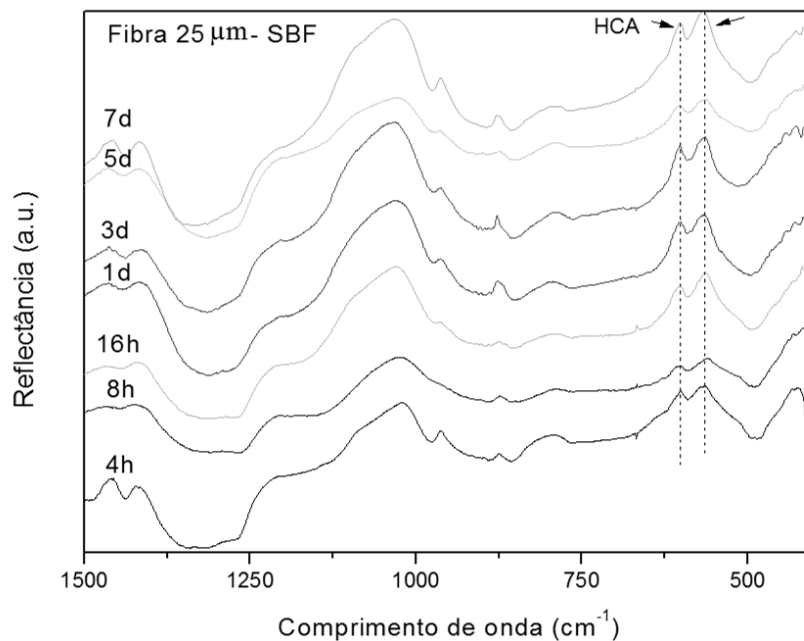


Figura 6.45 – Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em fibra de 25 μm em solução normatizada de SBF nos períodos de 4, 8 e 16h, 1, 3, 5 e 7 dias.

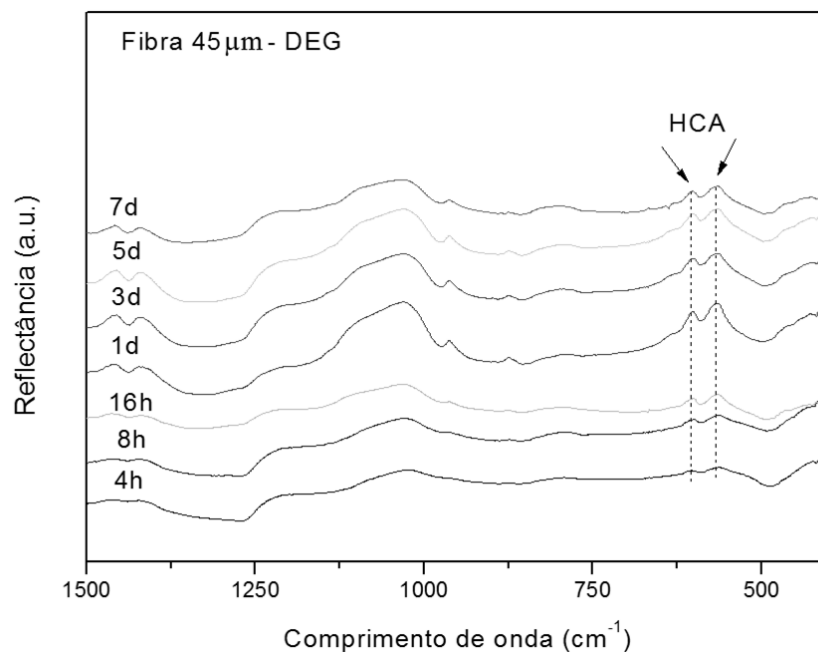


Figura 6.46 – Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em fibra de 45 μm em solução normatizada de degradação ISO 10993-14 nos períodos de 4, 8 e 16h, 1, 3, 5 e 7 dias.

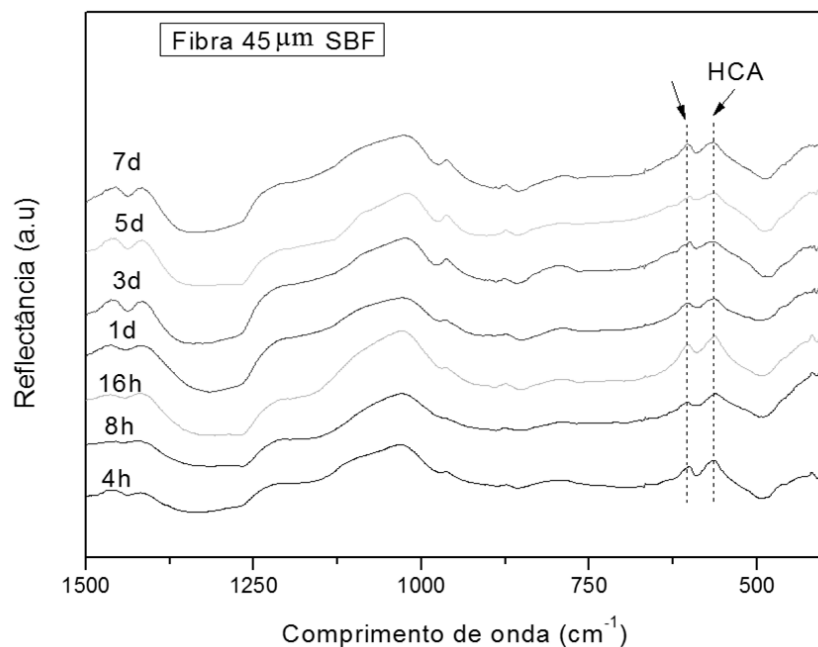


Figura 6.47 – Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra em fibra de 45 μm em solução de SBF nos períodos de 4, 8 e 16h, 1, 3, 5 e 7 dias.

Os espectros de FTIR e as micrografias das superfícies das amostras evidenciam a formação da camada de HCA, visto que na região de 560 e 610 cm^{-1} observa-se o pico característico referente a esta camada formada na superfície das amostras [4,81]. Em todos os períodos analisados e para ambos os tamanhos de fibra foi identificada nos espectros a formação da camada de hidroxicarbonatoapatita, mesmo nos períodos experimentais iniciais. Em apenas 4 horas, principalmente para a solução SBF, é possível a clara detecção dos picos referentes à fase HCA. Esta rápida formação deve-se a alta área superficial deste tipo de amostra tornando-as altamente reativas e acelerando as reações de precipitação da fase cristalina HCA. O mesmo ocorreu para as amostras na forma de pó (seção 6.3.2.2.2), a fase HCA foi detectada a partir do primeiro período experimental analisado, fato este que mostra o potencial bioativo das fibras de nova composição desenvolvida.

As Figuras 6.48 a 6.51 são referentes às micrografias das superfícies das amostras de fibras nas diferentes condições estudadas.

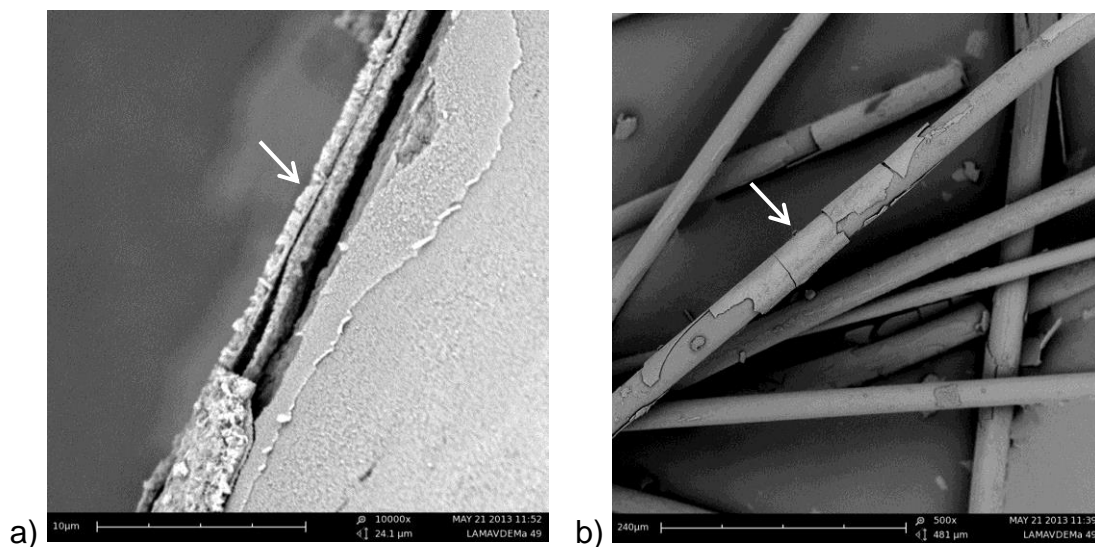


Figura 6.48 - Micrografia da amostra em fibra 25 μm em solução de degradação ISO 10993-14 por 4 horas (a) aumento de 10000x e (b) aumento de 5000x (seta – HCA).

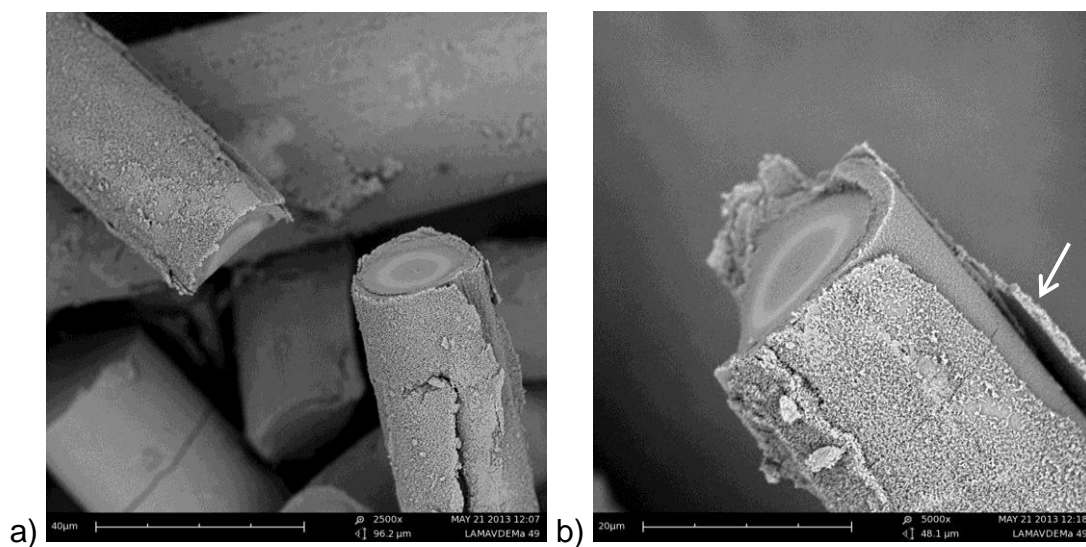


Figura 6.49- Micrografia da amostra em fibra 25µm em solução de SBF por 4 horas (a) aumento de 2500 e (b) aumento de 5000x (seta – HCA).

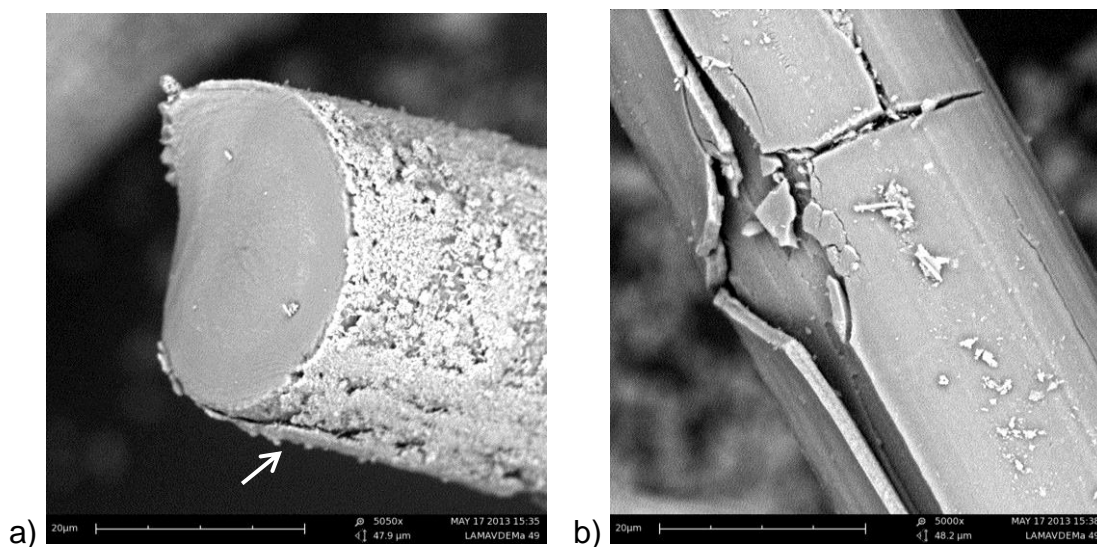


Figura 6.50 - Micrografia da amostra em fibra 45µm em solução de degradação ISO 10993-14 por 4 horas (a) aumento de 5050x e (b) aumento de 5000x (seta – HCA).

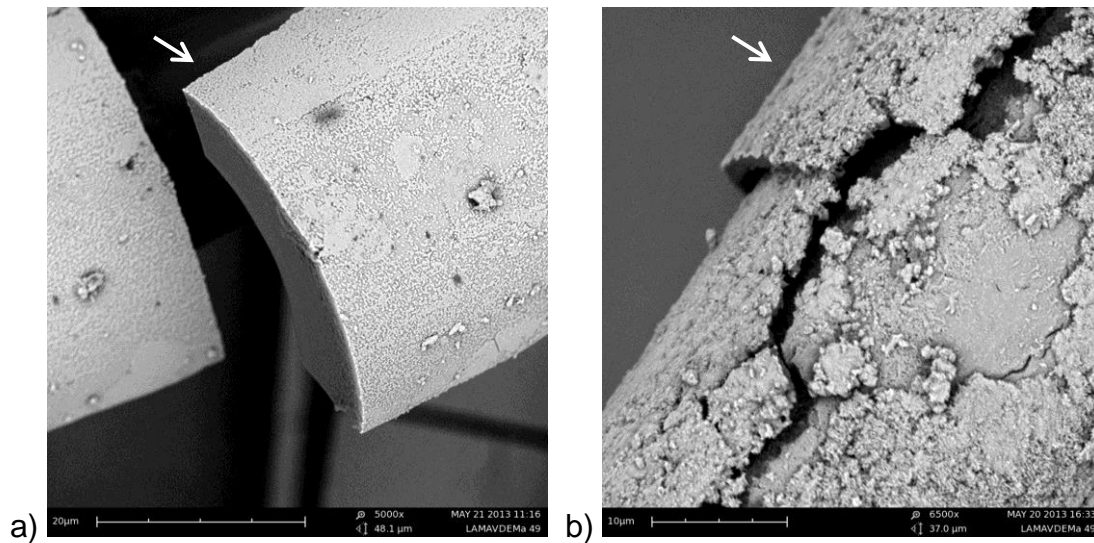


Figura 6.51 - Micrografia da amostra em fibra 45µm em solução de SBF por 4 horas (a) aumento de 5000x e (b) aumento de 6500x (seta – HCA).

Nas Figuras 6.48 a 6.51, referentes às micrografias das amostras de fibras de 25 e 45µm de diâmetro, é possível notar que, já em 4 horas, foi formada a camada de HCA, como os espectros de FTIR constataram. É notável também a degradação sofrida pelas mesmas, resultando na construção de camadas distintas em torno da fibra, que eventualmente se trincaram e/ou destacaram da superfície durante o ensaio ou após o processo de secagem do material.

A formação destas camadas indica que os cinco estágios característicos que levam a formação da HCA, extensivamente explorados na literatura [1,4,10,81], aconteceram de maneira bastante acelerada devido à grande área superficial deste tipo de amostra.

As Figuras 6.52 a 6.59 apresentam as micrografias das amostras dos tempos de ensaios subsequentes de 8, 24 e 168 horas.

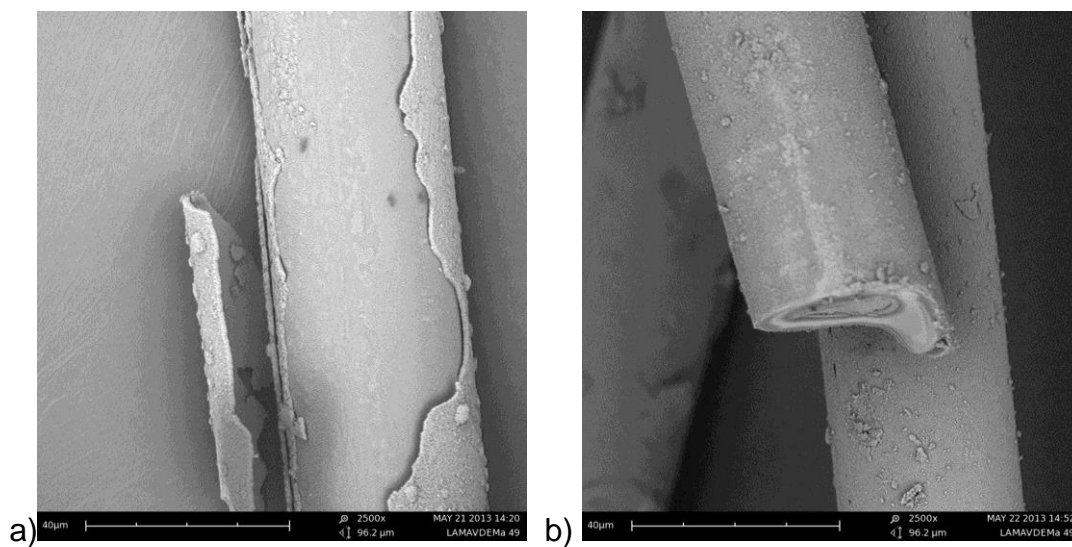


Figura 6.52 - Micrografia da amostra em fibra 25µm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 e (b) em solução de SBF por 8 horas (aumento de 2500x).

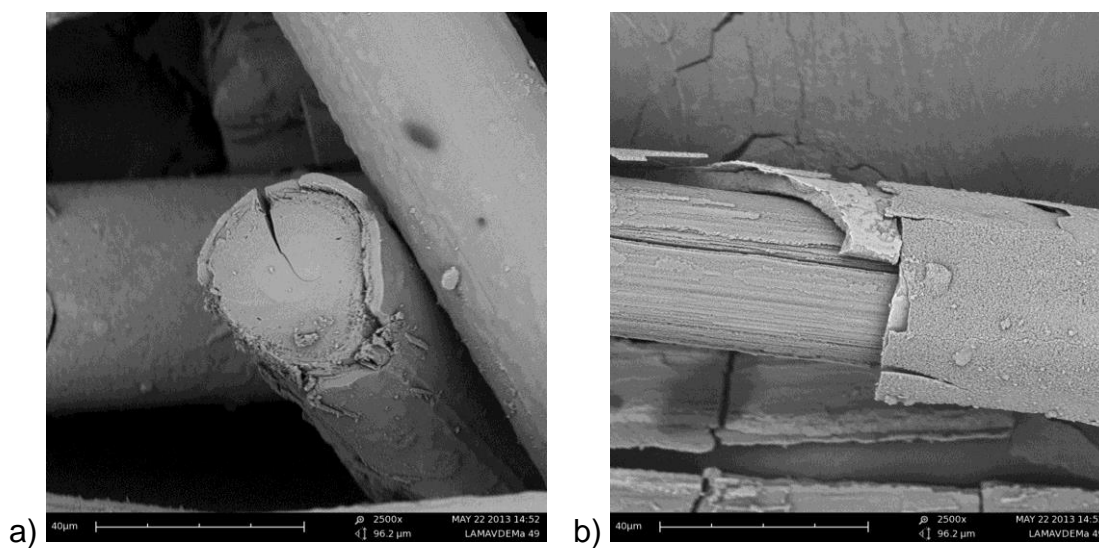


Figura 6.53 - Micrografia da amostra em fibra 45µm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 e (b) em solução de SBF por 8 horas (aumento de 2500x).

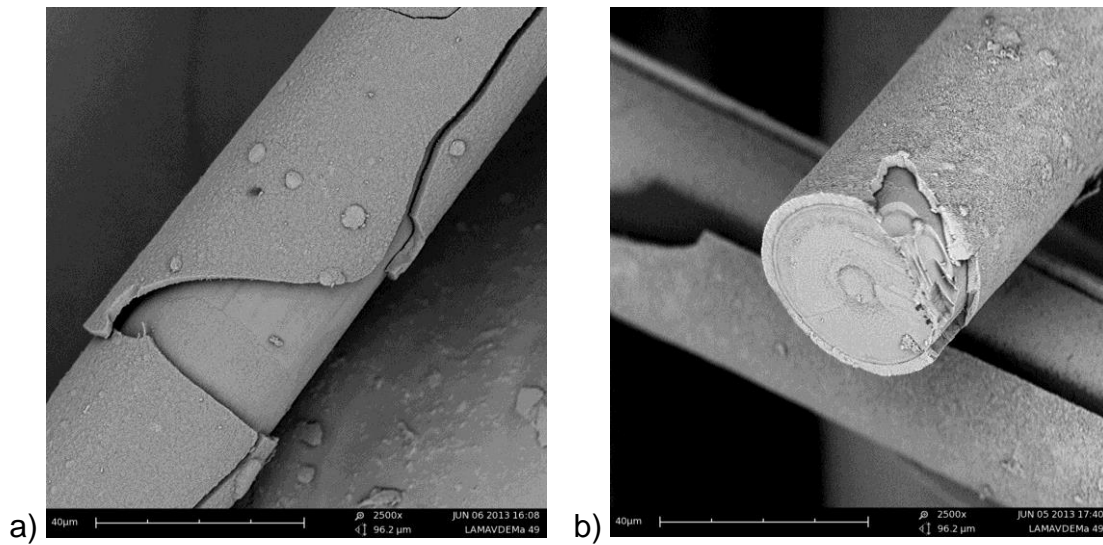


Figura 6.54 - Micrografia da amostra em fibra 25µm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 (aumento de 2500x) e (b) em solução de SBF por 24 horas (aumento de 2500x).

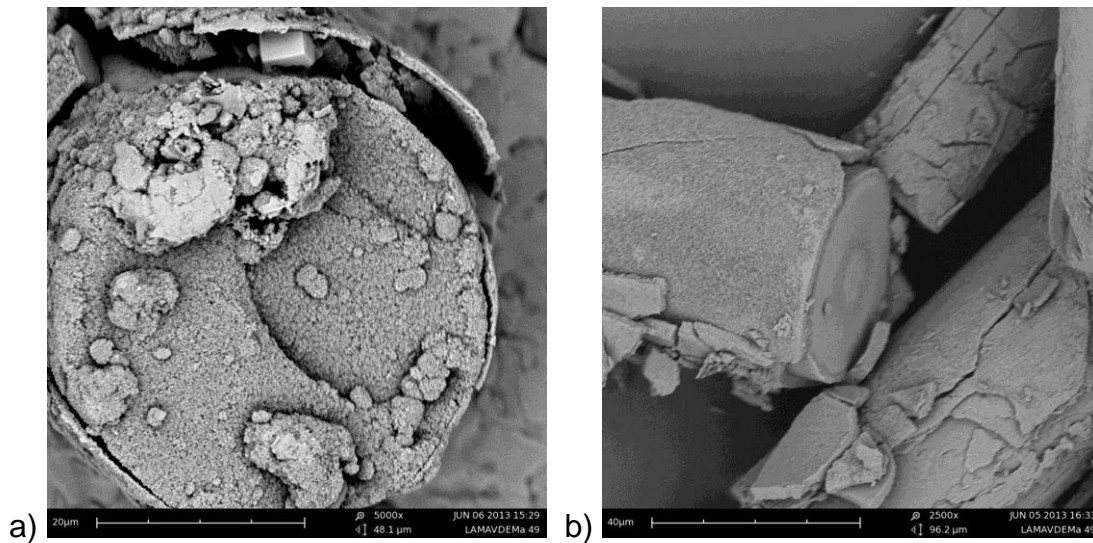


Figura 6.55 - Micrografia da amostra em fibra 45µm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 (aumento de 5000x) e (b) em solução de SBF por 24 horas (aumento de 2500x).

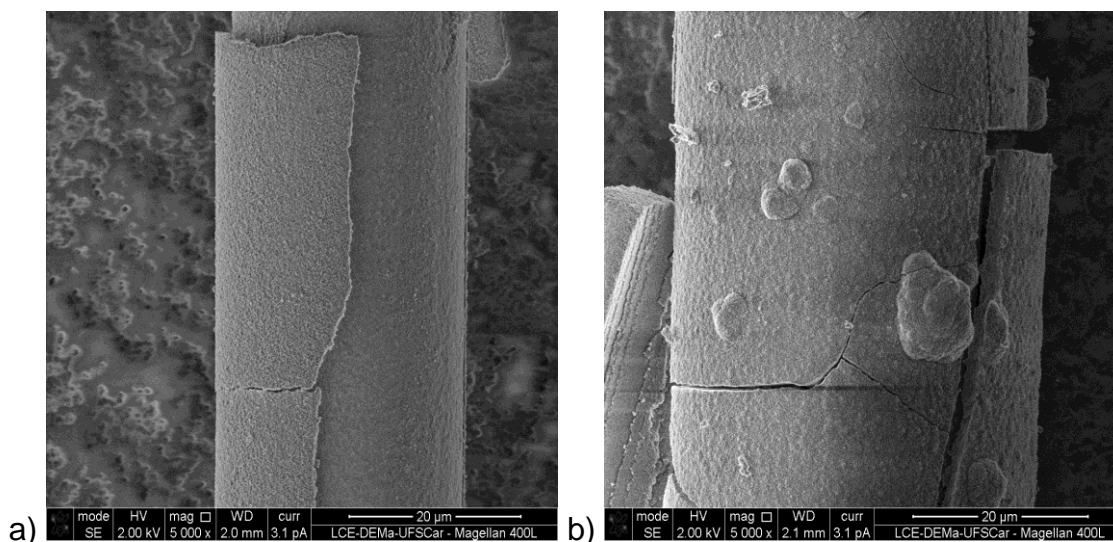


Figura 6.56 - Micrografia da amostra em fibra 25µm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 (aumento de 5000x) e (b) em solução de SBF por 5 dias (aumento de 5000x).

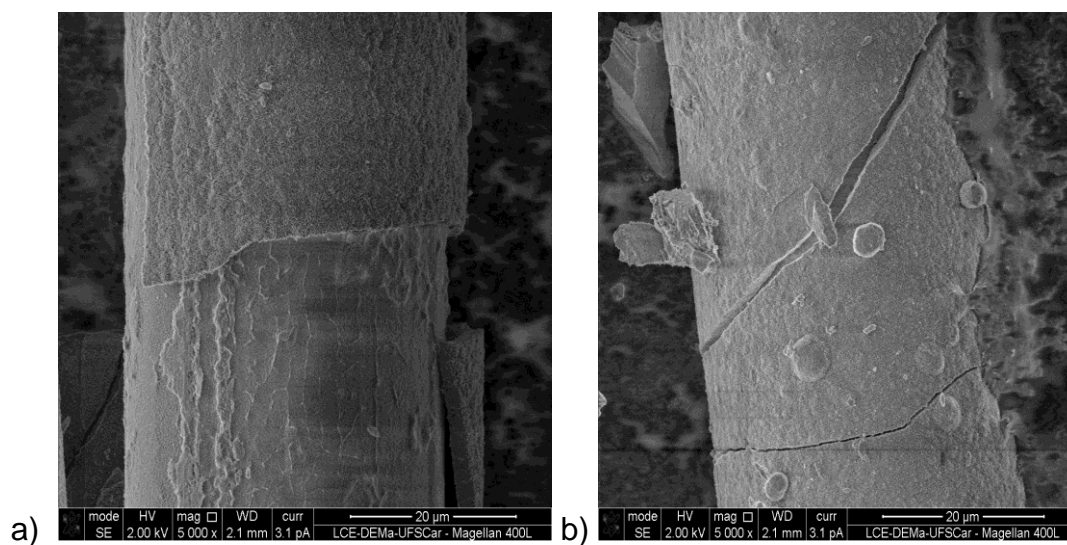


Figura 6.57 - Micrografia da amostra em fibra 45µm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 (aumento de 5000x) e (b) em solução de SBF por 5 dias (aumento de 5000x).

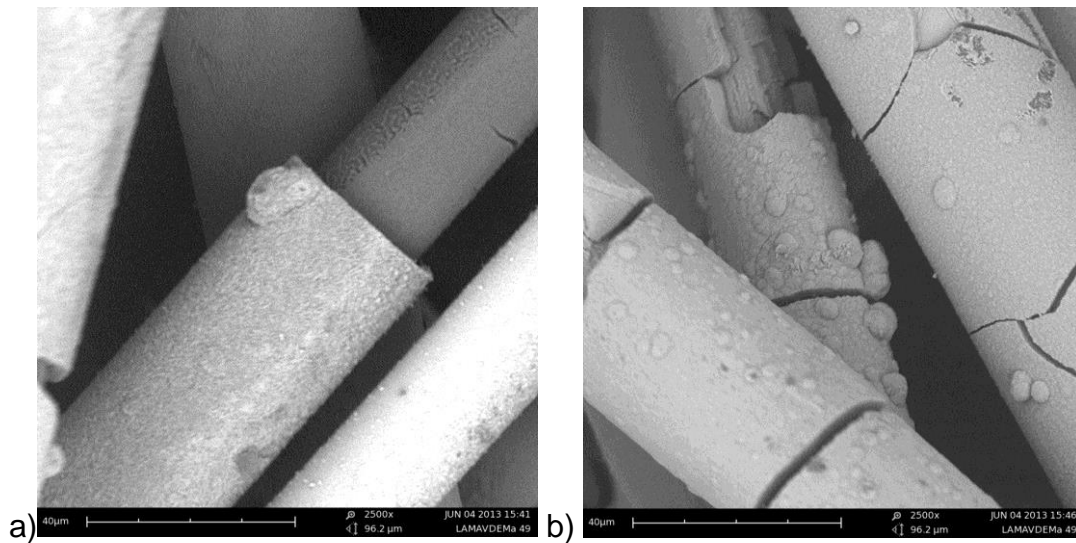


Figura 6.58 - Micrografia da amostra em fibra 25µm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 (aumento de 2500x) e (b) em solução de SBF por 7 dias (aumento de 2500x).

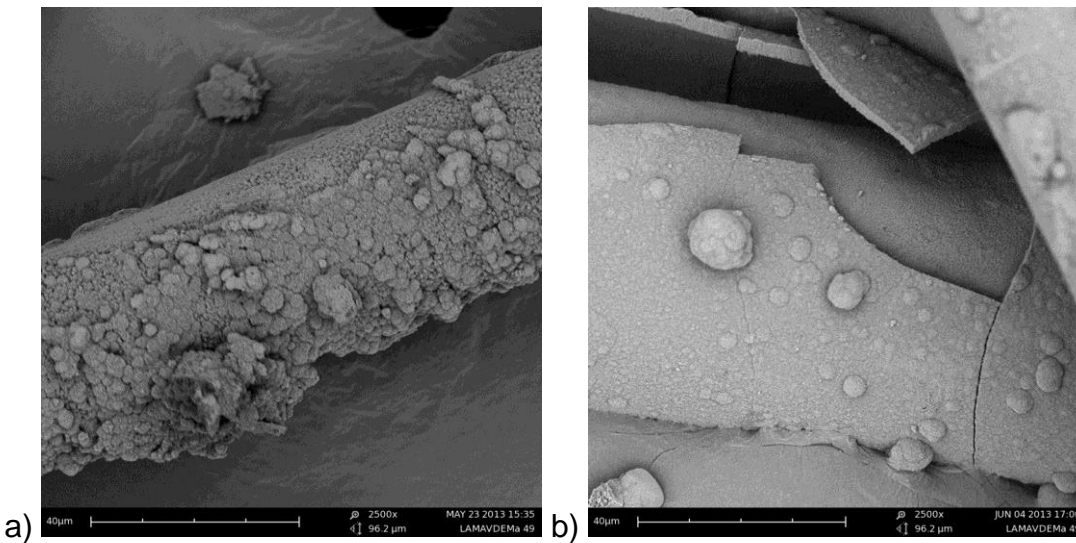


Figura 6.59 - Micrografia da amostra em fibra 45µm em (a) solução de degradação ISO 10993-14 (aumento de 2500x) e (b) em solução de SBF por 7 dias (aumento de 2500x).

Os ensaios subsequentes (Figuras 6.52 a 6.59) revelam a presença e o espessamento da camada de HCA sobre a superfície das fibras para ambas os tamanhos e soluções.

É possível notar que a morfologia da camada é caracterizada por glóbulos agrupados e bem definidos característicos da HCA, que com o tempo vão aumentando em tamanho e quantidade. A espessura atingida, após 7 dias, para a camada foi de aproximadamente 8 μm para a solução de SBF e de 4 μm para a solução de degradação para as fibras de 25 μm e de 7,5 μm para a solução de SBF e de 3,5 μm para a solução de degradação para as fibras de 45 μm . Porém, como mencionado anteriormente, análises por meio do Teste T mostraram que não houve diferença estatística para a degradação das amostras nas diferentes soluções e para as os diferentes diâmetros de fibras. Quando comparamos a espessura da camada formada para as fibras de F18 e de 13-93 (45 μm), por meio de dados da literatura [43], vemos que o vidro F18 é drasticamente mais reativo, visto que a camada de Ca-P formada para o 13-93 em um período de 5 semanas (840 horas) em solução de SBF é de aproximadamente 1,5 μm , já o F18 leva apenas 24 a 72 horas para formar uma camada com esta espessura.

