

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

**OBTENÇÃO DE ESTRUTURAS POROSAS ALTAMENTE BIOATIVAS VIA  
SINTERIZAÇÃO DO BIOSILICATO®**

**Murilo Camuri Crovace**

**SÃO CARLOS – SP  
2009**



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

**OBTENÇÃO DE ESTRUTURAS POROSAS ALTAMENTE BIOATIVAS VIA  
SINTERIZAÇÃO DO BIOSILICATO®**

**Murilo Camuri Crovace**

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

**Orientador: Profa. Dra. Ana Candida Martins Rodrigues**

**Co-orientador: Prof. Dr. Oscar Peitl Filho**

**Agência Financiadora: CAPES**

**SÃO CARLOS – SP**

**2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C952oe

Crovace, Murilo Camuri.

Obtenção de estruturas porosas altamente bioativas via sinterização do Biosilicato<sup>®</sup> / Murilo Camuri Crovace. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

117 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Engenharia de materiais. 2. Biomateriais. 3. Ossos - enxerto. 4. Vitrocerâmica. 5. Biosilicato. I. Título.

CDD: 620.11 (20<sup>a</sup>)



## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, cujos esforços permitiram que eu chegasse até aqui.

## **VITAE DO CANDIDATO**

Graduado em Engenharia de Materiais pela UFSCar (2006)



MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE  
MURILO CAMURI CROVACE

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO  
CARLOS, EM 07 DE ABRIL DE 2009.

BANCA EXAMINADORA:



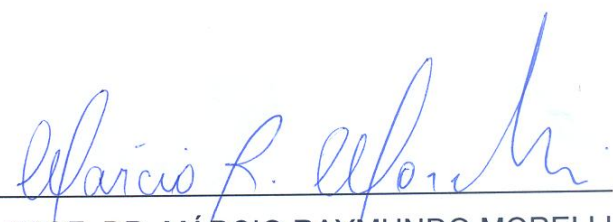
---

PROFA. DRA. ANA CANDIDA MARTINS RODRIGUES  
PPG-CEM / UFSCar



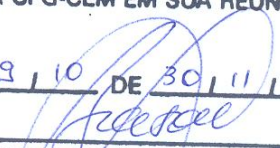
---

PROF. DR. CARLOS ALBERTO FORTULAN  
EESC/USP



---

PROF. DR. MÁRCIO RAYMUNDO MORELLI  
PPG-CEM/UFSCar

APROVADO / HOMOLOGADO / REFERENDADO  
PELA CPG-CEM EM SUA REUNIÃO  
Nº 519 / 10 DE 30 / 11 / 10  
  
SECRETARIA DO PPG-CEM

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Ana Candida Martins Rodrigues pela oportunidade de trabalho que me foi dada, pelas contribuições para esta dissertação e por ter aceitado o desafio.

Aos professores Oscar Peitl Filho, pela co-orientação, e Edgar D. Zanotto, pelas valiosas discussões.

Ao Prof. Dr. Carlos A. Fortulan do LTC (EESC/USP) pela incomparável ajuda na parte experimental deste trabalho, sem o qual a realização dos experimentos não seria possível.

Ao técnico do LaMaV, José Rodrigues da Silva – Zé, pela atenção e assistência diária no laboratório.

Ao Walter Aparecido Mariano, técnico do DEMa/UFSCar, pelo auxílio nas análises termogravimétricas e de picnometria de hélio.

Aos técnicos Maria H. Racy e Vitor A. S. Mendes do LCE/UFSCar, pelo auxílio nas análises por EDS.

À Claudia C. Camilo do LTC (EESC/USP) pelo auxílio na síntese dos primeiros *scaffolds*.

À Renata N. Granito do DFisio/UFSCar pela realização de testes *in vitro* em cultura de células.

À Prof. Karina Nogueira Z. Pinto do DMP/UFSCar pela condução dos testes *in vivo*.

Ao aluno de iniciação científica Bruno Poletto Rodrigues pelo grande auxílio no estudo da fase secundária.

À Viviane Oliveira Soares pelo companheirismo, carinho, paciência e pelos incansáveis MEVs.

Aos demais companheiros do LaMaV pela amizade e convívio.

Ao projeto CNPq/Universal n° 476256/2008-9.

Ao projeto temático FAPESP processo n° 2007/08179-9.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Aos meus familiares pela força.

E à Deus.

## RESUMO

No presente trabalho, foram obtidos “*scaffolds*” através da sinterização controlada do Biosilicato<sup>®</sup>. Este material apresenta boas propriedades mecânicas e nível de bioatividade comparável ao dos biovidros, sendo um candidato interessante para ser empregado como *scaffold* no auxílio da regeneração óssea. Estudos anteriores reportam que quando este material é tratado termicamente em temperaturas superiores a 700°C, ocorre o aparecimento de uma fase cristalina secundária. Os testes de bioatividade *in vitro* revelaram que a presença da fase secundária não é prejudicial, mas torna o nível de bioatividade do Biosilicato<sup>®</sup> ainda maior, igualando-o ao nível de bioatividade do Bioglass - 45S5. Duas técnicas diferentes foram utilizadas na síntese dos *scaffolds*: (1) via adição de agentes porogênicos e (2) método da réplica. Cinco agentes porogênicos foram testados e comparados: naftaleno, amido de mandioca, amido de milho, microesferas de polietileno e negro de fumo. A técnica de adição de agentes porogênicos permitiu a obtenção de *scaffolds* exibindo porosidade total entre 67 e 87%, com uma estrutura de poros altamente interconectada. O melhor resultado foi alcançado através do uso do negro de fumo, onde o tamanho médio de poros obtido foi de 230 µm e uma porosidade total de 87%, tornando-o o mais promissor para aplicação como *scaffold*. O método da réplica permitiu a obtenção de *scaffolds* exibindo uma porosidade total de aproximadamente 96% e abertura de células na faixa de 435 – 945 µm, com abertura média de 650 µm.

## ABSTRACT

### SYNTHESIS OF HIGHLY BIOACTIVE POROUS STRUCTURES VIA SINTERING OF BIOSILICATE®

In the present work, scaffolds were obtained through the controlled sintering of Biosilicate®. This material possesses good mechanical properties and its bioactivity level is comparable to that of bioglasses, making it an interesting candidate for use as a scaffold to stimulate bone tissue regeneration. Previous studies have found that a secondary crystalline phase is formed when Biosilicate® is heat-treated at high temperatures ( $T > 700^{\circ}\text{C}$ ). The *in vitro* bioactivity tests revealed that the presence of the secondary phase is not harmful, but instead enhances the bioactivity of Biosilicate® to a level comparable to that of Bioglass - 45S5. Two different techniques were used in the synthesis of scaffolds: (1) the addition of porogen agents, and (2) the replication method. Five porogen agents were tested and compared: naphthalene, cassava starch, corn starch, polyethylene beads and carbon black. The first technique yielded scaffolds with a total porosity of 67 to 87% in a highly interconnected porous structure. The best result was achieved with carbon black, which resulted in an average pore size of 230  $\mu\text{m}$  and a total porosity of 87%, making it the most promising porogen agent for application as a scaffold. The replication technique led to the formation of scaffolds with a total porosity of 96% and open cells in the range of 435 – 945  $\mu\text{m}$ , with an average cell size of 650  $\mu\text{m}$ .

## PUBLICAÇÕES

Crovace, M. C.; Ravagnani, C.; Rodrigues, A. C. M.; Peitl, O.; Zanotto, E. D. "Hydroxycarbonate apatite (HCA) formation in a  $P_2O_5$ - $Na_2O$ - $CaO$ - $SiO_2$  glass-ceramic". In: IV International Symposium on Non-Crystalline Solids & VIII Brazilian Symposium on Glass and Related Materials, 2007, Aracaju-SE (Resumo).

Crovace, M. C.; Fortulan, C. A.; Rodrigues, A. C. M.; Peitl, O.; Zanotto, E. D. "Scaffolds via sinterização de Biosilicato<sup>®</sup>". In: 18º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2008, Porto de Galinhas-PE (Resumo).

## ÍNDICE DE ASSUNTOS

BANCA EXAMINADORA.....	i
AGRADECIMENTOS .....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT .....	iv
PUBLICAÇÕES.....	v
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Objetivos .....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Considerações sobre a regeneração óssea.....	5
2.2. <i>Scaffolds</i> .....	7
2.2.1. Materiais bioativos e reabsorvíveis .....	8
2.2.2. Osteocondução e osteoindução .....	10
2.2.3. A importância da porosidade.....	10
2.2.4. Propriedades mecânicas dos <i>scaffolds</i> .....	12
2.2.5. Fabricação de formas complexas.....	13
2.3. Obtenção de <i>scaffolds</i> : o estado da arte.....	13
2.4. Vidros e vitrocerâmicas: candidatos potenciais.....	17
2.5. O Biosilicato® .....	20
2.6. Produtos comercialmente disponíveis.....	21
2.7. Motivação.....	25
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	27
3.1. Preparação e moagem do Biosilicato® .....	28
3.2. Tratamento térmico complementar .....	29
3.3. Obtenção do Bioglass .....	30
3.4. Testes de bioatividade “ <i>in vitro</i> ” e análise por FTIR .....	31
3.5. Análise de difração de raios-x .....	35
3.6. Testes de sinterização .....	35
3.6.1. Análise de partículas do Biosilicato® .....	35
3.6.2. Preparação e sinterização das amostras .....	36
3.6.3. Caracterização das amostras sinterizadas.....	36



3.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	37
3.8. Análise do tamanho de partículas dos agentes porogênicos.....	38
3.9. Determinação da densidade do Biosilicato <sup>®</sup> e dos agentes porogênicos. ....	38
3.10. Análise termogravimétrica .....	38
3.11. Observação da fase secundária por microscopia ótica .....	38
3.12. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	39
3.13. Manufatura de <i>scaffolds</i> .....	40
3.13.1. Via adição de agentes porogênicos .....	40
3.13.2. Seleção dos agentes porogênicos .....	42
3.13.3. Método da réplica .....	44
3.14. Queima dos <i>scaffolds</i> .....	45
3.15. Caracterização dos <i>scaffolds</i> .....	46
3.15.1. Cálculo da porosidade total, da porosidade aparente e da retração linear .....	46
3.15.2. Determinação da macroporosidade .....	48
3.15.3. Determinação do tamanho médio e da distribuição do tamanho dos poros.....	49
3.16. Queima dos agentes porogênicos e obtenção de resíduo.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
4.1. Análise da fase secundária.....	53
4.1.1. Microscopia ótica .....	53
4.1.2. Microscopia eletrônica de varredura .....	57
4.1.3. Difração de raios-X .....	59
4.1.4. Influência da fase secundária na bioatividade do Biosilicato <sup>®</sup> .....	60
4.2. Estimativa da densidade teórica do Biosilicato <sup>®</sup> contendo a fase secundária .....	64
4.3. Distribuição do tamanho de partículas do Biosilicato <sup>®</sup> .....	65
4.4. Testes de sinterização .....	66
4.5. Caracterização dos agentes porogênicos.....	73
4.5.1. Distribuição do tamanho de partículas .....	73
4.5.2. Morfologia dos agentes porogênicos .....	74

4.5.3. Picnometria de hélio .....	78
4.5.4. Preparação das barbotinas contendo Biosilicato® .....	79
4.5.4.1. Via adição de agentes porogênicos .....	79
4.5.4.2. Método da réplica.....	80
4.5.5. Análise termogravimétrica .....	81
4.6. Caracterização dos <i>scaffolds</i> .....	83
4.6.1. <i>Scaffolds</i> obtidos através da adição de agentes porogênicos .....	83
4.6.2. Resíduos inorgânicos gerados pelos agentes porogênicos .....	93
4.6.3. <i>Scaffolds</i> obtidos através do método da réplica .....	98
5. CONCLUSÕES .....	103
6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS .....	105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	107

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de íons (mM) na solução SBF-K9 e no plasma sanguíneo humano. ....	32
Tabela 2 - Reagentes utilizados na preparação da solução SBF-K9. ....	33
Tabela 3 – Densidade dos agentes porogênicos determinada através de picnometria de hélio. ....	78
Tabela 4 - Barbotinas: composições e dados. ....	80
Tabela 5 - Valores de porosidade total, porosidade aparente, macroporosidade, abertura média de canal e retração linear diametral, dos <i>scaffolds</i> obtidos através da adição de diferentes agentes porogênicos. ....	92
Tabela 6 - Composição química determinada por EDS dos resíduos gerados após a queima dos agentes porogênicos e seus respectivos valores de perda ao fogo. ....	98

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Organização hierárquica simplificada do tecido ósseo para diferentes escalas de comprimento [2]. .....	6
Figura 2.2 - Diagrama do sistema $\text{Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ com uma concentração em peso fixa de 6% de $\text{P}_2\text{O}_5$ , mostrando a região com índice de bioatividade superior a 8 [58]. .....	19
Figura 2.3 - Vendas de enxertos ósseos e produtos relacionados nos EUA [69]. .....	21
Figura 2.4 - Cerasorb <sup>®</sup> (a), ChronOs <sup>™</sup> (b) e Vitoss <sup>®</sup> (c) são <i>scaffolds</i> produzidos a partir de fosfato de tricálcio. ....	22
Figura 2.5 - Bio-Oss <sup>®</sup> (a), Cerabone <sup>®</sup> (b) e Bonefill <sup>®</sup> (c) são <i>scaffolds</i> produzidos a partir de hidroxiapatita. ....	23
Figura 2.6 - ReproBone <sup>™</sup> (a), Osteosynt <sup>®</sup> (b) e GenPhos <sup>®</sup> (c) são <i>scaffolds</i> produzidos a partir da cerâmica bifásica HA/ $\beta$ -TCP. ....	24
Figura 2.7 - O produto NovaBone <sup>®</sup> é um <i>scaffold</i> produzido a partir do Bioglass <sup>®</sup> - 45S5. ....	25
Figura 3.1 - Fluxograma simplificado das atividades realizadas. ....	27
Figura 3.2 - Tempo de duração do tratamento térmico em função da temperatura para o surgimento da fase secundária (identificação da fase secundária realizada através de FTIR) [1]. ....	29
Figura 3.3 - Forno utilizado para o tratamento térmico complementar do Biosilicato <sup>®</sup> .....	30
Figura 3.4 - Representação do teste de bioatividade [89]. ....	34
Figura 3.5 – Dimensões das amostras utilizadas nos testes de sinterização do Biosilicato <sup>®</sup> (dimensões em mm). ....	36
Figura 3.6 – Fluxograma esquemático do procedimento utilizado na preparação das barbotinas. ....	41
Figura 3.7 - Estágios de queima das pastilhas para a obtenção de <i>scaffolds</i> (Ta: Temperatura ambiente; Tr1: Temperatura de remoção do agente porogênico; Tr2: Temperatura de remoção do ligante ou espuma de PU; Ts: Temperatura de sinterização do <i>scaffold</i> ). ....	46

Figura 3.8 - Exemplo de imagem obtido por MEV e tratada no software Image-J para a determinação da macroporosidade do <i>scaffold</i> . .....	49
Figura 3.9 - Sobreposição da imagem a 0° (a) e a 45° (b) da seção transversal do <i>scaffold</i> por rede de linhas. ....	51
Figura 4.1 - Amostras de Biosilicato <sup>®</sup> contendo a fase secundária tratadas a: a) 900°C/1min; b) 900°C/5min; c) 900°C/10min; d) 900°C/15min; e) 900°C/20min; f) 900°C/30min; g) 900°C/60min; h) 900°C/120min; i) 900°C/5760min (96h)...	54
Figura 4.2 - Crescimento dendrítico da fase secundária no Biosilicato <sup>®</sup> .....	55
Figura 4.3 - Exemplo de imagem da amostra tratada a 900°C/20min, e a mesma imagem após o tratamento no software Image-J. ....	55
Figura 4.4 - Porcentagem de fase secundária no volume da amostra em função do tempo de tratamento para a temperatura de 900°C.....	56
Figura 4.5 - Micrografias obtidas por MEV de amostra do Biosilicato <sup>®</sup> tratada a 900°C por 3h revelando a fase secundária na região intergranular. ....	57
Figura 4.6 - Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) da região intragranular (a) e intergranular (b). ....	58
Figura 4.7 - Difratoograma do Biosilicato <sup>®</sup> contendo fase secundária em dois equipamentos diferentes A (sem anodo rotativo) e B (com anodo rotativo). Por motivos de segredo industrial, os valores de 2θ foram omitidos. ....	59
Figura 4.8 - Espectroscopia de Infravermelho para amostras de (a) Bioglass 45S5, (b) Biosilicato <sup>®</sup> e (c) Biosilicato <sup>®</sup> contendo a fase secundária, expostas à solução de SBF durante períodos variando entre 1h e 48h. ....	61
Figura 4.9 - Espectros de FTIR ampliados para o Bioglass, Biosilicato <sup>®</sup> e Biosilicato <sup>®</sup> contendo a fase secundária, sem exposição ao SBF-K9. ....	62
Figura 4.10 - Espectros de FTIR para o Bioglass, Biosilicato <sup>®</sup> e para o Biosilicato <sup>®</sup> contendo a fase secundária, para tempos de exposição ao SBF variando de 4 a 12h. ....	64
Figura 4.11 - Distribuição do tamanho de partículas do Biosilicato <sup>®</sup> após processo de moagem.....	65
Figura 4.12 - Porosidade aparente (Pap) em função do tempo de tratamento térmico, para temperaturas variando entre 800 e 1100°C. ....	66