Em praticamente todas as imagens é possível observar um destacamento da camada de HCA da superfície das amostras. Este fato reforça a suposição adotada anteriormente sobre os resultados de perda de massa das amostras devido ao ciclo de degradação suposto inferido pelos gráficos, pois apesar destas trincas terem provavelmente ocorrido durante a secagem e preparação de amostra para a análise de MEV, este fato evidencia a fragilidade da camada e seu fácil destacamento da superfície.

Como o material pretende ser aplicado *in vivo* na forma de fibras, a quantificação dos íons lixiviados durante sua degradação faz parte do conjunto de informações importantes para a previsão de seu comportamento no meio biológico. Portanto, na seção 6.3.2.2.3.2 apresentam-se aos resultados obtidos na quantificação dos íons Ca, Na, K, P e Si lixiviados para as soluções em relação ao tempo.

6.3.2.2.3.2 Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma (ICP-OES)

Para as amostras em forma de fibras foi realizado o ensaio de ICP-OES a fim de se quantificar a taxa de degradação bem como compará-la com os dados já obtidos.

Este ensaio foi realizado para esta forma de amostra, pois é no formato de fibras que se deseja sua utilização *in vivo*, portanto, o entendimento de taxa de lixiviação iônica para o meio é de extrema relevância.

As curvas obtidas pelos dados fornecidos para o ensaio de ICP para os diferentes tamanhos de fibras e diferentes soluções são mostradas nas Figuras 6.60 a 6.65.

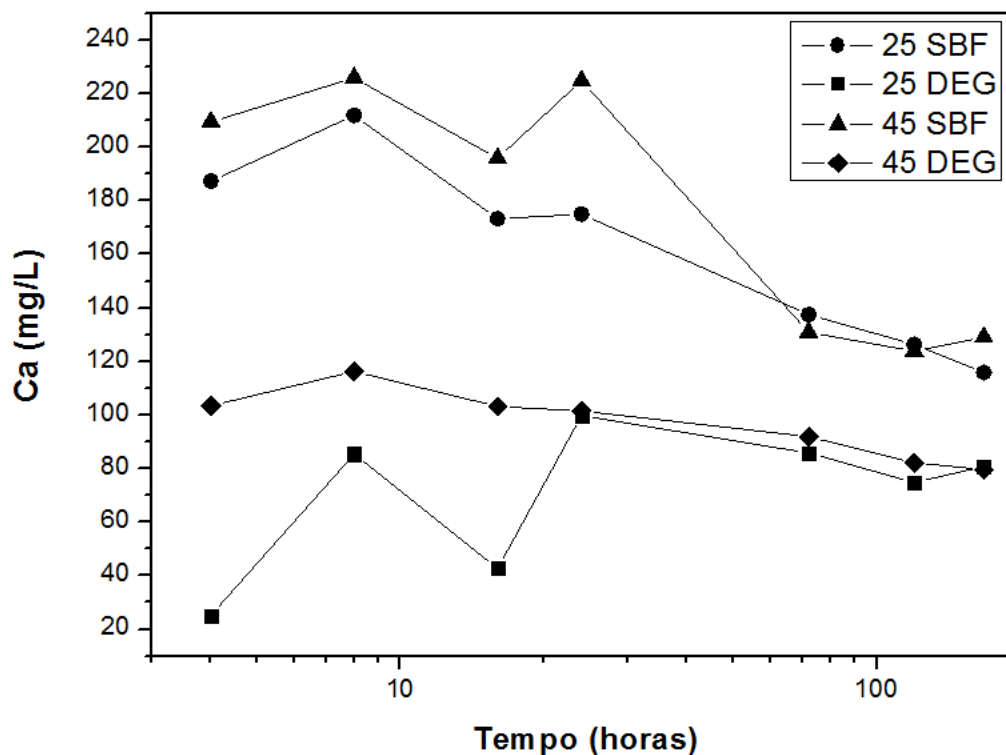


Figura 6.60 – Quantificação iônica de cálcio nas soluções de degradação ISO 10993-14 e SBF para fibras de 25 e 45 μm de diâmetro.

A Figura 6.60 apresenta a quantificação iônica de cálcio nas soluções de degradação e SBF. Para este elemento, percebe-se um pico de sua

concentração em 8 horas, seguida por uma queda gradual com o tempo. Esta queda provavelmente está ligada ao consumo deste elemento para a formação e precipitação das camadas de fosfato de cálcio amorfo para posteriormente, cristalização da camada de HCA [1,4]. Em comparação aos resultados obtidos para o vidro na forma de pastilhas, vemos a mesma tendência, porém ocorrendo mais rapidamente e com uma concentração maior do elemento para a forma de fibras, devido a maior área superficial deste tipo de amostra [81,83]. Este fato corrobora com os resultados que apresentam a formação da camada de HCA em 4 horas para as amostras na forma de fibras e apenas em 12 horas para as amostras monolíticas.

Nota-se também que para a solução SBF, os valores apresentados são mais altos, visto que a mesma apresenta este elemento em sua composição em uma concentração similar a porção iônica do plasma sanguíneo [60], já a solução de degradação ISO 10993-14 somente possui TRIS e HCl em sua composição, portanto, apresentou valores que referem-se, em princípio, apenas a quantidade de Ca lixiviada pelo vidro bioativo.

É importante notar que a amostra 25 DEG, que corresponde às fibras de 25 μm de diâmetro e testadas em solução de degradação ISO 10993-14, demonstrou para todas as análises em 16 horas uma queda na concentração iônica para todos os íons analisados, isso deve ter ocorrido devido à precipitação dos componentes entre os períodos de finalização dos ensaios e realização dos testes de ICP.

As Figuras 6.61 e 6.62 apresentam a quantificação iônica de sódio nas soluções de degradação ISO 10993-14 e SBF, respectivamente.

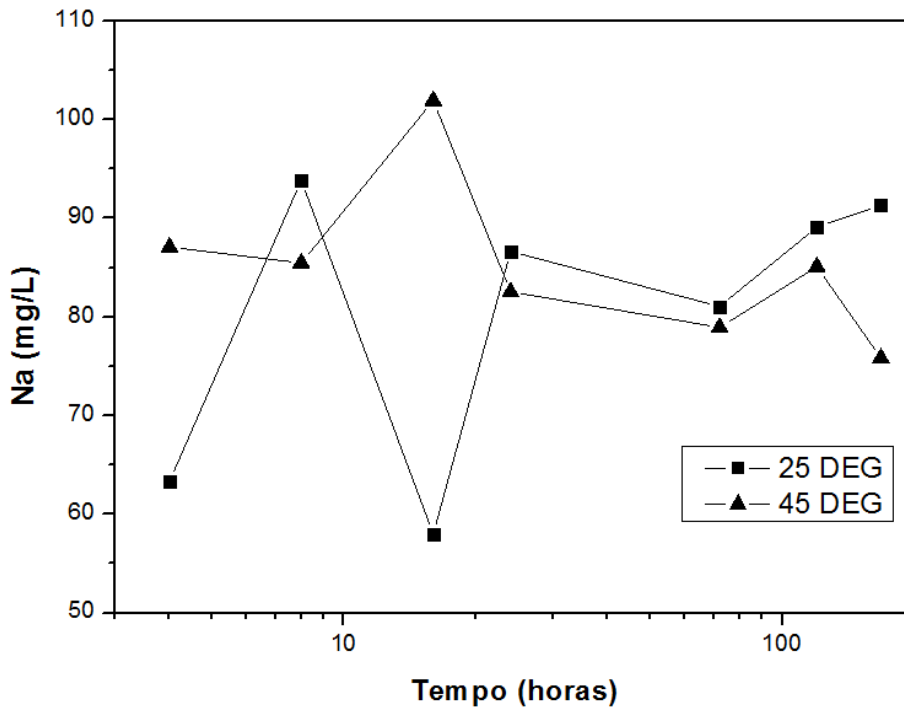


Figura 6.61 - Quantificação iônica de sódio na solução de degradação durante o ensaio com fibras de 25 e 45 μm de diâmetro.

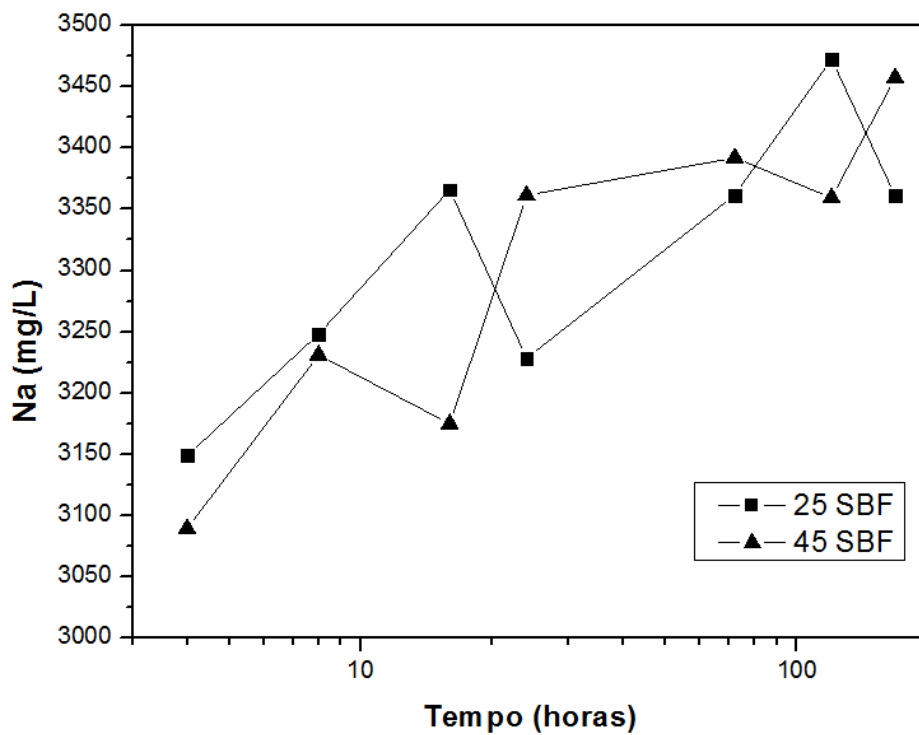


Figura 6.62 - Quantificação iônica de sódio na solução de SBF durante o ensaio com fibras de 25 e 45 μm de diâmetro.

As Figuras 6.61 e 6.62 apresentam a quantificação iônica de sódio nas soluções de degradação ISO 10993-14 e SBF, respectivamente.

De maneira geral, a concentração de Na também apresenta a mesma tendência das amostras monolíticas, aumentando seu valor com o tempo. Devido a grande quantidade do íon na solução, precipitações de sais podem ter ocorrido durante o experimento, portanto, há uma variação dos dados obtidos.

Novamente, há uma discrepância dos valores apresentados pelas soluções, devido a solução de SBF já conter inicialmente aproximadamente 3075 mg/L de sódio em sua formulação. Como podemos observar, este íon é rapidamente lixiviado no estágio I de degradação, apresentando valores de concentração elevados desde o primeiro período experimental [1].

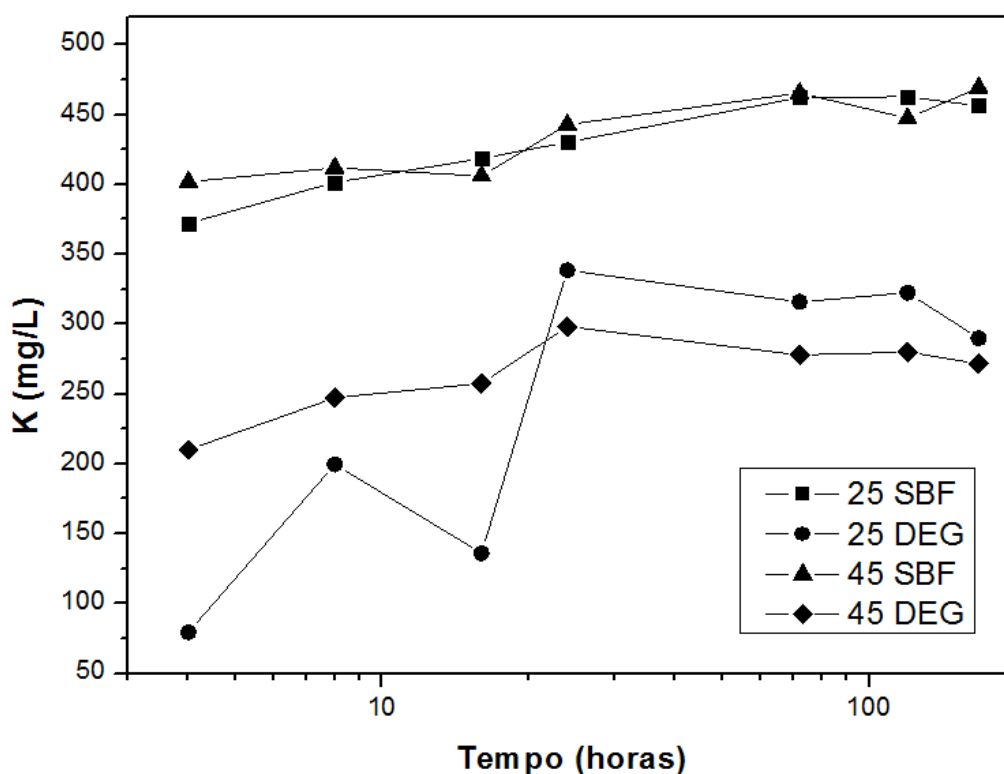


Figura 6.63 – Quantificação iônica de potássio nas soluções de degradação e SBF durante o ensaio de degradação das fibras de 25 e 45 μm de diâmetro.

A Figura 6.63 refere-se à lixiviação dos íons de potássio nas soluções de degradação e SBF. Nota-se uma lixiviação contínua do elemento, já que o

mesmo não é consumido durante a formação das camadas de fosfato de cálcio amorfo e HCA, este comportamento foi similar ao apresentado pelo sódio.

Portanto, para este elemento vemos também a mesma tendência apresentada pelas amostras na forma monolítica, porém, com uma taxa maior de lixiviação devido a maior área superficial das fibras, como esperado.

A Figura 6.64 apresenta a quantificação iônica de fósforo nas soluções de degradação e SBF.

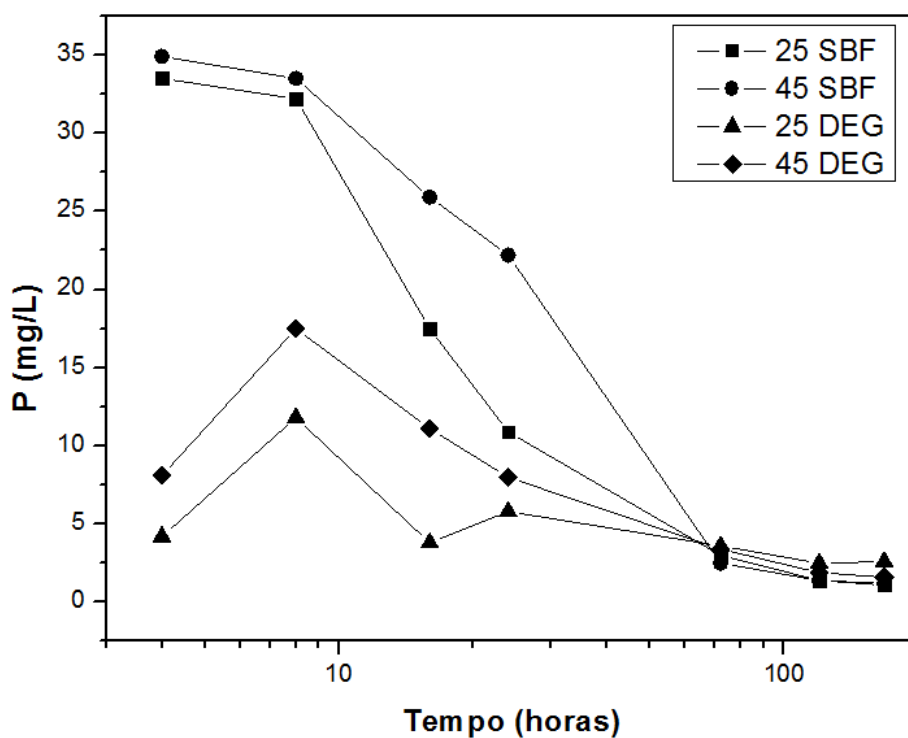


Figura 6.64 – Quantificação iônica de fósforo nas soluções de degradação e SBF durante o ensaio de degradação das fibras de 25 e 45 μm de diâmetro.

A concentração de P na solução possui um pico nos estágios iniciais analisados e, que em seguida, diminui continuamente com o tempo, o que pode ser atribuído ao desenvolvimento da camada de fosfato de cálcio amorfo (Ca-P) e também de HCA. Esta tendência também é observada para as amostras monolíticas, mas, como mencionado anteriormente, devido a alta reatividade do vidro na forma de fibras, a lixiviação ocorre de maneira acelerada, mostrando o pico de concentração em aproximadamente 34 mg/L,

para solução SBF, em apenas 4 horas. Estes valores só são alcançados para as amostras monolíticas após 8 horas de ensaio. O consumo deste elemento também é acelerado, já que os níveis finais apresentados chegam a 3 mg/L após 7 dias, enquanto para as pastilhas de vidro os valores apresentado ficam em aproximadamente 15 mg/L.

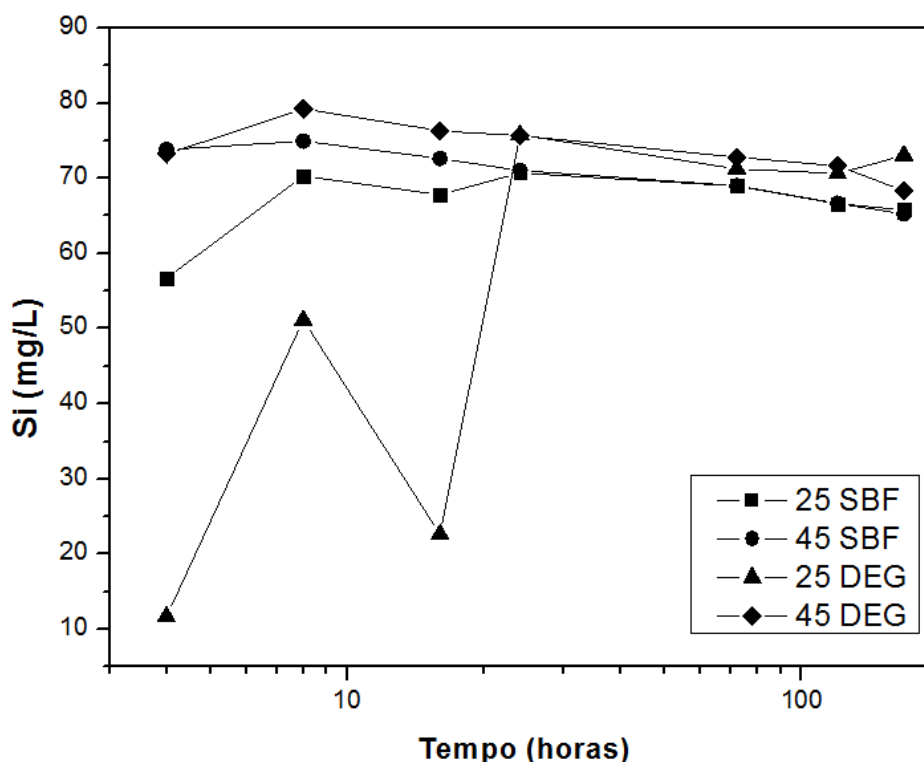


Figura 6.65 – Quantificação iônica de silício nas soluções de degradação e SBF durante o ensaio de degradação das fibras de 25 e 45 μm de diâmetro.

Na Figura 6.65, temos a quantificação de Si apresentada. Para este elemento é interessante notar a velocidade de lixiviação ocorrida, já que em apenas 4 horas, alcançou-se até 55mg/L para a solução de degradação ISO 10993-14 e 75 mg/L para a solução de SBF. Os dados coletados com as amostras monolíticas e dados na literatura indicam que em uma solução de SBF-K9 espera-se que somente após 16h de ensaio a quantidade de sílica presente na solução esteja por volta de 55mg/L para amostras monolíticas [85]. Novamente, este fato pode estar ligado ao aumento de área superficial das

amostras na forma de fibras, que permitiu uma maior taxa de liberação destes íons para solução. Nos períodos experimentais vemos um patamar, provavelmente devido a formação da camada de sílica-gel e subsequente formação das camadas de CaP amorfo e HCA, este fenômeno também é observado para o vidro 45S5 [1,4,85].

6.3.2.2.4 Tecido Vítreo

A realização dos testes de degradação para este formato de amostra deveu-se a necessidade da verificação se a presença do *coating* reabsorvível influenciaria na taxa de dissolução do material vítreo, assim como se a grande densidade de fibras afetaria a degradação e a formação da camada de HCA.

Os resultados obtidos por meio dos ensaios com as amostras em tecido vítreo apresentou um comportamento de perda de massa e pH similar àquele obtido com as amostras em forma de fibra e na forma de pó. Portanto, mais uma evidência de que a presença da camada polimérica não interfere significativamente nas reações de degradação do vidro bioativo F18.

Nas Figuras 6.66 e 6.67, têm-se os resultados obtidos da degradação desse tipo de amostra.

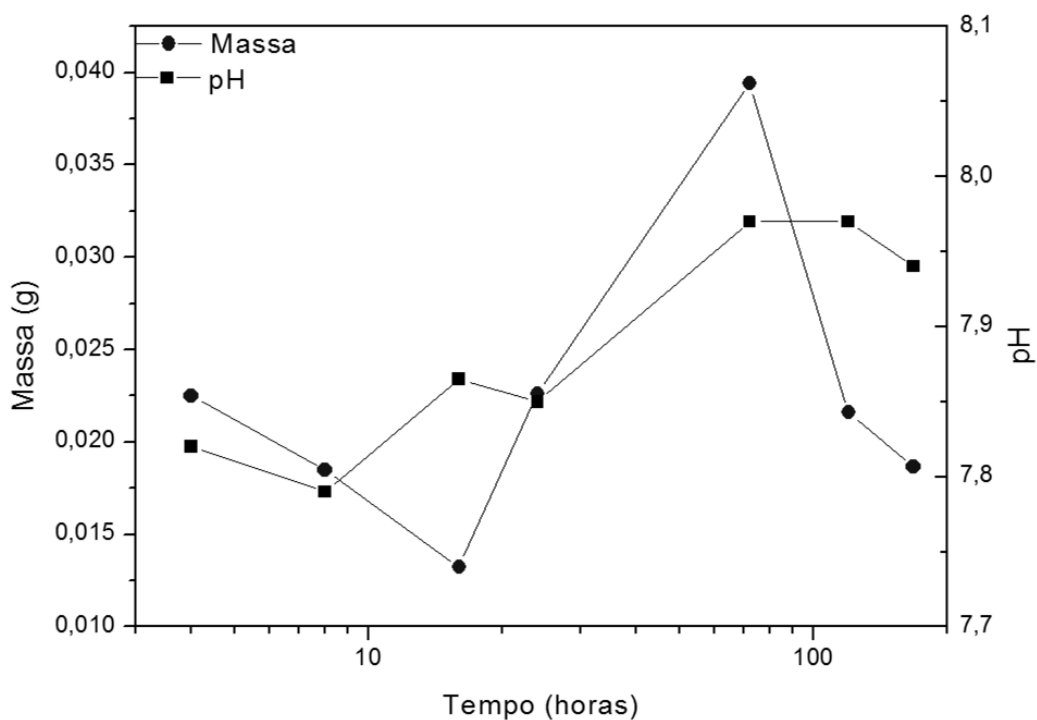


Figura 6.66 - Perda de massa das amostras de tecido vítreo em solução de SBF e pH em relação ao tempo de ensaio

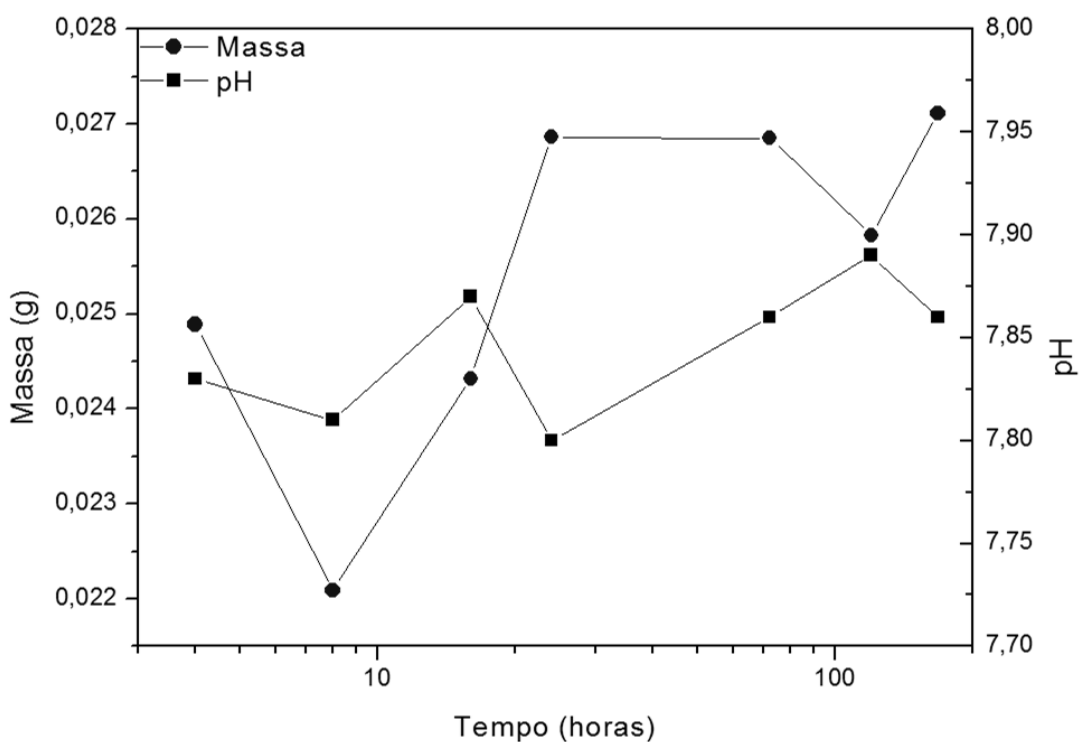


Figura 6.67 - Perda de massa das amostras de tecido vítreo em solução normatizada de degradação e pH em relação ao tempo de ensaio.

6.3.2.2.4.1 Espectroscopia de Infravermelho e Microscopia Eletrônica de Varredura

Os espectros de infravermelho e as micrografias das superfícies de tecido vítreo obtidos apresentam resultados semelhantes aos encontrados para as fibras de vidro (Figura 6.68).

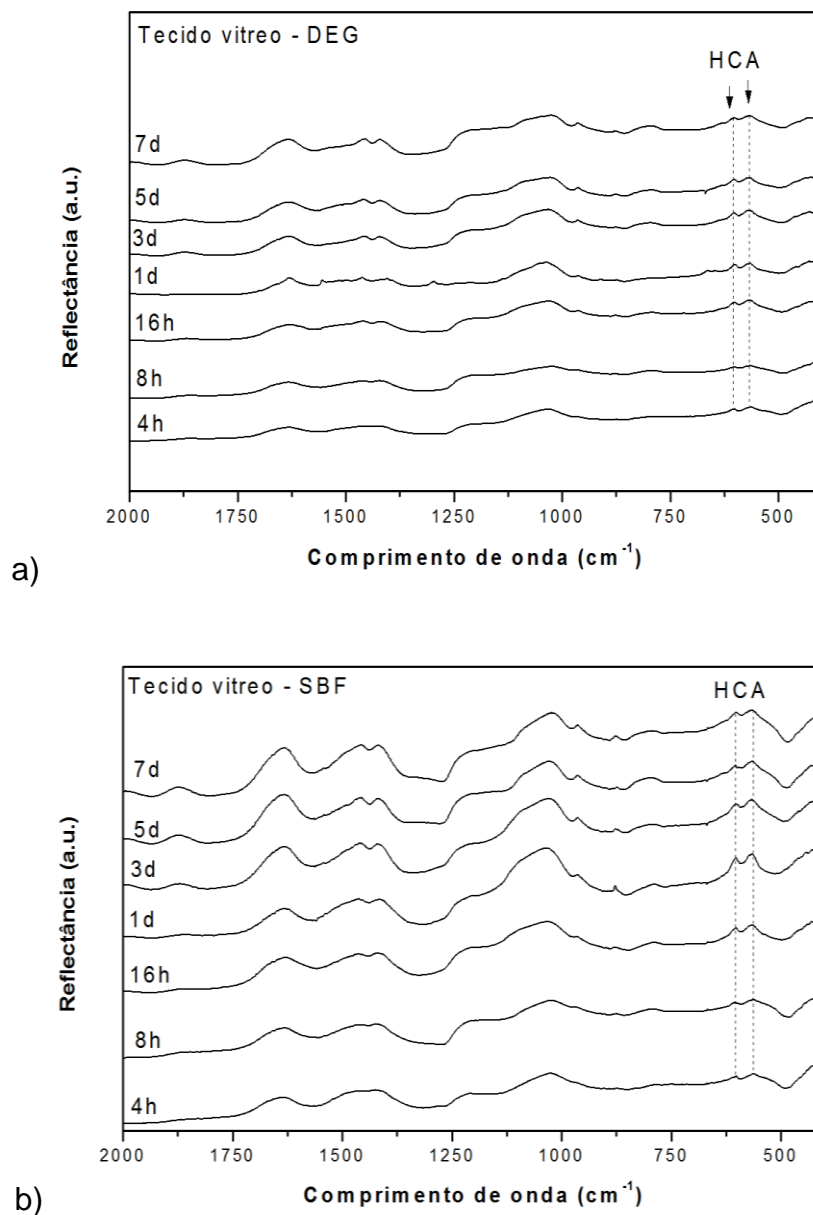


Figura 6.68 – Espectros de infravermelho dos ensaios de degradação da amostra de tecido vítreo em solução normatizada de degradação ISO 10993-14 (a) e SBF-K (b) nos períodos de 4, 8 e 16h, 1, 3, 5 e 7 dias.

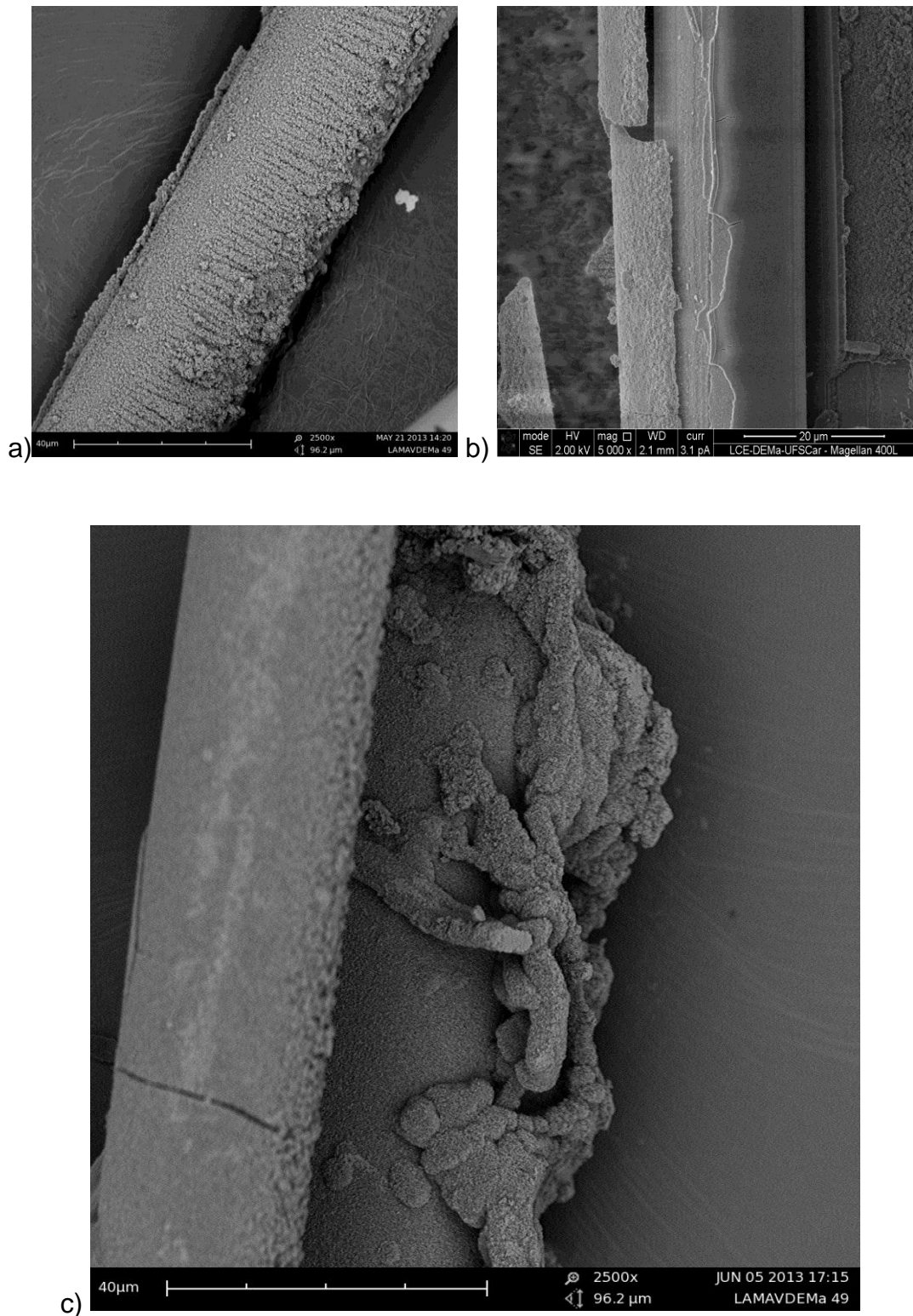


Figura 6.69 - Micrografia da amostra de tecido vítreo em solução de degradação por (a) 4 horas, (b) 16 horas e (c) 24 horas.

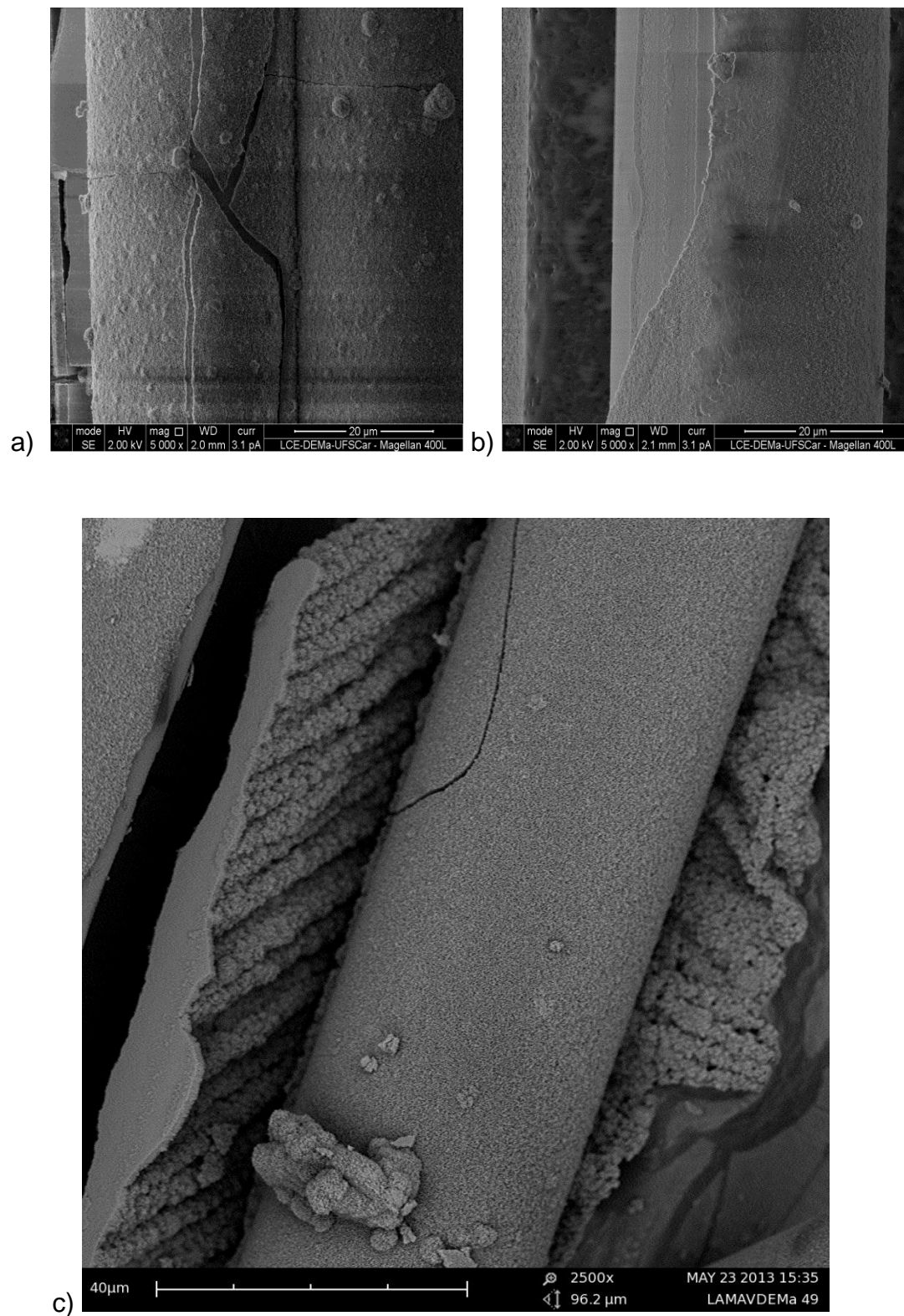


Figura 6.70 - Micrografia da amostra de tecido vítreo em solução de degradação por (a) 3 dias, (b) 5 dias e (c) 7 dias.

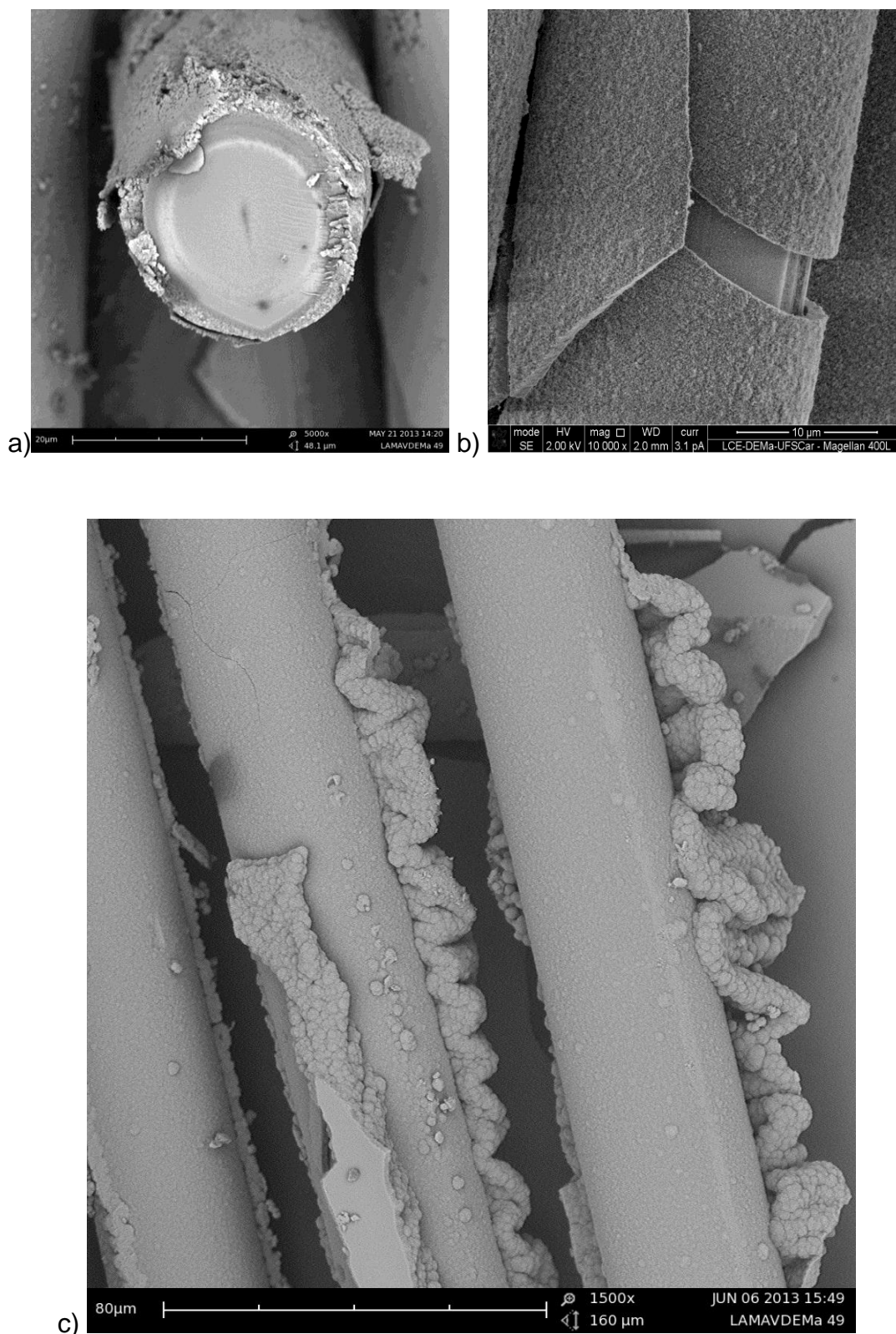


Figura 6.71 - Micrografia da amostra de tecido vítreo em solução de SBF por (a) 4 horas, (b) 16 horas e (c) 24 horas.

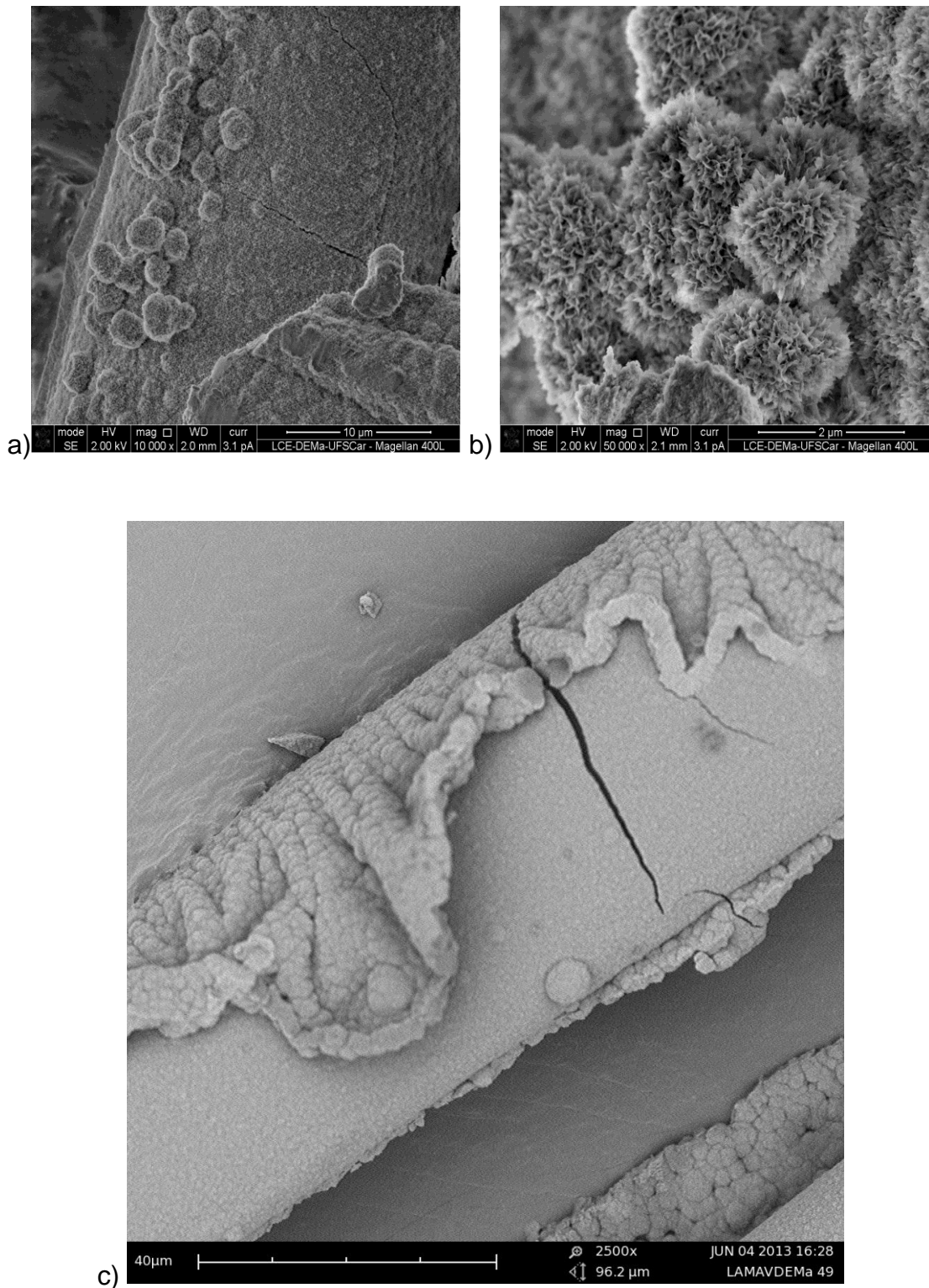


Figura 6.72 - Micrografia da amostra de tecido vítreo em solução de degradação por (a) 3 dias, (b) 5 dias e (c) 7 dias.

Para as amostras de tecido vítreo observa-se, em todos os períodos, a formação da camada de hidroxicarbonatoapatita caracterizada pelo pico na

região de 560 e 610 cm^{-1} nos espectros de FTIR. Nas micrografias observa-se a mesma morfologia já vista anteriormente, que são os agrupados globulares característicos da HCA bem como a camada formada espessa e o desprendimento de partes da mesma. Um fato interessante é a estrutura alinhada de HCA formada entre as fibras, como as apresentadas nas Figuras 6.69 (a) e 6.70 (c). Possivelmente essas estruturas foram formadas devido ao microambiente rico em íons Ca e P na região provindos da lixiviação do vidro bioativo.

A partir dos resultados obtidos para todos os tipos de amostragem é possível fazer uma média para a perda de massa em relação ao tempo e quanto isso representou em porcentagem da massa inicial. Esses dados podem ser observados na Tabela 6.10.

Tabela 6.10 – Médias para a perda de massa por dia para os vidros F18 e 45S5.

Amostras	F18	45S5
Pastilha	7 mg/dia (1,75 %)	5,5 mg/dia (1%)
Pó	3 mg/dia (6%)	3,3 mg/dia (6,5%)
Fibras	3,5 mg/dia (7%)	-

Como pode ser observado na Tabela 6.10, os valores encontrados para os dois vidros, F18 e 45S5, são semelhantes para as diferentes formas de amostras, evidenciando mais uma vez a coerência dos testes estatísticos, que não mostraram diferença entre a degradação das duas composições vítreas. Vale lembrar que estes números são as médias dos valores de degradação e não representam fielmente a perda de massa, pois não é possível separar as reações de dissolução, que implicam em perda, e as precipitações de fases como fosfato de cálcio amorfo e HCA, que levam ao ganho de massa.

Estes resultados nos indicaram bons prognósticos em relação à utilização do novo vidro bioativo F18 em ensaios *in vitro* com células, *in vivo* e clínicos, já que a sua perda de massa e seu processo de lixiviação dos íons apresentam taxas semelhantes ao vidro *gold standard* 45S5.

Nas seções 6.4 e 6.5 são apresentados todos os resultados obtidos com os ensaios *in vitro* e *in vivo* para verificação da capacidade de interação e verificação do espectro de utilização desta nova formulação vítrea bioativa.

6.4 Ensaios In Vitro

6.4.1 Ensaios Acelulares

6.4.1.1 Ensaios de Remineralização Dental

Este ensaio buscou a verificação da capacidade do novo biomaterial para a remineralização de tecidos dentais (mais especificamente o esmalte) após procedimentos de clareamento com peróxido de hidrogênio a 35%.

Primeiramente, o desenvolvimento de um carreador que não interferisse nas propriedades das partículas teve de ser explorado. Neste sentido, a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) foi escolhida. Este polímero é largamente utilizado como espessante em soluções oftálmicas e na indústria alimentícia, sendo possível a obtenção de géis com diferentes viscosidades.

Para constatação da sua não interferência na taxa de dissolução e formação da camada de HCA, foi realizado ensaios de FTIR e MEV. Neste, foi possível observar a formação da camada de HCA em apenas 8 horas de exposição à solução de SBF-K9.

Na Figura 6.73 é possível observar a distribuição granulométrica das partículas obtidas, com diâmetro médio de 3 μ m, e a Figura 6.74 apresenta as partículas dispersas no gel de HPMC antes e depois do ensaio utilizando-se a solução SBF, seguindo os procedimentos utilizados por Kokubo *et al.* [60].

Posteriormente ao desenvolvimento do gel, o mesmo foi aplicado na superfície das amostras, sendo elas porções de dente bovino que passaram pelo processo de clareamento dental. Após o período de 12 horas, as amostras

foram analisadas qualitativamente e quantitativamente em relação aos íons Ca por meio da técnica LIBS.

A partir dos dados obtidos, foram feitas análises estatísticas (PCA) e constatou-se que o procedimento de clareamento dental (peróxido de hidrogênio 35%) resulta em uma perda mineral significativa do esmalte, aproximadamente 50% do Ca é perdido após o procedimento.

Após o uso do vidro F18 observou-se um ganho de aproximadamente 60% deste elemento, evidenciando a capacidade de remineralização deste novo material.

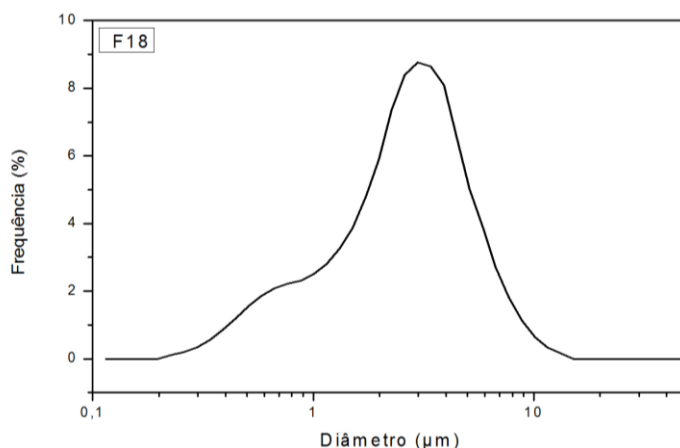


Figura 6.73 – Análise da faixa granulométrica para o pó do vidro bioativo F18.

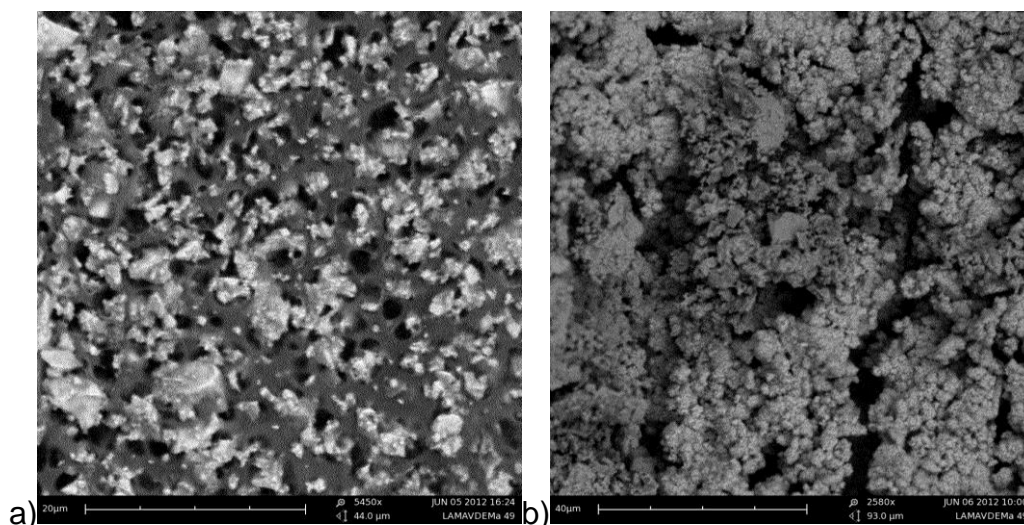


Figura 6.74 – Micrografias das amostras recoberta com o gel de HPMC e o pó do vidro F18 antes e depois dos ensaios de imersão em solução SBF-K9.

A aplicação do vidro F18, mesmo combinado com o gel de HPMC, conseguiu repor grande parte dos íons Ca perdidos durante o tratamento de clareamento, isto, provavelmente, se deve a rápida reação e dissolução do mesmo quando em contato com o meio aquoso, lixiviando grande quantidade de Ca para o meio, como observado nos ensaios de degradação mostrados na seção 6.3.2.2.3.2. Estes resultados corroboram com outros trabalhos evidenciando a ação remineralizadora para o vidro 45S5 e para a vitro-cerâmica Biosilicato [88,89,90].

Até o momento não há um procedimento padrão *gold standard* para o controle da desmineralização e hipersensibilidade dentinária pós-clareamento. A possibilidade do uso do vidro bioativo F18, principalmente na forma particulada com um diâmetro médio de 3 μm , representaria uma boa alternativa de tratamento, já que poderia devolver parte dos minerais perdidos durante o procedimento odontológico e também poderia obliterar os túbulos dentinários, que também possuem de 2,5 a 3 μm de diâmetro [91], diminuindo o desconforto do paciente após estes procedimentos e melhorando a saúde oral.

6.4.2 Ensaios Celulares

6.4.2.1 Ensaios de Adesão e Viabilidade

Os ensaios de MTT foram realizados para verificação da capacidade de adesão e viabilidade celular do vidro bioativo F18 em forma monolítica. Para isto, foram utilizadas células osteoblásticas UMR 106 em íntimo contato com o biomaterial pelos períodos de 1, 3 e 5 dias. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 6.75 a 6.77. Nestes estudos, o vidro 45S5 foi utilizado como controle positivo (Figura 6.76).

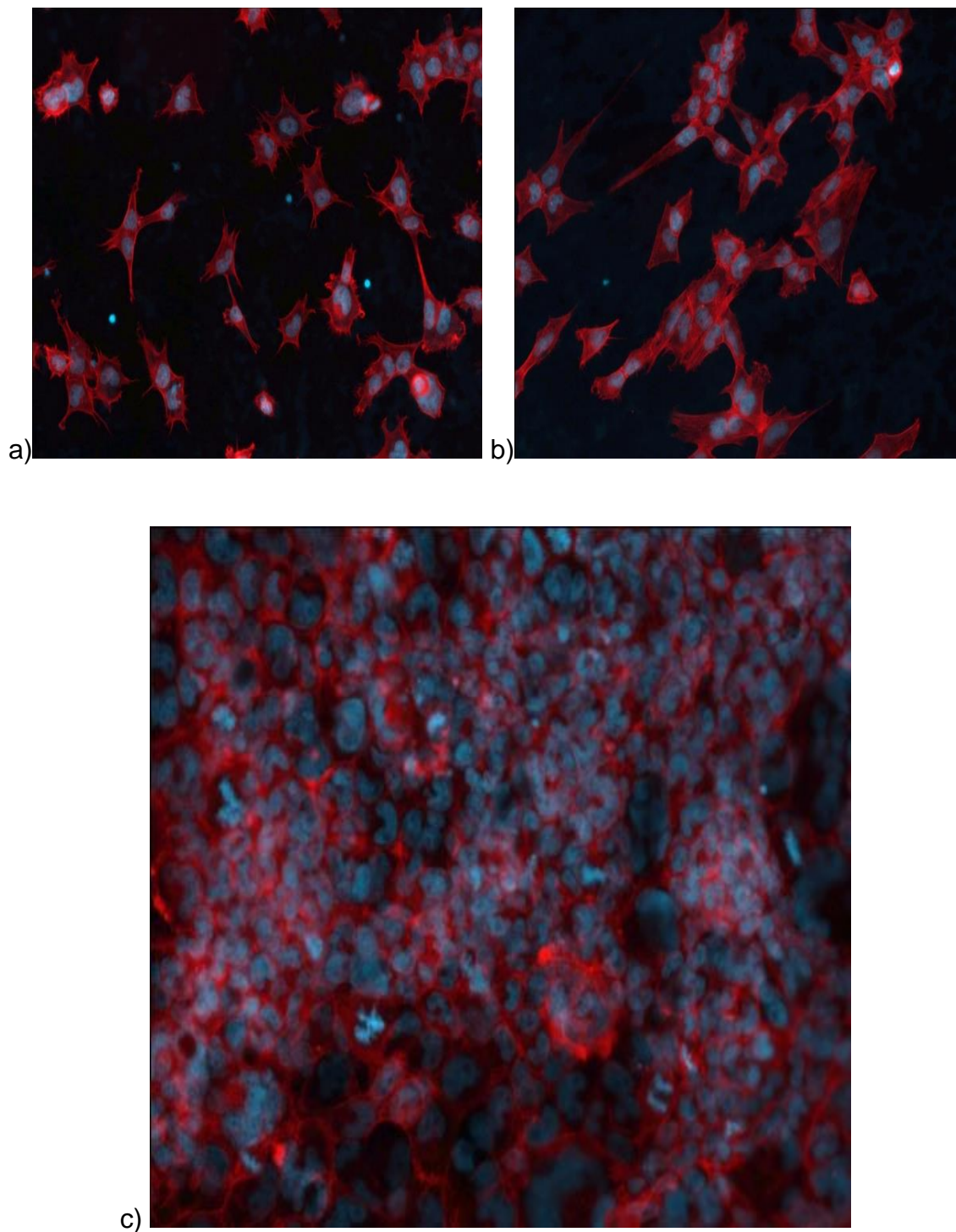


Figura 6.75 - Análise microscópica da viabilidade celular de osteoblastos em amostras monolíticas de vidro F18 em a) 1 dia, b) 3 dias e c) 5 dias.

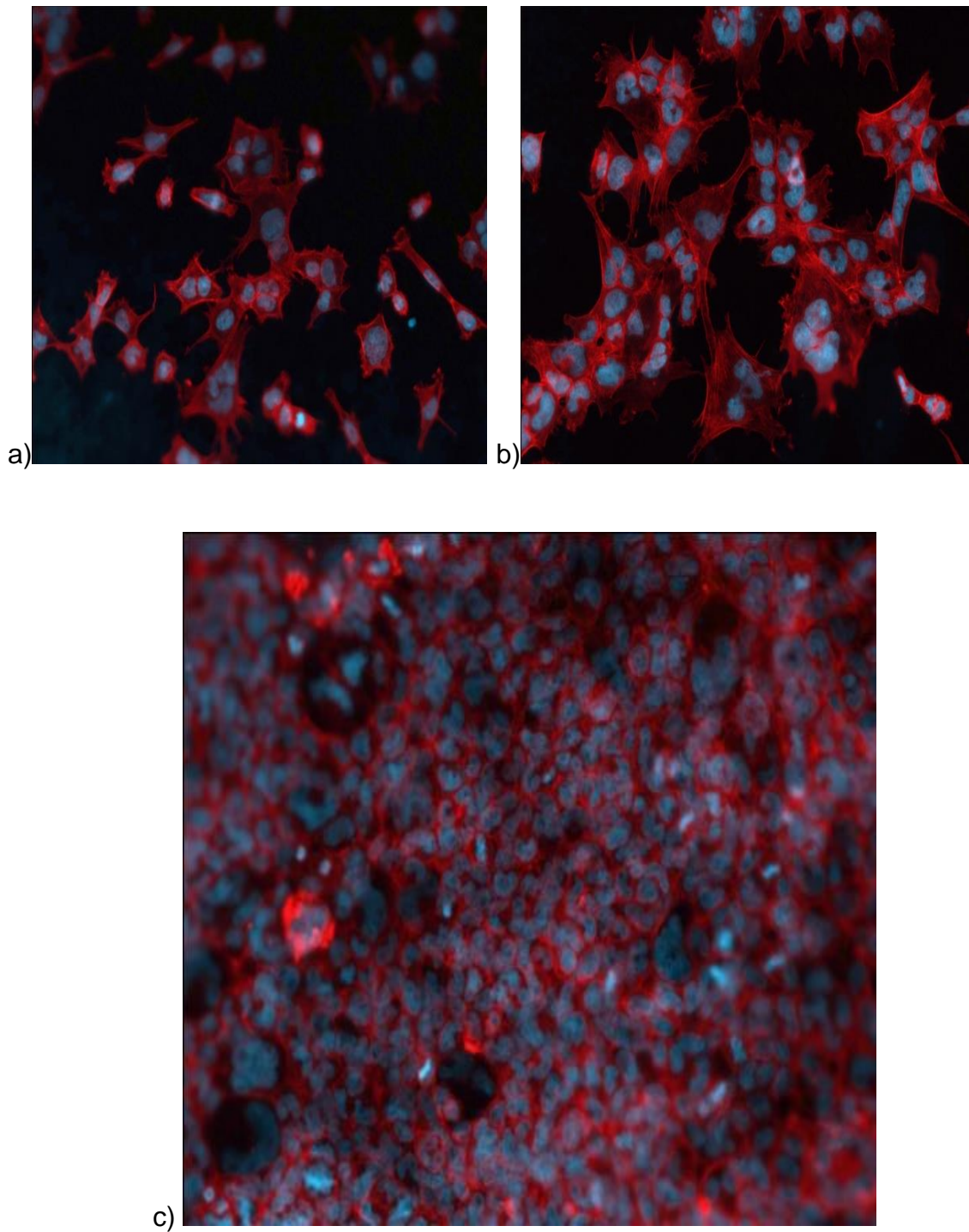


Figura 6.76 - Análise microscópica da viabilidade celular de osteoblastos em amostras monolíticas de vidro 45S5 em a) 1 dia, b) 3 dias e c) 5 dias.

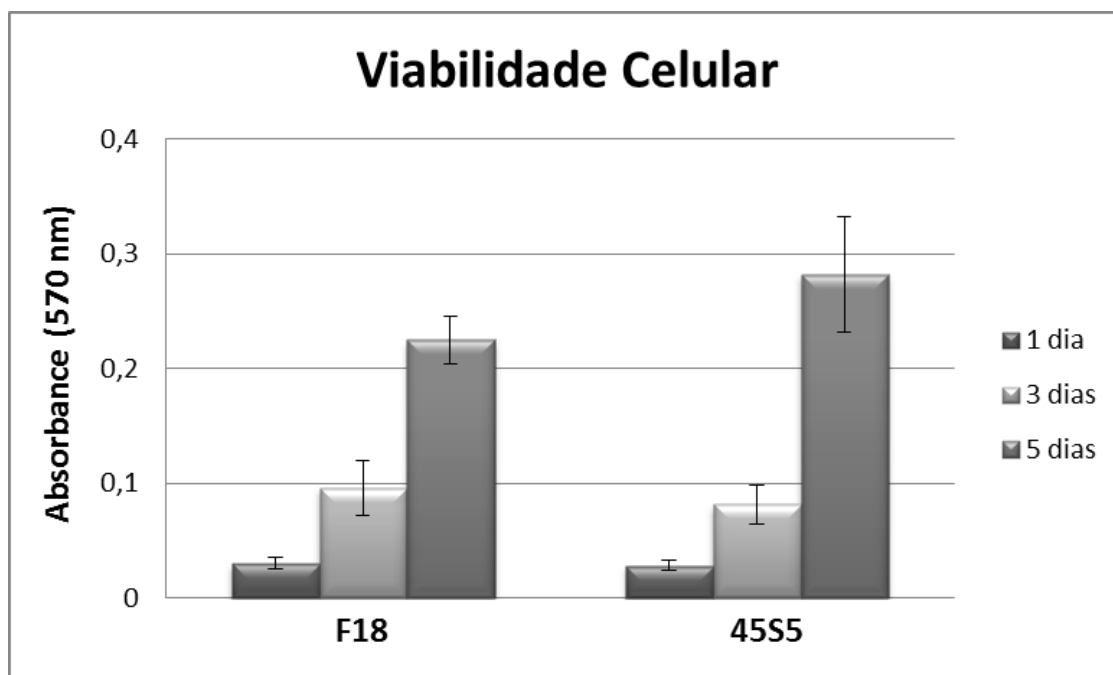


Figura 6.77 - Gráfico da viabilidade celular para 1, 3 e 5 dias para amostras de F18 e 45S5.

Ambos os materiais estudados, os vidros F18 e 45S5, possibilitaram a adesão e viabilidade celular para todos os períodos experimentais, portanto, nenhum material pode ser caracterizado como citotóxico, já que de acordo com a norma ISO 10993-5 [92], o efeito citotóxico é verificado quando há redução de pelo menos 30% na viabilidade celular em relação a um padrão conhecido.

As duas formulações possibilitaram que a linhagem de células osteoblásticas se proliferassem continuamente em relação ao tempo e os resultados obtidos para a formulação F18 foram bastante semelhantes aos obtidos para o biovidro 45S5, sendo $p > 0,05$ para todos os períodos experimentais, portanto, não evidenciando diferença estatística para estas duas formulações.

Deste modo, quando comparado ao vidro bioativo *gold standard*, Bioglass 45S5, o vidro F18 apresentou um ótimo desempenho na adesão e proliferação celular, demonstrando claramente não ser citotóxico na forma monolítica.

6.4.2.2 Ensaios de Viabilidade e Genotoxicidade

Em colaboração com o Departamento de Fisioterapia e Biotecnologia (Profa. Ana Claudia Rennó e MSc. Paulo Armelim) foram realizados ensaios de citotoxicidade do novo vidro F18 na forma de fibras.

Este ensaio foi realizado para células fibroblásticas e osteoblastos pelos períodos de 24, 72 e 144 horas de contato entre as células e extratos obtidos da solução PBS e as fibras do novo biovidro F18. Os resultados encontrados para as diferentes concentrações do extrato utilizadas (100, 50, 25 e 12,5%) são apresentados nas Figuras 6.78 e 6.79.