Figura 4.13 - Porosidade aparente (Pap) em função do tempo de permanência, para temperaturas variando entre 975 e 1100°C.....	67
Figura 4.14 - Densidade aparente (Dap) em função do tempo de permanência, para temperaturas variando entre 975 e 1100°C.....	68
Figura 4.15 - Retração linear axial em função do tempo de permanência, para temperaturas variando entre 975 e 1100°C.....	69
Figura 4.16 - Retração linear diametral em função do tempo de permanência, para temperaturas variando entre 975 e 1100°C.....	70
Figura 4.17 - Representação esquemática do abaulamento lateral em amostra sinterizada devido à possível formação de fase líquida. ....	71
Figura 4.18 - DSC de amostras sinterizadas isotermicamente a 900°C/1h, 1075°C/1h e 1100°C/1h, e de um <i>scaffold</i> sinterizado a 1075°C/1h de maneira não-isotérmica. ....	71
Figura 4.19 - Imagens obtidas por microscopia ótica mostrando a evolução da fase vítrea nas amostras sinterizadas a 1075°C/1h (a), 1075°C/5h (b), 1100°C/1h (c) e 1100°C/5h (d). ....	72
Figura 4.20 - Distribuição do tamanho de partículas dos agentes porogênicos. ....	74
Figura 4.21 - Microscopia eletrônica de varredura do amido de milho. ....	75
Figura 4.22 - Microscopia eletrônica de varredura do amido de mandioca. ....	76
Figura 4.23 - Microscopia eletrônica de varredura das microesferas de polietileno. ....	77
Figura 4.24 - Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de negro de fumo. ....	78
Figura 4.25 - Representação da composição das barbotinas.....	79
Figura 4.26 - Análises termogravimétricas do naftaleno (a), amido de mandioca (b), amido de milho (c), microesferas de polietileno (d), negro de fumo (e), do PVB (f) e da espuma de poliuretano (g). ....	82
Figura 4.27 - Imagens dos <i>scaffolds</i> de Biosilicato <sup>®</sup> obtidos a partir da utilização do naftaleno como agente porogênico: superfície de fratura (a-d) e embutidos em resina epóxi (e-g).....	84

Figura 4.28 - Imagens dos <i>scaffolds</i> de Biosilicato <sup>®</sup> obtidos a partir da utilização do amido de milho como agente porogênico: superfície de fratura (a-d) e embutidos em resina epóxi (e-f).....	86
Figura 4.29 - Exemplo de imagem tratada no software Image-J para a determinação da macroporosidade do <i>scaffold</i> .....	86
Figura 4.30 - Imagens dos <i>scaffolds</i> de Biosilicato <sup>®</sup> obtidos a partir da utilização do amido de mandioca como agente porogênico: superfície de fratura (a-d) e embutidos em resina epóxi (e-f).....	88
Figura 4.31 - Imagens dos <i>scaffolds</i> de Biosilicato <sup>®</sup> obtidos a partir da utilização das microesferas de polietileno como agente porogênico: superfície de fratura (a-d) e embutidos em resina epóxi (e-f). ....	89
Figura 4.32 - Imagens dos <i>scaffolds</i> de Biosilicato <sup>®</sup> obtidos a partir da utilização do negro de fumo como agente porogênico: superfície de fratura (a-d) e embutidos em resina epóxi (e-f).....	90
Figura 4.33 - Freqüência acumulada (%) em função da abertura média entre os canais para <i>scaffolds</i> obtidos através do uso de diferentes agentes porogênicos.....	92
Figura 4.34 – Fusão e retração durante a queima do amido de milho (a) e das microesferas de polietileno (b). ....	93
Figura 4.35 - Imagens do resíduo obtido após a queima do amido de milho... 94	
Figura 4.36 - Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) da região clara (a) e da região avermelhada (b) do resíduo obtido após a queima do amido de milho. ....	95
Figura 4.37 - Imagens do resíduo obtido após a queima do amido de mandioca. ....	96
Figura 4.38 - Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) do resíduo obtido após a queima do amido de mandioca. ....	96
Figura 4.39 - Imagens do resíduo obtido após a queima do negro de fumo. ... 97	
Figura 4.40 - Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) do resíduo obtido após a queima do negro de fumo.....	97
Figura 4.41 - Imagem da superfície de fratura (a-f) e seção transversal dos <i>scaffolds</i> de Biosilicato <sup>®</sup> embutidos em resina epóxi (g-h), obtidos a partir do	

método da réplica. As setas brancas indicam a presença de células fechadas.

..... 100



## SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ATG – análise termogravimétrica

A/W – vitrocerâmica apatita/wolastonita

Dap – densidade aparente

Daps – densidade aparente do *scaffold*

D<sub>BioS</sub> – densidade do Biosilicato<sup>®</sup>

DSC – calorimetria exploratória diferencial

DRX – difração de raios-X

EDS – espectroscopia de energia dispersiva

FTIR – espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

HA – hidroxiapatita

HCA – hidroxicarbonato apatita

I<sub>B</sub> – índice de bioatividade

JCPDS - *joint committee on powder diffraction standards*

LaMaV – laboratório de materiais vítreos

LCE – laboratório de caracterização estrutural

L<sub>f</sub> – comprimento final

L<sub>i</sub> – comprimento inicial

L<sub>M</sub> – comprimento de intercepto médio

L<sub>T</sub> – comprimento total

LTC – laboratório de tribologia e compósitos

M – aumento

MEC – matriz extracelular

MEV – microscopia eletrônica de varredura

M<sub>i</sub> – massa inicial

M<sub>f</sub> – massa final

MO – microscopia ótica

MP - macroporosidade

M<sub>s</sub> – massa do *scaffold*

N<sub>i</sub> – número de interceptos

P. A. – pureza analítica

Pap – porosidade aparente

PE - polietileno

PF – perda ao fogo

PGA – poliácido glicólico

Pi – peso imerso

PLA – poliácido lático

PPG-CEM – programa de pós-graduação em ciência e engenharia de materiais

Ps – peso seco

$P_{TS}$  – porosidade total do *scaffold*

Pu – peso úmido

PU – poliuretano

PVA – poli(álcool vinílico)

PVB – polivinil butiral

RLA – retração linear axial

RLD – retração linear diametral

rpm – rotações por minuto

SA/V – área superficial por volume de solução

SBF – *simulated body fluid*

T – temperatura

$T_g$  – temperatura de transição vítrea

TCP – fosfato de tricálcio

$V_S$  – volume do *scaffold*

ZAS – zircônia/alumina/sílica

$\alpha$  - fração cristalizada

$\beta$  - beta

$\lambda_{med}$  – abertura média dos canais

$\rho_L$  – densidade do líquido

%BiosilicatoS – porcentagem em massa do Biosilicato<sup>®</sup> no *scaffold*





## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente muitas lesões ósseas não são adequadamente tratadas porque defeitos ósseos acima de um tamanho crítico não podem ser reparados através do crescimento natural do tecido, sendo necessária a introdução de um enxerto. O enxerto ósseo é o segundo tecido mais comumente transplantado, sendo o sangue de longe o primeiro. Mais de 500 mil procedimentos de enxerto ósseo ocorrem anualmente nos Estados Unidos e 2,2 milhões em todo o mundo a fim de reparar lesões ósseas em ortopedia, odontologia e neurocirurgia.

Apesar do uso do enxerto autógeno (proveniente do próprio paciente) ainda ser considerada a melhor estratégia para o tratamento de lesões, a pequena quantidade de material disponível, os riscos de infecção e a necessidade de cirurgias adicionais, tornam a terapia insatisfatória. Uma alternativa seria o uso de enxertos alógenos (provenientes de um doador) ou xenógenos (provenientes de animais), porém o grande risco de rejeição e transmissão de doenças limitam a utilização destes. Por essas razões, enxertos aloplásticos (artificiais), também conhecidos como “*scaffolds*”, têm sido desenvolvidos. Os *scaffolds* são estruturas macroporosas que servem como matrizes para o crescimento do tecido ósseo, auxiliando na sua regeneração.

Dentre uma infinidade de materiais utilizados na síntese de *scaffolds*, destacam-se alguns vidros que possuem propriedades bioativas, sendo capazes de se ligar quimicamente a tecidos vivos. Os vidros bioativos possuem o maior nível de bioatividade dentre os materiais conhecidos, incluindo as cerâmicas bioativas. Isso significa que estes reagem com os tecidos vivos a uma taxa mais alta. Por outro lado, os vidros bioativos possuem como desvantagens a baixa resistência mecânica e a baixa tenacidade à fratura.

De forma a contornar o problema relacionado à competência mecânica, foi desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (LaMaV) uma vitrocerâmica do sistema  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$  denominada Biosilicato<sup>®</sup>, que possui propriedades mecânicas comparáveis às cerâmicas e, ao mesmo tempo, alta bioatividade. Estas características fazem do Biosilicato<sup>®</sup> um candidato

interessante e desafiador para estimular a regeneração óssea e sustentar o novo tecido ósseo formado na forma de *scaffolds*. Até o presente momento este material têm sido utilizado apenas no tratamento da hipersensibilidade dentinária.

Dentre várias técnicas empregadas para a confecção de *scaffolds*, optou-se pela utilização de duas: (1) via adição de agentes porogênicos e (2) através do método da réplica. Tendo em vista que as duas técnicas envolvem a sinterização do Biosilicato<sup>®</sup>, as melhores condições de sinterização (temperatura e tempo) deste material foram determinadas.

Adicionalmente, um estudo recente realizado por Ravagnani et al. [1] revelou que quando o Biosilicato<sup>®</sup> é tratado termicamente a altas temperaturas ( $T > 700^{\circ}\text{C}$ ), ocorre o aparecimento de uma fase secundária ainda não identificada. Desta forma, tendo em vista que a sinterização do Biosilicato<sup>®</sup> tem início em temperaturas superiores a esta, a influência da fase secundária na bioatividade também foi investigada.

Apesar das propriedades mecânicas serem importantes, o presente trabalho se limitou a analisar a possibilidade de obtenção de *scaffolds* através das duas técnicas citadas e caracterizar os *scaffolds* obtidos em relação à porosidade e interconectividade dos poros. Para a determinação da distribuição de tamanho de poros e do tamanho médio dos poros dos *scaffolds*, foi proposta uma metodologia baseada em conceitos estereológicos.

Estão sendo realizados testes *in vitro* em cultura de células e testes *in vivo* em cooperação com o Departamento de Fisioterapia (DFisio) e com o Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da UFSCar.

### 1.1. Objetivos

O objetivo principal do presente trabalho é desenvolver “*scaffolds*” com porosidade superior a 70% e tamanho médio de poros superior a 200  $\mu\text{m}$ , a partir da sinterização do Biosilicato<sup>®</sup>. Para isso, outros estudos conjugados foram desenvolvidos, como os seguintes:

- Análise da influência da fase secundária na bioatividade do Biosilicato<sup>®</sup>;
- Comparação da bioatividade do Biosilicato<sup>®</sup> com a bioatividade do Bioglass - 45S5;
- Determinação das melhores condições de sinterização (temperatura e tempo) para o Biosilicato<sup>®</sup>;
- Teste de duas diferentes rotas visando à obtenção de *scaffolds*: (1) via adição de agentes porogênicos e (2) método da réplica.
- Caracterizar e testar diferentes agentes porogênicos;
- Testar a viabilidade do método da réplica na confecção de *scaffolds*;
- Caracterizar os *scaffolds* obtidos em relação aos seguintes aspectos: porosidade total e aparente, distribuição de tamanho e interconectividade dos poros.





## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Considerações sobre a regeneração óssea

O osso é um tecido dinâmico e altamente vascularizado que é remodelado continuamente durante o tempo de vida de um indivíduo. Ele cumpre um papel fundamental na locomoção, garante que o esqueleto tenha uma adequada sustentação mecânica, e atua como um invólucro protetor para os delicados órgãos internos do corpo. Adicionalmente a estas funções estruturais, o tecido ósseo está intimamente ligado à homeostase através do armazenamento de íons cálcio e fósforo, e regulação da concentração de eletrólitos importantes no sangue [2].

Distintas condições de solicitação influenciam o desenvolvimento de estruturas ósseas com formas, propriedades mecânicas e distribuições espaciais cuidadosamente dimensionadas. Mais de 206 diferentes tipos de ossos constituem o esqueleto humano, variando de ossos longos encontrados em nossos membros, ossos pequenos no punho e tornozelo, e ossos achatados do esterno e crânio, até ossos irregulares como a pélvis e as vértebras. O tecido ósseo é ordenado em um padrão compacto (osso cortical) ou em um padrão “esponjoso” (osso trabecular) [3]. Assim como todos os órgãos do corpo, o tecido ósseo possui estrutura altamente complexa e uma organização hierárquica que alcança muitas ordens de grandeza da macro-escala (centímetros) até componentes nanoestruturados. Como pode ser visto na Figura 2.1, a matriz extracelular é constituída por componentes orgânicos não-mineralizados (predominantemente colágeno do tipo 1) e um componente inorgânico mineralizado, composto por cristais de hidroxiapatita (HA) na forma de placas, com aproximadamente 4 nm de espessura [2].

A estrutura formando uma espécie de nanocompósito (uma matriz composta por fibras de colágeno tenazes e flexíveis, reforçada por cristais de HA) é fundamental para a alta resistência à compressão e a alta tenacidade à fratura do osso.

O osso possui uma alta capacidade regenerativa e a maioria das fraturas é curada sem a necessidade de uma maior intervenção, especialmente

em indivíduos jovens. Apesar disso, defeitos ósseos acima de um tamanho crítico, como os observados depois da remoção de tumores, requerem intervenção cirúrgica e a introdução de um enxerto para que a regeneração ocorra de forma orquestrada.

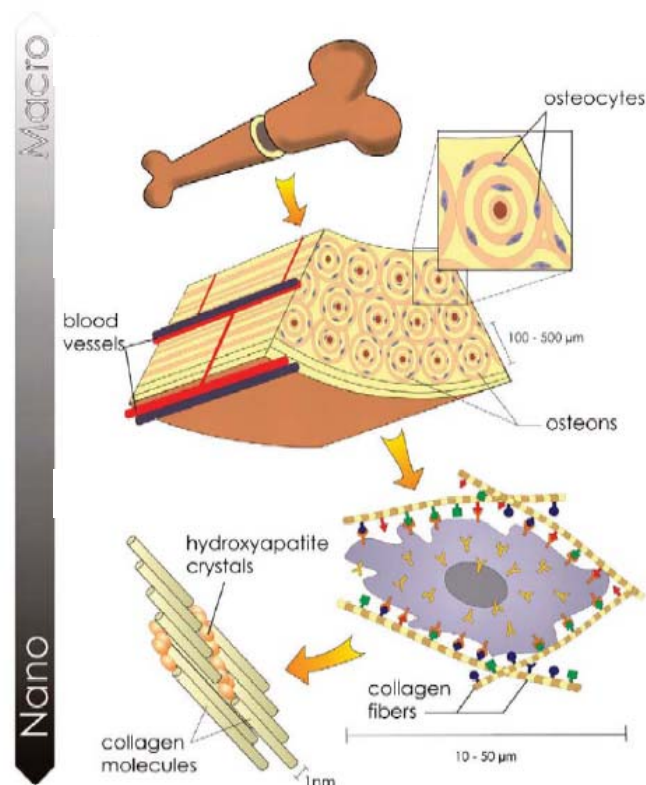


Figura 2.1 - Organização hierárquica simplificada do tecido ósseo para diferentes escalas de comprimento [2].

Enxertos ósseos também são freqüentemente necessários no caso de neoplasia óssea, estabilização de segmentos da coluna espinhal e, de maneira mais geral, em cirurgias ortopédicas, maxilofaciais e craniofaciais.

O tamanho do defeito crítico pode variar com o tipo do osso, idade e estado nutricional do indivíduo. Contudo, estima-se que este seja da espessura do osso cortical.

Atualmente, a melhor estratégia para o tratamento destas lesões é o uso de um procedimento chamado “transplante autólogo”, que envolve a remoção de uma pequena parte de um osso “doador” situado em um local de baixa

solicitação mecânica no próprio paciente (tipicamente um local de fácil acesso como a crista do osso ilíaco) e o transplante até o local do defeito. Embora apenas uma pequena fração das células transplantadas com os segmentos desvascularizados do enxerto sobrevivam, estas contribuem de maneira decisiva para a regeneração óssea [4].

O transplante do enxerto autógeno (do próprio paciente) possui o melhor resultado clínico uma vez que ele exhibe compatibilidade com o osso hospedeiro e evita complicações relacionadas à transmissão de doenças ou resposta imune, como é o caso dos enxertos alógenos (provenientes de um doador) e xenógenos (provenientes de uma fonte animal). Contudo, seu uso é limitado pela pequena quantidade disponível para retirada e pela considerável necrose do local doador [5-6]. Além disso, a retirada do enxerto autógeno está associada a 8,5 - 20% das complicações pós-cirúrgicas, incluindo formação de hematomas, perda de sangue, lesão de nervos, formação de hérnia, infecção, lesão arterial, instabilidade pélvica, defeitos cosméticos e algumas vezes dor crônica no local doador [7].

Por estas razões, enxertos aloplásticos (produzidos a partir de materiais sintéticos), também conhecidos como “*scaffolds*”, estão sendo desenvolvidos com o intuito de estimular a regeneração óssea e fornecer suporte para o novo tecido ósseo formado. Muitos materiais vêm sendo testados nas últimas duas décadas, de forma a suprir a necessidade de substituição dos enxertos autógenos e alógenos. Geralmente, estes consistem em cerâmicas bioativas, vidros e vitrocerâmicas bioativos, polímeros naturais e sintéticos, ou ainda, compósitos destes [2].

## **2.2. Scaffolds**

“*Scaffolds*” são estruturas tridimensionais macroporosas que atuam como matrizes temporárias, proporcionando um ambiente e arquitetura específicos para o desenvolvimento e regeneração do tecido ósseo. Os *scaffolds* devem favorecer a fixação celular, o crescimento e a diferenciação destas células. Idealmente, os *scaffolds* devem ser desenvolvidos para

degradar de forma lenta após a implantação no paciente e serem substituídos gradualmente pelo novo tecido formado.

Um *scaffold* ideal deve satisfazer vários critérios para atuarem de forma efetiva na regeneração óssea [8, 9, 10, 11, 12]:

- Ser produzido a partir de um material bioativo e reabsorvível;
- Possuir excelente osteocondução, ou seja, capacidade de permitir a migração, aderência e proliferação das células, dando seqüência à síntese da matriz óssea;
- Apresentar osteoindução, ou seja, ser capaz de induzir a formação do tecido ósseo diretamente a partir de osteoblastos;
- Possuir estrutura altamente porosa e interconectada (porosidade > 70%, com poros interconectados > 200  $\mu\text{m}$ );
- Apresentar propriedades mecânicas adequadas (o mais próximo possível do osso hospedeiro);
- Poder ser fabricado em formas complexas e irregulares.

Outra característica desejável seria a opacidade ao raio-X diferente da do osso, de forma a permitir uma distinção radiográfica entre o *scaffold* implantado e o novo tecido formado.

Até o presente momento, não existe um *scaffold* que satisfaça todos estes critérios. Os vidros e vitrocerâmicas bioativos podem satisfazer os três primeiros critérios descritos acima: apresentam excelente bioatividade, osteocondução e osteoindução. Estas vantagens os tornam materiais promissores para a fabricação de *scaffolds*. No caso do Biosilicato<sup>®</sup>, existe a possibilidade de obtenção de *scaffolds* com melhores propriedades mecânicas em relação ao Bioglass<sup>®</sup>.

Estas características ideais são mais bem esclarecidas nos itens que seguem (2.2.1 - 2.2.5).

### **2.2.1. Materiais bioativos e reabsorvíveis**

Os biomateriais podem ser classificados de acordo com o tipo de interação que apresentam com os tecidos vivos. Nenhum material implantado

em tecidos vivos é inerte e todos induzem um tipo de resposta do tecido em sua superfície [13]. Desta forma, os biomateriais podem ser classificados como:

- Tóxicos;
- Biologicamente próximos à inerte;
- Bioativos;
- Reabsorvíveis.

Obviamente, qualquer material implantável deve evitar a resposta tóxica que mata as células nas suas vizinhanças ou a liberação de quaisquer substâncias tóxicas que possam migrar para os fluidos dos tecidos vivos e causar um dano sistêmico no paciente.

A resposta mais comum dos tecidos a um implante é a formação de uma cápsula fibrosa não aderente. Esse tecido fibroso atua como uma espécie de parede que isola o implante do tecido hospedeiro. É um mecanismo de autodefesa do organismo que, com o passar do tempo, envolve completamente o implante. Os metais e a maioria dos polímeros produzem este tipo de resposta interfacial.

Cerâmicas como a alumina e a zircônia, da mesma maneira que os metais e as maiorias dos polímeros, também provocam o desenvolvimento de um tecido fibroso na interface. A baixa reatividade química da alumina e da zircônia resulta em uma camada fibrosa muito fina e de maior estabilidade. Os metais, como o aço e o titânio, apresentam maior reatividade do que as cerâmicas inertes e desenvolvem uma cápsula fibrosa mais espessa, que possui resistência mecânica inferior e aumenta a probabilidade de movimentação da interface do implante durante a solicitação, e em grande parte dos casos leva à falha clínica do implante causada pela perda de aderência [13].

Os materiais bioativos são aqueles que em contato com o tecido vivo, se ligam quimicamente a este através da formação de uma camada de hidroxicarbonato apatita (HCA) biologicamente ativa na sua superfície, que promove uma ligação química extremamente forte entre o tecido e o implante. Esta camada interfacial imita o tipo de interface que é formada pelos processos

naturais de reconstrução dos tecidos e é química e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso.

Se a cinética das reações na interface bioativa for suficientemente rápida, o implante se “dissolve” ou é “reabsorvido” e o tecido gerado pelos processos naturais substitui gradativamente o implante, ocorrendo a reconstrução do tecido degenerado. Os materiais que apresentam este tipo de resposta são designados de reabsorvíveis. Os materiais reabsorvíveis devem ter uma composição que possa ser facilmente degradada pelos fluídos corpóreos ou digerida pelas células do tipo macrófagos. Os produtos da degradação devem ser compostos químicos não tóxicos e facilmente expelidos pelo corpo. No caso específico de *scaffolds*, sua reabsorção deve ocorrer à mesma taxa na qual o novo tecido é formado [14].

### **2.2.2. Osteocondução e osteoindução**

Os materiais bioativos podem apresentar osteocondução e/ou osteoindução. A osteocondução ocorre quando o material exibe compatibilidade biológica que permite a migração do tecido ósseo sobre o material na interface material-tecido. A osteoindução é o processo no qual o material estimula a osteogênese, ou seja, o crescimento de células ósseas fora da interface material/tecido. Desta forma, os materiais bioativos são divididos em duas classes, A e B. Os materiais bioativos classe A apresentam simultaneamente osteocondução e osteoindução, sendo os que apresentam maiores níveis de bioatividade. Nesta classe encontram-se os vidros bioativos como é o caso do Bioglass<sup>®</sup>, que é capaz de estimular o crescimento do tecido ósseo sem a necessidade de incorporação de agentes biológicos [9]. Os materiais bioativos classe B apresentam somente osteocondução [15]. Nesta classe encontram-se as cerâmicas de fosfato de tricálcio ( $\beta$ -TCP) e de hidroxiapatita (HA) e vitrocerâmicas comerciais como Ceravital<sup>®</sup> e A/W<sup>®</sup>.

### **2.2.3. A importância da porosidade**

A porosidade é outra característica de grande relevância para os *scaffolds*. As estruturas ideais devem ser altamente porosas e formadas por

uma rede de poros interconectados; estes poros devem ser grandes o suficiente para permitir crescimento do tecido ósseo e sua vascularização, garantindo o fluxo de nutrientes e resíduos através do *scaffold*.

A mesoporosidade e a rugosidade da parede dos poros também são importantes para a osteogênese, uma vez que estas características favorecem a adesão de proteínas, a fixação e a proliferação das células. Adicionalmente, a superfície porosa favorece a fixação mecânica entre o *scaffold* e o tecido ósseo presente ao redor deste [16-17].

Quando os poros não possuem tamanho adequado, as células ósseas não podem migrar para o interior do *scaffold* devido à falta de nutrientes e oxigênio, e à insuficiente remoção dos resíduos. Além disso, a rápida colonização por osteoblastos e a conseqüente mineralização da superfície do *scaffold*, podem atuar como uma barreira efetiva para a difusão de oxigênio e nutrientes para o interior do *scaffold* [18]. Desta forma, as células capazes de sobreviver seriam apenas aquelas próximas à superfície. Deve ser ressaltado que nenhum tipo de célula, excetuando-se os condrócitos, é capaz de se desenvolver a uma distância maior do que 25 – 100  $\mu\text{m}$  do suprimento de sangue [19-20].

Apesar da importância, não há um consenso na literatura em relação à porosidade total, tamanho de poros ou distribuição de tamanho de poros ideais. Em geral, é bem aceito que os poros devem possuir ao menos 200  $\mu\text{m}$ , para garantir a vascularização até a região central do *scaffold* [10, 12, 21]. Segundo Vaccaro [22], o tamanho ótimo estaria na faixa de 150 – 500  $\mu\text{m}$ , o que seria comparável ao tamanho de vasos sanguíneos e osteoblastos, e com uma porosidade total maior do que 50 - 60% em volume.

Segundo Freyman et al. [23] e Hutmacher [24], o tamanho dos poros deve estar na faixa de 400 - 500  $\mu\text{m}$ , com uma porosidade superior a 90% em volume. Salgado et al. [11] admite como sendo ótima uma distribuição de tamanho de poros mais larga, situando-se entre 200 e 900  $\mu\text{m}$ . De maneira similar, Chen et al. [8] e Jones et al. [9] consideram como ideal uma distribuição de tamanho de poros na faixa de 300 - 600  $\mu\text{m}$ .

Holly et al. [25] apresentaram um conceito diferente. Os autores acreditam que a regeneração óssea será alcançada somente quando a estrutura interconectada possuir poros com tamanhos variando na faixa de 1,2 - 2 mm. Esta última abordagem possui vantagens evidentes devido à alta razão superfície/volume, o que facilitaria o crescimento de células e vasos sanguíneos. Contudo, estas características afetam de forma drástica as propriedades mecânicas dos *scaffolds*.

#### **2.2.4. Propriedades mecânicas dos *scaffolds***

Na literatura têm sido reportado com frequência que, uma vez que o osso está continuamente sob solicitação, as propriedades mecânicas do *scaffold* devem ser similares ao do osso onde este será implantado, de forma que a mobilização do local lesionado possa ocorrer o mais cedo possível [26-27].

Existem muitas publicações tratando das propriedades mecânicas do osso trabecular, que foram revisadas por Cowin [28]. De acordo com este autor, as propriedades mecânicas das trabéculas no osso trabecular são próximas às do osso cortical. Valores típicos são: 12 GPa para o módulo elástico, 136 MPa para a resistência à compressão e 105 MPa para a tensão de tração. Por outro lado, a resistência à compressão do osso trabecular (não das trabéculas) é mais baixa, situando-se na faixa de 0,2 – 4 MPa, quando a densidade relativa é de aproximadamente 0,1 [29].

Na opinião de Logeart-Avramoglou et al. [30], a alta resistência mecânica não deve ser encarada como uma prioridade, uma vez que “*a função principal do scaffold é estimular o crescimento do tecido ósseo em seu interior e não prover suporte para a solicitação mecânica*”. Segundo o autor, quando necessária, a estabilidade mecânica pode ser alcançada, na maioria dos casos, através de dispositivos ortopédicos apropriados como pinos internos e intramedulares, ou então fixadores externos.

Adicionalmente, Tamai et al. [31] reportaram que resistência à compressão de *scaffolds* de HA aumenta significativamente (por exemplo, de ~ 10 para ~ 30 MPa) devido ao crescimento do tecido ósseo *in vivo*. Desta forma, tem sido especulado também que a obtenção de um *scaffold* com uma



resistência mecânica semelhante à do osso não deve ser necessária, pois a formação do tecido ósseo *in vivo* no interior deste criaria um biocompósito, aumentando significativamente a resistência do *scaffold* com o tempo [21].

Um *scaffold*, contudo, deve possuir ao menos uma resistência mecânica e tenacidade à fratura suficientes para permitir que este seja adequadamente manuseado. De acordo com Chen et al. [32], uma resistência mecânica entre 0,3 - 0,4 MPa é suficiente para um manuseio satisfatório do *scaffold*.

### **2.2.5. Fabricação de formas complexas**

O material a partir do qual o *scaffold* será fabricado deve ser usinável ou então poder ser fabricado diretamente em formas complexas, ou seja, ser prontamente produzido em formas irregulares para se adequarem às dimensões do defeito ósseo de cada paciente.

O método de produção dos *scaffolds* deve ser reprodutível e permitir a produção em escala (“*scale-up*”) da tecnologia desenvolvida [33-34].

O crescente interesse em técnicas de prototipagem rápida para a fabricação de *scaffolds* ocorre principalmente devido ao fato de que esta técnica permite a construção de *scaffolds* usando dados manipulados por computador. Por exemplo, implantes individualizados para um defeito ósseo específico podem ser gerados através de dados de tomografia computadorizada do paciente.

No entanto, as técnicas de prototipagem rápida têm sido tradicionalmente aplicadas em sistemas poliméricos. Além disso, a resolução estrutural alcançável na prototipagem rápida até o presente momento não é suficiente para imitar com precisão uma estrutura complexa como a do osso trabecular [35].

### **2.3. Obtenção de *scaffolds*: o estado da arte**

Os *scaffolds* podem ser fabricados a partir de inúmeros tipos de materiais, incluindo metais, polímeros, cerâmicas, ou ainda, compósitos destes. Os aços inoxidáveis e as ligas de titânio são os materiais que usualmente consistem a

base dos implantes metálicos usados para regeneração óssea. Estes são geralmente constituídos de duas camadas, sendo a parte interna de metal sólido, enquanto que partículas de titânio formam um recobrimento superficial poroso. A espessura da camada porosa pode variar de poucos nanômetros até centenas de microns, dependendo da técnica de fabricação [21].

Diferentes técnicas têm sido empregadas para a preparação do recobrimento poroso incluindo “plasma-spraying”, no caso de implantes com porosidade na faixa de 50-60% e tamanho de poros variando entre 200 e 400  $\mu\text{m}$  [36], e sinterização, no caso de implantes com 35% de porosidade e tamanho de poros variando entre 50 e 200  $\mu\text{m}$  [37]. Outras técnicas incluem usinagem, ataque químico e jateamento, mas resultam em poros muito pequenos [37]. Exemplos de *scaffolds* metálicos completamente porosos são as malhas de titânio com porosidade de 86% e tamanho médio de poros de aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ , que foram utilizadas em testes *in vivo* na reparação de defeitos craniais [38-39]. A maior vantagem dos metais em relação aos outros tipos de materiais é a sua excelente resistência mecânica. Todavia, os metais possuem como principal desvantagem o fato de serem quase inertes, ou seja, não são capazes de se ligar ao tecido ósseo ou promover sua regeneração. Além disso, há riscos de toxidez relacionados à acumulação de íons metálicos [40].

No caso dos polímeros, muitos métodos têm sido desenvolvidos para gerar *scaffolds* altamente porosos, incluindo “fiber bonding”, colagem de solvente/lixiviação de material particulado (“solvent casting/particulate leaching”), “gas-foaming”, “freeze-drying” e separação de fases seguida de emulsificação [24]. Uma grande desvantagem destes materiais quando implantados, contudo, é a excreção de produtos da degradação ácida que podem levar a respostas inflamatórias [14, 26, 41-42].

Outra limitação é a ausência de bioatividade, o que significa que estes polímeros não permitem a fixação do tecido ósseo em sua superfície [43]. Além disso, todas estas técnicas requerem o uso de solventes orgânicos, que podem reduzir a habilidade das células em formar novos tecidos *in vivo* [14].

De acordo com Colombo [44] e Studart et al. [45], dentre as várias técnicas de obtenção cerâmicas macroporosas encontradas na literatura, destacam-se três: (a) o método da adição e eliminação de agentes porogênicos (“sacrificial template method”); (b) a técnica da réplica (também conhecida como “polymer sponge method”) e (c) e a técnica conhecida como “direct foaming”.

A primeira técnica (a) usualmente consiste na preparação de um compósito bifásico contendo uma matriz contínua de partículas cerâmicas precursoras e uma fase de sacrifício dispersa homogeneamente na matriz, que é posteriormente extraída para gerar poros na microestrutura. Camilo [46] obteve *scaffolds* de alumina infiltrados com hidroxiapatita e Bioglass<sup>®</sup> através desta técnica. Inicialmente, a autora preparou uma barbotina contendo alumina e partículas de sacarose dispersas. Após a secagem da barbotina, o pó obtido foi prensado isostaticamente na forma de pastilhas. As pastilhas foram imersas em água para a remoção da sacarose e posteriormente sinterizadas a altas temperaturas (~ 1400°C). *Scaffolds* com aproximadamente 70% de porosidade e resistência mecânica relativamente alta foram obtidos. Utilizando procedimento similar, Monaretti [47] obteve *scaffolds* de alumina utilizando o naftaleno como agente porogênico ao invés da sacarose.

A técnica da réplica (b) consiste na imersão de uma espuma em uma barbotina contendo o material de interesse, ou seja, as partículas cerâmicas. Em seguida o corpo a verde passa por um processo de queima, onde ocorre a eliminação do polímero e a sinterização do pó. Através desta técnica, Ramay et al. [48] produziram *scaffolds* de hidroxiapatita com porosidade variando entre 70-77%, sendo que os poros apresentavam tamanhos variando entre 200 e 400 µm.

No caso do método de “direct foaming” (c), materiais porosos são produzidos através da incorporação de gases e/ou surfactantes em uma suspensão, que é subsequente ajustada para manter a estrutura de bolhas formada. Na maioria dos casos, as espumas consolidadas são sinterizadas a altas temperaturas. Ebaretonbofa et al. [49] obtiveram *scaffolds* de hidroxiapatita altamente porosos (porosidade > 90%) através deste método,

porém, com baixa resistência mecânica (0,2 MPa) e poros pobremente interconectados.

Tancred et al. [50] descreveram um novo processo de obtenção de *scaffolds*, onde uma barbotina composta de hidroxiapatita (HA) e fosfato de tricálcio (TCP) é depositada em um molde negativo de cera. Após a secagem, a cera é removida e o *scaffold* cerâmico é queimado. Este método permitiu a obtenção reprodutiva de estruturas com porosidade similar ao do osso trabecular.

Como a maioria das cerâmicas baseadas em fosfatos de cálcio (HA, TCP,  $\beta$ -TCP, etc.) geralmente apresenta uma lenta cinética de ligação ao tecido ósseo e baixa taxa de reabsorção, *scaffolds* obtidos a partir de vidros bioativos tornaram-se uma alternativa promissora. *Scaffolds* de vidros bioativos têm sido fabricados apenas a partir de técnicas sol-gel, “gel-casting” e “direct foaming” [51-52].

Sepulveda et al. [53] obtiveram *scaffolds* através da adição de agentes espumantes durante a preparação via sol-gel de vidros, usando precursores alcóxidos. Três sistemas foram testados a fim de verificar a aplicabilidade desta rota de fabricação:  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2\text{-CaO}$  e  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ . Foram obtidos *scaffolds* cilíndricos de 25 x 20 mm contendo poros interconectados de 100-500  $\mu\text{m}$  e poros nanométricos na faixa de 2-50 nm, inerentes ao processo sol-gel.

Navarro et al. [17] descreveram um método de obtenção de vidros e vitrocerâmicas porosas do sistema  $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O-TiO}_2$ . O método consiste na adição de um agente espumante ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em uma suspensão de partículas de vidro, seguida da secagem da suspensão e subsequente sinterização da estrutura porosa obtida.