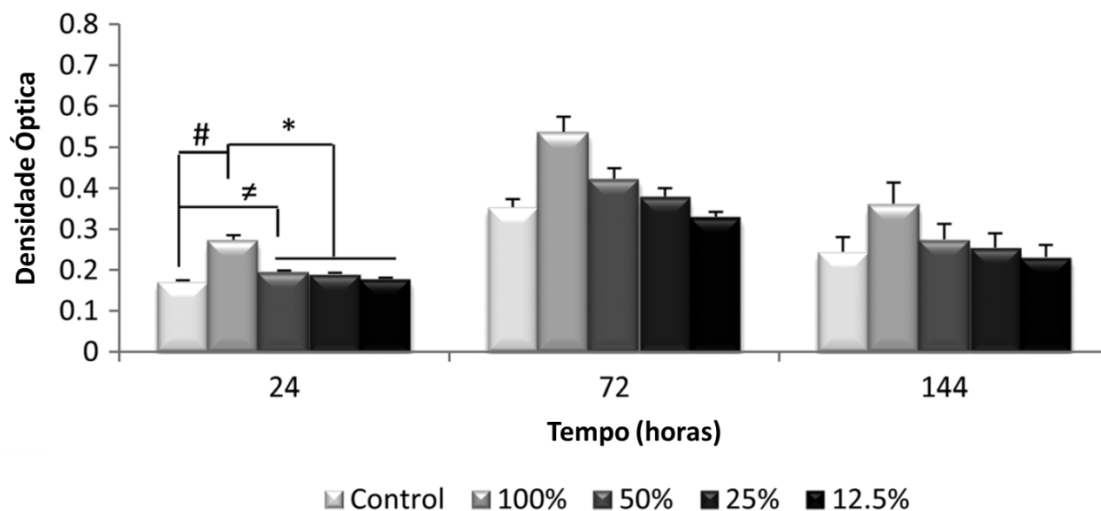


Figura 6.78 – Proliferação de fibroblastos em diferentes concentrações do extrato com as fibras de vidro F18 (100%, 50%, 25% e 12.5%) em diferentes tempos de cultivo (24, 72 e 144 h). (#) $p \leq 0.05$ vs. CG, (\neq) $p \leq 0.05$ vs. CG, e (*) $p \leq 0.05$ vs. 50%, 25%, e 12.5% [Adaptado de 64].

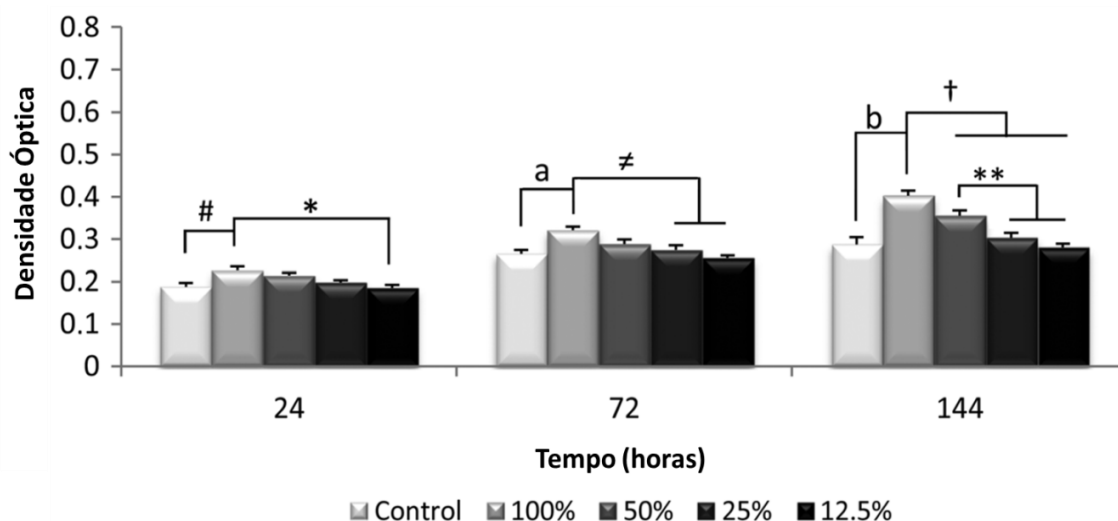


Figura 6.79– Proliferação de osteoblastos em diferentes concentrações do extrato com as fibras de vidro F18 (100%, 50%, 25% e 12.5%) em diferentes tempos de cultivo (24, 72 e 144 h). (#) $p \leq 0.05$ vs. CG, (*) $p \leq 0.05$ vs. 12.5%, (a) $p \leq 0.05$ vs. CG, (≠) $p \leq 0.05$ vs. 25% e 12.5%, (b) $p \leq 0.05$ vs. CG, (†) $p \leq 0.05$ vs. 50%, 25% e 12.5%, e (**) $p \leq 0.05$ vs. 25% e 12.5% [Adaptado de 64].

Os resultados demonstraram que a presença do extrato obtido por meio das fibras possibilitou a proliferação e crescimento celular tanto para osteoblastos quanto para fibroblastos durante todos os períodos avaliados. Nas amostras com os fibroblastos, observou-se diferença estatística em 24 horas de exposição das células ao biomaterial. Já para os osteoblastos, há diferença estatística do grupo controle para os grupos com o biomaterial para todos os extratos em todos os tempos experimentais.

Nos ensaios de genotoxicidade (teste cometa), verificou-se que nenhum dano ao DNA celular foi causado com a utilização das fibras bioativas e as células desenvolveram seu ciclo celular normalmente [64].

Com estes ensaios foi possível observar que a presença do biomaterial estimulou uma maior proliferação celular do que as amostras do grupo controle. Isto provavelmente se deve a presença de íons em solução (presentes nos extratos) que aumentam a expressão gênica e aceleram a proliferação celular. A influência dos íons lixiviados dos vidros bioativos na expressão de famílias de

genes e conseqüentemente a aceleração na proliferação celular é reportada por Xynos *et al.* [26].

6.4.2.3 Ensaios de Citotoxicidade em Fibroblastos Humanos

Para análise da citotoxicidade do vidro F18 em células humanas, foram coletados fibroblastos de uma paciente de 63 anos de idade. Estes ensaios foram realizados com colaboração da Profa. Dra. Maria Beatriz Puzzi do Departamento de Medicina da UNICAMP.

Nestes, a contagem inicial das células, em microscópio ótico, foi de 50.000 células no meio de cultura de cada poço para ambos os grupos (controle e com o biomaterial).

Após o período de 7 dias, realizou-se a contagem para o grupo controle (poço unicamente com as células e solução de RPMI) sendo encontrado um número médio de 425.000 células viáveis. Já para os poços que continham o biomaterial na forma de membrana foi encontrada uma média de 320.000 células viáveis.

Este número menor para o grupo com o biomaterial provavelmente deveu-se ao aumento do pH, devido a lixiviação de íons Ca, Na, K para a solução, diminuindo o crescimento e proliferação celular, já que variações no pH tem interferência direta nos processos de proliferação [93]. Mesmo com a troca do meio a cada 48 horas, foi identificada a mudança de coloração do meio de cultura RPIM-1640 durante todo o período experimental, isto ocorre quando há uma mudança de pH da solução, que pode ser observado devido ao uso de indicadores no meio de cultura.

Porém, como é possível observar nas Figuras 6.80 a 6.82, o uso das fibras bioativas foi positivo em relação à adesão celular, as imagens de MEV mostram células espalhadas em íntimo contato com o biomaterial.

É também possível de se observar a precipitação de estruturas globulares circundando as células, possivelmente a fase HCA.

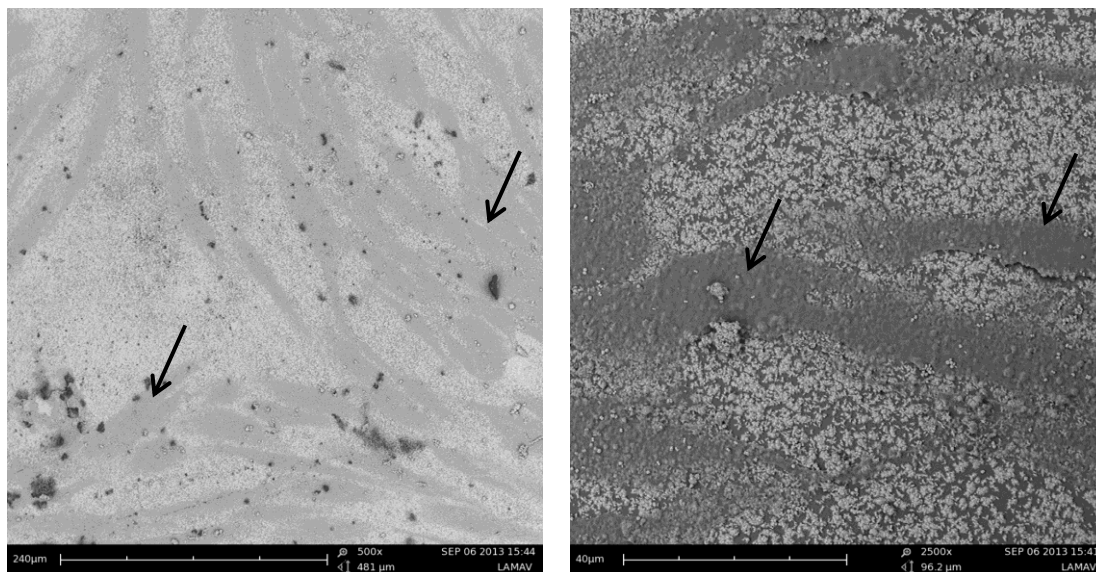


Figura 6.80 - Imagens de MEV das amostras controle (setas - fibroblastos).

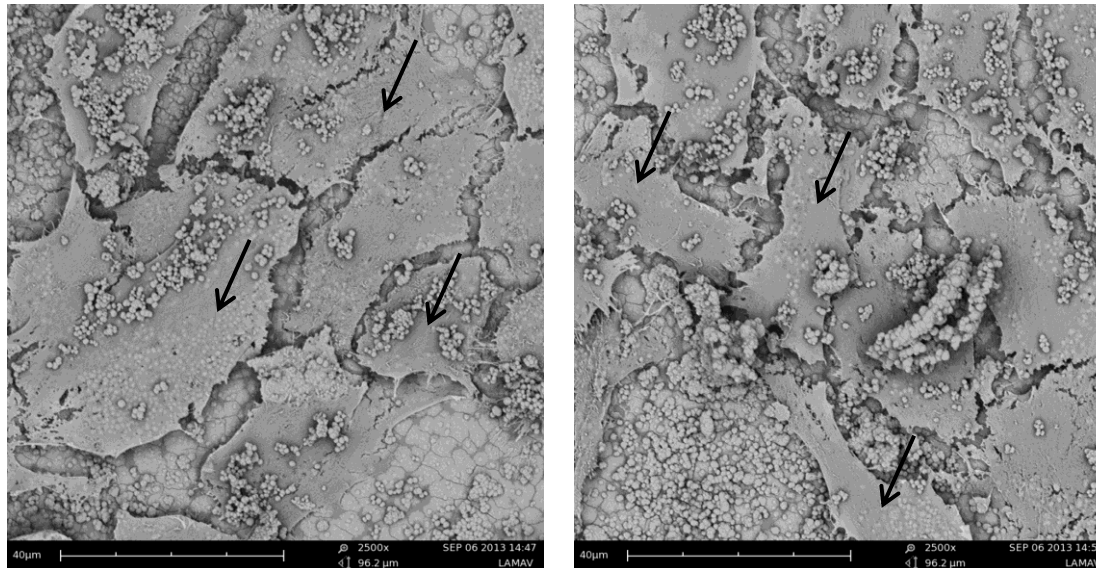


Figura 6.81 - Imagens de MEV do poço com o biomaterial (setas – fibroblastos).

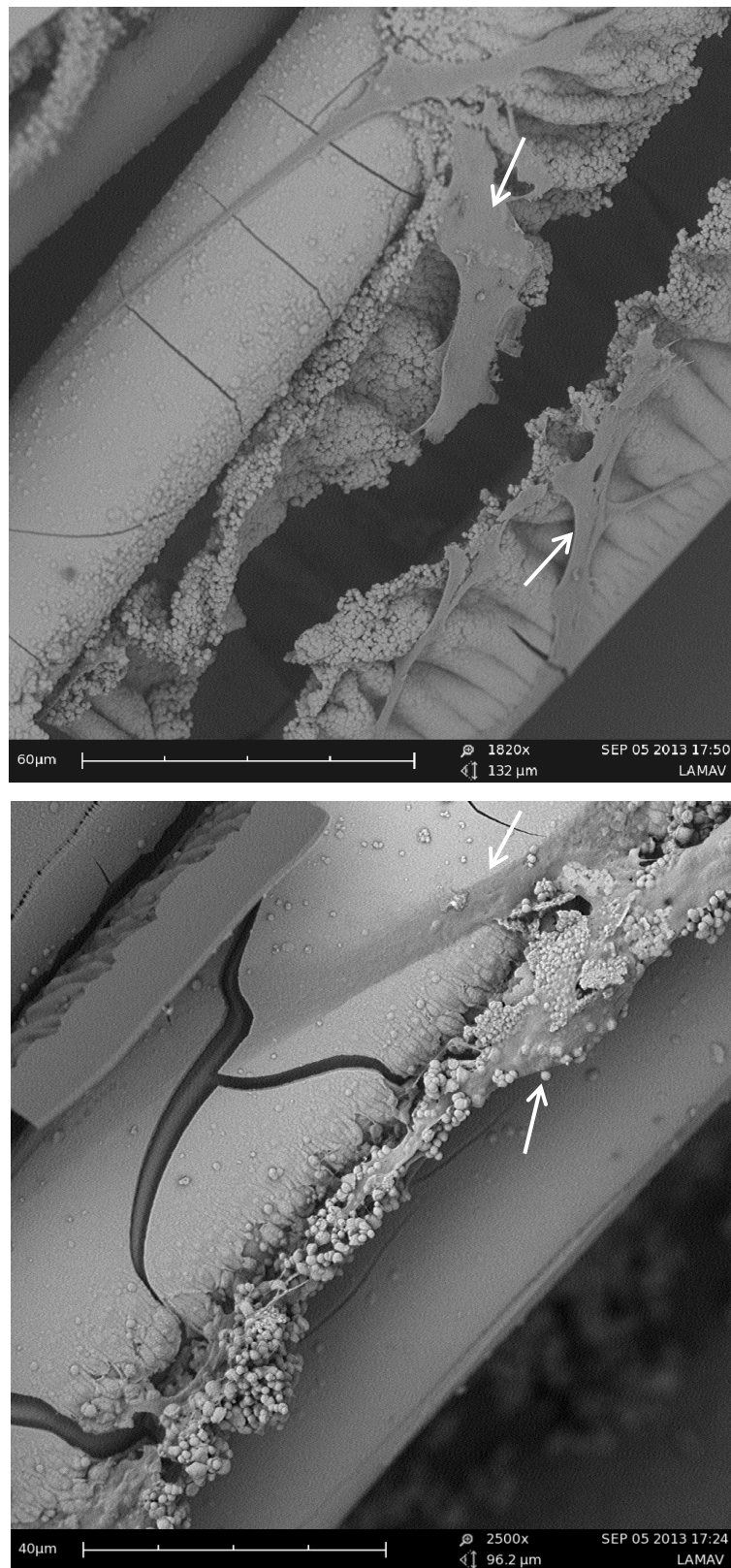


Figura 6.82 - Imagens de MEV das fibras após os ensaios de citotoxicidade (setas – fibroblastos).

6.4.2.4 Propriedades Antibacterianas

Ensaio para verificação da capacidade antibacteriana do novo tecido vítreo foram conduzidos seguindo as orientações presentes na norma JIS Z 2801:2010 [65].

Os resultados obtidos em relação à redução logarítmica do número de células viáveis de cada microrganismo testado são mostrados na Figura 6.83 e 6.84.

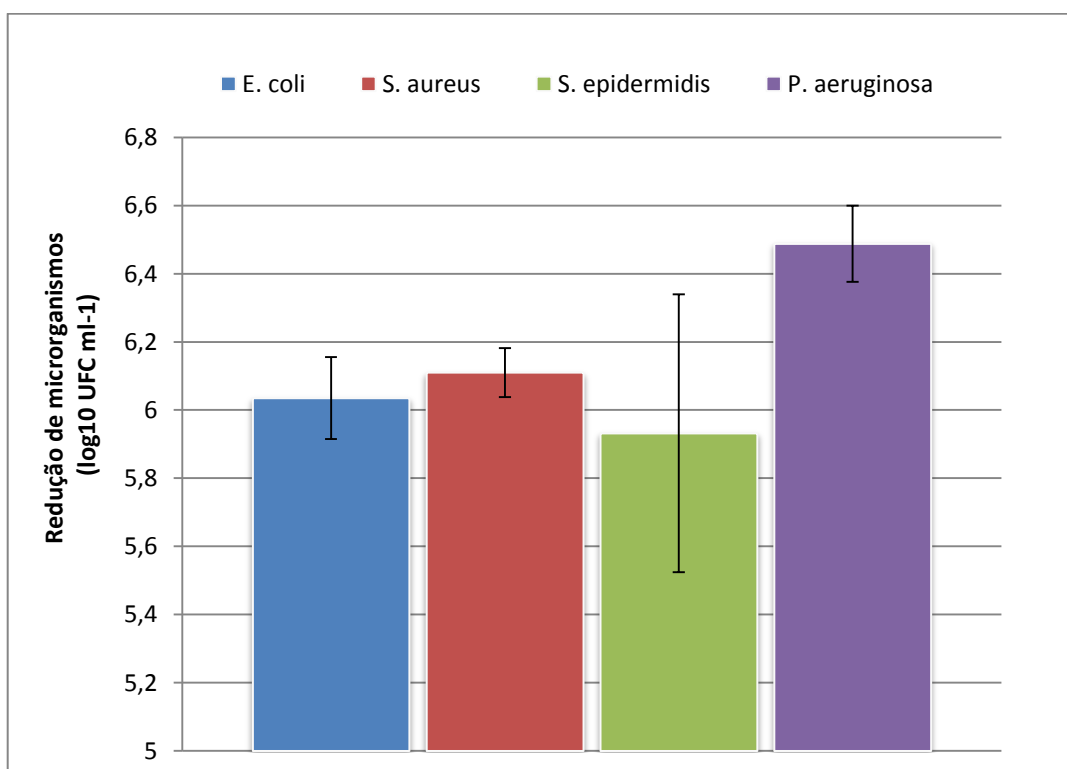


Figura 6.83 - Efeito bactericida do vidro F18 sobre quatro cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* [Adaptado de 94].

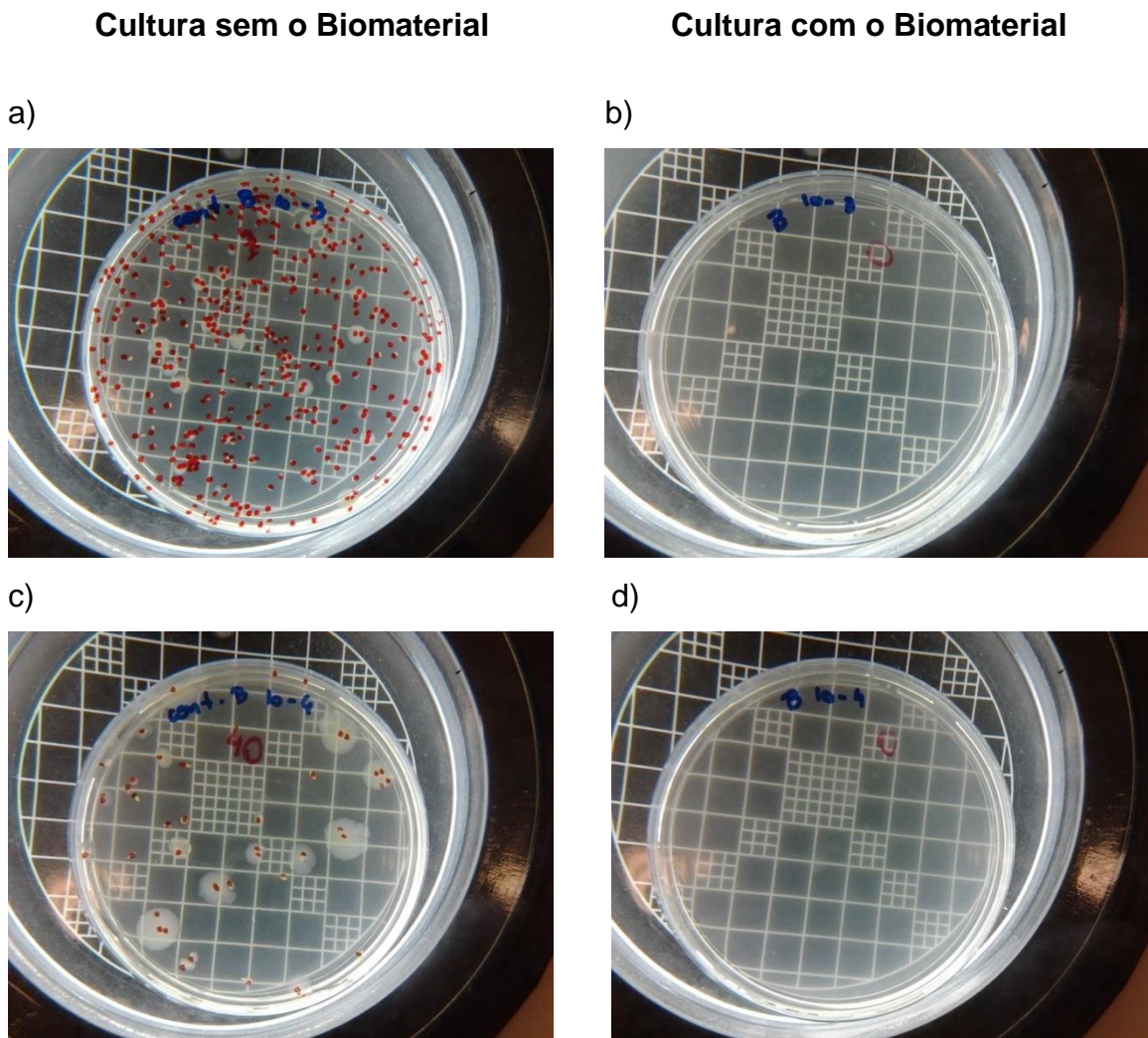


Figura 6.84 - Placas de Petri inoculadas com 3^a (a e c) e 4^a diluição (b e d) nas amostras controle e com o biomaterial [Adaptado de 94].

Os resultados para as amostras utilizando o pó do vidro F18 mostraram que para todas as cepas o valor de atividade bactericida (redução logarítmica de microrganismos) foi maior que o dobro do limite 2,0 estipulado pela JIS [94].

Observa-se também, que não houve diferença de sensibilidade ao F18 entre as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) após o tempo de contato de 24 horas. Nos quatro casos pode-se afirmar que a eficiência bactericida do pó do F18 foi extremamente próxima de 100%. Como pode ser observado na Tabela 6.11.

Tabela 6.11 - Resultados obtidos a partir dos ensaios baseados na norma JIZ Z 2801:2010 através do contato do pó do vidro bioativo F18 com diferentes cepas bacterianas [94].

Cepa	Viabilidade (log₁₀ UFC ml⁻¹)	Controle - 24 h (log₁₀ UFC ml⁻¹)	F18 Pó - 24 h (log₁₀ UFC ml⁻¹)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739P)	5,8 ± 0,1	6,0 ± 0,1	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	5,7 ± 0,2	6,1 ± 0,1	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	5,2 ± 0,01	5,9 ± 0,4	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	5,8 ± 0,01	6,5 ± 0,1	0

Na Tabela 6.11 é possível observar que, para todas as cepas, os inóculos bacterianos iniciais estavam dentro do desejado e previsto pela norma, em 10⁵ UFC ml⁻¹. E que após as 24 horas, as amostras controle apresentaram um crescimento significativo no número de colônias em comparação com a viabilidade, mostrando que os microrganismos foram capazes de se reproduzir sob as condições fornecidas durante a incubação.

Para amostras de F18 em pó, após o período estipulado não foi encontrada nenhuma unidade formadora de colônia para nenhuma das bactérias estudadas.

Os resultados encontrados para as amostras na forma de mantas podem ser observados na Figura 6.85 e na Tabela 6.12.

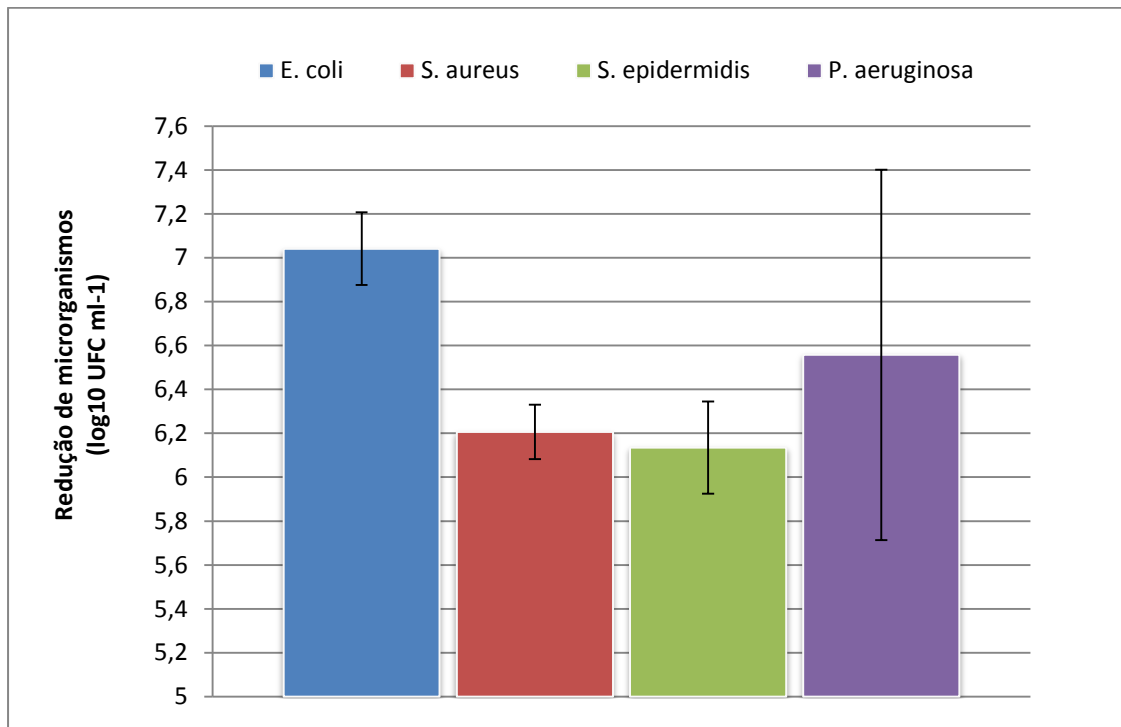


Figura 6.85 - Resultados obtidos a partir dos ensaios baseados na norma JIZ Z 2801:2010 através do contato da manta do vidro bioativo F18 com diferentes cepas bacterianas [Adaptado de 94].

Os resultados mostram que a redução para todas as cepas foi extremamente eficiente. No caso de *P. aeruginosa*, o desvio padrão encontrado entre as contagens realizadas nas amostras foi o maior, devido a alta taxa de replicação deste microrganismo [94]. Mesmo com o maior desvio, o F18 na forma de manta foi altamente bactericida contra esse microrganismo, atingindo o valor mínimo de redução de 5,7 logs (3,7 logs acima do que é considerado bactericida pela norma).

Os valores iniciais de UFC's do controle e para as amostras que foram expostas ao vidro bioativo na forma de malha por 24 horas são apresentados na Tabela 6.12.

Novamente, as amostras controle apresentaram um crescimento significativo no número de colônias em comparação com a viabilidade e para as amostras tratadas com o biomaterial não foi encontrada nenhuma unidade formadora de colônia, exceto para a *P. aeruginosa*, mas, como mencionado

acima, o erro intrínseco do ensaio e a quantidade de cepas eliminadas (5 logs) levam a quase 100% de eliminação dos microrganismos.

Tabela 6.12 - Resultados obtidos a partir dos ensaios baseados na norma JIS Z 2801:2010 através do contato de mantas do vidro bioativo F18 com diferentes cepas bacterianas [94] .

Cepa	Viabilidade (log ₁₀ UFC ml ⁻¹)	Controle - 24 horas (log ₁₀ UFC ml ⁻¹)	F18 24 - horas (log ₁₀ UFC ml ⁻¹)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739P)	5,8 ± 0,1	7,0 ± 0,2	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	5,2 ± 0,1	6,2 ± 0,1	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	5,1 ± 0,1	6,1 ± 0,2	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	5,8 ± 0,01	7,3 ± 0,2	0,8 ± 0,6

Os resultados obtidos indicam que o novo biomaterial foi capaz de interagir e eliminar unidades formadoras de colônias viáveis para todas as bactérias e, portanto, segundo a classificação indicada pela norma JIS 2801:2010, este possui propriedades antibacterianas, sendo então, um material bactericida.

Os mecanismos envolvidos nesta ação bactericida ainda não são totalmente conhecidos. Estudos sugerem que as propriedades antibacterianas de alguns vidros bioativos podem estar relacionadas ao elevado valor de pH do meio, alcançado após a imersão ou implantação destes biomateriais [95,96,97]. Outro fator associado é o desequilíbrio osmótico criado pela dissolução do vidro e lixiviação de íons, como sódio [95].

Estudos mostram que o vidro bioativo 45S5 mostrou-se eficiente na eliminação de cepas *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis* utilizando-se partículas abaixo de 50 μm [96,98]. Porém, trabalhos realizados por Bellantone *et al.* mostraram que partículas entre 90 a 710 μm do vidro 45S5 já não foram eficazes contra cepas *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* [99]. Gorriti *et al.* também demonstraram que não houve redução significativa para cepa *S. aureus* após contato das mesmas com *scaffolds* de 45S5 após 24 horas de contato [100].

Este fato evidencia uma vantagem no uso do novo vidro bioativo F18, já que este mesmo na forma de malha foi extremamente eficiente na eliminação dos microrganismos estudados, apresentando uma ação tão eficaz quanto o pó do material. Isto talvez se deva a alta solubilidade do material, com a lixiviação de grandes quantidades dos íons Ca, Na, K etc.

Esses resultados promovem um bom prognóstico no uso clínico deste novo biomaterial, já que o mesmo apresenta atividade bactericida em diferentes formatos e maiores diâmetros de partícula.

6.4.2.4.1 Atividade Anti-Biofilme

O potencial anti-biofilme do novo biomaterial foi avaliado utilizando-se 2 cepas: *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Para estes testes foram utilizados como controle negativo um vidro inerte (vidro de janela - SLS), como controle positivo o Bioglass 45S5 e o novo vidro F18.

Após 24 horas, os resultados encontrados mostram que os vidros de janela e o 45S5 não demonstraram atividade anti-biofilme, já que para o vidro bioativo 45S5 o número de colônias ao final do experimento era similar ao vidro janela, 7,5 a 8 logs, portanto, não apresentando diferença estatística entre os grupos. Porém, o vidro F18 demonstrou uma atividade anti-biofilme exibindo valores próximos a 5,5 logs, apresentando diferença estatística quando comparados aos demais materiais utilizados (Figura 6.86).

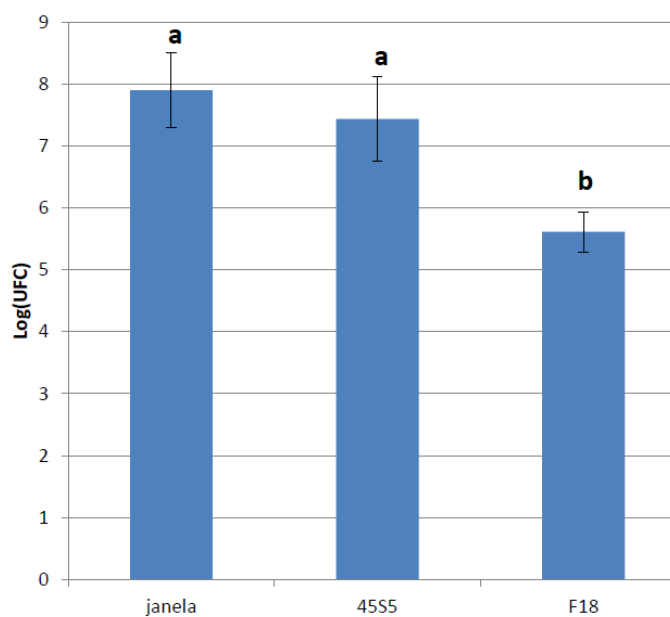


Figura 6.86 - Gráfico da quantidade de unidades formadoras de colônia encontradas para amostras dos vidros de janela, 45S5 e F18.

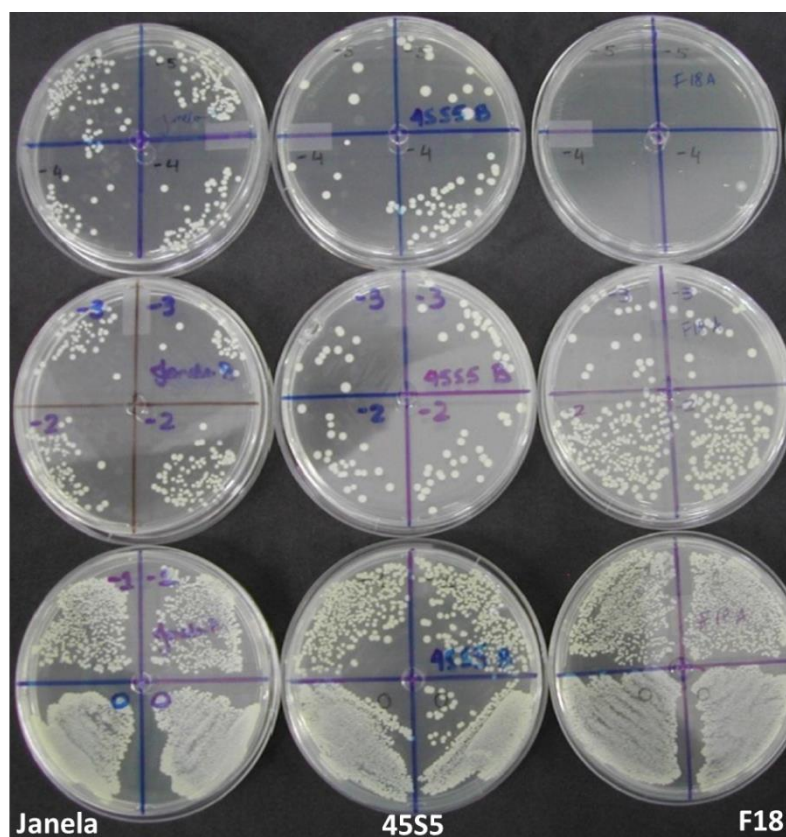


Figura 6.87 - Placas de Petri inoculadas com as 5 diluições das amostras dos vidros de janela, 45S5, e F18.

Na Figura 6.87 observa-se as placas inoculadas com as 5 diluições para cada material testado. É possível observar que para as amostras de F18 não são observados ufc's nas últimas diluições, porém, para os vidros de janela e 45S5 as colônias ainda estão presentes.

Os resultados observados com as cepas da *P. aeruginosa* podem ser observados na Figura 6.88.

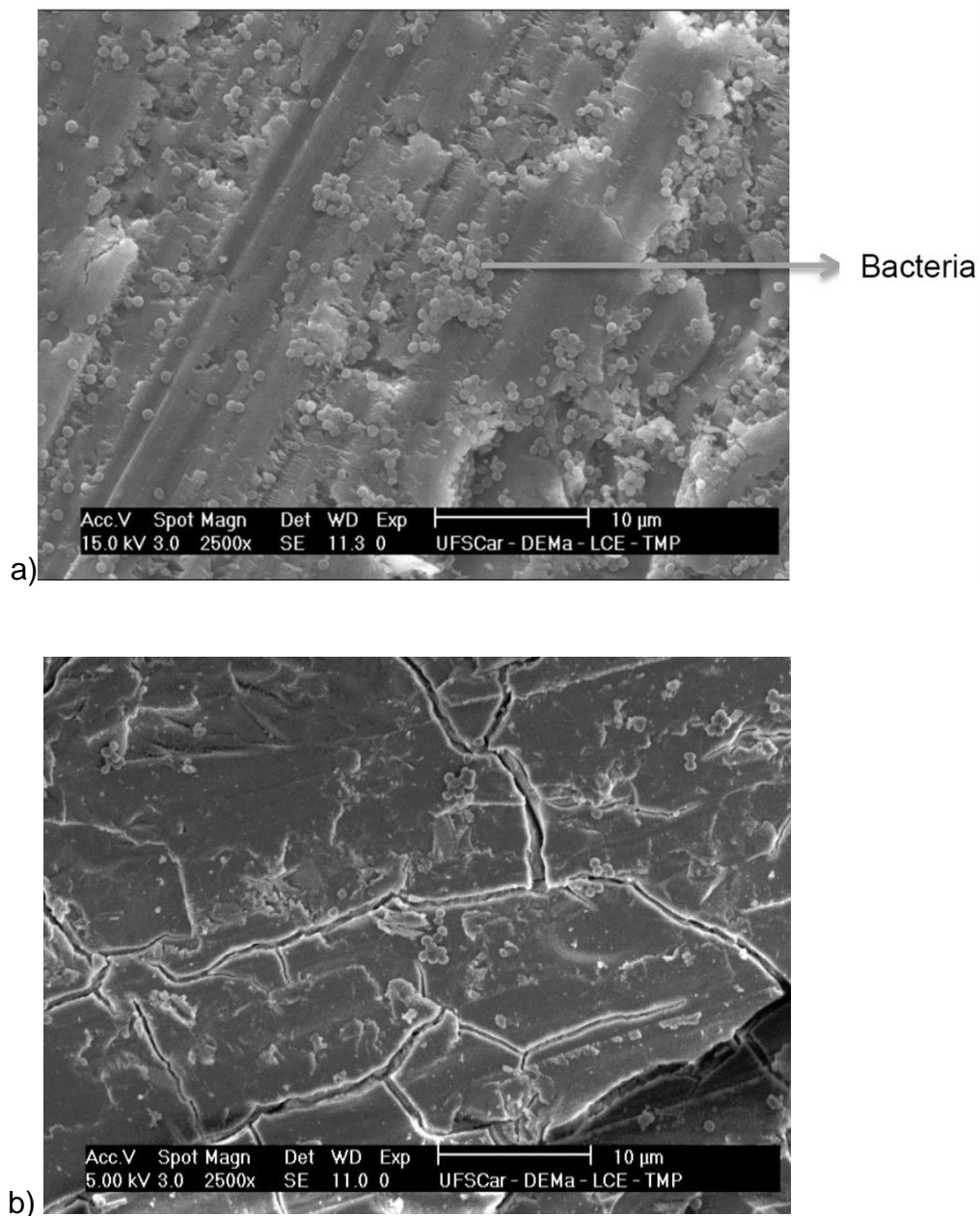


Figura 6.88 – Imagens de MEV para as superfícies de a) vidro de janela (alta quantidade de bactérias) e b) vidro F18 (poucas bactérias encontradas).

As imagens de MEV indicam uma clara ação inibitória (bactericida) da formação do biofilme quando da utilização do novo vidro bioativo F18, tanto para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Estes testes mais simplificados, utilizando-se biofilmes monoespécies, nos dão boas perspectivas para a utilização do material em casos mais complexos de biofilmes mais maduros e com diversas espécies celulares.

6.4.2.5 Ensaios Imunológicos

Quando ocorre algum dano tecidual, patogenias ou a presença de corpos estranhos há o desencadeamento de uma série de eventos complexos ligados à resposta inflamatória [101,102,103]. As primeiras células a chegar ao sítio inflamatório são os neutrófilos, estes são os leucócitos polimorfonucleares¹ mais abundantes no sangue e sua ação depende da quantidade de enzimas proteolíticas (que causam a lise de proteínas) e de espécies reativas de oxigênio (ERO) liberadas durante o *burst oxidativo* [103].

Assim que detectado um possível "invasor", os neutrófilos começam a se organizar e lançar mão de sistemas de metabolização de oxigênio, processo conhecido como *burst oxidativo*. Este por sua vez, é então o que confere a capacidade de *killing* aos neutrófilos. Estes eventos geram quimiluminescência e a adição de substratos quimiluminescentes, como lucigenina e luminol, a um sistema de teste de células fagocitárias aumenta em várias ordens de grandeza o rendimento de luminescência, facilitando a monitoração da atividade dessas células [103].

Em busca do entendimento de como as células imunes se comportam quando em contato com o novo material, realizou-se o estudo do *burst oxidativo*.

Os resultados obtidos após 30 minutos de contato entre os neutrófilos e o vidro F18 em forma de pó (aproximadamente 30 µm) e malha (diferentes tamanhos) são apresentados nas Figuras 6.89 e 6.90 respectivamente.

¹ Definição em Anexos

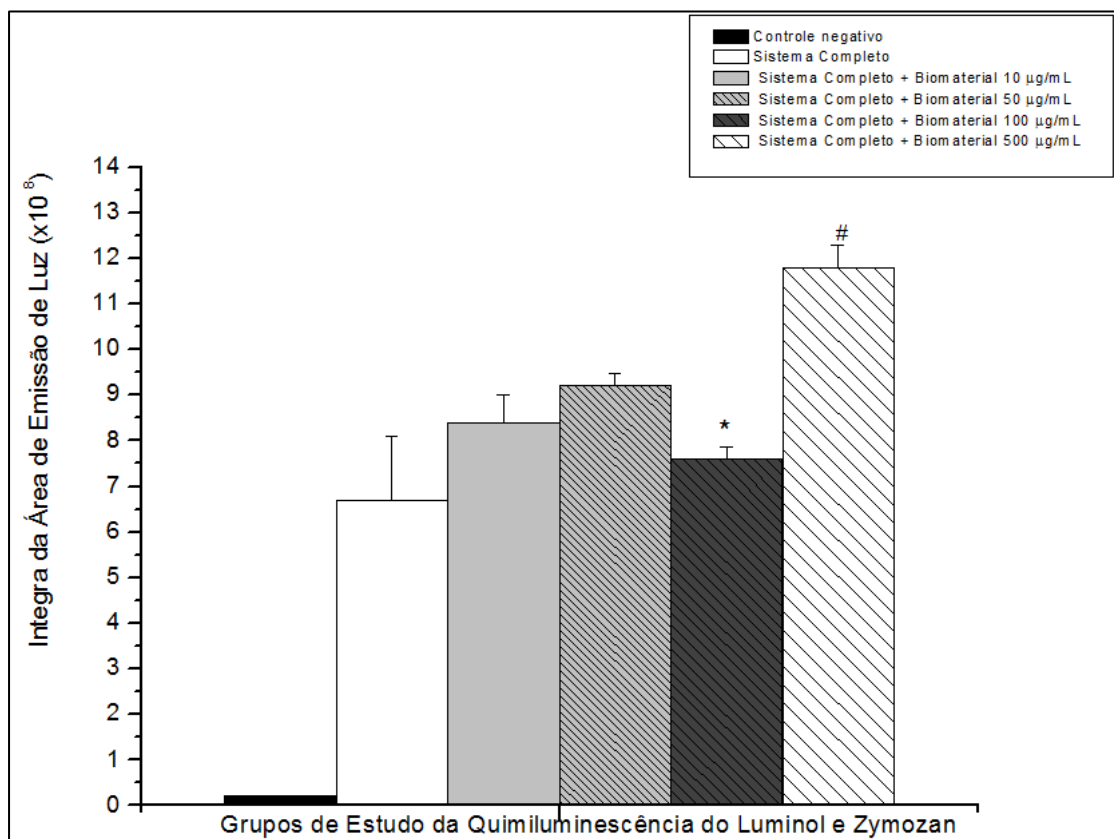
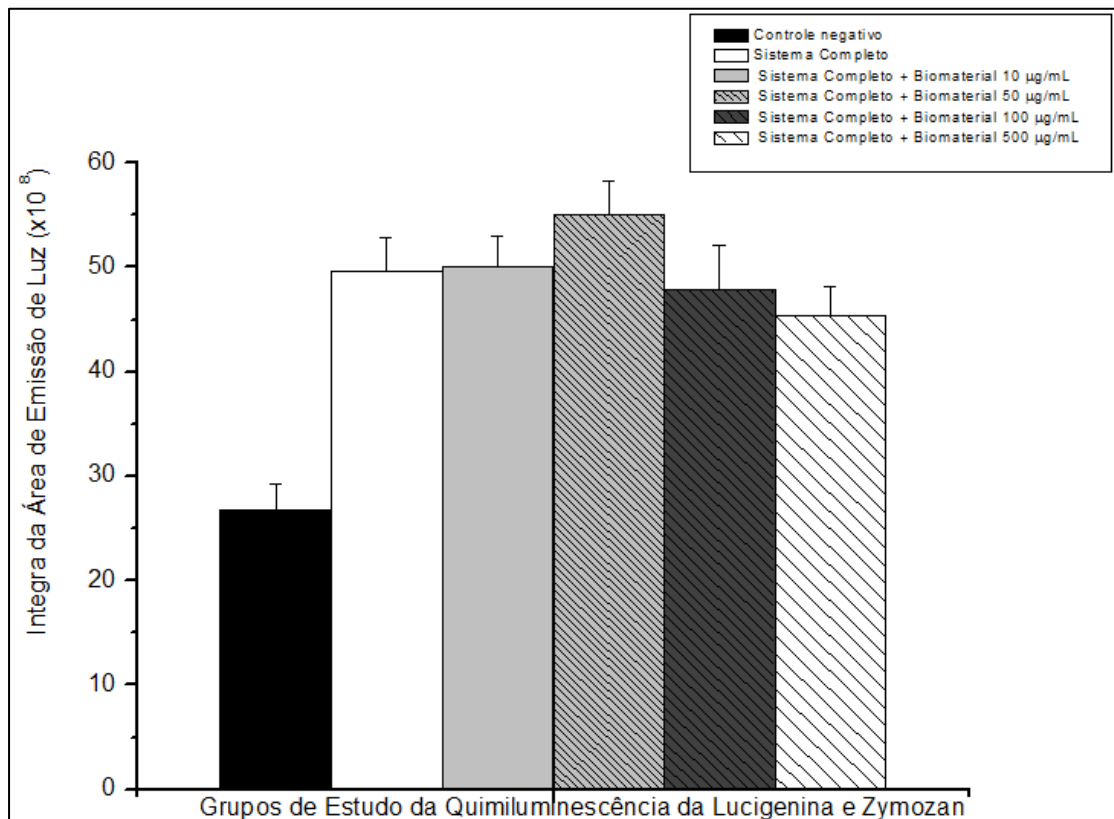


Figura 6.89 - Ensaio de burst oxidativo, com diferentes concentrações do pó do vidro bioativo F18 para os sistemas com luminol e lucigenina (e zymozan).

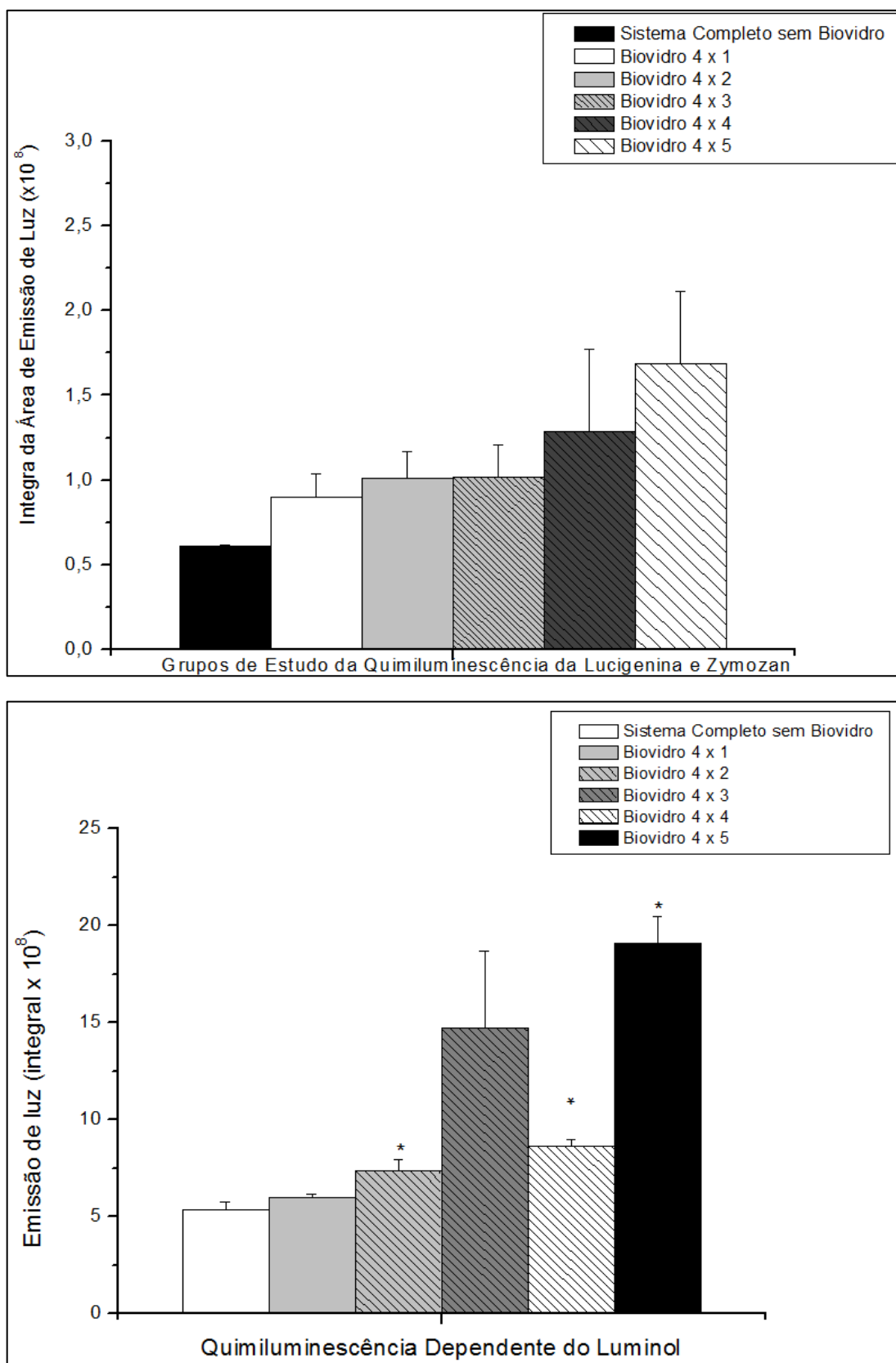


Figura 6.90 - Ensaio de burst oxidativo com diferentes tamanhos de malha do vidro bioativo F18 para os sistemas com luminol e lucigenina (e zymozan).

Os resultados indicam que há uma reação inflamatória normalmente esperada quando da inclusão de um corpo estranho, já que todos os grupos emitiram luz, até mesmo o controle (sistema completo).

No caso do material particulado não houve diferença estatística entre a reação do controle positivo (sistema completo) e os demais grupos para a lucigenina. Já para o luminol, houve diferença para os grupos de 100 e 500 µg/ml, possivelmente devido a maior quantidade de material. Porém, de maneira geral o material não despertou uma reação inflamatória exacerbada quando em contato com estas células.

Para as amostras na forma de tecidos, temos resultados semelhantes. Quanto maior a quantidade de material mais intensa a reação, como esperado. Porém, novamente vemos pouca diferença em relação ao controle positivo (sistema completo), portanto, especulava-se a pouca reação inflamatória quando este biomaterial fosse utilizado em ensaios *in vivo* e clínicos.

Sabe-se que o Bioglass 45S5 possui propriedades anti-inflamatórias [5,14,78], estes estudos *in vitro* indicam que o vidro F18 também possa apresentar esta propriedade, já que em comparação ao controle, praticamente não apresentou evidência de diferença estatística. Claramente, esta propriedade deve também ser comprovada em ensaios *in vivo*. Os mesmos serão abordados na seção 6.4.3.

6.5 Ensaios In Vivo

6.5.1 Biocompatibilidade

Para os ensaios de biocompatibilidade *in vivo*, foram desenvolvidos *scaffolds* compostos por pequenas porções de fibras bioativas.

As Figuras 6.91 e 6.92 apresentam a microestrutura obtida para estes *scaffolds* de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, como é possível observar os mesmos apresentaram poros de mais de 1,5 mm.

Após o desenvolvimento desta nova forma de apresentação para o vidro F18, foram realizados os testes de biocompatibilidade por meio da implantação deste material no dorso de ratos Wistar. Os resultados são apresentados na Figura 6.93.



Figura 6.91 - *Scaffold* de 10 mm de diâmetro desenvolvido a partir de fibras de vidro do F18.

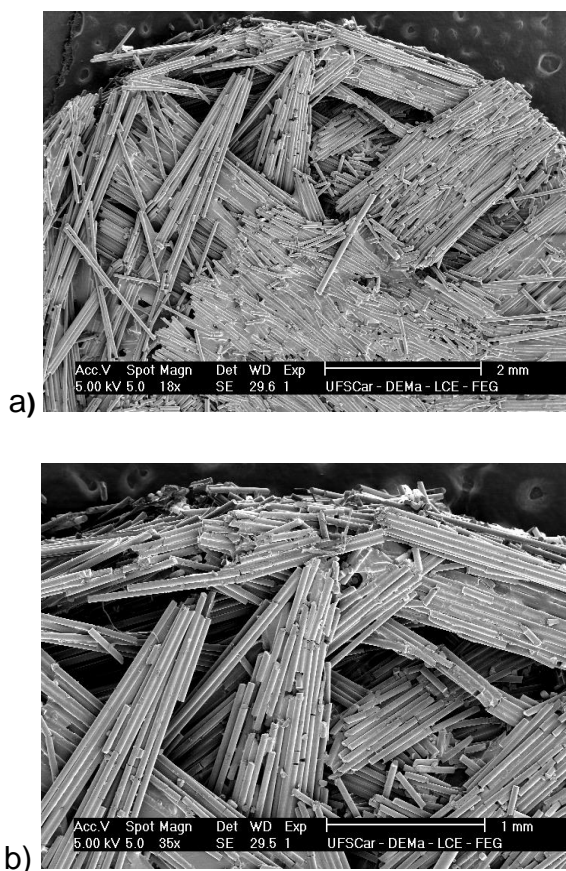


Figura 6.92- Micrografias dos *scaffolds* de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.

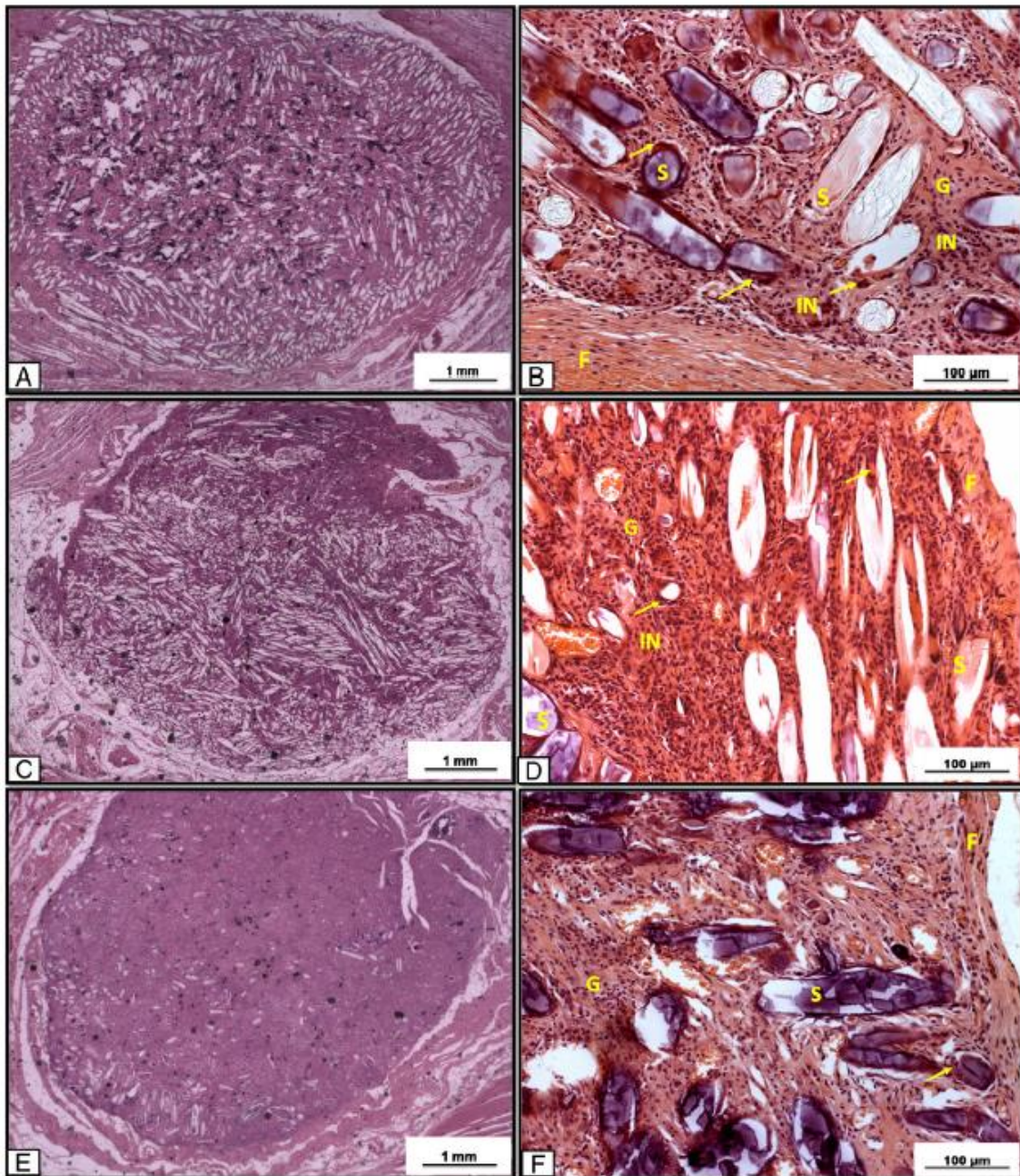


Figura 6.93 - Análise histológica dos implantes subcutâneos para os períodos de A e B) 15 dias; C e D) 30 dias e E e F) 60 dias. IN = células inflamatórias; G = tecido de granulação; S = fibras de vidro bioativas; F = cápsula fibrosa; Setas = células multinucleadas. Tecido corado em H&E [Adaptado de 64]. A, C e E com magnificação de 12,5x. B, D e F com magnificação de 200x.

Na Figura 6.93 é possível observar que já no primeiro período experimental (15 dias) houve uma reabsorção parcial do material, com a

presença de tecido de granulação circundando as fibras bioativas. É interessante notar que todo o *scaffold* foi preenchido por um novo tecido, até mesmo em sua região central, isto indica que a alta porosidade (aproximadamente 75%) do mesmo permitiu a infiltração de sangue e de células por todo material, evento crucial para a regeneração de um tecido danificado.

Após 30 dias, o material encontra-se ainda mais degradado, células inflamatórias e um tecido fibroso foram detectados em volta das fibras de vidro.

No período final de avaliação, 60 dias, vê-se uma organização do tecido de granulação, já semelhante ao tecido circundante não danificado. Houve a diminuição da cápsula fibrosa e não foram mais encontradas células inflamatórias e macrófagos [64].

Como encontrado nos testes *in vitro* (seção 6.4.2.5), o material induziu uma reação inflamatória discreta, e seus produtos de lixiviação não causaram irritação e induziram a organização de um novo tecido. Sua reabsorção possibilitou que o tecido fosse neoformado em toda área da lesão, e a porosidade do *scaffold* desenvolvido, assim como a interconectividade dos poros foram fatores chaves na reparação da lesão, possibilitando a migração e proliferação das células, assim como estimulando a formação de novos vasos sanguíneos [64].

Estes ensaios evidenciaram a biocompatibilidade e a não citotoxicidade das fibras de vidro bioativas, demonstrando sua capacidade de reabsorção e estímulo à regeneração tecidual.

6.5.2 Regeneração Óssea

6.5.2.1 Regeneração de Lesões em Calvária

Estes testes foram realizados com intuito de se investigar a neoformação óssea estimulada pela malha de vidro bioativa em defeitos críticos de 6 mm de diâmetro na calota craniana de ratos Wistar (G2) em

comparação com o defeito não tratado (G1) (Figura 6.94) [67]. Os resultados obtidos são apresentados abaixo.



Figura 6.94 - Procedimento cirúrgico com a confecção de defeito crítico na calota craniana de ratos Wistar [57].

Os resultados para G2 indicam que as fibras de vidro fazem com que o osso neoforme da periferia até o centro da lesão. De maneira geral observou-se que:

- Grupo de **2 semanas** - fibras de vidro bioativas presente na lesão e presença de osteoblastos acompanhados de neoformação óssea.
- Grupo de **4 semanas** - poucas fibras de vidro bioativas, maior concentração de osteoblastos e neoformação óssea.
- Grupo de **8 semanas** - fibras de vidro bioativas praticamente inexistentes, o osso novo avança para a falha crítica.

A Figura 6.95 apresenta a análise histológica dos animais de controle e com o biomaterial com 8 semanas.

É possível observar que os animais com o biomaterial apresentaram uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado. Os animais do controle apresentaram uma maior quantidade de tecido conjuntivo e um osso ainda bastante imaturo.

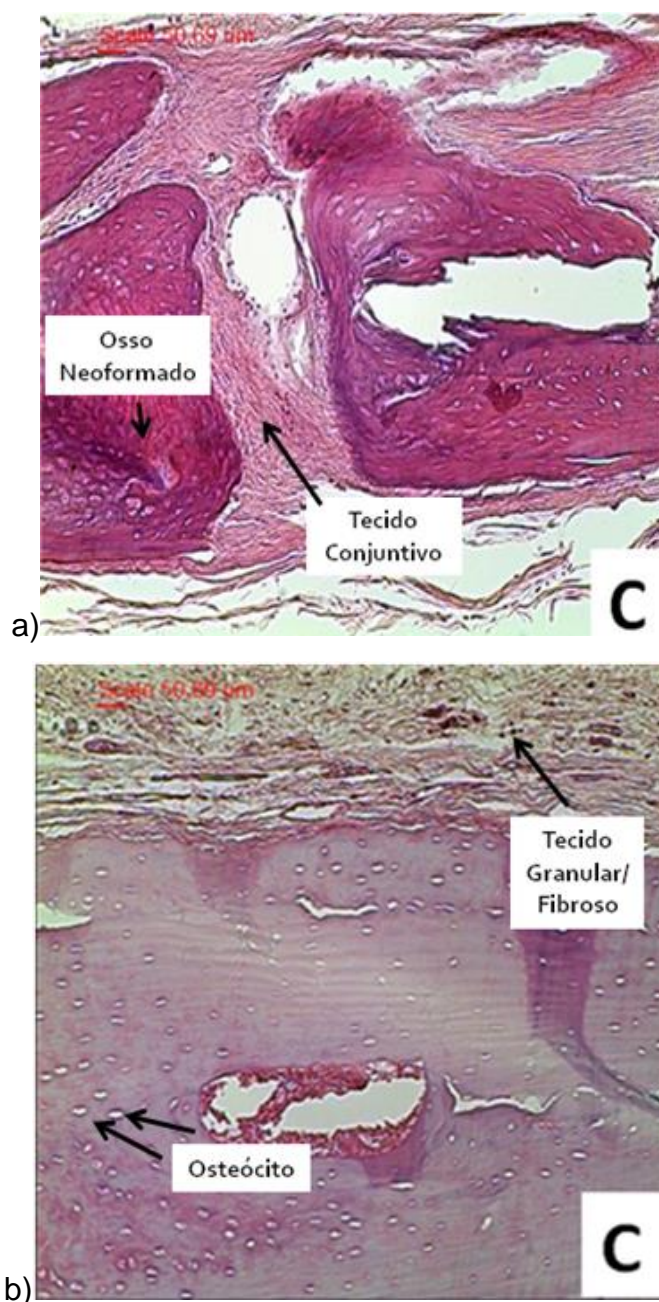


Figura 6.95 – Análise histológica para o grupo controle sem enxerto (a) e para o grupo tratado (b) após 8 semanas. Amostra corada em hematoxilina-eosina.

Porém, com a utilização de outra coloração (Picrosirius Red) e luz polarizada os resultados não conseguiram ser conclusivos. Já que a variação experimental não possibilitou observar diferença estatística nos grupos experimentais (Figuras 6.96 e 6.97).

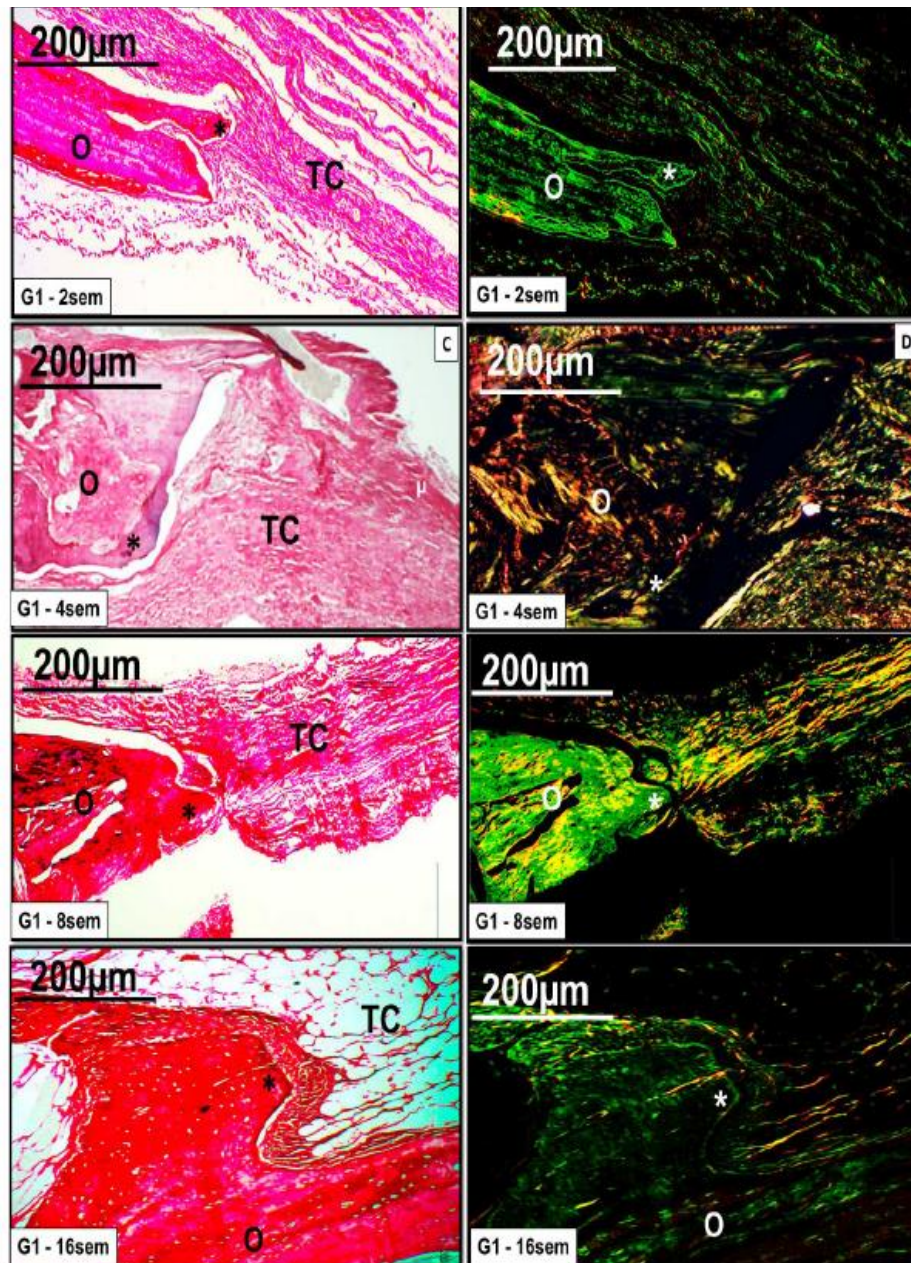


Figura 6.96 - Fotomicrografia da periferia da área cirúrgica do grupo controle (G1), sacrificado nos tempos de 2(A, B), 4(C, D), 8(E, F) e 16(G, H) semanas pós-operatório. Observou-se a expressão e a organização das fibras colágenas na área cirúrgica na luz polarizada. Coloração Picrosirius Red sem luz polarizada (A, C, E, G) e com luz polarizada (B, D, F, H). Indicados: Tecido

conectivo na área cirúrgica (TC), Osso original (O), Osso neoformado (*) [Adaptado de 57].