Apenas recentemente, a técnica da réplica foi utilizada por Boccaccini et al. [8] para a fabricação de *scaffolds* a partir do Bioglass<sup>®</sup>. Através desta técnica, os autores conseguiram obter com sucesso estruturas altamente porosas, com porosidade de aproximadamente 90% e poros com diâmetro na faixa de 510-720  $\mu\text{m}$ .

## 2.4. Vidros e vitrocerâmicas: candidatos potenciais

Em 1969 Hench [54] descobriu que os tecidos ósseos podiam se ligar quimicamente a certos tipos de vidros. Este grupo de vidros tornou-se conhecido como vidros bioativos baseado na seguinte definição: “O *material bioativo* é aquele que exhibe uma resposta biológica específica na interface que resulta na formação de uma ligação química entre os tecidos vivos e o material”.

Um importante aspecto que torna os biovidros diferentes das demais biocerâmicas é a possibilidade de controlar, dentro de uma determinada faixa de composição, as propriedades químicas e a taxa de ligação aos tecidos. Wilson et al. [55] verificaram que a composição mais reativa dos biovidros desenvolve uma ligação estável inclusive com os tecidos macios do corpo humano. Isto possibilita projetar composições de vidros com propriedades específicas para uma aplicação clínica particular.

A ligação entre um vidro bioativo e o tecido ósseo foi primeiramente observada em composições que continham  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$  e  $\text{P}_2\text{O}_5$  em proporções específicas. Existem três características composicionais importantes nos vidros bioativos: concentração de  $\text{SiO}_2$  menor que 60% em mol, alta concentração de  $\text{Na}_2\text{O}$  e  $\text{CaO}$  e elevada razão  $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ . Além destes componentes básicos, existem composições que apresentam outros componentes adicionais, tais como:  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$  e  $\text{CaF}_2$  [13, 56-57].

A composição do vidro bioativo determina a cinética das reações do vidro com os tecidos. Quando um biovidro entra em contato com os fluidos corpóreos, ocorre primeiramente a lixiviação dos cátions  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  e sua substituição na estrutura do vidro por cátions  $\text{H}^+$  ou  $\text{H}_3\text{O}^+$  do fluido (estágio I). Isto causa um aumento do pH local provocando a ruptura das ligações Si-O-Si e a sílica é liberada na solução na forma de  $\text{Si}(\text{OH})_4$  (estágio II). Se o pH local for menor que 9,5 ocorre condensação do  $\text{Si}(\text{OH})_4$  e a sílica se repolimeriza na superfície do vidro, formando uma camada de sílica-gel (estágio III).

A estrutura aberta da sílica-gel permite que a troca iônica entre o vidro e a solução continue ocorrendo. Íons cálcio e fosfato se difundem a partir do vidro pela camada de sílica-gel e somando-se aos íons cálcio e fosfato da solução,

formam sobre a superfície do vidro uma camada de fosfato de cálcio amorfa (estágio IV). Após o aumento de espessura das camadas de sílica-gel e fosfato de cálcio amorfas, esta última passa a incorporar íons hidroxil, carbonato e flúor, e inicia a sua cristalização em HCA (estágio V) [13, 15, 58].

As diferenças na taxa de adesão ao tecido podem ser estimadas quantitativamente através do Índice de Bioatividade ( $I_B$ ), e assim é possível comparar a cinética de ligação interfacial de dois materiais distintos. O índice de bioatividade de um biomaterial pode ser definido como o inverso do tempo para que mais de 50% da interface esteja ligada às células do tecido vivo:  $I_B = 100/t_{0,5}$  (tempo em dias). As células do colágeno, constituintes dos tecidos macios, podem aderir fortemente a vidros bioativos que apresentem  $I_B > 8$ . Neste caso, as fibrilas do colágeno entremeiam na interface pelo crescimento da camada de HCA. Estes aglomerados de HCA-colágeno mimetizam a natureza da ligação entre tendões e ligamentos, compostos inteiramente por fibrilas do colágeno, e o osso, o qual é composto por cristais de HCA e colágeno [13, 55].

A Figura 2.2 ilustra o índice de bioatividade dos vidros do sistema  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$  com uma concentração em peso fixa de 6% de  $\text{P}_2\text{O}_5$  [58]. É possível notar que, para composições no interior da região tracejada, o índice de bioatividade é superior a 8.

Os vidros bioativos são capazes de se ligarem mais rapidamente ao tecido ósseo do que as cerâmicas bioativas, como a hidroxiapatita. A razão para isso tem sido longamente relacionada à taxa de formação da camada superficial de HCA; quanto maior for a taxa de formação da HCA, mais rapidamente o material se ligará ao tecido ósseo [9].

O mecanismo de osteoindução, todavia, parece ser mais complicado. Conforme um biovidro degrada, íons como silício (na forma de ácido silícico), cálcio, sódio e fosfatos são liberados no meio fisiológico. Acredita-se que uma combinação destes íons estimula células a produzir novo tecido ósseo, especialmente os íons cálcio e silício [59]. Estudos de biologia molecular têm mostrado que sete famílias de genes envolvidos na osteogênese são estimuladas pelos produtos de dissolução dos vidros bioativos [60].

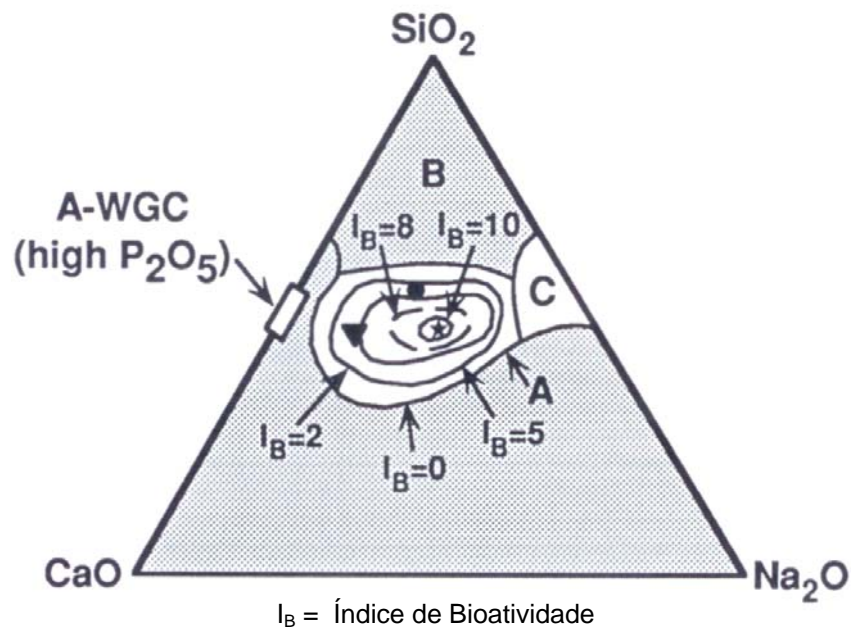


Figura 2.2 - Diagrama do sistema  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$  com uma concentração em peso fixa de 6% de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , mostrando a região com índice de bioatividade superior a 8 [58].

Entretanto, as maiores desvantagens dos biovidros são a baixa resistência mecânica e a baixa tenacidade à fratura. No sentido de melhorar o desempenho mecânico, materiais vitrocerâmicos têm sido desenvolvidos [15]. As vitrocerâmicas são materiais produzidos a partir da cristalização controlada de vidros, podendo apresentar propriedades térmicas, químicas, biológicas e dielétricas diferenciadas, podendo ser superiores aos metais e polímeros orgânicos nestas áreas. Além disso, os materiais vitrocerâmicos geralmente apresentam propriedades mecânicas superiores aos vidros precursores. A grande variedade de composições e a possibilidade de desenvolvimento de microestruturas especiais devem ser destacadas. Uma vitrocerâmica pode ser altamente cristalina ou conter uma quantidade substancial de vidro residual, podendo ser composta de uma ou mais fases cristalinas e vítreas.

Peitl [15] comprovou que a cristalização de vidros com composições químicas próximas à do Bioglass<sup>®</sup> possibilitou a elevação da resistência mecânica em até 2,8 vezes em relação ao vidro, passando de 76 para 214

MPa. Este valor é similar ao da vitrocerâmica A/W, a de melhor desempenho mecânico dentre as vitrocerâmicas comerciais. A tenacidade à fratura também aumentou na ordem de 40% com a cristalização, devido à presença de tensões residuais entre os cristais e a matriz vítrea. Por outro lado, o módulo elástico também aumentou, o que seria uma desvantagem. Contudo, o valor ainda é o mais próximo do tecido ósseo quando comparado às demais vitrocerâmicas comerciais.

Um estudo demonstrou que a cristalização diminui o nível de bioatividade, podendo transformar um vidro bioativo em um material inerte [61]. Entretanto, Peitl et al. [62-63] encontraram resultados opostos. Segundo Peitl, a cristalização diminui ligeiramente a cinética de formação da camada de HCA, porém sua formação não é inibida, mesmo para vidros totalmente cristalizados.

## 2.5. O Biosilicato<sup>®</sup>

O Biosilicato<sup>®</sup> é uma designação de uma composição em particular de um conjunto de vitrocerâmicas totalmente cristalinas do sistema  $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ , que apresentam propriedades bioativas. Este material foi especialmente desenvolvido para a utilização no tratamento da hipersensibilidade dentinária [64-65]. Desde 2003, o Biosilicato<sup>®</sup> tem sido utilizado com sucesso em testes clínicos [66-67].

Em um recente estudo [68], o Biosilicato<sup>®</sup> e o Bioglass<sup>®</sup> foram submetidos a uma cultura osteogênica de células ósseas com a finalidade de avaliar comparativamente suas propriedades. Foi observado que, embora ambos os materiais tenham suportado osteogênese *in vitro*, áreas significativamente maiores de matriz óssea calcificada foram formadas na superfície do Biosilicato<sup>®</sup>. Os autores sugeriram ainda que estes resultados indicam que o Biosilicato<sup>®</sup> é um material osteoindutor, possuindo um nível de bioatividade maior do que as vitrocerâmicas de apatita comerciais. Esta característica, aliada às boas propriedades mecânicas, torna o Biosilicato<sup>®</sup> um candidato potencial para o desenvolvimento de *scaffolds* para uso como enxerto ósseo.



## 2.6. Produtos comercialmente disponíveis

Tendo em vista a crescente necessidade clínica, o mercado para os tratamentos baseados em biomateriais para ortopedia está aumentando a uma rápida taxa. Enquanto os materiais para a implantação eram desenvolvidos para serem inertes, cientistas de materiais direcionaram seus estudos para o desenvolvimento de materiais deliberadamente bioativos, os quais interagem com moléculas biológicas ou células e são capazes de regenerar tecidos. Um grande número de alternativas tornou-se comercialmente disponível para uso ortopédico.

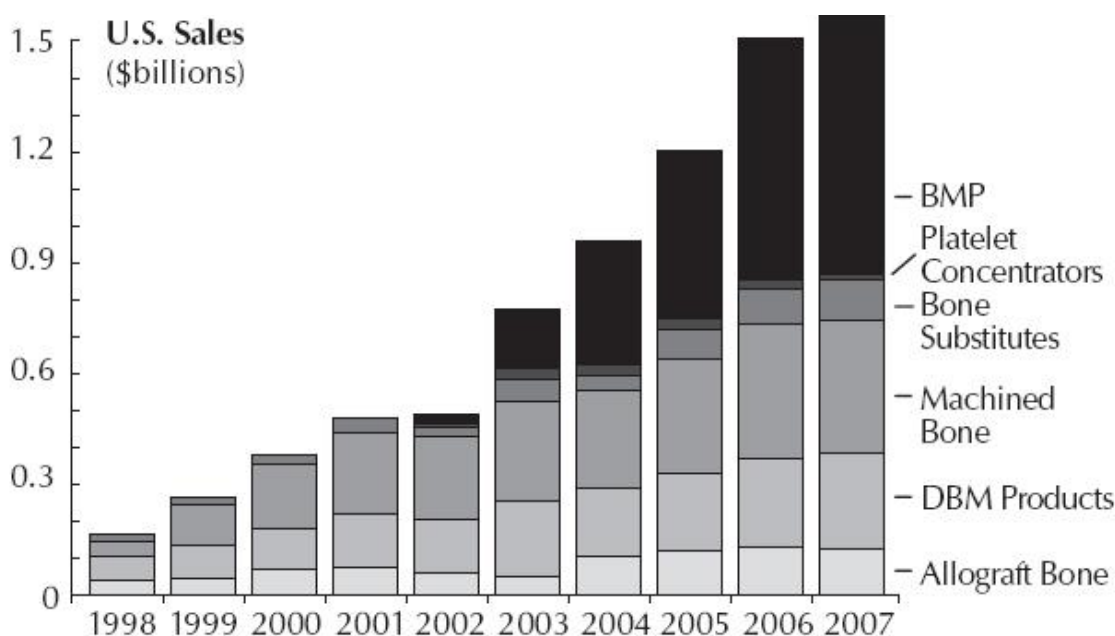


Figura 2.3 - Vendas de enxertos ósseos e produtos relacionados nos EUA [69].

É estimado que mais de 500 mil procedimentos de enxerto ósseo sejam realizados anualmente nos EUA. Estes números superam a marca de 2 milhões em todo o mundo e crescem a cada ano, promovendo um déficit na disponibilidade de enxertos autógenos e alógenos, tradicionalmente utilizados nos procedimentos de reconstrução óssea. Esta realidade estimulou o interesse das empresas no fornecimento de materiais para enxerto ósseo, um mercado que vem crescendo a cada ano, chegando a movimentar 1,5 bilhões de dólares nos EUA no ano de 2007 (Figura 2.3).

Atualmente, um grande número de produtos está comercialmente disponível. Os *scaffolds* variam em composição e mecanismo de ação, entre outras características específicas. Grande parte dos produtos é comercializada apenas na forma de grânulos, dada a dificuldade em se obter peças macroporosas. Dentre os principais materiais cerâmicos comercializados na forma de *scaffolds* destacam-se:

- **Fosfato de Tricálcio ( $\beta$ -TCP)**

Entre as cerâmicas de fosfato de tricálcio encontramos o produto Cerasorb<sup>®</sup>, ChronOs<sup>™</sup> e o produto Vitoss<sup>®</sup>. O produto Cerasorb<sup>®</sup> da empresa Curasan (Figura 2.4 – a) é composta por grânulos na faixa de 1 - 4 mm, com porosidade total de 65% e larga distribuição de tamanho de poros, variando entre 5 e 500  $\mu\text{m}$  [70]. O produto ChronOs<sup>™</sup> da empresa Synthes (Figura 2.4 – b) é vendido na forma de grânulos ou blocos [71]. O produto Vitoss<sup>®</sup> da empresa Orthovita pode ser encontrado na forma de grânulos ou tiras com porosidade de 90%, sendo o *scaffold* cerâmico de maior porosidade existente no mercado [72].



(a)



(b)



(c)

Figura 2.4 - Cerasorb<sup>®</sup> (a), ChronOs<sup>™</sup> (b) e Vitoss<sup>®</sup> (c) são *scaffolds* produzidos a partir de fosfato de tricálcio.

- **Hidroxiapatita (HA)**

Entre os *scaffolds* produzidos a partir de hidroxiapatita, encontramos o produto Bio-Oss<sup>®</sup> da empresa Geistlich, o produto Cerabone<sup>®</sup> da empresa aap Implantate AG e o produto Bonefill da empresa Bionnovation. O produto Bio-Oss<sup>®</sup> (Figura 2.5 – a) é produzido a partir do osso bovino e comercializado na forma de grânulos de 0,25 a 1 mm ou blocos de 0,3 cm<sup>3</sup>. Estes blocos são formados pela união de grânulos com colágeno suíno purificado (aproximadamente 10% em peso) [73]. O produto Cerabone<sup>®</sup> (Figura 2.5 – b) é encontrado na forma de grânulos ou blocos de até 20 x 20 x 40 mm, com poros variando entre 100 e 1500 µm [74]. O produto Bonefill<sup>®</sup> da empresa brasileira Bionnovation é produzido a partir do osso bovino desmineralizado, também sendo comercializado na forma de grânulos (Figura 2.5 – c) [75].



(a)



(b)



(c)

Figura 2.5 - Bio-Oss<sup>®</sup> (a), Cerabone<sup>®</sup> (b) e Bonefill<sup>®</sup> (c) são *scaffolds* produzidos a partir de hidroxiapatita.

- **HA/ $\beta$ -TCP**

O produto ReproBone™ da empresa Ceramisys (Figura 2.6 – a) é composto por 60% de hidroxiapatita e 40% de fosfato de tricálcio [76]. É comercializado na forma de pequenos blocos com porosidade acima de 80% ou grânulos de 1 a 4 mm. O produto Osteosynt® da empresa mineira Einco também é composto pela biocerâmica bifásica HA/ $\beta$ -TCP. Este produto é comercializado nas mais variadas formas como grânulos, esferas, blocos, cunhas, ente outras (Figura 2.6 – b) [77]. O produto GenPhos® da também brasileira Baumer (Figura 2.6 – c) é composto por 70% de HA e 30% de  $\beta$ -TCP, sendo comercializado na forma de grânulos [78].



(a)



(b)



(c)

Figura 2.6 - ReproBone™ (a), Osteosynt® (b) e GenPhos® (c) são *scaffolds* produzidos a partir da cerâmica bifásica HA/ $\beta$ -TCP.

- **Bioglass®**

O produto NovaBone® da empresa americana homônima (Figura 2.7) é produzido a partir do Bioglass® - 45S5, que possui o maior nível de bioatividade dentre todos os materiais conhecidos. Atualmente, este produto é comercializado apenas na forma de grânulos [79].



Figura 2.7 - O produto NovaBone® é um *scaffold* produzido a partir do Bioglass® - 45S5.