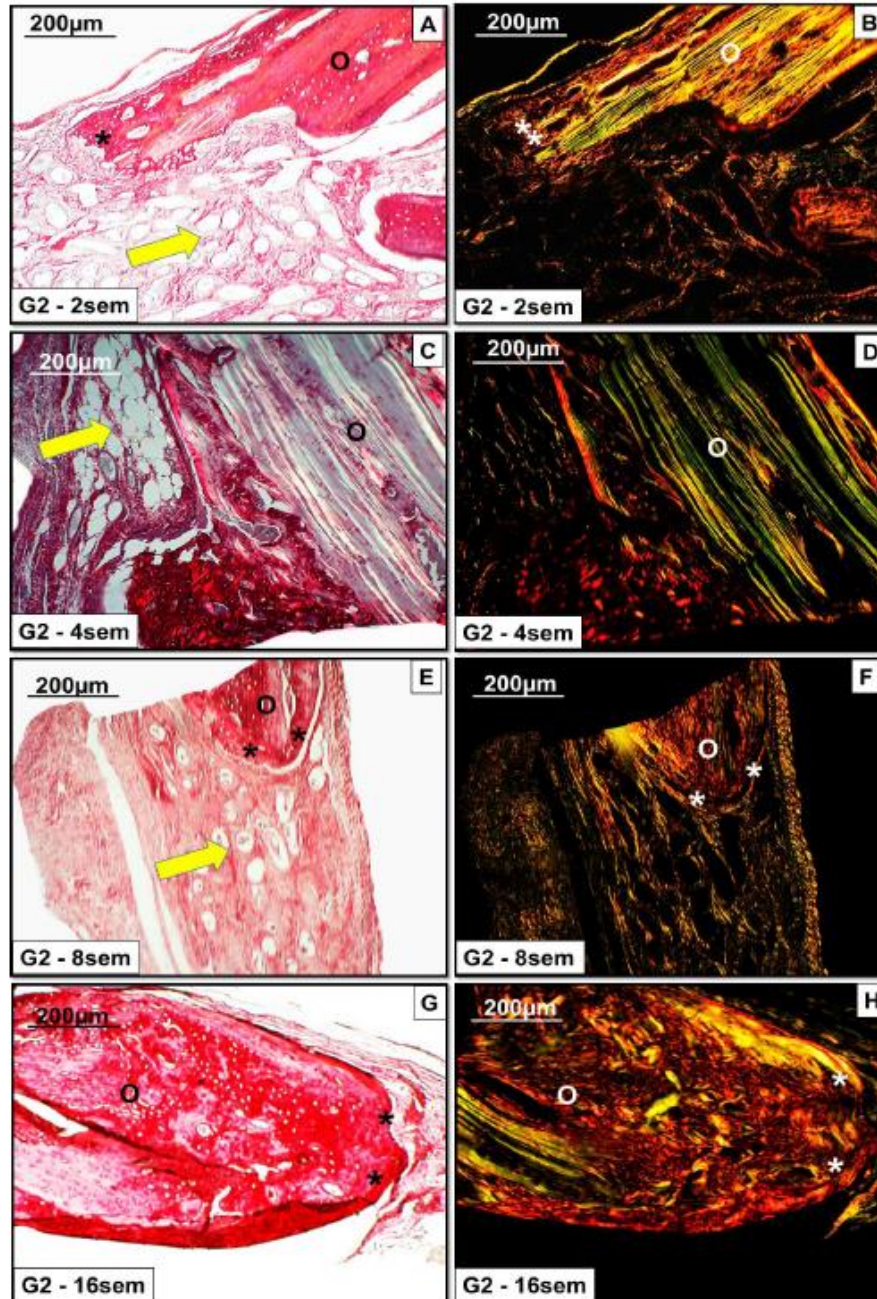


Figura 6.97 - Fotomicrografia da área periférica da falha óssea do grupo implantado G2, sacrificado nos tempos de 2(A, B); 4(C, D); 8(E, F) e 16(G, H) de pós-operatório. Observou-se a expressão óptica e a organização estratigráfica das fibras colágenas e a predominância de fibras mais espessas, fibras do tipo I e II na área cirúrgica. Indicados: malha de vidro bioativa (seta), osso original (O), osso neoformado (*). Coloração Picrosirius Red [Adaptado de 57].

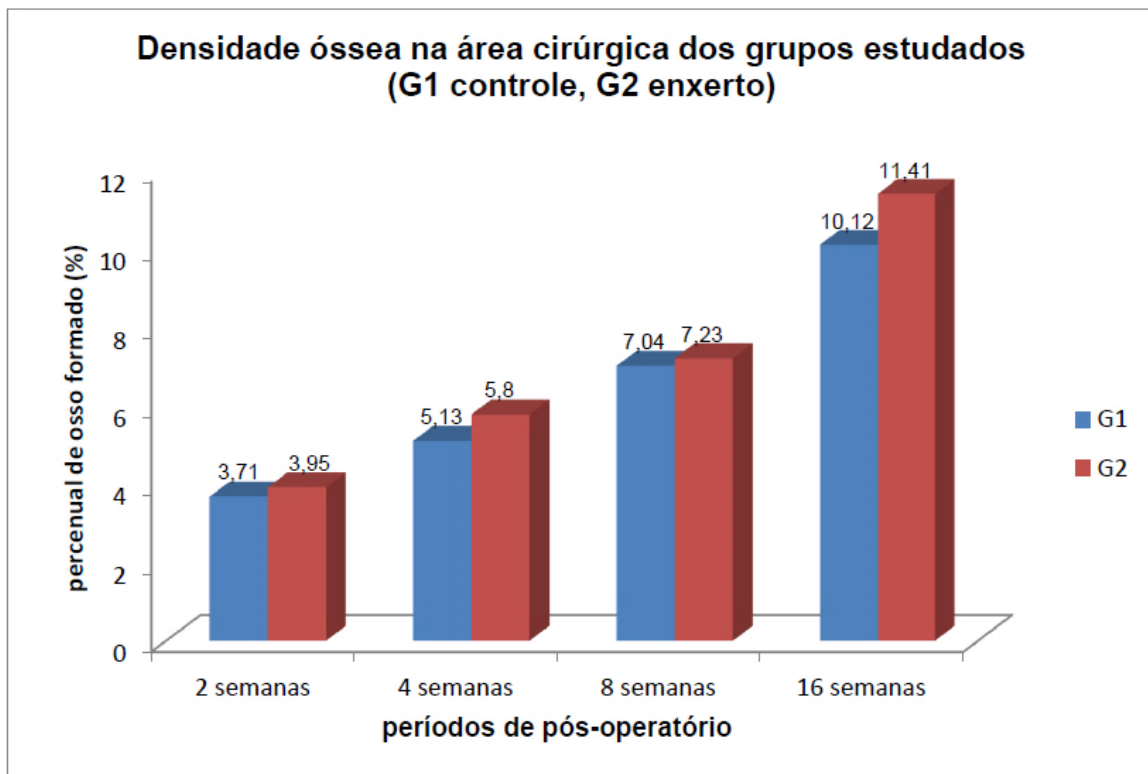


Figura 6.98 - Estereologia da densidade da neoformação óssea da área cirúrgica dos grupos G1 e G2 nos períodos estudados de 2, 4, 8 e 16 semanas [67].

Tabela 6.13 - Percentual e desvio padrão da densidade óssea neoformada nos grupos G1 e G2 para os tempos de 2, 4, 8 e 16 semanas [67].

	02	04	08	16	
G1	3,71±0,23 ^{a#}	5,13±0,14 ^{a#}	7,04±0,07 ^{a#}	10,12±0,41 ^{a#}	S ^a
G2	3,95±0,05 ^{b#}	5,80±0,20 ^{b#}	7,23±0,49 ^{b#}	11,41±0,56 ^{b#}	S ^b
G1 X G2	NS [#]	NS [#]	NS [#]	NS [#]	

^a significativo (S) entre os subgrupos G1, $P \leq 0,05$

^b significativo (S) entre os subgrupos G2, $P \leq 0,05$

[#] não significativo (NS) entre os grupos para cada tempo estudado, $P \geq 0,05$

Nos períodos pós-operatórios de 2, 4, 8 e 16 semanas, o percentual da densidade óssea formada na área cirúrgica em G1 (grupo controle) foi $3,71\pm 0,23$; $5,13\pm 0,14$; $7,04\pm 0,07$; $10,12\pm 0,41$, respectivamente, enquanto que em G2 (grupo tratado), os valores foram $3,95\pm 0,05$; $5,80\pm 0,20$; $7,23\pm 0,49$; $11,41\pm 0,56$ (Tabela 6.13, Figura 6.98).

Na análise estatística dos valores para G1 entre os períodos pós-operatórios estudados, observou-se que houve diferença entre todas as comparações das semanas (2/4; 2/8; 2/16; 4/8; 4/16; 8/16), evidenciando aumento gradativo da neoformação óssea ao longo do experimento, apesar de lento. Desta maneira, notou-se que em 16 semanas a neoformação óssea foi 2,7 vezes maior do que a observada em 2 semanas [67].

Em relação ao G2, os resultados das comparações (2/4; 2/8; 2/16; 4/8; 4/16; 8/16) foram semelhantes aos encontrados em G1. Neste caso, notou-se que em 16 semanas a neoformação óssea foi 2,9 vezes maior do que a observada em 2 semanas [67].

Ao comparar os valores entre os grupos G1 e G2 para cada período pós-operatório estudado, notou-se que não houve diferença estatística, com $p > 0,05$. Talvez isso ocorreu devido a pouca quantidade de material utilizada e a grande porosidade entre as fibras, o que levou a rápida degradação do mesmo [67].

Um material mais compactado (75% de porosidade) foi utilizado nos ensaios em tibia (seção 6.6.1.2), no qual foram observados resultados muito positivos em relação à regeneração óssea.

6.5.2.2 Regeneração de Lesões em Tibia

Visando à avaliação da capacidade do novo vidro em auxiliar a regeneração tecidual óssea em lesões de tibia, foram desenvolvidos *scaffolds* a partir das fibras bioativas.

Para isto, um molde de Teflon foi confeccionado para obtenção de amostras de 3 mm de diâmetro e 1 mm de espessura (Figura 6.99).

Os *scaffolds* desenvolvidos possuíam uma porosidade de aproximadamente 75% ($\pm 3\%$) e apresentaram propriedades mecânicas suficientes para sofrerem o processo de esterilização e também serem manipulados para implantação nas lesões.

A Figura 6.100 apresenta a microestrutura obtida para os *scaffolds*, os mesmos apresentaram poros de até $900\mu\text{m}$.

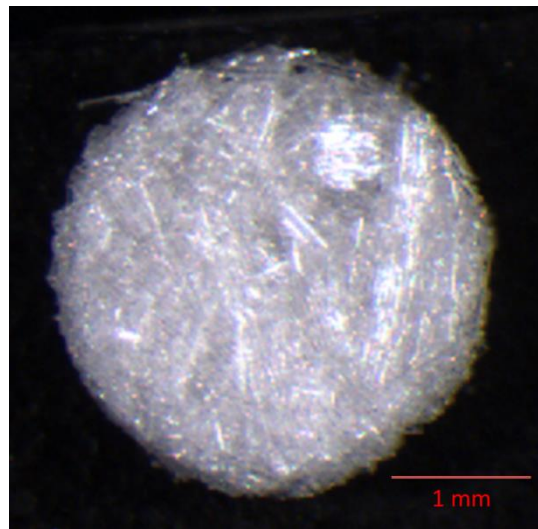
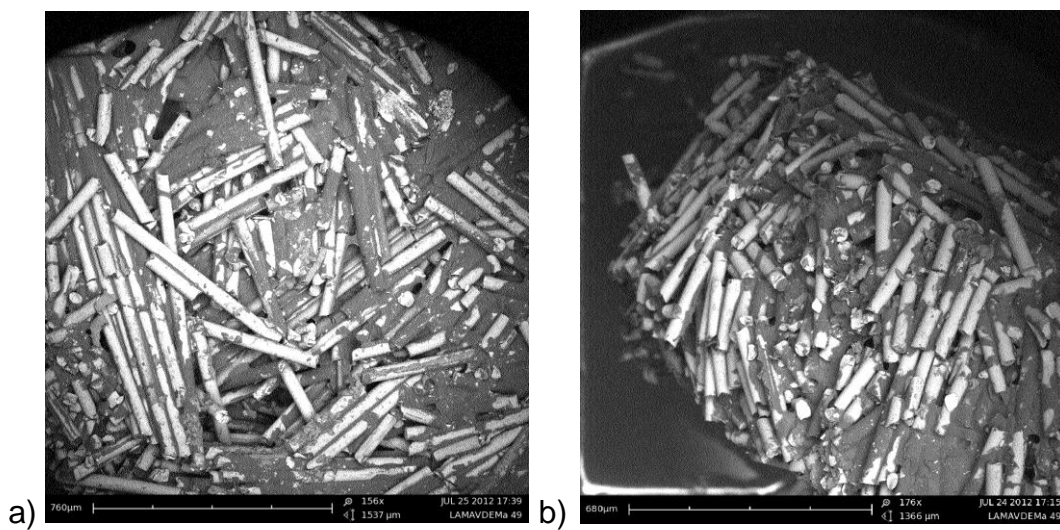


Figura 6.99 - *Scaffold* de 3mm de diâmetro desenvolvido a partir da fibras de vidro do F18.



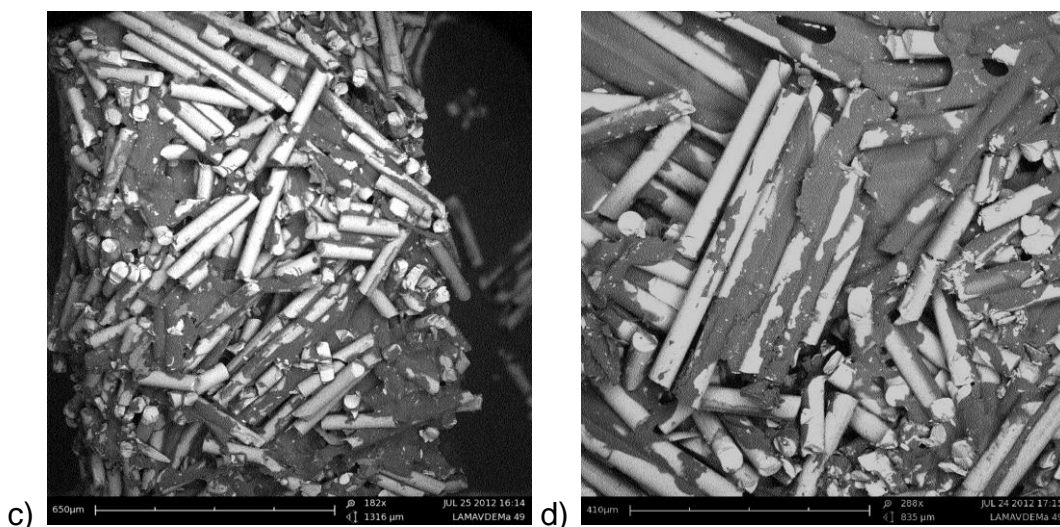


Figura 6.100 - Micrografias dos *scaffolds* de 3mm de diâmetro e 1 mm de espessura.

Para o cálculo da porosidade, os *scaffolds* foram embutidos em resina por meio de um processo à vácuo e, em seguida, foram feitas imagens por MEV. Quinze imagens representativas foram posteriormente tratadas e com auxílio do software Image J – Image Processing and Analysis in Java foi determinada a porosidade dos *scaffolds* desenvolvidos (Figura 6.101).

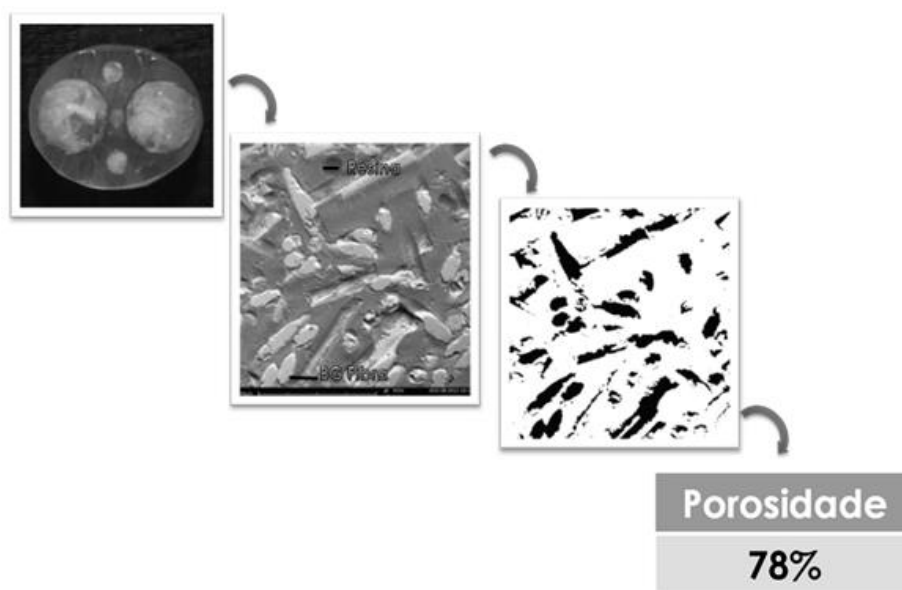


Figura 6.101 - Processo de determinação da porosidade dos *scaffolds* desenvolvidos.

Os resultados histológicos encontrados com a utilização destes biomateriais podem ser observados nas Figuras 6.102 e 6.103, para o grupo controle (GC) e para o grupo tratado com os *scaffolds* (BG).

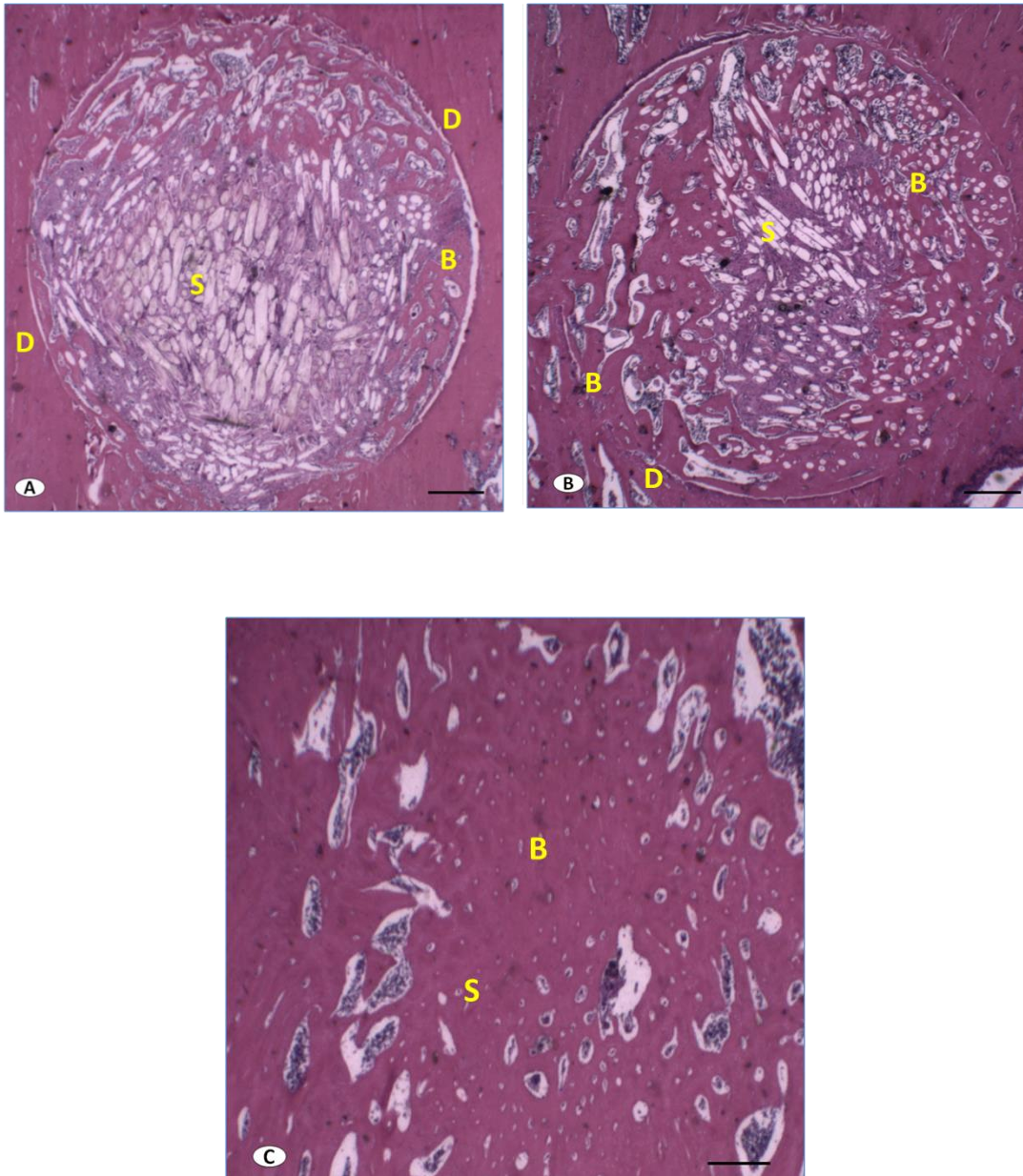


Figura 6.102 – Defeitos na tíbia com aplicação dos *scaffolds* fibrosos em três períodos experimentais A) 15 dias, B) 30 dias e C) 60 dias. A barra representa 200 μ m. Amostra corada em hematoxilina-eosina. Magnificação de 12,5x. S = scaffolds fibroso; B = osso neoformado; D = linha do defeito [Adaptado de 68].

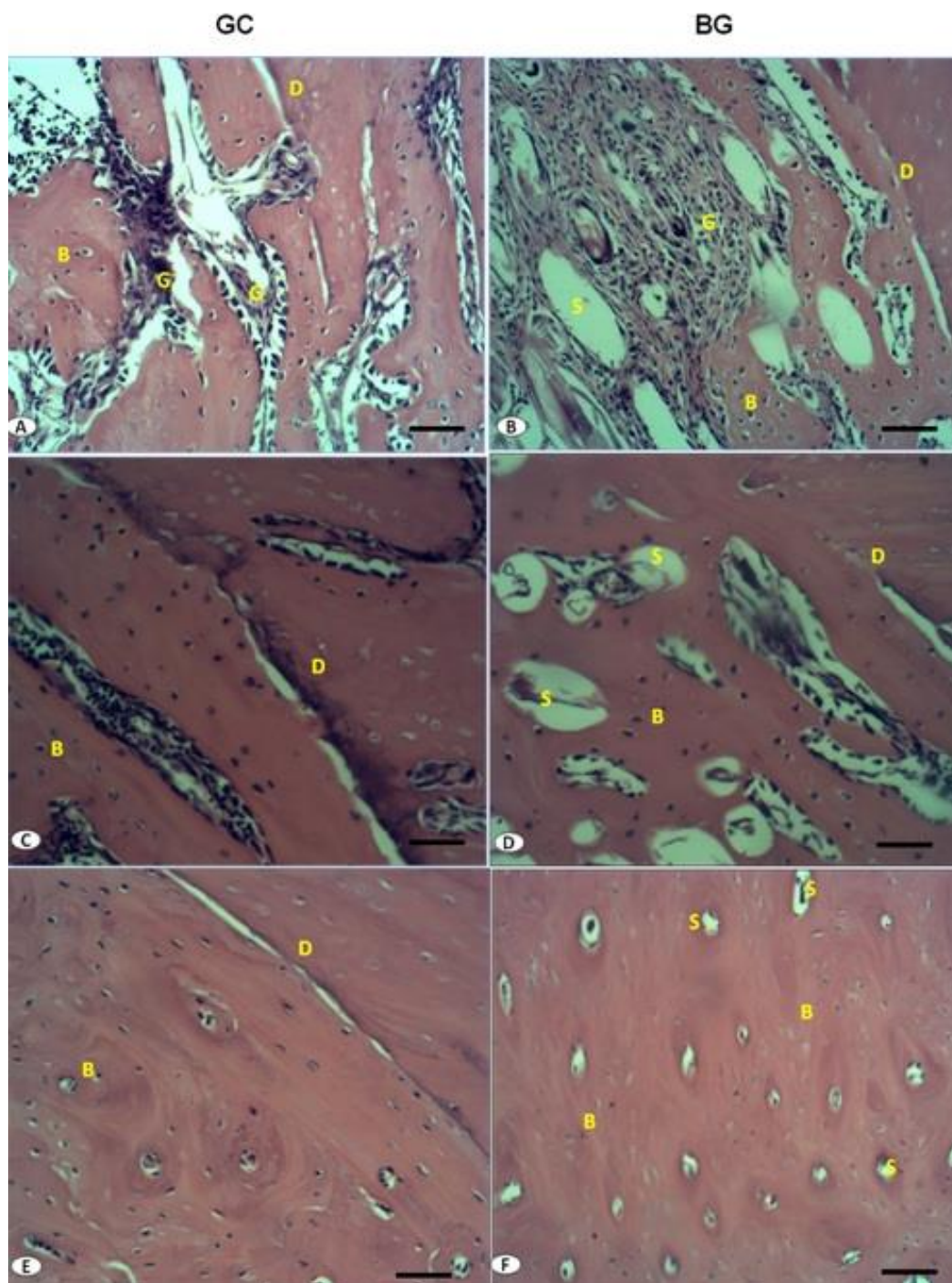


Figura 6.103 – Análise histológica das amostras controle GC e com enxerto BG nos períodos experimentais 15, 30 e 60 dias. GC: 15 dias (A), 30 (C) e 60 (E). BG: 15 dias (B), 30 (D) e 60 (F). Foram encontrados tecidos granular (G); Fibras provenientes dos *scaffolds* (S); Neoformação óssea (B) e a Linha do defeito (D). A barra representa 100 μm . Amostra corada em hematoxilina-eosina. Magnificação de 200x. [Adaptado de 68].

Nestas figuras (6.102 e 6.103), é possível observar que para o grupo tratado com o *scaffold* bioativo, no primeiro período de análise (15 dias) há um completo preenchimento do material por tecido mole, evidenciando a interconectividade dos poros e o início da formação de um novo tecido ósseo. Também é possível perceber a degradação do biomaterial, com o mesmo sendo substituído pelo tecido do hospedeiro. Já em 30 dias, nota-se uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado em substituição do biomaterial. Não é mais observado nenhum processo inflamatório e uma menor quantidade de tecido de granulação é observada.

Após 60 dias não é mais possível observar a linha do defeito para o grupo tratado (BG) como é visto para o grupo controle (GC), sendo o biomaterial quase que totalmente reabsorvido e substituído por um novo tecido ósseo [68].

Estes resultados nos mostraram a capacidade das fibras bioativas na forma de *scaffolds* (com controlada porosidade) em regenerar tecidos duros. A utilização do biomaterial proporcionou uma aceleração na formação de um novo tecido ósseo e sua taxa de degradação permitiu que o mesmo fosse substituído gradativamente pelo tecido do hospedeiro, fator crucial para a completa regeneração do defeito [68].

Ensaio biomecânicos realizados neste estudo indicaram que para o grupo tratado (BG) em 15 dias pós-cirurgia o osso neoformado apresentou-se significativamente mais resistente do que o tecido ósseo de grupo controle [68].

Outra análise realizada foi a histomorfometria para determinação da quantidade de osso neoformado. Os resultados encontrados podem ser observados na Figura 6.104.

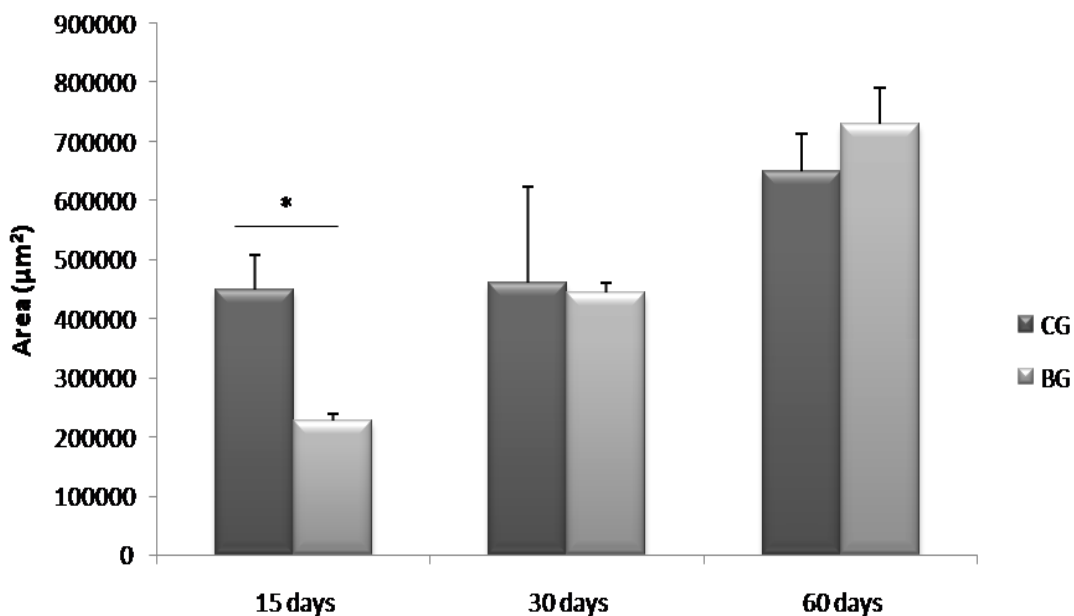


Figura 6.104 – Análise histomorfométrica do grupo controle e do grupo com o enxerto após os períodos de 15, 30 e 60 dias. Valores de $p < 0,05$ estão marcados com “*” [Adaptado de 68].

Estes resultados mostram que para os períodos iniciais houve uma maior quantidade de tecido ósseo formado para o grupo controle, sendo este fato revertido para os outros períodos experimentais. Estes resultados são esperados, já que inicialmente o volume preenchido pelo *scaffold* não é descontado nos cálculos, e para que um novo tecido cresça é necessária, primeiramente, à reabsorção do material. Porém, com a continuidade do estudo vê-se uma maior formação para o grupo tratado (BG).

Na Figura 6.105 são apresentados os resultados obtidos a partir dos estudos de imunohistoquímica para os fatores RUNX-2, RANK-L e COL-1.

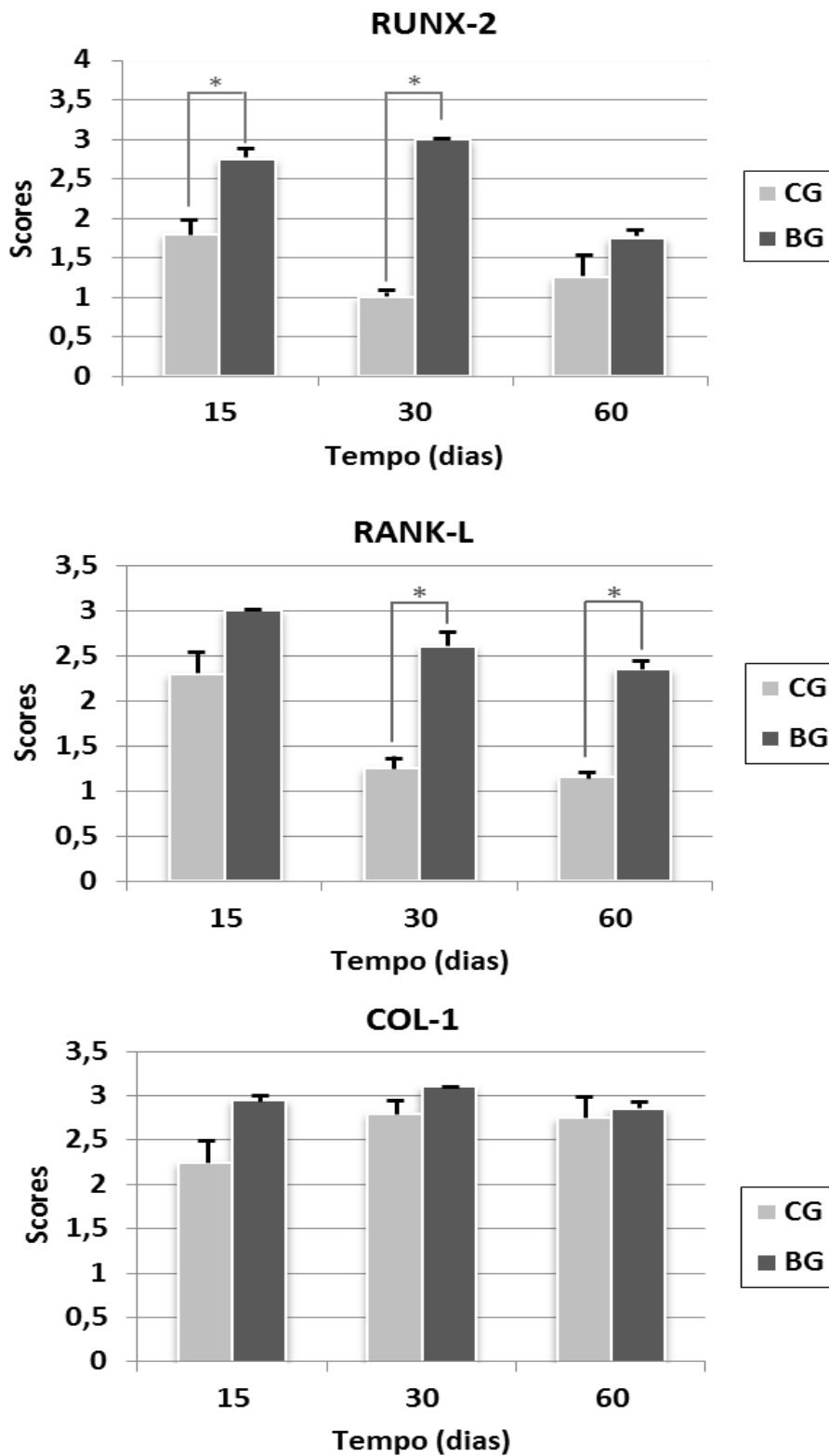


Figura 6.105 – Valores Médios e desvio-padrão para a análise imunohistoquímica para os fatores a) RUNX-2, b) RANK-L e c) COL-1 [Adaptado de 68].

Como pode ser observado na Figura 6.105, todos os fatores foram mais expressos no grupo tratado com o biomaterial. Isso representa um processo de regeneração acelerada com uma maior formação de tecido ósseo. Já que o fator RUNX-2 controla a diferenciação osteoblástica e também regula a expressão de marcadores osteoblásticos. A RANK-L, também mais expressa para o grupo tratado, é responsável pelo controle da função dos osteoclastos, sendo estas células imprescindíveis no processo de remodelação óssea [68].

Este estudo, realizado em colaboração com o doutorando Paulo Gabbai-Armelin, mostrou que *scaffolds* obtidos a partir das fibras de vidro demonstraram um alto potencial para a regeneração do tecido ósseo, aumentando a expressão de fatores osteogênicos e gerando um tecido com maior resistência mecânica em apenas 15 dias pós-procedimentos cirúrgicos.

6.5.3 Ensaios para Tecidos Tegumentares

Visando uma melhor exploração das propriedades de manipulação e flexibilidade apresentada pelos tecidos vítreos desenvolvidos, propuseram-se estudos para a aplicação deste novo biomaterial para a regeneração de tecidos moles. Devido ao grande interesse tecnológico, decidiu-se a verificação da capacidade de estímulo do biomaterial em regenerar lesões de queimadura.

6.5.3.1 Ensaios para Regeneração de Queimaduras

Ensaios explorando o potencial uso das fibras bioativas em lesões de pele foram realizados em colaboração com a Profa. Ana Claudia Rennó. Neste, ratos Wistar machos sofreram lesões de queimadura de terceiro grau por escaldamento, e após a confecção das lesões os tecidos vítreos foram aplicados, como pode ser observado na Figura 6.106,

Sete dias após a realização destes procedimentos, foram realizadas análises histológicas (Figura 6.107) e imunohistoquímicas (Figura 6.108).

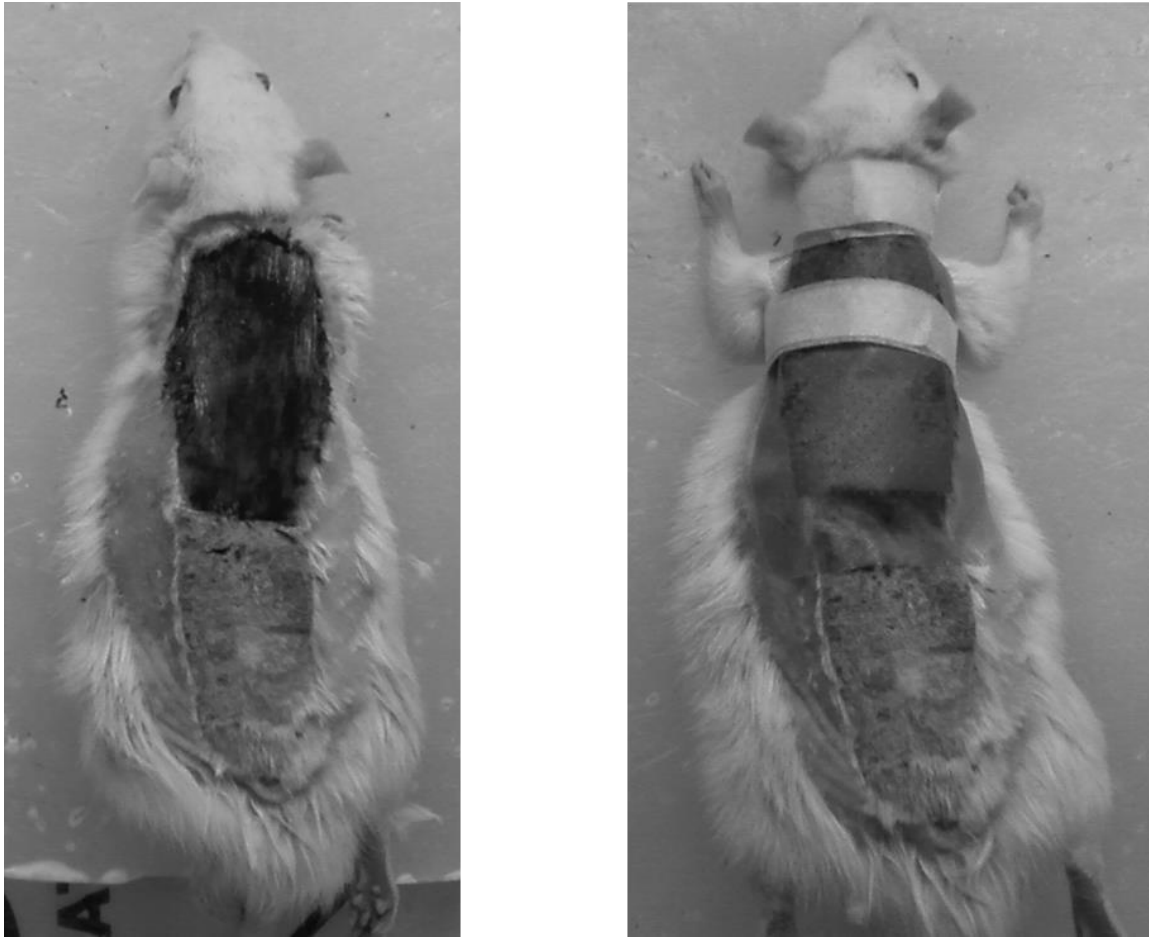


Figura 6.106 – Animais pós implantação da malha de fibras de vidro bioativas após a confecção das lesões de queimadura de terceiro grau.

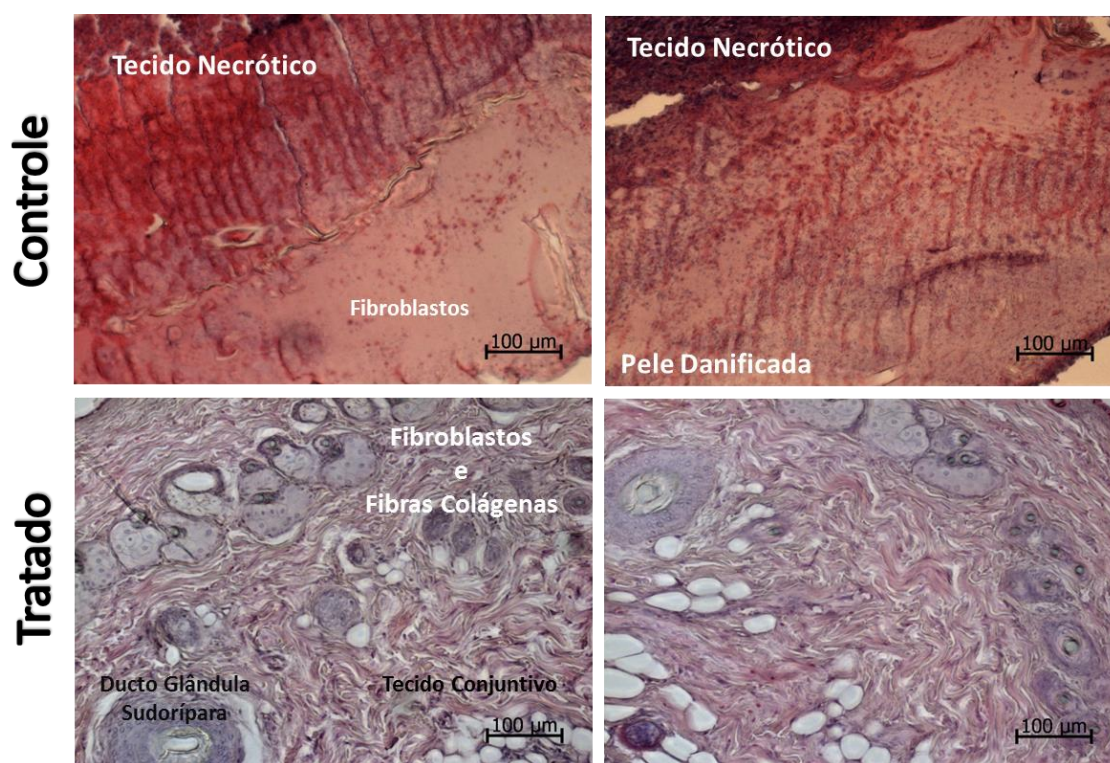


Figura 6.107 – Análises histológicas para os grupos controle e tratado após 7 dias da lesão para o grupo controle e tratado. Magnificação de 200x.

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que a utilização do biomaterial proporcionou uma regeneração acelerada do tecido cutâneo. Na Figura 6.107, observa-se que para o grupo controle, que não recebeu nenhum tratamento, ainda tem-se uma grande quantidade de tecido necrótico e poucas células ligadas a regeneração do tecido (os fibroblastos), já o grupo que recebeu o biomaterial, apresenta um tecido com estruturas semelhantes a um tecido de derme normal, com a presença de fibroblastos, fibras colágenas, queratinócitos e até mesmo a formação de dutos de glândulas sudoríparas.

Ensaio evidenciando o uso de vidros bioativos na regeneração de lesões da pele usando nanofibras de vidro ou pomadas contendo partículas de vidros bioativos têm demonstrado sucesso. No estudo realizado por Day e Jung [55], as nanofibras serviram de suporte para o crescimento do novo tecido, além de acelerar a regeneração devido à lixiviação dos íons provindos o vidro 13-93B.

Lin *et al.* aplicaram um pomada com os vidros 58S e 45S5 em feridas profundas e constataram a sua eficácia na promoção da formação de um novo tecido entre 7 e 14 dias [104].

Porém, nenhum destes materiais consegue combinar as propriedades de facilidade manipulação com o alto caráter bactericida e angiogênico, como apresentado pelo novo vidro F18.

Em relação aos outros estudos apresentados, temos outra grande vantagem com o uso das fibras de vidro do F18, pois os outros materiais necessitam de trocas ou reposições periódicas, já o F18 foi aplicado apenas uma vez, sendo o mesmo reabsorvido com o tempo, sem a necessidade de procedimentos delicados e, possivelmente, dolorosos de retirada e reaplicação do material.

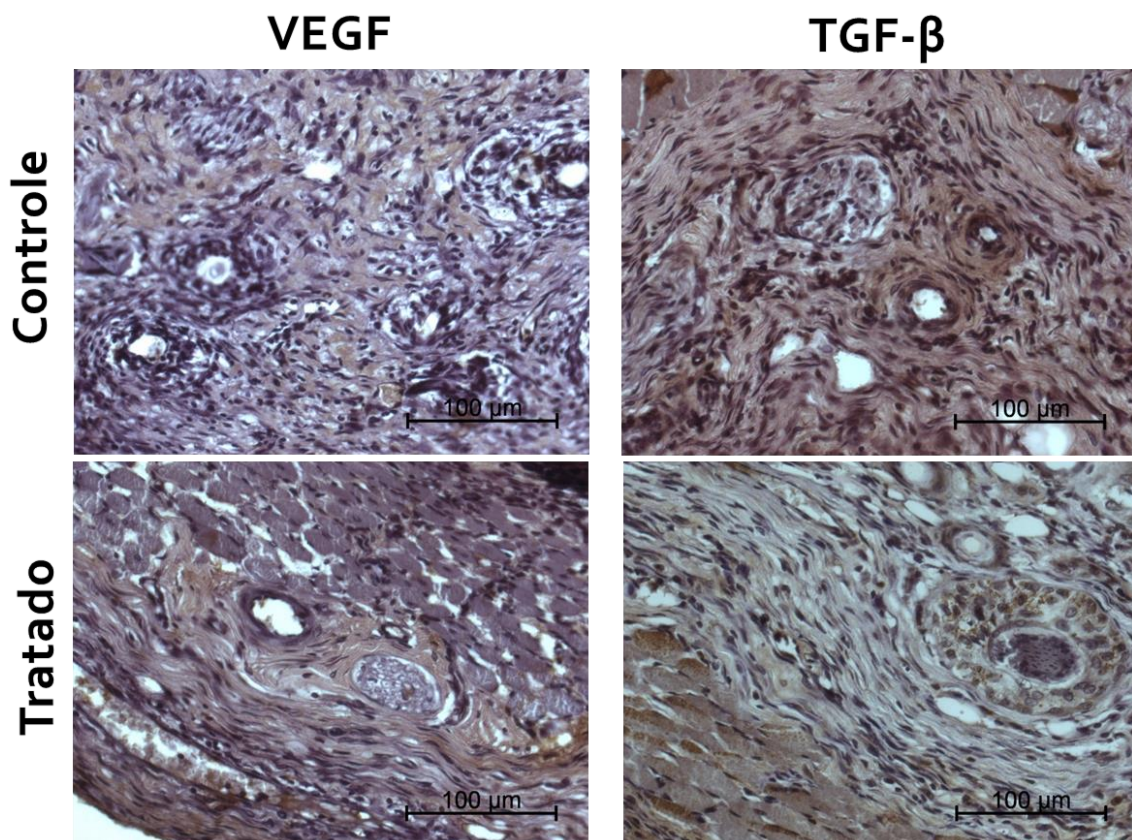


Figura 6.108 – Análise imunohistoquímica para os fatores VEGF e TGF- β após 7 dias da lesão. Magnificação de 400x.

As análises imunohistoquímicas buscaram verificar a presença de dois fatores VEGF e TGF- β após o período de 7 dias, estes fatores de crescimento foram corados e apresentam-se nas áreas marrons dos cortes histológicos (Figura 6.108).

O fator VEGF indica o potencial angiogênico, ou seja, se há o crescimento de vasos sanguíneos no local, já o fator TGF- β indica se há atividade e proliferação celular. Como é possível de se observar, para ambos os fatores, o grupo tratado com o biomaterial apresentou maior expressão, o que indica uma regeneração acelerada do tecido.

Os resultados obtidos com a utilização do novo vidro bioativo F18 evidenciam o potencial uso deste novo biomaterial para aplicações que envolvam a regeneração de tecido mole, especialmente a pele.

7 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados permitem inferir que o novo biomaterial desenvolvido (fibras finas e flexíveis de vidro F18) tem um grande potencial em relação a sua produção de fibras e mantas em escala industrial, assim como sua utilização em diversos procedimentos médicos e odontológicos que visem à regeneração de tecidos duros e/ou moles *in situ*.

As modificações e adaptações realizadas no equipamento de *downdrawing* resultaram em ganhos significativos no processo, como a não cristalização da formulação 18 durante períodos mais longos, permitindo assim, a obtenção de maiores quantidades de fibras.

Mudanças de outros parâmetros, tais como: diâmetro dos orifícios dos cadinhos e a obtenção de dados de viscosidade também permitiram a otimização do processo, culminando em fibras de menor diâmetro e tecidos mais flexíveis e mais resistentes à manipulação.

Os ensaios de degradação mostraram a similaridade na taxa de dissolução e formação da camada de HCA para os vidros bioativos 45S5 e F18.

A quantificação dos íons lixiviados pelo material por meio da técnica de ICP-OES, FTIR e MEV mostraram de maneira mais clara a alta bioatividade do novo material e sua taxa para a formação da camada de HCA para diferentes tipos de amostras. O vidro F18 na forma de fibras se mostrou bastante reativo, com a formação da camada de HCA em apenas poucas horas (4 horas) de imersão nas soluções SBF-K9 e a proposta pela ISO 10993-14.

Os resultados *in vitro* e *in vivo* até o momento coletados demonstram a capacidade de ampliação do espectro de utilização deste novo biomaterial e criam grandes expectativas em relação à aplicação clínica do mesmo em suas diversas formas de apresentação.

Com estes ensaios, foi possível a confirmação da grande capacidade osteocondutora e osteoindutora do vidro F18, assim como a comprovação de sua característica bactericida e das propriedades anti-biofilme.

O vidro F18 também demonstrou-se um material não genotóxico, possibilitando o crescimento e proliferação de células osteoblásticas e fibroblásticas sem causar nenhum dano ao código genético.

Sua alta reatividade o fez eficaz na aplicação odontológica de remineralização dental, na qual a degradação e lixiviação iônica pelo material são extremamente relevantes.

O material também se mostrou bastante promissor nas aplicações onde a flexibilidade das fibras foi mais explorada, como nas aplicações para tecido mole. Nos testes *in vivo* explorando a aplicabilidade do material em queimaduras, verificou-se a efetividade na promoção de um novo tecido cutâneo de maneira acelerada, incitando a expressão de fatores de crescimento responsáveis pela proliferação celular e neoformação de vasos sanguíneos.

Portanto, o desenvolvimento de fibras de vidro bioativas, assim como tecidos flexíveis foi possível com uma técnica simples, pouco onerosa e com grande rentabilidade. As fibras bioativas e bactericidas possibilitaram o desenvolvimento de diversos dispositivos visando diferentes aplicações, o que evidencia mais uma vez a ampliação do espectro de aplicações possíveis para os vidros bioativos.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos com este estudo, poderiam ser sugeridas as seguintes atividades para trabalhos futuros:

- A caracterização mecânica das fibras e tecidos obtidos em relação ao seu comportamento durante os ensaios *in vitro*, utilizando-se as soluções de SBF-K9 e de degradação ISO 10993-14.

- Ensaios *in vivo* e *in vitro* que explorem outras propriedades como a regeneração de cartilagem.

- Desenvolvimento de novos biocompósitos reforçados com as fibras de vidro bioativo provindas da formulação F18. Tanto para aplicações para regeneração óssea (na forma de *scaffolds* porosos) quanto para regeneração de lesões da pele ou outros tecidos moles (na forma de filmes).

- Realização de ensaios clínicos.

9 REFERÊNCIAS

- [1] HENCH, L. L.; WILSON, J. **An Introduction to Bioceramics. Advanced Series in Ceramics.** Singapore: World Scientific Publishing Publishing Co. Pte. Ltd., v. 1, 1993.
- [2] CERRUTI, M. G.; GREENSPAN, D.; POWERS, K. An analytical model for the dissolution of different particle size samples of Bioglass in TRIS-buffered solution. **Biomaterials**, v. 26, p. 4903-4911, 2005.
- [3] OONISHI, H.; KUSHITANI, S.; YASUKAWA, E.. E. A. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. **Clin Orthop Relat Res**, p. 316-325, 1997.
- [4] HENCH, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, p. 1487-1510, 1991.
- [5] HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v. 19, p. 1419-23, 1998. ISSN 16.
- [6] HOLZAPFEL, B. M. et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews** , v. 65, p. 581–603, 2013.
- [7] FIRM, M. R. Markets and Markets. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/>>. Acesso em: 26 Agosto 2013.
- [8] HENCH, L. L. . P. J. Third generation biomaterial materials. **Science**, v. 295, p. 1014-1017, 2002.
- [9] NAVARRO, M. et al. Biomaterials in Orthopaedics. **J. R. Soc. Interface**, v. 5, p. 1137-1158, 2008.
- [10] HENCH, L. L. The Story of Bioglass. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 17, p. 967-978, 2006.
- [11] CAO, W.; HENCH, L. L. Bioactive Materials. **Ceramics Internacional**, v. 22, p. 493-507, 1996.
- [12] VÄLIMÄKI, V. V.; ARO, H. T. Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. **Scandinavian Journal of**

- Surgery**, v. 95, p. 95-102, 2006.
- [13] BROWN, R. F. et al. Growth and differentiation of osteoblastic cells on 13-93 bioactive glass fibers and scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 4, p. 387–96, 2008.
- [14] RAHAMAN, M. N. et al. Bioactive glass in tissue engineering. **Acta Biomater**, v. 7, p. 2355-2373, 2011. ISSN 6.
- [15] HUANG, Z.-M. et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Composites science and technology**, v. 63, n. 15, p. 2223-2253, 2003.
- [16] MARION, N. et al. Bioactive borate glass supports the osteogenic potential of human mesenchymal stem cells. **Mech Adv Mater Struct**, v. 12, p. 239-246, 2005.
- [17] CLARK, A. E.; HENCH, L. L.; PASCHALL, H. A. The influence of surface chemistry on implant interface histology: a theoretical basis for implant materials selection. **J Biomed Mater Res**, v. 10, p. 161-74, 1976.
- [18] SOUZA, M. T. **Desenvolvimento de Manta Flexível Altamente Bioativa**. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p. 118. 2011.
- [19] BEST, S. M.; PORTER, A. E. Bioceramics: Past, present and for the future. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 28, p. 1319-1327, 2008.
- [20] NEREM, R. M. Cellular Engineering. **Ann Biomed Eng.**, v. 19, p. 529-545, 1991.
- [21] BOWLIN, G. L.; WNEK, G. **Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering**. 2nd ed. ed. New York: Informa Healthcare USA, v. 1, 2008.
- [22] CHEN, C. C. et al. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. **Biomaterials**, v. 24, p. 1167-73, 2003. ISSN 7.

- [23] WILSON, J. et al. Toxicology and biocompatibility of bioglasses. **J Biomed Mater Res**, v. 15, p. 805-817, 1981. ISSN 6.
- [24] WILSON, J. E., NOLLETI, D. Bonding of Soft Tissues to Bioglass. In: YAMAMURO, T. H. L. L. . W. J. **Handbook of Bioactive Ceramics: Bioactive glasses and Glass-Ceramics**. 1. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, v. 1, 1990. p. 903-904.
- [25] HENCH, L. L. Genetic design of bioactive glass. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, p. 1257–1265, 2009.
- [26] XYNOS, I.D. et al. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 55, p. 151-157, 2001. ISSN 2.
- [27] RECK, R. Tissue reactions to glass ceramics in the middle ear. **Clin Otolaryngol Allied Sci**, v. 6, p. 63-65, 1981.
- [28] WILSON, J.; YLI-URPO, A.; HAPPONEN, R. **Bioactive Glasses: Clinical Applications. An Introduction to Bioceramics**. Advanced Series in Ceramics. ed. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, v. 1, 1993.
- [29] LOVELACE, T. B. et al. Clinical evaluation of bioactive glass in the treatment of periodontal osseous defects in humans. **J Periodontol**, v. 69, p. 1027-35, 1998.
- [30] TAI, B. J. et al. Anti-gingivitis efficacy of a dentifrice containing bioactive glass (NovaMin) particulate. **J Dent Res Special Issue A**, v. 83, p. 1545, 2004.
- [31] TAI, B. J. et al. Anti-gingivitis effect of a dentifrice containing bioactive glass (NovaMin®) particulate. **J Clin Period**, v. 33, p. 86-91, 2006.
- [32] RAVAGNANI, C.. **Biosilicato para promoção da saúde oral**. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos - São Paulo., p. 161 p. 2003.

- [33] RADIN, S. et al. Osteogenic effects of bioactive glass on bone marrow stromal cells. **Journal Biomed. Mater Res**, v. 73, p. 21-29, 2005.
- [34] WALLENBERGER, F.T., WATSON, J.C., LI, H., PPG INDUSTRIES, INC.. **ASM Handbook: Glass Fibers**. Ohio, USA: ASM International, v. 21, 2001.
- [35] ARSTILA, H. **Crystallization Characteristics of Bioactive Glasses**. Åbo Akademi University, Process Chemistry Centre. Åbo Finlândia, p. 58. 2008.
- [36] WALLENBERGER, F.T., BINGHAM, P.A. **Fiberglass and Glass Technology - Energy-friendly Compositions and Applications**. 1. ed. London: Springer , v. 1, 2010.
- [37] LOEWENSTEIN, K. L. **The Manufacturing Technology of Continuous Glass Fibers**. 3. ed. [S.I.]: Elsevier, 1993.
- [38] BINGHAM, P.A., MARSHALL, M. Reformulation of container glasses for environmental benefit through lower melting temperatures. **Glass Technol.**, v. 46, p. 11–19, 2005.
- [39] HRMA, P. et al. Effect of float glass composition on liquidus temperature and devitrification behaviour. **Glass Technology - European Journal of Glass Science and Technology Part A**, v. 47, p. 78-90, 2006. ISSN 3.
- [40] CUARTAS, R. R. Calculo Teorico de Propriedades del Vidrio: Viscosidad, Parametros Termicos y Parametros de Devitrificacion. **Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr.**, v. 23, p. 105–111, 1984.
- [41] BRINK, M., KARLSSON, K., YLI-URPO, A. **Bioactive Glasses and their Use**. Int. Cl. C03C 3/097, U.S. Patent Documents n. 6054400, Abril 2000.
- [42] WIKIPEDIA. Disponivel em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Melt_spinning>. Acesso em: 13 Abril 2011.

- [43]. PIRHONEN, E. et al. Manufacturing, mechanical Characterization, and In Vitro Performance of Bioactive Glass 13-93 Fibers.. **Wiley InterScience**, DOI: **10.1002/jbm.b.30429**, 2005.
- [44] PIRHONEN, E.; MIOMAS, L.; BRINK, M. Mechanical Properties of Bioactive Glass 9-93 Fibres. **Acta Biomaterialia**, v. 2, p. 103-107, 2006.
- [45] LU, H. et al. Electrospun submicron bioactive glass fibers for bone tissue scaffold. **J Mater Sci: Mater Med**, v. v. 20, p. p. 793-798, 2009.
- [46] HONG, Y. et al. Fabrication and Drug Delivery of Ultrathin 2010 Mesoporous Bioactive Glass Hollow Fibers.. **Adv. Funct. Mater.**, v. 20, p. 1503–1510, 2010.
- [47] ARSTILA, H. et al. Factors affecting crystallization of bioactive glasses. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 27, p. 1543-1546, 2007.
- [48] CLUPPER, D. C. et al. Bioactive Evaluation of 45S5 bioactive glass fibres and Preliminary Study of Human Osteoblast Attachment. **J. Mat Science: Materials in Medicine**, v. 15, p. 803-808, 2004.
- [49] BRINK, M. The Influence of Alkali and Alkaline Earths on the Working Range for Bioactive Glasses.The Influence of Alkali and Alkaline Earths on the Working Range for Bioactive Glasses. **J Biomed Mater Res**, v. 36, p. 109-117, 1997.
- [50] PIRHONEN, E. **Fibres and Composites for Potential Biomaterials Applications**. Tese (Doutorado) — Tampere University of Technology. Tampere, Finlândia., p. 84. 2006.
- [51] MOIMAS, L. et al. Rabbit pilot study on the resorbability of three-dimensional bioactive glass fibre scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 2, p. 191–199, 2006.
- [52] DE DIEGO, M. A.; COLEMAN, N. J.; HENCH, L. L. Tensile Properties of Bioactive Fibers for Tissue Engineering Applications. **J Biomed Mater Res**, v. 53, p. 199, 2000.

- [53] PINTO, J. G. S. et al. Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais – uma revisão de conceitos atuais. **RFO**, v. 12, p. 79-84, 2007.
- [54] CORTEZ, A. L. V.; RABELO, G. O.; MAZZONETTO, R. Reconstrução de Maxila Atrófica utilizando Osso Autogéneo e Malha de Titânio para Posterior Reabilitação com Implantes– Caso Clínico. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 45, p. 163-167, 2004.
- [55] JUNG, S., Day, D. Cotton-Candy that heals? **American Ceramic Society Bulletin**, , v. 90, 2011. ISSN 4.
- [56] ISO 10993:14. **Biological evaluation of medical devices - Identification and quantification of degradation products from ceramics**. ISO 10993. EUA. 2009.
- [57] SOUZA, M. T., PEITL, O., ZANOTTO, E. D. "**Composição Vítrea, Fibras e Tecidos Vítrosos Bioativos e Artigos**". BR 10 2013 020961 9, PCT: BR2014/000275, 2013.
- [58] WIKIPÉDIA. Wikipédia, 2010. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Bragg's_law>. Acesso em: 09 Abril 2010.
- [59] INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **Implants for surgery — In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials**. ISO 23317. EUA. 2014.
- [60] KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; SAKKA, S. Solutions Able to Reproduce in vivo Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A-W3. **J Biomed Mat Res**, v. 24, p. 721-734, 1990.
- [61] STUART, B. **Modern Infrared Spectroscopy**. Chichester: John Wiley & Sons, v. 1, 1996.
- [62] JONES, J. R., SEPULVEDA, P., HENCH, L.L. Dose-Dependent Behavior of Bioactive Glass Dissolution. **J Biomed Mater Res.**, v. 58, p. 720-6, 2001.
- [63] P. SEPULVEDA, J. R. JONES, L. L. HENCH. In vitro dissolution

- of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 61, p. 301–311, 2002.
- [64] GABBAI-ARMELIN, P.R. et al. Characterization and biocompatibility of a fibrous glassy scaffold. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.**, DOI: 10.1002/term.2017, 2015.
- [65] JAPANESE INDUSTRIAL STANDARDS. **Antibacterial products -- Test for antibacterial activity and efficacy. JIS 2801**, 2010.
- [66] GASIK, M. et al. Reduction of Biofilm Infection Risks and Promotion of Osteointegration for Optimized Surfaces of Titanium Implants. **Advanced Healthcare Materials**, v. 1, p. 117-127, 2012.
- [67] VECINA, C.A.D. **VIABILIDADE DO IMPLANTE DE MALHA DE VIDRO BIOATIVA BASE DE BIOSILICATO NA REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEOCRANIANO DE RATOS**. FACULDADE DE MEDICINA DE JUNDIAÍ – FMJ. Jundiaí, p. 84. 2014.
- [68] GABBAI-ARMELIN, P.R., SOUZA, M. T., KIDO, H. W. et al. Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. **J Mater Sci: Mater Med**, 26, 2015, DOI 10.1007/s10856-015-5516-1.
- [69] SOUZA, M. T., PEITL, O., ZANOTTO, E. D. **“Equipamento e Método para a Obtenção de Fibras por Downdrawing a partir de Composições de Baixa Estabilidade Vítreas”**. BR 10 2014 023349 0, 2014.
- [70] NASCIMENTO, M. L. F. et al. Can Glass Stability Parameters Infer Glass Forming Ability? **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 351, p. 3296–3308, 2005.
- [71] VEDEL, E. et al. Control of the forming properties of bioactive glasses. **Proc. Eighth Eur. Soc. Glass Sci Technol. Conf. Glass Technol.: Eur. J. Glass Sci. Technol. A**, v. 48 (4), p. 1-5, 2007.
- [72] HUPA, L. Melt Derived Bioactive Glasses. In: YLÄNEN, H. **Bioactive Glasses: Materials, Properties and Applications**.

- Cambridge UK: Woodhead Publishing Limited, v. 1, 2011. p. 3-23.
- [73] H. ARSTILA, et al. Liquidus Temperatures of Bioactive Glasses. **Advanced Materials Research**, v. 39-40, p. 287-292, 2008.
- [74] CHATZISTAVROU, X. et al. Surface and Bulk Contributions in the Crystallization Process of a Bioactive Glass. **Key Engineering Materials**, v. 309-311, p. 313-316, 2006.
- [75] ARSTILA, H. et al. Predicting physical and chemical properties of bioactive glasses from chemical composition. Part 2. Devitrification characteristics. **Glass Technol.: Eur. J Glass Sci A**.
- [76] VEDEL, E. et al. Predicting physical and chemical properties of bioactive glasses from chemical composition. Part 4: Tailoring compositions with desired properties. **Glass Technol.: Eur. J. Glass Sci. Technol. A**, v. 50 (1), p. 9-16, 2009.
- [77] VEDEL, E. et al. Predicting physical and chemical properties of bioactive glasses from chemical composition. Part I. Viscosity characteristics. **Glass Technol.: Eur. J. Glass Sci. Technol. A**, v. 49 (6), p. 251-259, 2008.
- [78] RAMALINGAM, M. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine. A Nano Approach**. Boca Raton, FL: CRC Press, v. 1, 2013.
- [79] NASCIMENTO, M.L.F., APARICIO, C. Viscosity of strong and fragile glass-forming liquids investigated by means of principal component analysis. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 68, p. 104–110, 2007.
- [80] CHINAGLIA, C. R. **O uso de um vidro altamente bioativo para conferir bioatividade à superfície do titânio – desenvolvimento de um método para recobrimentos descontínuos**. Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p. 220. 2013.
- [81] PEITL, O.; ZANOTTO, E.D.; HENCH, L.L. Highly Bioactive P2O5-Na2O-CaO-SiO2 Glass-Ceramics. **Journal of Non-Crystalline**

- Solids**, 292, 2001. 115-126.
- [82] KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. **J Biomed Mater Res**, v. 62, p. 600, 2002.
- [83] SOUZA, M.T., CROVACE, M.C., SCHRÖDER, C., ECKERT, H., PEITL, O., ZANOTTO, E.D. Effect of magnesium ion incorporation on the thermal stability, dissolution behavior and bioactivity in Bioglass-derived glasses. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 382, p. 57-65, 2013.
- [84] GREENSPAN D.C., ZHONG, J. P., LaTORRE, G. P. Effect of surface area to volume ratio on in vitro surface reactions of bioactive glass particulates. In: ANDERSSON, O. H. . U. A. **Bioceramics**. Oxford: Butterworth-Heinemann, v. 7, 1994. p. 29-33.
- [85] ZHANG, D. et al. Predicting physical and chemical properties of bioactive glasses from chemical composition. Part 3: In vitro reactivity. **Glass Tech.: Eur. Glass Sci Tech A**, v. 50 (1), p. 1-8, 2009.
- [86] FILGUEIRAS, M. R. T., LaTORRE, G. P.; HENCH, L. L. Solution effects on the surface reactions of three bioactive glass compositions. **J Biomed Mat Res**, v. 27, p. 1485-1493, 1993.
- [87] HENCH, L. L.; CLARK, D. E. Physical chemistry of glass surfaces. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 28, p. 1487-1510, 1976.
- [88] HENCH, L. L. Bioglass: 10 milestones from concept to commerce.. **J. Non-Cryst. Solids**, p. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2014.12.038>, 2015.
- [89] TIRAPELLI, C. et al. The effect of a novel crystallised bioactive glass-ceramic powder on dentine hypersensitivity: a long-term clinical study. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 38, p. 253-262, 2011.
- [90] PINTADO-PALOMINO, K., PEITL, F. O. . ZANOTTO, E. D., TIRAPELLI, C. A clinical, randomized, controlled study on the use of desensitizing agents during tooth bleaching. **Journal of Dentistry**, p.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2015.07.002>, 2015.