## 2.7. Motivação

Como já exposto anteriormente, a osteocondutividade do Biosilicato® é superior ao das cerâmicas de HA ou TCP comerciais e comparável ao Bioglass® - 45S5. Um recente estudo [68] sugere que o Biosilicato® é também osteoindutor, ou seja, é capaz de estimular o crescimento do tecido ósseo sem a necessidade de incorporação de agentes biológicos.

No caso do Biosilicato®, pode-se utilizar qualquer uma das técnicas tradicionais de obtenção de estruturas macroporosas cerâmicas, de forma que os *scaffolds* obtidos não se limitem apenas à forma de grânulos. Além disso, existe a possibilidade de obtenção de *scaffolds* com propriedades mecânicas superiores aos biovidros, como é o caso do Bioglass® – 45S5.

Todos estes fatores fazem do Biosilicato® um candidato potencial para estimular a regeneração óssea e sustentar o novo tecido ósseo formado na forma de *scaffolds*.



### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para se atingir os objetivos propostos, o trabalho foi dividido em três etapas principais. A primeira etapa consistiu na obtenção dos vidros (Biosilicato<sup>®</sup> e Bioglass), moagem do Biosilicato<sup>®</sup> e na determinação das melhores condições de sinterização. A segunda etapa compreendeu a realização de tratamentos térmicos complementares para a caracterização da fase secundária e análise de sua influência na bioatividade do Biosilicato<sup>®</sup>. Uma vez determinadas as melhores condições de sinterização, a terceira etapa consistiu no teste de duas rotas para a fabricação de *scaffolds*: (a) adição de agentes porogênicos e (b) através do método da réplica.

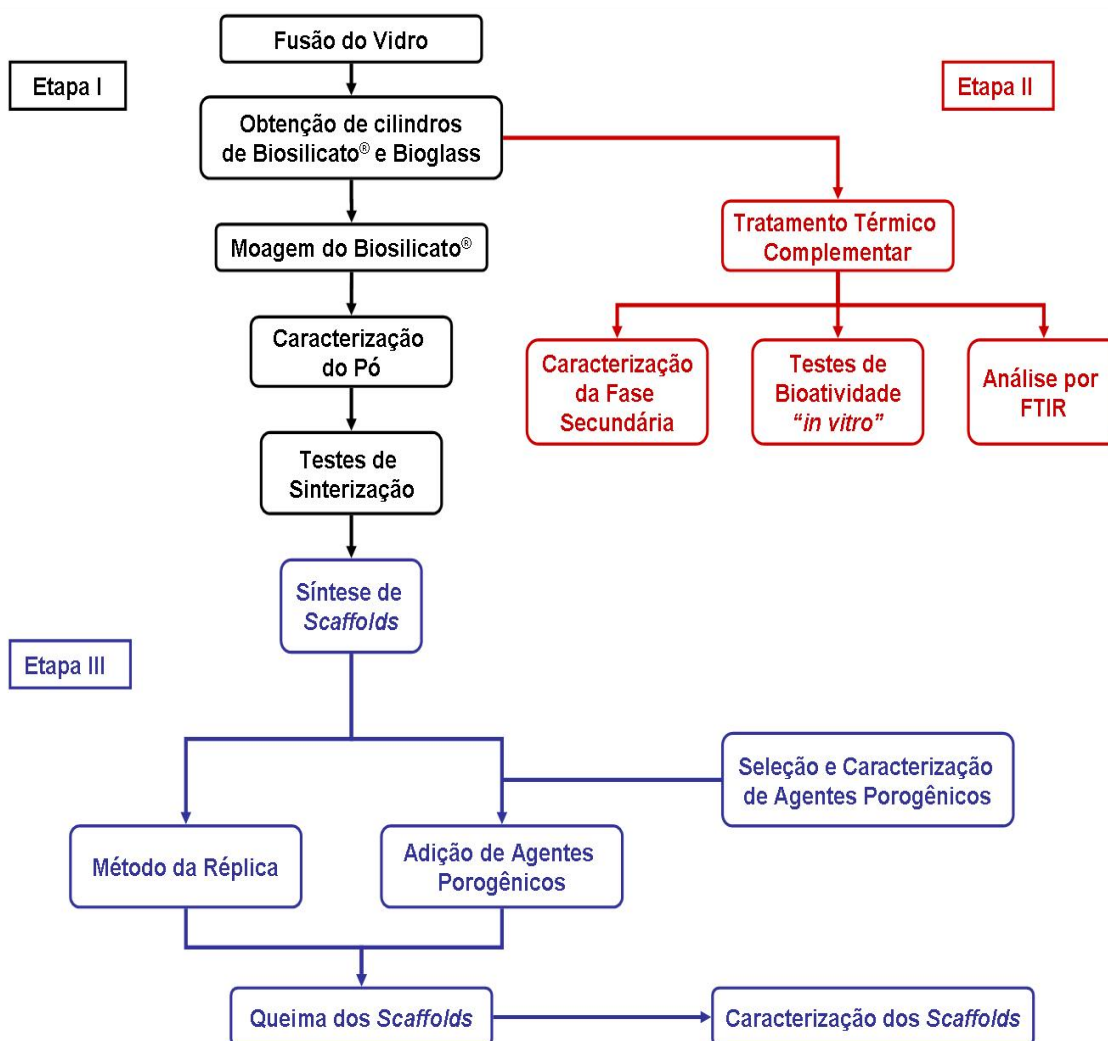


Figura 3.1 - Fluxograma simplificado das atividades realizadas.

Os *scaffolds* obtidos por meio destas duas técnicas foram então caracterizados em relação à porosidade e interconectividade dos poros. Na Figura 3.1 é apresentado um fluxograma simplificado das atividades realizadas.

### 3.1. Preparação e moagem do Biosilicato<sup>®</sup>

Os procedimentos empregados na fusão do vidro e no tratamento térmico para obtenção do Biosilicato<sup>®</sup> já estão bem estabelecidos e podem ser encontrados no trabalho de Ravagnani [1]. Neste trabalho, foram obtidos cilindros de Biosilicato<sup>®</sup> de 12 mm (diâmetro) por 50 mm (altura). Alguns destes cilindros foram moídos em um moinho planetário com jarro e meios de moagem de ágata. A ágata é uma espécie mineral constituída por várias formas cristalinas da sílica ( $\text{SiO}_2$ ). Assim sendo, o uso de meios de moagem de ágata minimiza a contaminação do Biosilicato<sup>®</sup>, uma vez que a sílica está presente na sua composição.

Estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa [80] mostraram que quando se varia o tamanho dos meios de moagem assim como o tempo de moagem, é possível obter pós muito finos, com distribuição de tamanho de partículas relativamente larga. Estas condições são desejáveis para melhorar o empacotamento e densificação durante a sinterização dos *scaffolds*. Desta forma, foi utilizado o seguinte procedimento para a moagem do Biosilicato<sup>®</sup>:

1. Moagem inicial a 450 rpm por 30 min com 3 esferas de ágata de 30 mm de diâmetro;
2. Moagem a 450 rpm por 70 min com 10 esferas de ágata de 20 mm de diâmetro;
3. Moagem a 550 rpm por 130 min com 50 esferas de ágata de 10 mm de diâmetro.

O pó obtido por este procedimento foi utilizado tanto nos testes de sinterização do Biosilicato<sup>®</sup> quanto na síntese de *scaffolds*.



### 3.2. Tratamento térmico complementar

Um recente estudo realizado por Ravagnani [1] revelou que quando o Biosilicato<sup>®</sup> é tratado termicamente a temperaturas superiores a 700°C, ocorre o aparecimento de uma fase cristalina secundária, como pode ser observado na Figura 3.2:

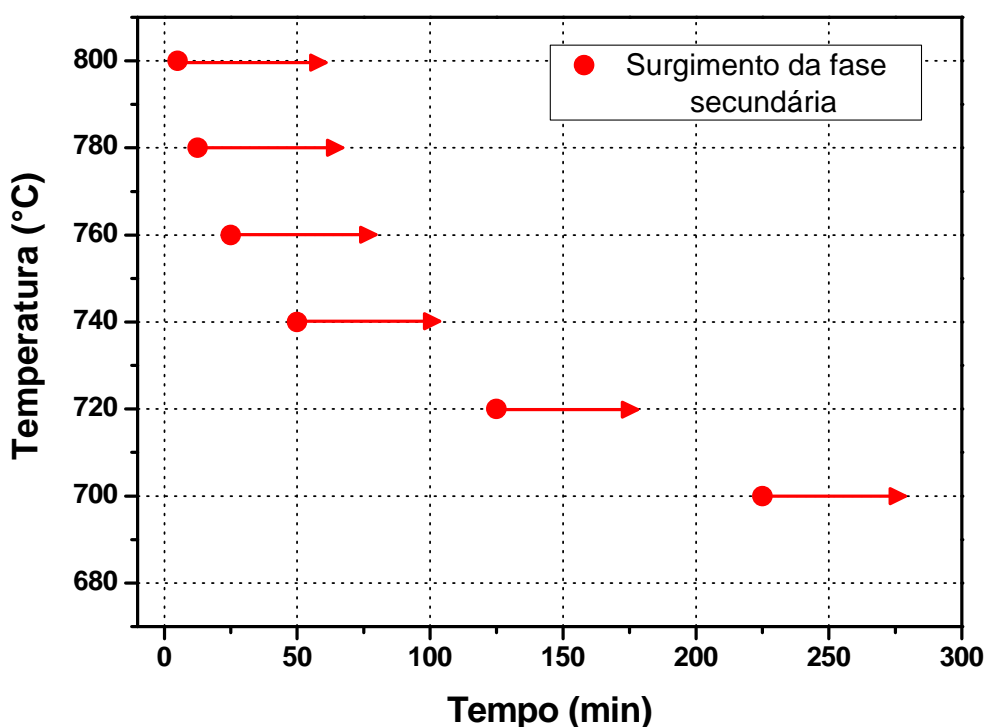


Figura 3.2 - Tempo de duração do tratamento térmico em função da temperatura para o surgimento da fase secundária (identificação da fase secundária realizada através de FTIR) [1].

As amostras de Biosilicato<sup>®</sup> foram tratadas termicamente em várias temperaturas, e em seguida analisadas por FTIR. Através deste gráfico, podemos observar que o aparecimento da fase secundária depende do tempo e da temperatura de tratamento térmico. Por exemplo, à temperatura de 700°C, são necessários 225 minutos de tratamento térmico para o surgimento da fase secundária. A 800°C, a fase secundária já pode ser identificada com apenas 5 minutos de tratamento térmico.

Durante as fases de desenvolvimento do Biosilicato<sup>®</sup> no estudo conduzido por Ravagnani, todos os esforços foram realizados no sentido de impedir o surgimento da fase secundária. Contudo, nenhum tipo de análise foi realizada para comprovar ou não as suspeitas de que tal fase de fato diminuiria a bioatividade do material.

Uma vez que a sinterização do Biosilicato<sup>®</sup> deve ocorrer a temperaturas superiores a 700°C, a caracterização da fase secundária e o estudo de sua influência na bioatividade tornaram-se imprescindíveis. Desta forma, cilindros de Biosilicato<sup>®</sup> foram submetidos a um tratamento térmico complementar a 900°C por 3h, de forma a favorecer o aparecimento da fase secundária. Estes tratamentos térmicos foram realizados em forno elétrico horizontal especialmente desenvolvido no LaMaV, que possui excelente controle de temperatura (variação de aproximadamente 1°C) e pode atingir temperaturas próximas de 1000°C (Figura 3.3).



Figura 3.3 - Forno utilizado para o tratamento térmico complementar do Biosilicato<sup>®</sup>.

### 3.3. Obtenção do Bioglass – 45S5

Com a finalidade de comparar os respectivos níveis de bioatividade, foram realizados testes de bioatividade *in vitro* empregando-se o Biosilicato<sup>®</sup>, o

mesmo contendo a fase cristalina secundária e o Bioglass - 45S5 genérico, ou seja, produzido em nosso laboratório.

O Bioglass<sup>®</sup> - 45S5 é o material que possui o maior nível de bioatividade dentre os materiais conhecidos. Sua composição é bastante difundida: 24.5% de Na<sub>2</sub>O, 24.5% de CaO, 45% SiO<sub>2</sub> e 6% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (% em peso).

Para a obtenção do Bioglass, foram utilizados os seguintes reagentes: carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – P.A. J.T. Baker), carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub> – P.A. J.T. Baker), fosfato dibásico de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – P.A. J.T. Baker) e sílica (SiO<sub>2</sub> – P.A. Santa Rosa). Os reagentes foram pesados em uma balança analítica de precisão e misturados em girador de jarros por 1 hora, para garantir uma boa homogeneização e evitar qualquer tipo de segregação na mistura.

A mistura das matérias-primas devidamente homogeneizadas foi fundida em um cadinho de platina, utilizando-se um forno elétrico a 1450°C por 4 horas. O material fundido foi vertido em moldes cilíndricos de grafite, através dos quais foram obtidos cilindros de vidro de 12 mm de diâmetro por 50 mm de altura.

Os cilindros de vidro foram retirados do molde e imediatamente recozidos em um forno mufla a 30°C abaixo da temperatura de transição vítrea do material (T<sub>g</sub> ~ 550°C), por 4 horas, para relaxamento das tensões internas, com a finalidade de evitar a formação de trincas no vidro durante seu manuseio.

### **3.4. Testes de bioatividade “*in vitro*” e análise por FTIR**

Os testes de bioatividade *in vitro* dão informações sobre a velocidade de formação de HCA na superfície dos materiais em estudo. São testes preliminares e seletivos realizados anteriormente aos testes *in vivo*, os quais envolvem altos custos e profissionais especializados para a criação de animais, colocação dos implantes e sacrifício dos animais para a coleta de amostras para análise. Além disso, os testes *in vitro* são mais práticos, podendo ser realizados em tempos mais curtos.

Estes testes consistem na exposição do material em uma solução acelular denominada “*Simulated Body Fluid*” (SBF-K9) desenvolvida por Kokubo [81]. Esta solução simula as condições dos fluídos corpóreos, contendo os íons presentes em concentrações muito próximas às encontradas no plasma sanguíneo humano, como indicado na tabela 1:

Tabela 1 - Concentração de íons (mM) na solução SBF-K9 e no plasma sanguíneo humano.

Íon	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	(HCO <sub>3</sub> ) <sup>-</sup>	(HPO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>
<b>Plasma Humano</b>	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5
<b>SBF-K9</b>	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5

A preparação da solução SBF-K9 para os testes de bioatividade é um processo bem delicado e deve seguir uma seqüência rigorosa, caso contrário pode haver a precipitação de sais na solução, o que a torna inutilizável.

A preparação desta solução deve seguir os seguintes passos:

1. Lavar todos os frascos e utensílios utilizados em solução 1N de HCl, detergente neutro e água deionizada, nesta ordem;
2. Secar estes utensílios em estufa;
3. Colocar 500 ml de água deionizada em béquer de 1L e cobrir com vidro de relógio;
4. Manter a água do béquer sob constante agitação através de um agitador magnético e adicionar os reagentes na água, um a um e na mesma ordem apresentada na Tabela 2. Somente adicionar o próximo reagente quando o anterior estiver completamente dissolvido;
5. Ajustar a temperatura da solução contida no béquer a 36,5°C;

6. Ajustar o pH da solução para 7,25 através da adição da solução HCl 1N. Em seguida, retirar o eletrodo do pH, adicionando à solução a água deionizada empregada na sua lavagem;
7. Após o resfriamento da solução até a temperatura ambiente, transferir a solução do béquer para um balão volumétrico de 1L. Adicionar ao balão volumétrico a água utilizada na lavagem do béquer.
8. Ajustar o volume total da solução para um litro, adicionando-se água deionizada.
9. Transferir a solução para um frasco de polietileno ou polipropileno e armazená-la em refrigerador entre 5 e 10°C. Caso alguma substância precipite na solução durante o armazenamento, esta deve ser descartada.

Tabela 2 - Reagentes utilizados na preparação da solução SBF-K9.

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

Para a realização dos testes, os cilindros de Biosilicato<sup>®</sup>, de Biosilicato<sup>®</sup> contendo a fase secundária e de Bioglass – 45S5 foram cortados em discos de aproximadamente 12 x 3 mm. Estes discos foram desbastados em lixas de carbeto de silício até a grana 400, com a utilização de álcool isopropílico.

Foram feitos dois entalhes em lados opostos ao longo da circunferência dos discos, os quais serviram de guia para amarrar um fio de nylon de 0,10 mm. Os discos foram limpos em álcool isopropílico absoluto (QHEMIS – P.A.), permanecendo em limpador ultrasônico por 1 minuto. Após a secagem, os discos foram amarrados e suspensos no interior de pequenos frascos de polipropileno com excelente vedação contendo a solução SBF-K9. A vedação correta é importante, pois evita a evaporação da solução e mudanças na sua concentração. A razão entre a área superficial das pastilhas e o volume da solução SBF (SA/V) foi padronizada em  $0,1 \text{ cm}^{-1}$ , pois um aumento desta razão leva a um aumento excessivo da velocidade das reações devido ao aumento do pH da solução durante a reação [81].