- [91] LOPES, M. B. et al. Comparative Study of Tubular Diameter and Quantity for Human and Bovine Dentin at Different Depths. **Braz Dent J**, v. 20(4), p. 279-283, 2009.
- [92] INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. ISO 10993-5**. EUA. 2009.
- [93] NESTOR, A. L., WILLERY, J., ALLISON, D.C. Tissue Culture, Cell Growth and Analysis. In: SOUBA, W.W., WILMORE, D.W. **Surgical Research**. California, EUA: Academic Press, v. 1, p. 193-206, 2001.
- [94] CAMPANINI, L. **Avaliação da Atividade Bactericida do Biovidro F18 e F18 Com Prata para Aplicações Médicas**. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, p. 65. 2015.
- [95] STOOR, P., SÖDERLING, E., SALONEN, J.I. Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms. **Acta Odontol Scand**, v. 56(3), p. 161-5, 1998.
- [96] HU, S. et al. Study on Antibacterial Effect of 45S5 Bioglass. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, p. 281-286, 2009.
- [97] MARTINS, C. H. G. et al. Assessment of Antimicrobial Effect of Biosilicate® Against Anaerobic, Microaerophilic and Facultative Anaerobic Microorganism. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22 (6), p. 1439-1446, 2011.
- [98] RIVADENEIRA, J. et al. In Vitro Antistaphylococcal effects of a novel 45S5 Bioglass/Agar-Gelatin Biocomposite Films. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115 (2), p. 604-612, 2013.
- [99] BELLANTONE, M.; WILLIAMS, H. D.; HENCH, L. L. Broad-Spectrum Bactericidal Activity of Ag₂O-Doped Bioactive Glass. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46 (6), p. 1940-1945, 2002.

- [100] GORRITI, M. F. et al. In Vitro Study of the Antibacterial Activity of Bioactive Glass-Ceramic Scaffolds. **Advanced Engineering Materials**, v. 11, p. B67-B70, 2009.
- [101] HASLETT, C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease.. **Br Med Bull**, v. 53, p. 669-683, 1997.
- [102] BABIOR, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. **N Engl J Med**, v. 298, p. 659-668, 1978.
- [103] SILVA, S. O. **Oxidação de Melatonina Catalisada por Mieloperoxidase em Neutrófilos Ativados**. Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 73. 2001.
- [104] LIN, C. et al. Healing effect of bioactive glass ointment on full-thickness skin wounds. **Biomed. Mater.**, v. 7, p. 1-13, 2012.
- [105] WILLIAMS, D. **The Williams Dictionary of Biomaterials**. Liverpool: Liverpool University Press, v. 1, 1999.
- [106] ROSSI, R. J.; ARUN, K. G. **Implantodontia - Bases clínicas e cirúrgicas**. [S.I.]: Robe Editorial, v. v. 1, 1996.

ANEXO I

Glossário

Alguns dados foram adaptados do dicionário “The Williams Dictionary of Biomaterials” [105], outros apresentam suas referências ao final do texto.

Análise Histológica – estudo dos tecidos biológicos, visando à averiguação de sua estrutura e função.

Análise Imunohistoquímica – refere-se ao processo de localizar e quantificar proteínas (como anticorpos e antígenos) nas células de uma amostra de tecido biológico.

Angiogênico - O que induz a formação de novos vasos sanguíneos, especialmente os vasos sanguíneos que transportam oxigênio e nutrientes aos tecidos.

Bactericida - Qualquer agente que destrói bactérias.
<http://michaelis.uol.com.br>

Bacteriostática - Diz-se do agente capaz de inibir o desenvolvimento das bactérias.

Bioatividade - Um material bioativo é aquele que exibe uma resposta biológica específica do hospedeiro, resultando na formação de uma ligação com os tecidos vivos.

Biocompatibilidade - a capacidade de um material ser compatível com os tecidos vivos, sem levar a rejeição.

Biomaterial - O termo é abrangente, mas de forma geral são materiais que interagem diretamente com os sistemas biológicos com a função de avaliar, tratar, aumentar ou substituir tecido, órgão ou função do corpo.

Colágeno - O colágeno é a proteína mais abundante no corpo humano, sendo de importância fundamental na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo, sendo responsável por grande parte de suas propriedades físicas. O colágeno representa mais de 30% da proteína total do corpo, sendo obtidos industrialmente principalmente através dos bovinos e caninos.
<http://pt.wikipedia.org/wiki/Col%C3%A1geno>

Crônica - 1 Que dura há muito tempo. 2 *Med.* Diz-se das doenças que, em oposição às agudas, se prolongam, percorrendo lentamente os seus períodos. <http://michaelis.uol.com.br>

Enxertos Alógenos – são aqueles que apresentam o material retirado de um doador da mesma espécie. Uma grande vantagem desta técnica é a disponibilidade ilimitada do material, contudo, há um grande potencial de reabsorção e também existe o risco de transmissão de doenças quando manipulados de forma inadequada [106].

Enxertos Alopáticos - são aqueles materiais sintéticos ou naturais, sendo sua principal característica a osteocondutividade. Funcionando assim, como um material de preenchimento. Podem ser sintéticos como fosfato de cálcio ou naturais como aqueles obtidos por meio de corais. Esses materiais, dependendo de suas propriedades químico-físicas, podem permanecer no local, serem reabsorvidos ou atuarem como matriz para a deposição do tecido ósseo [106].

Enxertos Autógenos – são aqueles onde o material enxertado é retirado de uma área doadora do próprio paciente. As regiões doadoras mais

comumente utilizadas são a sínfise da mandíbula, costelas e a região da crista do osso ilíaco [63].

Enxertos Xenógenos – são aqueles em que o material é obtido de um doador de espécie diferente de quem receberá o material enxertado, como no caso da utilização do osso bovino, que vem sendo altamente empregado nos procedimentos cirúrgicos [106].

Fibroblastos - Os fibroblastos são as células mais comuns do tecido conjuntivo e responsável pela biossíntese de colágeno do tipo 1, as proteínas e a elastina, além das glicosaminoglicanas e glicoproteínas multiadesivas que farão parte da matriz extracelular. Produz substância intercelular e origina células de outros tecidos conjuntivos, são responsáveis pela regeneração. Essas células estão também envolvidas na produção de fatores de crescimento, que controlam o crescimento e a diferenciação celular.
<http://pt.wikipedia.org/wiki/Fibroblasto>

Fator transformador de crescimento β (TGF- β) - O Fator de transformação do crescimento beta (em inglês: transforming growth factor beta - TGF- β) é uma proteína que controla a proliferação, diferenciação celular e outras funções na maioria das células. Ela desempenha um papel na imunidade, câncer, doenças cardíacas, diabetes e síndrome de Marfan. TGF-beta atua como um fator antiproliferativo em células epiteliais normais e em estágios iniciais da oncogênese.
http://pt.wikipedia.org/wiki/Fator_de_transforma%C3%A7%C3%A3o_do_crescimento

Hidroxicarbonatoapatita (HCA) - A reatividade da superfície original de vidros bioativos com os fluidos corpóreos é um processo que envolve 11 etapas que conduzem à formação da camada de HCA. Sendo por meio desta ligação química do material com os tecidos do corpo. A capacidade de um

biomaterial de formar em sua superfície uma camada de HCA quando em contato com os tecidos vivos é o principal indicador de sua bioatividade.

Implante - dispositivo médico fabricado a partir de um ou mais biomateriais que é intencionalmente inserido no interior do corpo para reabilitação de um tecido danificado.

Índice de bioatividade - O índice de bioatividade (I_b) é definido como o inverso do tempo requerido para que mais de 50% da interface esteja ligada ao tecido do hospedeiro ($t_{0,5bb}$), ou seja: $I_b = 100/t_{0,5bb}$ [1].

Inflamação - Resposta local à ofensa celular (como na infecção ou trauma), caracterizada por dilatação capilar, infiltração leucocítica, calor, e comumente dor, e que constitui o primeiro mecanismo de controle dos agentes nocivos e de eliminação do tecido danificado. <http://www.priberam.pt>

Leucócitos - Também conhecidos por glóbulos brancos, é um grupo de células oriundas da medula óssea e presentes no sangue, linfa, órgãos linfoides e vários tecidos conjuntivos. Eles fazem parte do sistema imunitário do organismo e têm por função o combate e a eliminação de microrganismos e estruturas químicas estranhas por meio de sua captura ou da produção de anticorpos. <https://pt.wikipedia.org/wiki/Leuc%C3%B3cito>

Meio de cultura- Os meios de culturas são preparações químicas que possuem em sua formulação, nutrientes necessários para que os microrganismos possam multiplicar-se permitindo seu estudo. http://pt.wikipedia.org/wiki/Meio_de_cultura

Neoformação - formação de um tecido novo no seio de um tecido já diferenciado.

Neutrófilos - Os neutrófilos são uma classe de células sanguíneas leucocitárias, que fazem parte do sistema imunológico e são um dos 5

principais tipos de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos). São polimorfonucleados e possuem uma grande capacidade de fagocitose. https://pt.wikipedia.org/wiki/Granul%C3%B3cito_neutr%C3%B3filo

Osseointegração – conceito de uma adesão clínica assintomática de um biomaterial ao osso em condições de carga funcional, ou seja, o órgão é mantido em função recebendo cargas durante seu uso.

Osteoblasto- São células mononucleadas, que se encontram próximos à superfície óssea e responsáveis por produzir, inicialmente, a matriz óssea não mineralizada denominada osteóide, composto basicamente por colágeno. A fosfatase alcalina, uma proteína produzida e secretada pelo osteoblasto cria, em um segundo momento, sítios para a deposição de fósforo e cálcio, a partir dos quais crescem os cristais de hidroxapatita. Esse processo de nucleação e crescimento mineraliza a matriz osteóide, criando finalmente o tecido ósseo final que é composto principalmente por (1) colágeno tipo I. Esse processo de diferenciação de osteoblastos, que pode ser verificado tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ocorre basicamente em três fases: (1) proliferação das células, (2) a maturação da matriz, e (3) a mineralização da matriz.

Osteocondução - processo que permite que o osso cresça e se remodele sobre uma superfície. Um material osteocondutor tem a finalidade de orientar o tecido em seu processo de neoformação.

Patogênicos - Relativo à patogenia. Que provoca doença. <http://michaelis.uol.com.br>

Scaffold – na área de engenharia de tecidos, o scaffold é definido como uma estrutura porosa que serve como substrato e guia para a regeneração dos tecidos corpóreos ou ósseos.

Simulated Body Fluid - fluido que foi preparado de tal forma que se assemelha quimicamente à composição dos fluidos do corpo, geralmente o fluido extracelular que entra em contato com o biomaterial implantado.

Tecido Conjuntivo - O tecido conjuntivo ou tecido conectivo é amplamente distribuído pelo nosso corpo. A principal função do tecido conjuntivo é o preenchimento dos espaços intercelulares do corpo e fazer a ligação de órgãos e de tecidos diversos e entre outros, como por exemplo, preenchimento (Tecido Conjuntivo Frouxo), sustentação (Tecido Conjuntivo Ósseo), transporte e defesa (Tecido Conjuntivo Sanguíneo).

http://pt.wikipedia.org/wiki/Tecido_conjuntivo

Tecido Fibroso - A resposta típica do corpo aos materiais utilizados como implantes e com baixa bioatividade, em geral metais como o aço inox, é o seu encapsulamento por uma camada de tecido conjuntivo fibroso.

Tecido de granulação - É a parte mais característica do processo de cicatrização. Representa o novo tecido que cresce para preencher o defeito. A sua superfície possui um aspecto granuloso avermelhado. A matriz extracelular vai-se densificando, adquirindo cada vez mais fibras colágenas formando um padrão frouxo, mas que, pouco a pouco se dispõem em feixes paralelos, compactos, enquanto os vasos sanguíneos vão se tornando menos proeminentes e desaparecem. Assim, o tecido de granulação acaba dando lugar a uma cicatriz fibrosa, dura, esbranquiçada e retraída. Quanto menor a perda de tecido por doença ou trauma, mais rápido e simples será o reparo. Nas feridas cirúrgicas, se aproximam as bordas com o auxílio de suturas, fazendo a aposição das mesmas quase sem deixar espaços entre elas. Quando isso acontece, o reparo se faz com um mínimo de produção de tecido conjuntivo, praticamente sem deixar cicatriz. Diz-se então que houve uma cicatrização por primeira intenção. Quando o reparo se faz com produção mais evidente de tecido de granulação usa-se o termo cicatrização por segunda intenção.

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Cicatriz>

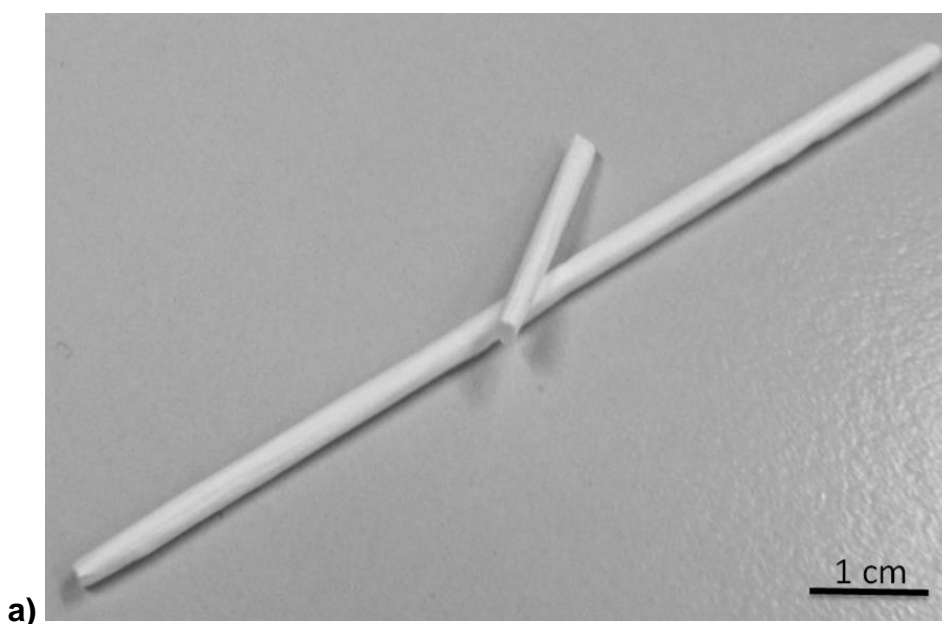
ANEXO II

Resultados Obtidos com o Estágio de Pesquisa no Exterior

O estágio de pesquisa no exterior foi realizado no Biomaterialien Institute da Universität Erlangen-Nürnberg, sob supervisão do Prof. Aldo R. Boccaccini com duração de 6 meses. Por meio deste, foram desenvolvidos *scaffolds* elastoméricos reforçados com fibras de vidro bioativas e, também, deu-se continuidade ao desenvolvimento de conduítes para regeneração de nervos periféricos. A seguir, tem-se uma breve apresentação dos dois materiais trabalhados.

1) *Conduíte para Regeneração de Nervo Periférico*

O processo de fabricação do novo conduíte gerou um material bicamada, que possuía fibras de vidro bioativas alinhadas em seu interior e nanofibras poliméricas em seu exterior (Figuras 1 e 2). O alinhamento interno é um fator crucial para a regeneração de um tecido tão peculiar como o tecido nervoso periférico.



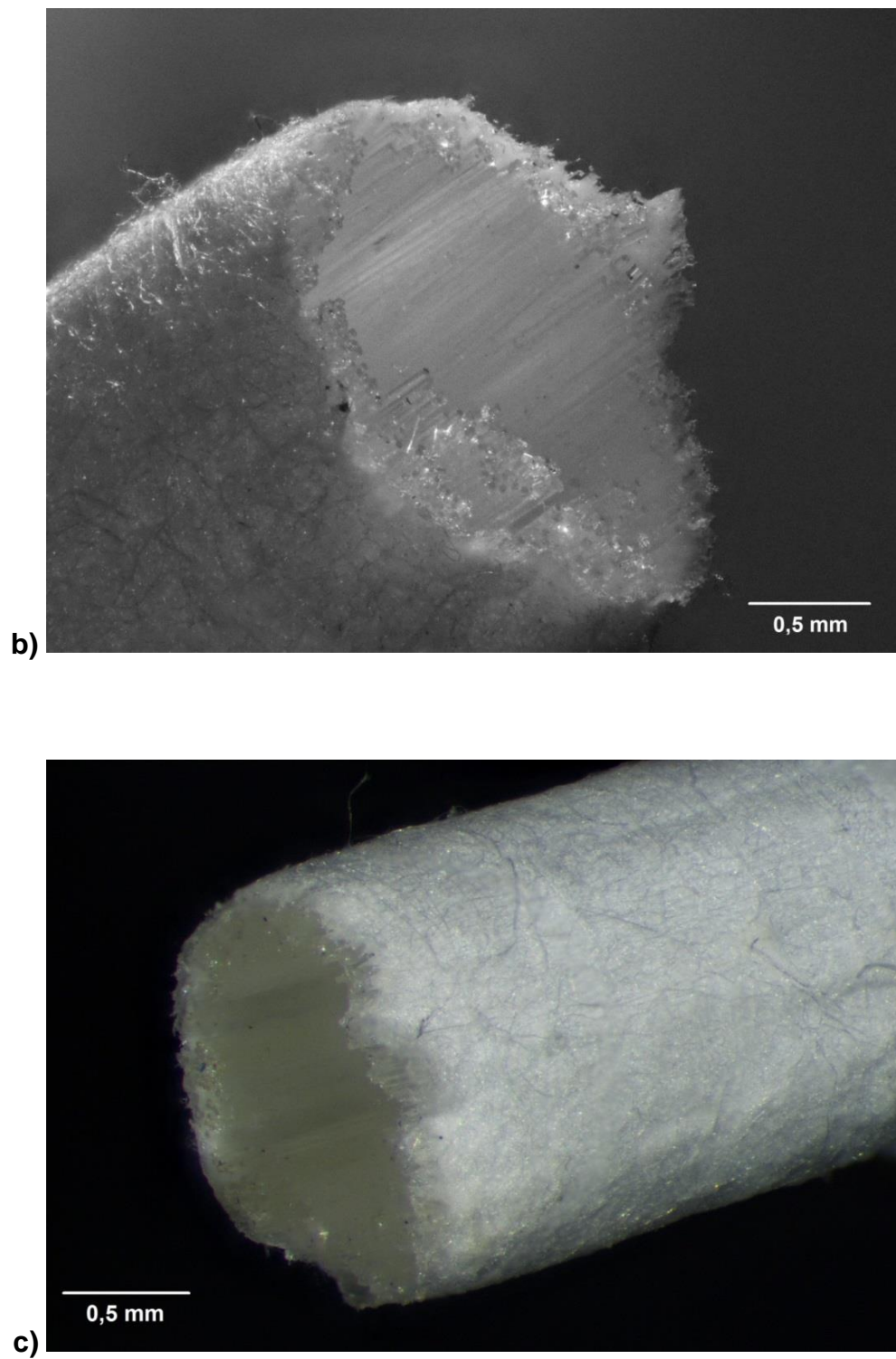


Figura 1 – Conduítes bi-camada a) recém-obtido; b e c) Alinhamento das fibras bioativas em seu interior.

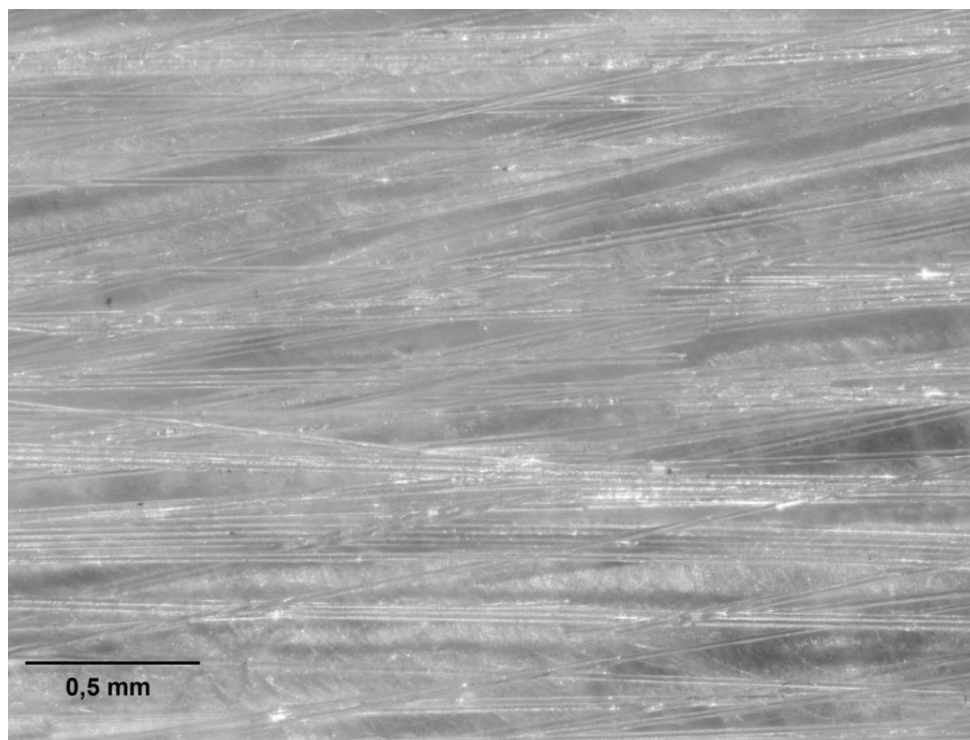


Figura 2 – Alinhamento das fibras de vidro bioativo F18 no interior do condúite.

Ensaio para a análise da bioatividade, resistência mecânica, permeabilidade, molhabilidade e perda de massa foram realizados e já foram compilados. Os resultados mostraram que a incorporação das fibras de vidro bioativas ao biopolímero não teve nenhuma influência na sua alta bioatividade (Figura 3), como pode ser observado na Figura 3, após o ensaio de SBF.

A molhabilidade foi drasticamente melhorada com a diminuição da hidrofobicidade do biopolímero por meio do uso das fibras de vidro. Um artigo com estes resultados já está na fase de redação.

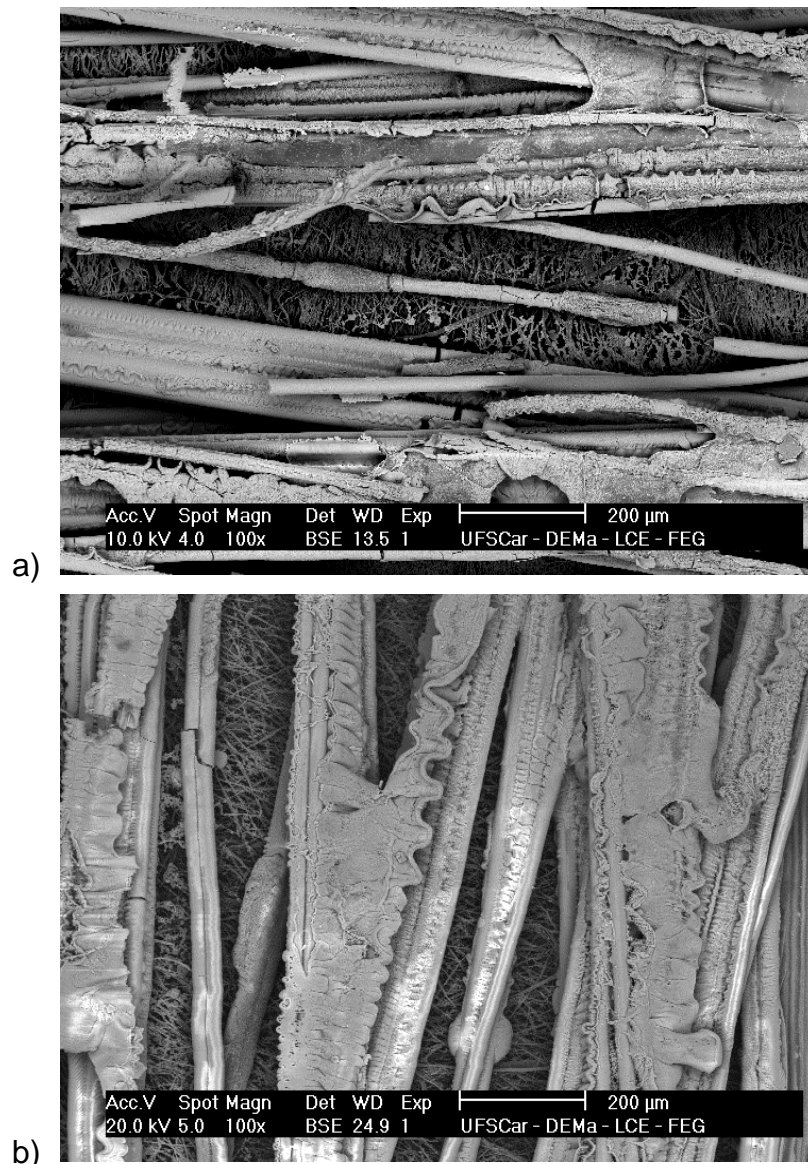


Figura 3 – Imagens de MEV do condúite após ensaios com a solução de SBF-K9 por 16 hours (a) e 14 dias (b).

2) *Biocompósito para Regeneração de Cartilagem*

Outro desenvolvimento realizado no estágio foi os *scaffolds* elastoméricos reforçados com as fibras de vidro bioativo.

Por meio de técnica de *casting* foram obtidas estruturas altamente porosas e bastante flexíveis (Figura 4), com o intuito de serem aplicadas a lesões de cartilagem.

Ensaio para a análise da bioatividade, resistência mecânica, permeabilidade e perda de massa foram realizados. Os resultados indicam o aumento da resistência mecânica com a incorporação da fase cerâmica, ao mesmo tempo, conferiu-se ao biopolímero bioatividade e uma possibilidade de melhor interação com os tecidos vivos (Figura 5).

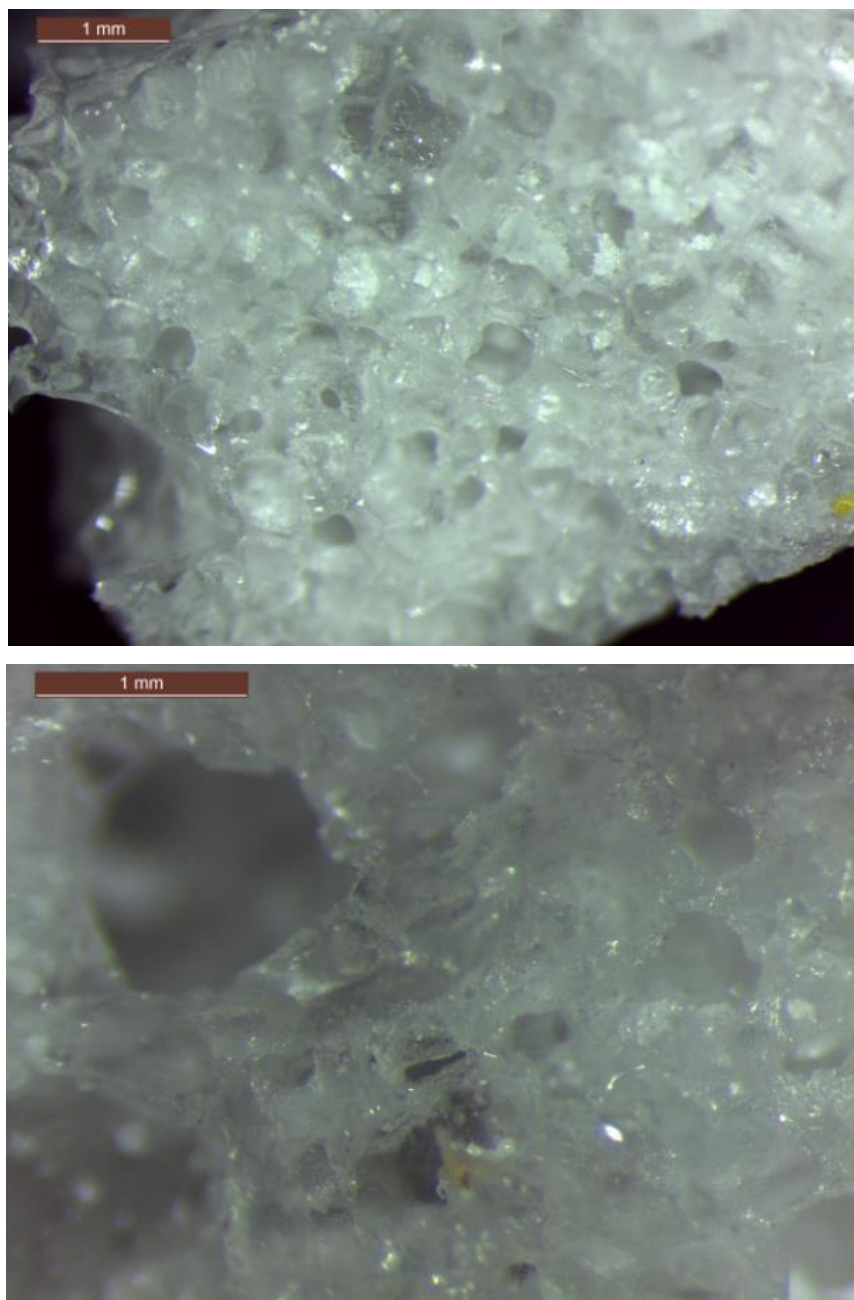


Figura 4 – Scaffold elastomérico reforçado por fibras de vidro providas do vidro bioativo F18.

Um artigo com estes resultados já está na fase de redação.

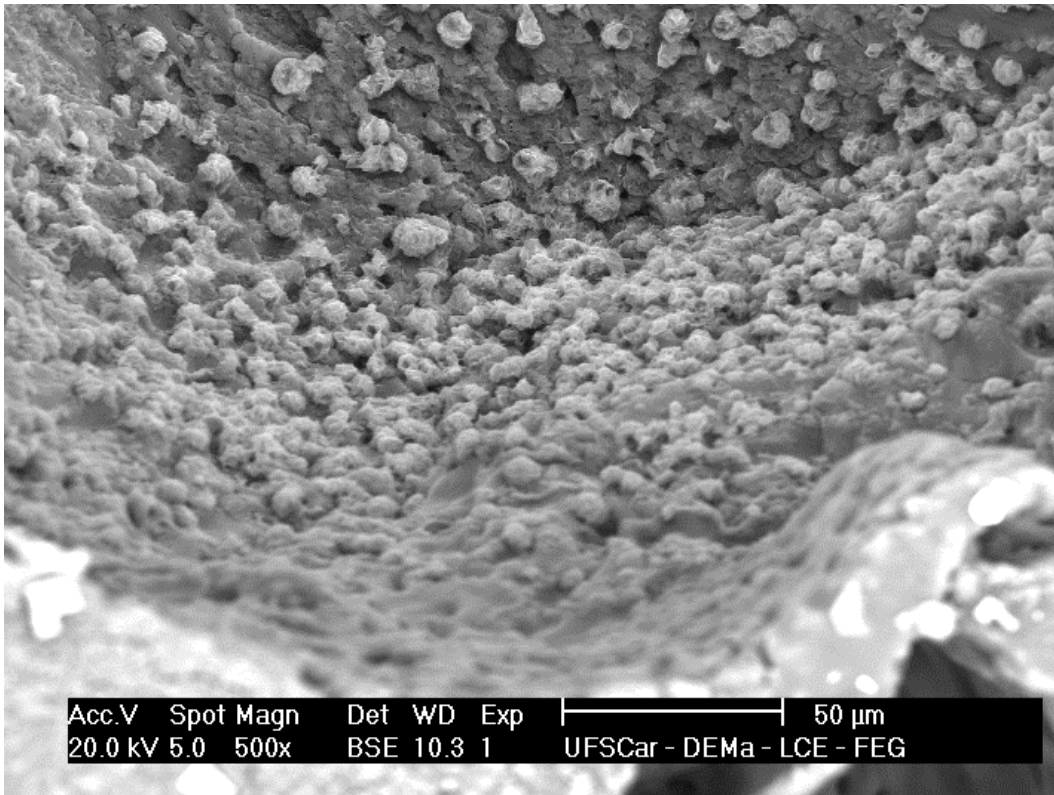


Figura 5 – Scaffold elastomérico reforçado por fibras de vidro providas do vidro bioativo F18 após ensaio com solução SBF-K9 por 14 dias.