Os frascos contendo os discos suspensos e a solução SBF-K9 foram então colocados em banho-maria a uma temperatura de  $36,7^\circ\text{C}$  (a mesma do corpo humano), onde permaneceram por tempos variando entre 1 e 48h. Para tal, foi utilizado o banho-maria Nova Técnica modelo CT 269 com controle rigoroso de temperatura (controlador Gefran 500), em que a variação de temperatura é de somente  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . A Figura 3.4 esquematiza o teste de bioatividade:

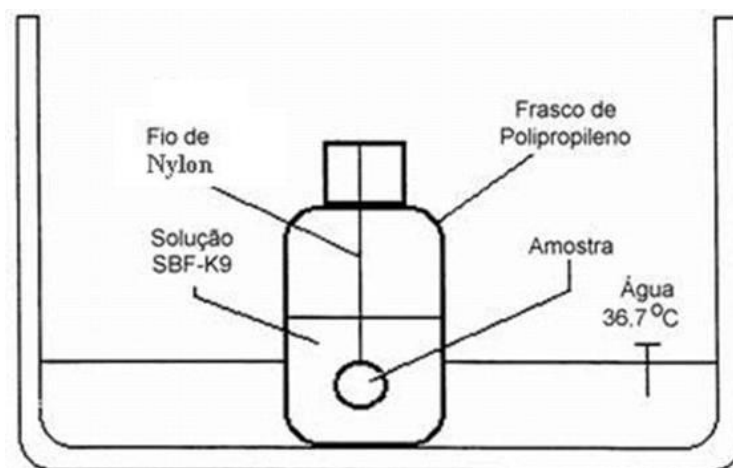


Figura 3.4 - Representação do teste de bioatividade [89].

Após a exposição ao SBF-K9, as amostras foram retiradas dos respectivos frascos e mergulhadas em acetona para a paralisação das

reações. Estas foram analisadas em ambos os lados paralelos através de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Através dessa técnica, foi possível detectar a influência da fase secundária na cinética de formação da HCA no Biosilicato<sup>®</sup>, assim como comparar os resultados obtidos com a cinética de formação da HCA no Bioglass.

### **3.5. Análise de difração de raios-x**

A caracterização da fase cristalina secundária resultante dos tratamentos térmicos adequados para o seu aparecimento foi realizada empregando-se a técnica de difratometria de raios-X (DRX). Para isto, uma amostra de Biosilicato<sup>®</sup> tratada a 900°C por 3h (e, portanto, contendo a fase secundária) foi moída em almofariz de ágata, obtendo-se um pó fino, o qual foi utilizado na análise.

O equipamento utilizado foi o difratômetro Siemens, modelo D 5000, que utiliza anodo rotativo. Os espectros de difração foram obtidos na faixa de  $2\theta$  de 10 a 90° e modo contínuo a 2°/min.

As fases presentes nas amostras foram posteriormente identificadas com o auxílio do programa computacional DIFFRACplus - EVA, com a base de dados centrada no sistema JCPDS.

### **3.6. Testes de sinterização**

#### **3.6.1. Análise de partículas do Biosilicato<sup>®</sup>**

A curva de distribuição de tamanho de partículas do Biosilicato<sup>®</sup> moído segundo as condições descritas no item 3.1 foi obtida em equipamento analisador de partículas Horiba (LA-930). Para isso, o pó foi disperso em álcool isopropílico absoluto (P.A. – 99,5%), sem a utilização de defloculante. O equipamento foi alimentado com a solução contendo as partículas dispersas.

### 3.6.2. Preparação e sinterização das amostras

Para os testes de sinterização, o pó do Biosilicato<sup>®</sup> foi prensado a uma pressão de 50 MPa, sem a adição de ligantes, em prensa automática desenvolvida pelo Laboratório de Tribologia e Compósitos (EESC/USP). Foram obtidas pastilhas com as dimensões especificadas na figura 3.5:

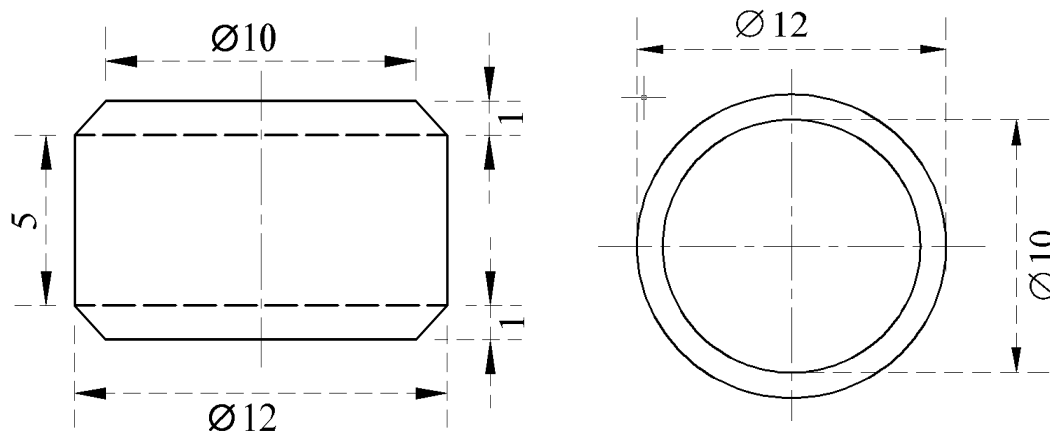


Figura 3.5 – Dimensões das amostras utilizadas nos testes de sinterização do Biosilicato<sup>®</sup> (dimensões em mm).

Os testes de sinterização das pastilhas foram realizados em forno elétrico (KEITH, modelo KKSK 8 8 11-3000), isotermicamente, para temperaturas variando entre 800 e 1100°C e tempos variando entre 1 e 5h. Para cada tempo e temperatura, foram sinterizadas três amostras.

### 3.6.3. Caracterização das amostras sinterizadas

Após a sinterização propriamente dita, foram calculadas a retração linear axial e diametral (RLA e RLD), a porosidade aparente (Pap) e a densidade aparente (Dap) das amostras, de modo a determinar as melhores condições de sinterização (temperatura e tempo) do Biosilicato<sup>®</sup>.

A densidade e a porosidade aparente foram determinadas através do teste de densidade por imersão, que leva em consideração o princípio de Arquimedes, utilizando balança de precisão da marca Mettler Toledo (AB 204).



Três amostras de cada tipo de tratamento térmico foram pesadas obtendo-se o peso seco ( $P_s$ ) de cada uma. Posteriormente, as amostras foram mantidas imersas em álcool etílico por 24h e em seguida foram determinados o peso imerso ( $P_i$ ) e o peso úmido ( $P_u$ ). Com estes dados foi possível calcular a porosidade aparente ( $P_{ap}$ ) e a densidade aparente ( $D_{ap}$ ), através das equações 3.1 e 3.2. Os valores obtidos representam a média aritmética de três amostras para cada condição de sinterização.

$$P_{ap} = \frac{(P_u - P_s)}{(P_u - P_i)} \times 100 \quad 3.1$$

$$D_{ap} = \frac{P_s}{(P_u - P_i)} \times \rho L \quad 3.2$$

, onde  $\rho L$  é a densidade do líquido (no caso o álcool etílico).

A retração linear axial (RLA) e diametral (RLD) foram determinadas com o uso de um paquímetro digital e da equação 3.3:

$$\text{RLA (\%)} \text{ ou } \text{RLD (\%)} = \frac{L_i - L_f}{L_i} \times 100 \quad 3.3$$

, onde  $L_f$  é o comprimento final e,  $L_i$ , o comprimento inicial.

### 3.7. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Esta técnica foi empregada para a confirmação da existência de fase vítrea nas amostras sinterizadas de Biosilicato<sup>®</sup>. As medidas foram realizadas no calorímetro diferencial de varredura DSC 404 (Netzsch), em atmosfera ambiente. Foram utilizados cadinhos de platina e taxa de aquecimento de 10°C/min até a temperatura de 900°C.

### **3.8. Análise do tamanho de partículas dos agentes porogênicos**

A distribuição de tamanho de partículas dos agentes porogênicos não pôde ser realizada no equipamento Horiba, uma vez que o índice de refração destes é desconhecido. Desta forma, utilizou-se a análise das imagens obtidas por microscopia ótica. Para cada agente porogênico foram medidas 1500 partículas.

### **3.9. Determinação da densidade do Biosilicato<sup>®</sup> e dos agentes porogênicos**

As densidades dos agentes porogênicos e do Biosilicato<sup>®</sup> em pó, essenciais para os cálculos utilizados na síntese de *scaffolds*, foram medidas em picnômetro de hélio (Micromeritics – AccuPyc 1330) do Laboratório de Cerâmica do DEMa/UFSCar.

### **3.10. Análise termogravimétrica**

Para definir a melhor estratégia para a remoção dos agentes porogênicos, da espuma de PU e do ligante (PVB), estes foram submetidos a análises termogravimétricas. Estes ensaios foram realizados no equipamento análise térmica (Netzsch STA 409) do Laboratório de Solidificação do DEMa/UFSCar. Foram utilizados cadinhos de platina (amostra e referência), atmosfera inerte de argônio e taxa de aquecimento de 5°C/min da temperatura ambiente até temperaturas variando na faixa de 300-1000°C, conforme o agente porogênico.

### **3.11. Observação da fase secundária por microscopia ótica**

Utilizou-se esta técnica para a observação da fase secundária presente no Biosilicato<sup>®</sup> submetido ao tratamento térmico complementar (item 3.2). Para isto, as amostras foram desbastadas em lixa de carvão de silício (granos 600 e 1200, nesta seqüência) e em seguida, polidas com óxido de cério. Tanto para o desbaste quanto para o polimento, o álcool isopropílico foi utilizado como

meio líquido. Após o polimento, as amostras foram limpas em limpador ultrasônico por 2 minutos. Para revelar a microestrutura, as amostras foram atacadas quimicamente com detergente por 5 segundos e novamente submetidas ao limpador ultrasônico. As amostras foram então observadas no microscópio ótico Leica (modelo DMRX) do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV).

### 3.12. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram utilizados os microscópios eletrônicos de varredura TMP Philips (XL-30) e também o FEG Philips (XL-30), ambos do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) da UFSCar. Esta técnica foi utilizada em diversas análises como:

- Observação da fase secundária e estimativa de sua composição química por EDS;
- Observação das características morfológicas das partículas dos agentes porogênicos;
- Obtenção de imagens para a medida do tamanho médio dos poros obtidos e cálculo da macroporosidade total, para comparação com os valores obtidos através da técnica de imersão (princípio de Arquimedes);
- Avaliação da interconectividade dos poros dos *scaffolds*;
- Observação da superfície de fratura do *scaffolds*;
- Observação e determinação semi-quantitativa da composição química dos resíduos gerados pelos agentes porogênicos.

Para a observação da fase secundária, uma amostra de Biosilicato<sup>®</sup> foi tratada a 900°C/3h e embutida em resina epóxi. Em seguida, a amostra foi desbastada em lixa de carbetto de silício nas granas 350, 600 e 1200 e posteriormente, polida com óxido de cério. Por último, esta amostra foi metalizada com Au por 70s.

Para a observação da superfície de fratura, os *scaffolds* fraturados foram metalizados com Au por 140s. Para a observação da interconectividade dos

poros e medida do tamanho médio dos poros, os *scaffolds* foram embutidos em vácuo com resina epóxi de baixa viscosidade (Epoxicure<sup>TM</sup> - Buehler). Em seguida, as amostras embutidas foram desbastadas e polidas, seguindo-se o mesmo procedimento descrito no parágrafo anterior. Neste caso, os *scaffolds* embutidos foram metalizados com Au por apenas 70s.

Os respectivos resíduos gerados pelos agentes porogênicos, como descrito no item 3.16, foram depositados sobre fita de carbono e recobertos com carbono.

### **3.13. Manufatura de *scaffolds***

Para a síntese dos *scaffolds* foram utilizadas duas rotas distintas: (1) a técnica de adição de agentes porogênicos e (2) o método da réplica. Estas rotas são detalhadas a seguir.

#### **3.13.1. Via adição de agentes porogênicos**

Segundo Studart et al. [45], a remoção dos agentes porogênicos no caso da primeira técnica não leva à formação de estruturas celulares “ocas”, como no caso da técnica da réplica. Desta forma, a resistência mecânica de estruturas porosas obtidas por esta técnica é consideravelmente maior do que aquela alcançada pela técnica da réplica. Este método é muito versátil, uma vez que uma infinidade de agentes porogênicos pode ser utilizada. Além disso, não encontramos na literatura nenhum *scaffold* obtido a partir de vitrocerâmicas utilizando esta técnica.

Para a preparação dos *scaffolds*, utilizou-se uma modificação do procedimento desenvolvido por Monaretti et al. [47]. Este método é baseado na preparação de uma barbotina contendo o material de interesse (no caso, o Biosilicato<sup>®</sup>) na forma de um pó, álcool isopropílico e PVB. Posteriormente, o agente porogênico na granulometria de interesse é adicionado à barbotina e misturado por tempos curtos, mas que são suficientes para que haja a aderência do material de interesse na superfície das partículas do agente porogênico. Esta mistura é então seca e granulada, e o pó granulado é

conformado por duas etapas de prensagem, obtendo-se pastilhas. O agente porogênico é então eliminado durante a queima, e uma estrutura porosa é obtida.

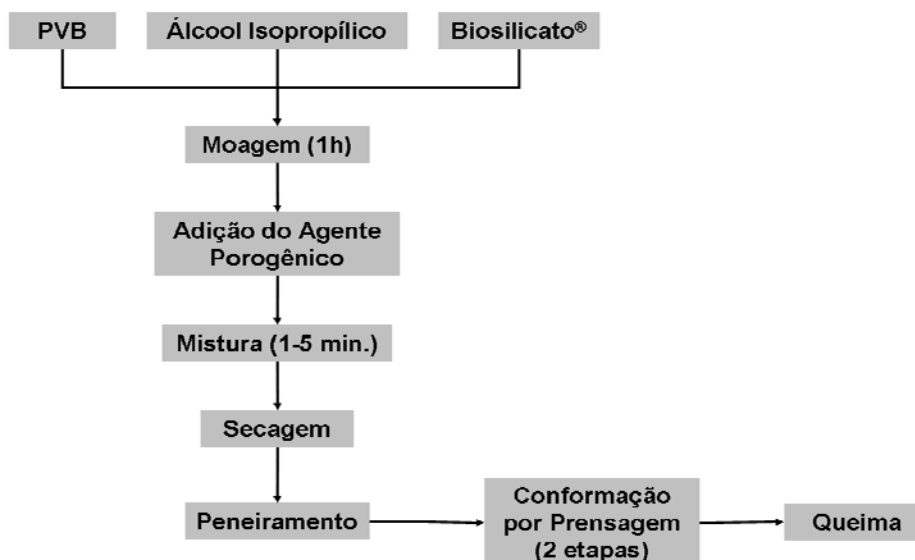


Figura 3.6 – Fluxograma esquemático do procedimento utilizado na preparação das barbotinas.

Inicialmente foi preparada a barbotina contendo o álcool isopropílico e o Biosilicato®. Ambos foram adicionados em um jarro de ágata contendo 30 bolas de ágata com diâmetro de 10 mm. O jarro permaneceu em moinho planetário (Pulverisette 6 – FRITSCH) por 30 minutos a uma rotação de 550 rpm. Em seguida o ligante foi adicionado (PVB) e a barbotina foi misturada por mais 1 hora no moinho planetário a uma rotação de 550 rpm. Posteriormente, os meios de moagem foram removidos do jarro e o agente porogênico foi adicionado à barbotina, sendo misturado por tempos variando entre 1-5 minutos a uma rotação de 150 rpm.

Após isso, a barbotina foi retirada do jarro e depositada em um recipiente de plástico e instantaneamente seca com o auxílio de um secador. O pó resultante foi granulado em uma peneira de nylon com abertura de 1 mm.

O pó granulado obtido foi primeiramente prensado em prensa pneumática; utilizou-se molde cilíndrico de aço de 12 mm de diâmetro e uma pressão de 20 MPa por 10s, obtendo-se pastilhas de aproximadamente 3 mm

de espessura. Posteriormente, as pastilhas foram colocadas em bexigas de borracha e prensadas isostaticamente a uma pressão de 100 MPa por 30s. A prensagem foi realizada no Laboratório de Tribologia e Compósitos da EESC/USP, onde ambas as prensas (pneumática e isostática) foram desenvolvidas. O procedimento acima descrito foi invariavelmente utilizado para todos os agentes porogênicos propostos. Este procedimento pode ser mais bem visualizado na Figura 3.6.

A primeira etapa de prensagem visou apenas conformar o pó granulado na forma de pastilhas. Foi utilizada uma pressão baixa (20 MPa) na tentativa de evitar a excessiva deformação das partículas dos agentes porogênicos. A etapa posterior de prensagem visou melhorar o empacotamento do Biosilicato<sup>®</sup> e diminuir a porosidade intrínseca (decorrente de sua sinterização), sem causar a excessiva fratura dos agentes porogênicos.

No presente trabalho, estabeleceu-se barbotinas contendo 30% em volume de sólidos, 67% em volume de álcool isopropílico e 3% em volume de PVB. A porcentagem referente à parte sólida foi constituída por 20% em volume de Biosilicato<sup>®</sup> e 80% em volume de agente porogênico. Adicionalmente, como será descrito no item 3.13.2, foram utilizados agentes porogênicos com granulometria na faixa de 300 – 600  $\mu\text{m}$ . Isso significa que os *scaffolds* resultantes foram projetados para apresentarem uma macroporosidade induzida de 80% em volume, com tamanho médio de poros maior do que 200  $\mu\text{m}$ .

### **3.13.2. Seleção dos agentes porogênicos**

Uma grande variedade de agentes porogênicos tem sido empregada na fabricação de cerâmicas macroporosas, incluindo materiais orgânicos naturais e sintéticos, líquidos, sais e até mesmo metais [45]. Idealmente os agentes porogênicos devem possuir baixo coeficiente de expansão térmica, ser facilmente removíveis, não gerar gases tóxicos e não deixar resíduos que possam afetar negativamente a bioatividade do material.

Optamos pela utilização dos seguintes agente porogênicos: naftaleno (P.A. - VETEC), o amido de milho (marca Milharina), amido de mandioca (marca Machiara), microesferas de polietileno (Polytechno) e negro de fumo granulado (CABOT – BP120).

- **Naftaleno**

O naftaleno é um candidato interessante para atuar com agente porogênico, pois sublima à temperatura ambiente, podendo ser facilmente removido a temperaturas mais altas. Por outro lado, é um material tóxico e deve ser manuseado com cuidado. Como dito no item 2.3, Monaretti [47] utilizou o naftaleno como agente porogênico na obtenção de *scaffolds* de alumina, obtendo relativo sucesso. Assim, optamos pela utilização deste material como ponto de partida.

- **Amido de milho e mandioca**

Os amidos, como é o caso da farinha de mandioca e de milho, são em geral muito baratos e compostos por partículas grosseiras que, incorporadas ao Biosilicato<sup>®</sup>, podem gerar poros grandes. Alguns trabalhos na literatura reportam o uso de amidos com a finalidade de se obter hidroxapatita porosa [82, 83, 84].

- **Microesferas de polietileno**

As microesferas de polietileno podem ser encontradas em diversas faixas granulométricas. Trata-se de um candidato interessante, pois há a possibilidade de um melhor empacotamento e um maior controle sobre a distribuição do tamanho de poros gerada nos *scaffolds*. Neste trabalho utilizaram-se as microesferas de polietileno da empresa Polytechno.

- **Negro de fumo**

O negro de fumo é uma forma amorfa do carbono, obtido através da combustão incompleta de produtos do petróleo. É considerado uma das formas

mais puras do carbono, sendo constituído por partículas nanométricas de alta área superficial. Trata-se de um material barato e também pode ser encontrado na forma granulada. O negro de fumo pode ser facilmente removido a altas temperaturas em atmosfera oxidante. O material BP-120 foi gentilmente fornecido pela empresa CABOT.

De forma a garantir que poros maiores do que 200  $\mu\text{m}$  fossem obtidos, o que corresponde ao tamanho mínimo necessário para permitir a vascularização do *scaffold*, optamos pela utilização de partículas entre 300 e 600  $\mu\text{m}$ . Para a separação da faixa granulométrica de interesse, os agentes porogênicos permaneceram em agitador de peneiras elétrico (Bertel) por 30 minutos. Na síntese dos *scaffolds*, utilizou-se o material que ficou retido entre as peneiras de malha 48 e 28 mesh (respectivamente, 300 e 600  $\mu\text{m}$ ). Apenas o naftaleno foi moído em almofariz de ágata anteriormente ao peneiramento.

### **3.13.3. Método da réplica**

Lembramos que o método da réplica consiste na impregnação de uma espuma com uma suspensão contendo partículas cerâmicas, de modo a produzir um material macroporoso exibindo a mesma morfologia do material poroso original. O método da réplica é a técnica mais empregada na produção de materiais cerâmicos macroporosos devido a sua simplicidade e flexibilidade.

Inicialmente foi preparada uma barbotina contendo o Biosilicato<sup>®</sup> em uma concentração de 40% em peso. Como meio líquido, foi utilizado o álcool isopropílico, pois o Biosilicato<sup>®</sup> é atacado quimicamente pela água. Como ligante, utilizou-se o Polivinil Butiral (PVB – B98) em uma concentração de 3% em peso. A barbotina foi preparada em um jarro de ágata contendo 30 bolas de ágata com diâmetro de 10 mm, de maneira similar ao descrito no item 3.13.1. A mistura foi realizada em moinho planetário (Pulverisette 6 – FRITSCH) a uma rotação de 550 rpm por 1h. Em seguida, a espuma de poliuretano foi imersa na barbotina, permanecendo por 30 minutos. Posteriormente, a espuma impregnada foi pressionada entre duas peneiras metálicas, de maneira a remover o excesso da suspensão e evitar a formação de células fechadas. A



secagem da espuma ocorreu à temperatura ambiente, por 12 horas. Este procedimento é similar ao utilizado por Boccaccini et al. [32] na fabricação de *scaffolds* a partir do Bioglass<sup>®</sup>. A espuma de poliuretano foi fornecida pela empresa Tecnopeças, possuindo abertura de células na faixa de 550 - 1150  $\mu\text{m}$ .

### **3.14. Queima dos *scaffolds***

Finalmente, a queima das pastilhas e da espuma impregnada foi realizada em 4 ou 5 estágios, no mesmo forno elétrico mencionado no item 3.6.2.

No primeiro estágio, estas foram aquecidas a uma taxa de aquecimento de 1°C/min até a temperatura ótima (determinada por ATG) para a remoção da espuma de poliuretano ou dos agentes porogênicos, conforme o caso. Em seguida, no segundo estágio, as pastilhas continuaram sendo aquecidas a 1°C/min até a temperatura ótima para a remoção do ligante (temperatura também determinada por ATG).

Para a remoção das microesferas de polietileno e da espuma de poliuretano, foi utilizado um estágio de queima adicional. No terceiro estágio, estas foram aquecidas a 5°C/min até a temperatura de sinterização mais adequada, determinada nos testes de sinterização do Biosilicato<sup>®</sup>. No quarto e último estágio, as pastilhas foram resfriadas com o forno a uma taxa de 5°C/min até a temperatura ambiente, de forma a evitar surgimento de tensões térmicas ou trincas devido ao choque térmico. Os estágios da queima podem ser mais bem visualizados na Figura 3.7.

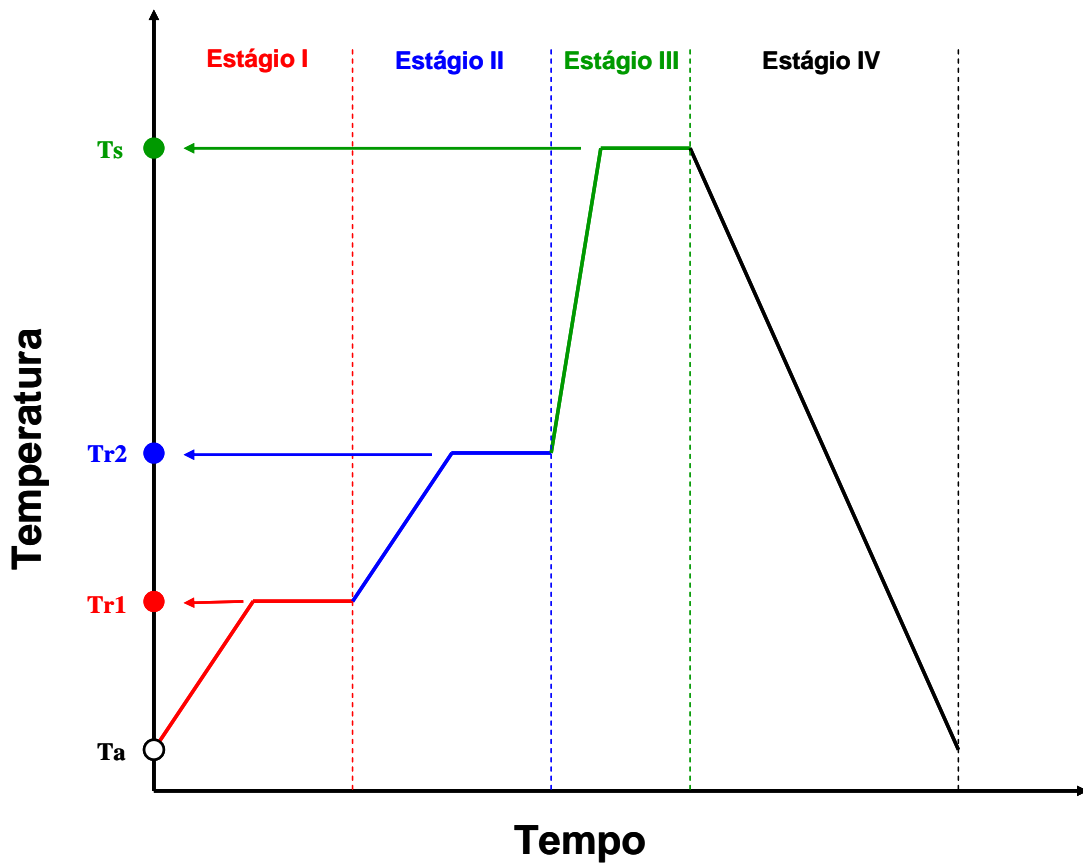


Figura 3.7 - Estágios de queima das pastilhas para a obtenção de *scaffolds* ( $T_a$ : Temperatura ambiente;  $T_{r1}$ : Temperatura de remoção do agente porogênico;  $T_{r2}$ : Temperatura de remoção do ligante ou espuma de PU;  $T_s$ : Temperatura de sinterização do *scaffold*).

### 3.15. Caracterização dos *scaffolds*

#### 3.15.1. Cálculo da porosidade total, da porosidade aparente e da retração linear

A densidade e a porosidade aparente dos *scaffolds* foram determinadas através do método de imersão descrito no item 3.6.3 e utilização das equações 3.1 e 3.2. Os valores obtidos representam a média aritmética de dez amostras para cada tipo de *scaffold*.

Conhecendo-se a densidade aparente do *scaffold* ( $D_{ap}$ ), é possível calcular sua porosidade total ( $P_{TS}$ ) através das equações 3.1 e 3.2:

$$P_{TS} = 100 - (\% Biosilicato_s) \quad 3.4$$

, onde  $\% Biosilicato_s$  é a porcentagem de Biosilicato<sup>®</sup> no *scaffold*.

A porcentagem de Biosilicato<sup>®</sup> é definida como:

$$\% Biosilicato_s = \frac{D_{ApS}}{D_{Bios}} \times 100 \quad 3.5$$

, onde  $D_{ApS}$  é a densidade aparente do *scaffold* e  $D_{Bios}$  é a densidade teórica do Biosilicato<sup>®</sup>.

Como dito anteriormente (item 3.2), quando o Biosilicato<sup>®</sup> é tratado termicamente em temperaturas superiores a 700°C, passa a ser constituído por duas fases cristalinas; assim sendo, a densidade teórica foi estimada utilizando-se o modelo de Voigt para materiais compósitos, que leva em consideração os valores das densidades das duas fases presentes. Este modelo utiliza a seguinte equação:

$$\rho_{compósito} = [\alpha \times \rho_1] + [(1 - \alpha) \times \rho_2] \quad 3.6$$

, onde  $\rho_{compósito}$  é a densidade do material bifásico,  $\alpha$  corresponde à fração volumétrica da fase 1 e,  $\rho_1$  e  $\rho_2$  representam as densidades teóricas das fases 1 e 2.

O modelo de Voigt apresenta uma boa concordância com os resultados experimentais obtidos por Peitl [15], que mediu a densidade de vidros bioativos contendo diferentes frações cristalizadas.

No caso dos *scaffolds* obtidos através do método da réplica, não foi utilizada a equação 3.2, pois o peso úmido ( $P_u$ ) dos *scaffolds* não pode ser determinado com exatidão devido à sua alta porosidade. Assim sendo, a

porosidade total foi determinada pelo método geométrico, medindo-se diretamente a massa e as dimensões dos *scaffolds* e utilizando a equação 3.6.

$$D_{ApS} = \frac{M_S}{V_S} \quad 3.7$$

, onde  $M_S$  e  $V_S$  representam a massa e o volume do *scaffold*, respectivamente.

A retração linear dos *scaffolds* foi calculada através da equação 3.3.

### 3.15.2. Determinação da macroporosidade

A macroporosidade dos *scaffolds* é uma informação importante. Neste trabalho, a macroporosidade representa a porosidade induzida pela adição dos agentes porogênicos. A macroporosidade dos *scaffolds* foi determinada através da análise de imagens da seção transversal dos *scaffolds* embutidos em resina epóxi.

Durante o tratamento das imagens, é obtido o negativo das imagens originais. Neste processo, a região correspondente Biosilicato<sup>®</sup> torna-se preta enquanto que a região correspondente aos poros preenchidos pela resina epóxi torna-se branca (Figura 3.8). O programa de análise de imagens Image-J é então capaz de contar o número de pixels brancos e de pixels pretos, e assim calcular a área ocupada pelos pixels brancos em relação à área total. Desta forma, as regiões brancas correspondem à macroporosidade do *scaffold*.

A média das porcentagens em área é numericamente igual à porcentagem em volume, logo foi possível, a partir de medidas de 10 imagens, ter uma estimativa da macroporosidade para cada tipo de *scaffold*.

Esta metodologia também foi empregada na determinação da quantidade de fase secundária nas amostras de Biosilicato<sup>®</sup> submetidas ao tratamento térmico complementar.

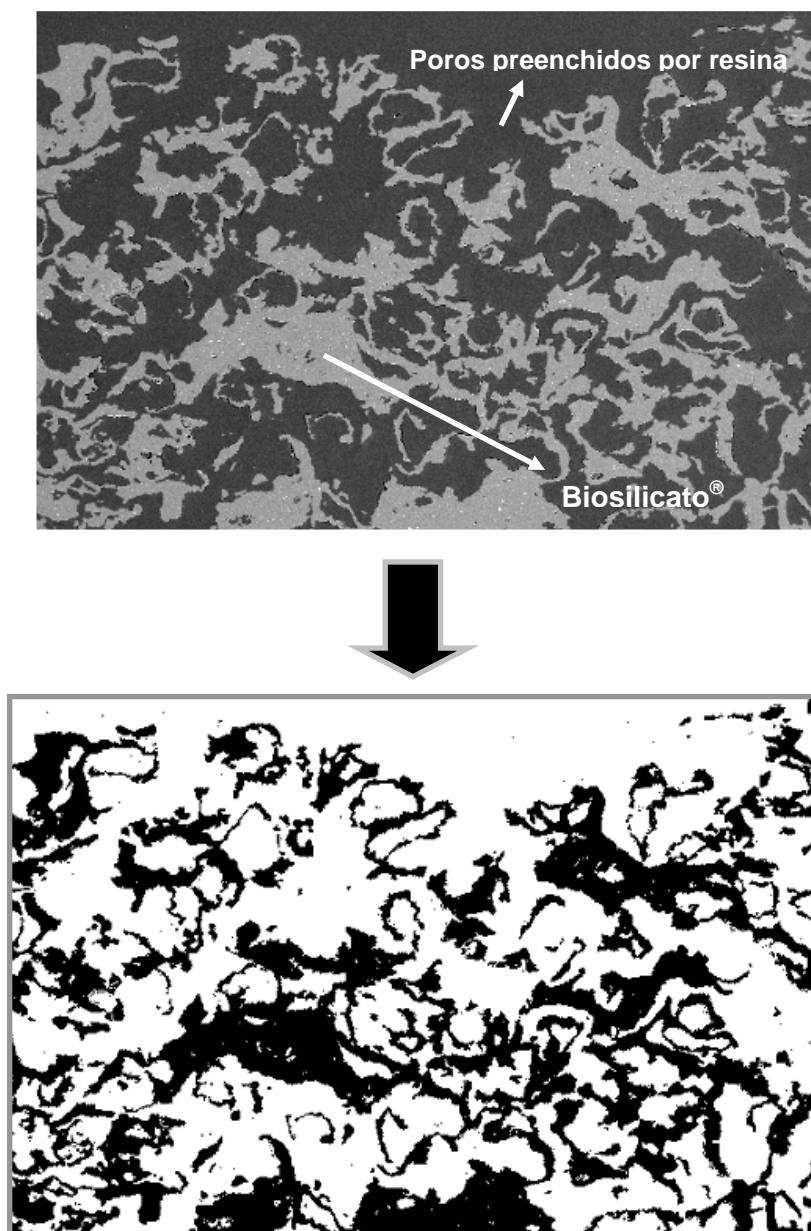


Figura 3.8 - Exemplo de imagem obtido por MEV e tratada no software Image-J para a determinação da macroporosidade do *scaffold*.

### 3.15.3. Determinação do tamanho médio e da distribuição do tamanho dos poros

Para a avaliação da distribuição do tamanho de poros e do tamanho médio de poros em materiais cerâmicos porosos, normalmente utiliza-se a

técnica de porosimetria de mercúrio. Porém, por esta técnica só é possível medir com precisão poros com diâmetro médio abaixo de 200  $\mu\text{m}$ , que estão fora da faixa considerada de interesse.

Quando o material cerâmico possui uma estrutura celular, ao invés do “tamanho médio de poros”, mede-se a “abertura média das células”, diretamente a partir das imagens da superfície de fratura do material.

No caso dos *scaffolds* deste trabalho, como será visto adiante, a estrutura obtida é altamente porosa, mas não apresenta uma estrutura celular. A medida direta do tamanho dos poros também não é possível, uma vez que a estrutura dos *scaffolds* não é formada por poros individualizados, mas sim por uma rede de canais interconectados.

O conceito de “comprimento de intercepto médio” ( $L_M$ ) é muitas vezes utilizado em microscopia ótica para caracterizar fases interconectadas [85-86].

Neste caso, a imagem da secção transversal do material é sobreposta por uma malha de linhas. Para a obtenção de um resultado mais representativo, a orientação da rede de linhas deve ser aleatória. O número de vezes que as linhas interceptam a fase de interesse é usado juntamente com a fração volumétrica para calcular o comprimento de intercepto médio. Desta forma, o comprimento de intercepto médio ( $L_M$ ) pode ser calculado através de uma equação do tipo:

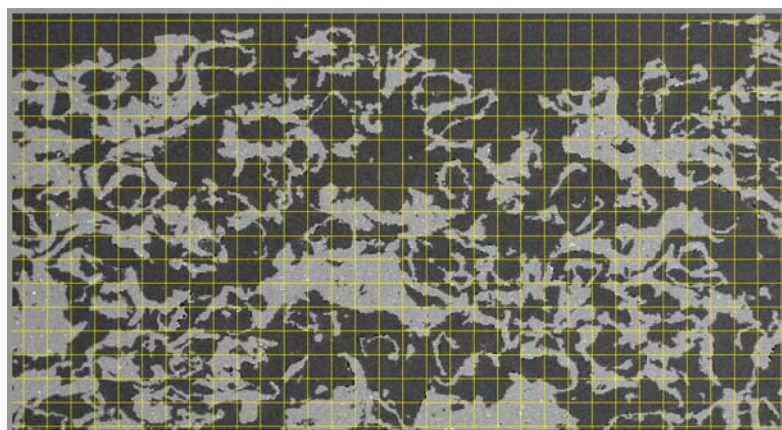
$$L_M = \frac{V \times \frac{L_T}{M}}{N_i}$$

, onde  $V$  representa a porcentagem volumétrica da fase em questão,  $L_T$  é o comprimento total das linhas,  $M$  é o aumento utilizado e  $N_i$  o número de interceptos. No entanto, através desta metodologia, é possível calcular apenas o comprimento de intercepto médio, não sendo possível ter idéia da distribuição de tamanhos, informação muito importante no caso dos *scaffolds*.

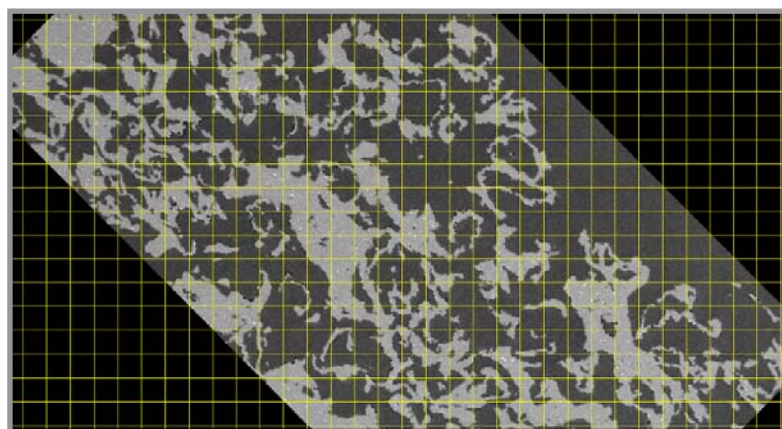
Desta forma, para a determinação da abertura média ( $\lambda_{\text{med}}$ ) e da distribuição da abertura dos canais interconectados, propomos aqui uma metodologia que utiliza um conceito correlato. A imagem da secção transversal

do *scaffold* foi, neste caso, também sobreposta por uma rede de linhas horizontais e verticais, com o auxílio do software Image-J (Figura 3.9). Sobre cada uma destas linhas é possível medir diretamente a abertura dos canais interconectados, tanto horizontalmente quanto verticalmente. Em seguida a imagem é girada em  $45^\circ$  e novamente sobreposta por uma rede de linhas verticais e horizontais; de maneira a garantir a aleatoriedade das medidas. Este procedimento foi repetido para dez imagens de cada tipo de *scaffold*.

Os dados plotados em um gráfico fornecem uma distribuição da abertura dos canais, a partir da qual é possível obter a abertura média dos canais.



(a)



(b)

Figura 3.9 - Sobreposição da imagem a  $0^\circ$  (a) e a  $45^\circ$  (b) da seção transversal do *scaffold* por rede de linhas.

### 3.16. Queima dos agentes porogênicos e obtenção de resíduo

Com a finalidade de observar se os agentes porogênicos e a espuma de poliuretano utilizados geram resíduos inorgânicos após a queima dos *scaffolds*, estes foram submetidos ao mesmo procedimento de queima para a obtenção dos *scaffolds*, conforme descrito no item 3.13. Para isto, foram utilizados cadinhos de ZAS (zircônia-alumina-sílica) e um forno mufla (EDG 1800 3P-S). A queima foi realizada dentro da mufla. Mediu-se a massa dos agentes porogênicos antes e após a queima, para a determinação da perda ao fogo (PF) através da equação 3.7:

$$PF(\%) = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad 3.7$$

, onde  $M_i$  é a massa inicial do agente porogênico e  $M_f$  é a massa do resíduo obtido após a queima.

Os resíduos obtidos foram observados por microscopia eletrônica de varredura e analisados por espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

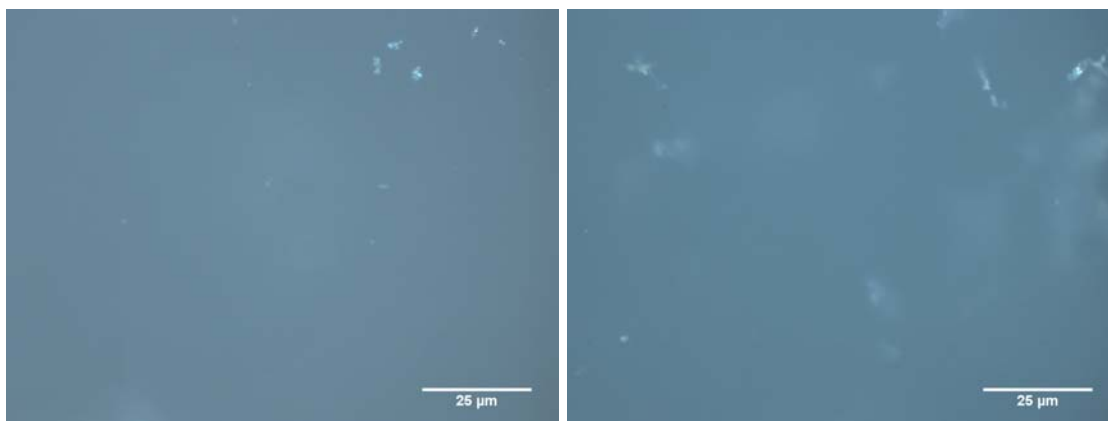


## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise da fase secundária

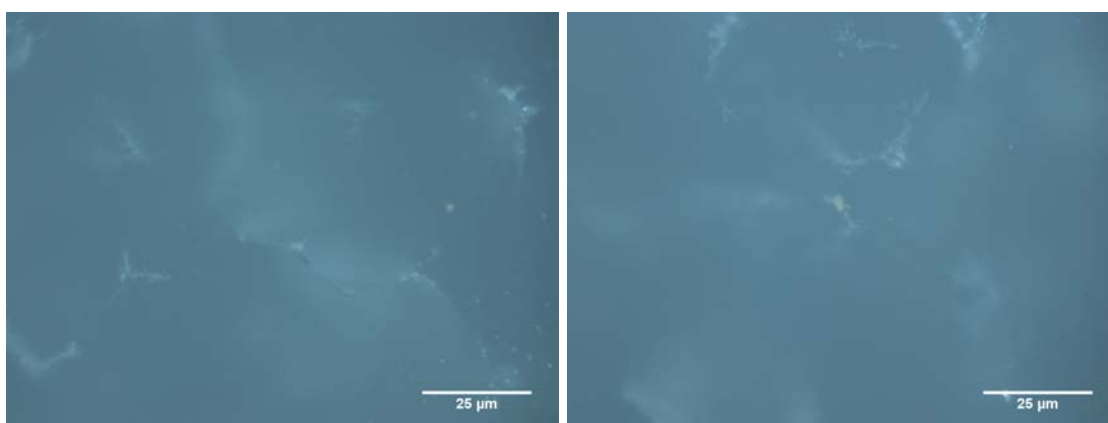
#### 4.1.1. Microscopia ótica

Com o objetivo de observar a fase secundária, amostras de Biosilicato<sup>®</sup> foram submetidas a tratamentos térmicos complementares e preparadas conforme descrito no item 3.10. As imagens da Figura 4.1, obtidas por microscopia ótica com luz refletida e filtro de luz polarizada a 90° (ou 270°), mostram a evolução do aparecimento da fase secundária, que pode ser observada graças a sua birrefringência:



(a)

(b)



(c)

(d)

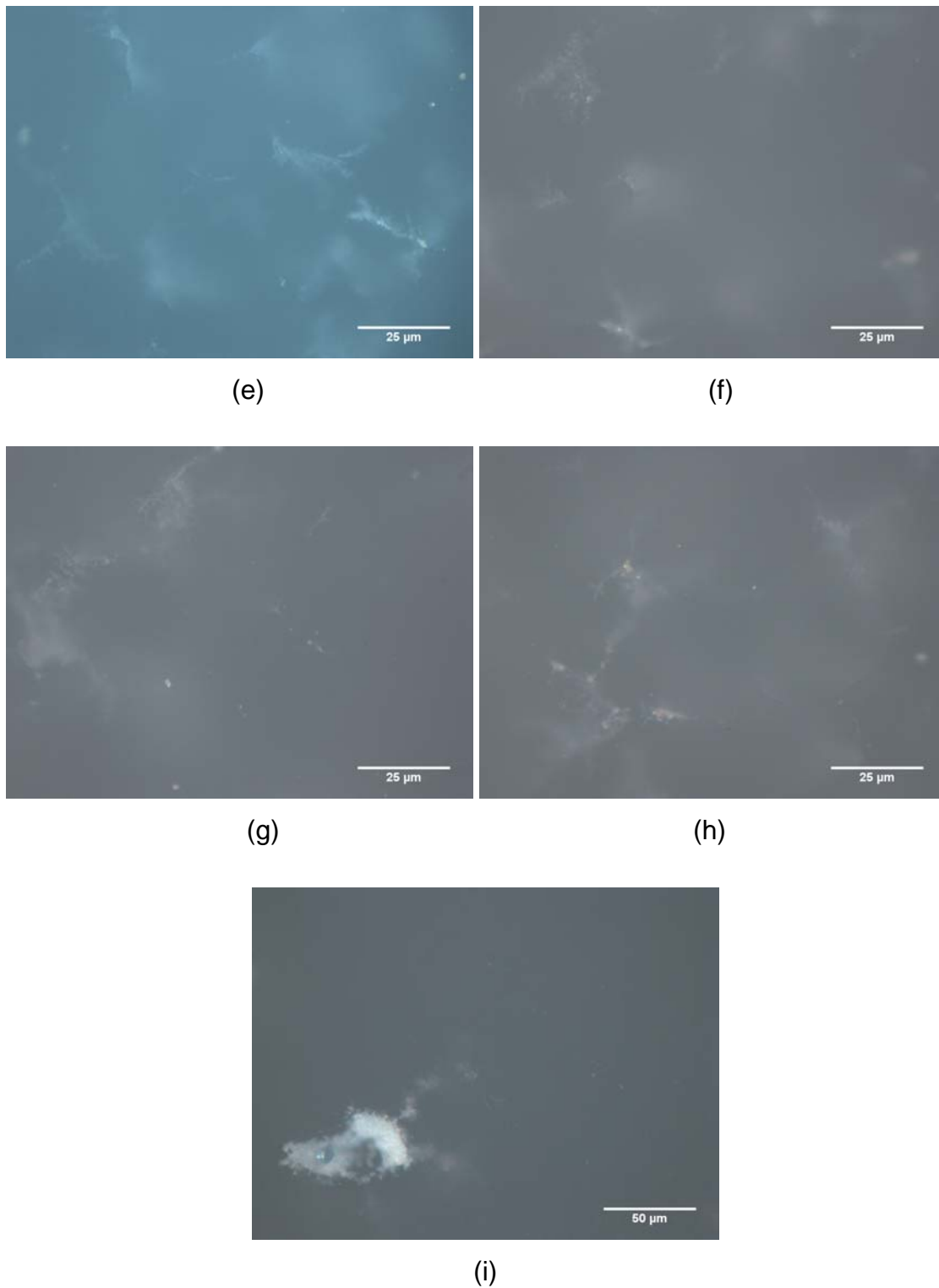


Figura 4.1 - Amostras de Biosilicato<sup>®</sup> contendo a fase secundária tratadas a: a) 900°C/1min; b) 900°C/5min; c) 900°C/10min; d) 900°C/15min; e) 900°C/20min; f) 900°C/30min; g) 900°C/60min; h) 900°C/120min; i) 900°C/5760min (96h).

A Figura 4.1 de (a) a (i), mostram que a fase secundária surge nos contornos de grão da fase majoritária. A fase secundária apresenta uma morfologia dendrítica, como pode ser observado com mais detalhes na Figura 4.2:



Figura 4.2 - Crescimento dendrítico da fase secundária no Biosilicato<sup>®</sup>.



Figura 4.3 - Exemplo de imagem da amostra tratada a 900°C/20min, e a mesma imagem após o tratamento no software Image-J.

Através do mesmo método empregado na determinação da macroporosidade dos *scaffolds*, descrito no item 3.15.2, foi possível determinar a percentagem ocupada pela fase secundária a partir de imagens das amostras tratadas a 900°C. Este procedimento é novamente exemplificado na Figura 4.3.

Durante o tratamento das imagens, foi obtido o negativo das mesmas imagens. Neste processo, a região correspondente à fase secundária torna-se preta enquanto a região correspondente à fase majoritária torna-se branca. Desta forma, a área ocupada pelas regiões negras em relação à área total, corresponde à fração cristalizada superficial da fase secundária. A partir de medidas de 30 imagens por amostra, foi possível estimar a quantidade de fase secundária existente no volume de cada amostra.

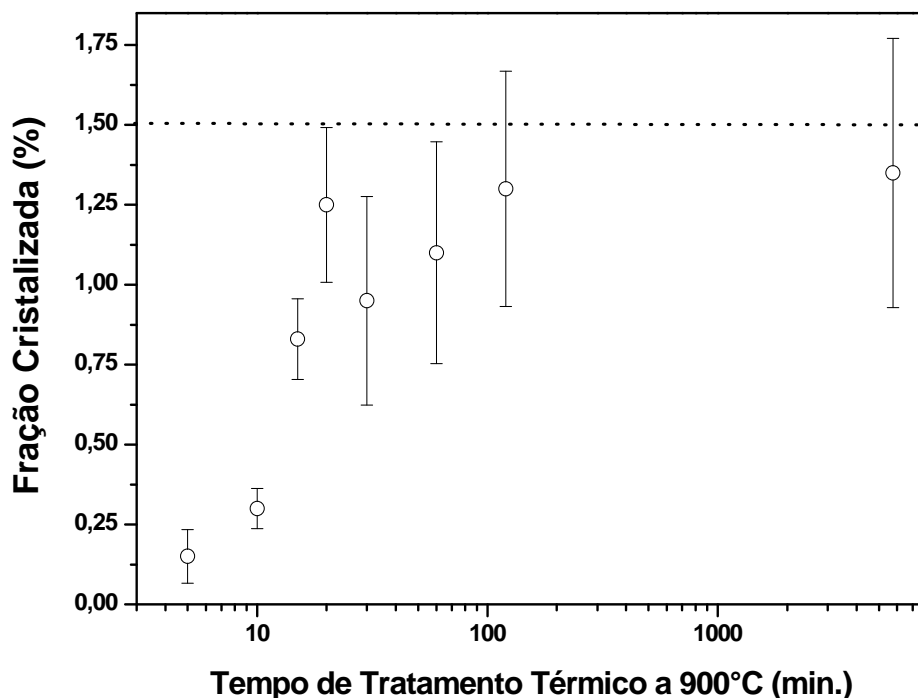


Figura 4.4 - Percentagem de fase secundária no volume da amostra em função do tempo de tratamento para a temperatura de 900°C.

É possível notar (Figura 4.4) que a fração cristalizada da fase secundária inicialmente aumenta com o tempo de tratamento térmico a 900°C, permanecendo praticamente constante para tratamentos térmicos mais longos. A quantidade de fase secundária presente no volume das amostras analisadas

é pequena, sendo menor do que 1,5% (representado pela linha tracejada na Figura 4.4). As barras de erro correspondem ao desvio padrão de 30 imagens.

#### 4.1.2. Microscopia eletrônica de varredura

Para confirmar a presença da fase secundária nos contornos de grão da fase majoritária, as mesmas amostras analisadas por microscopia ótica foram também analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

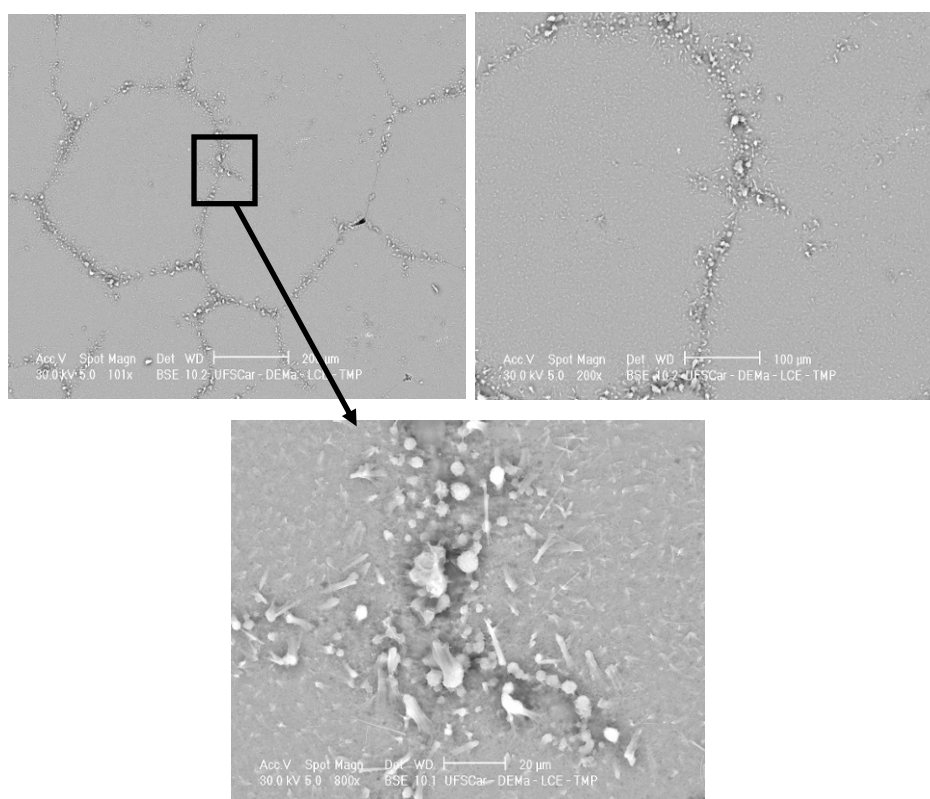
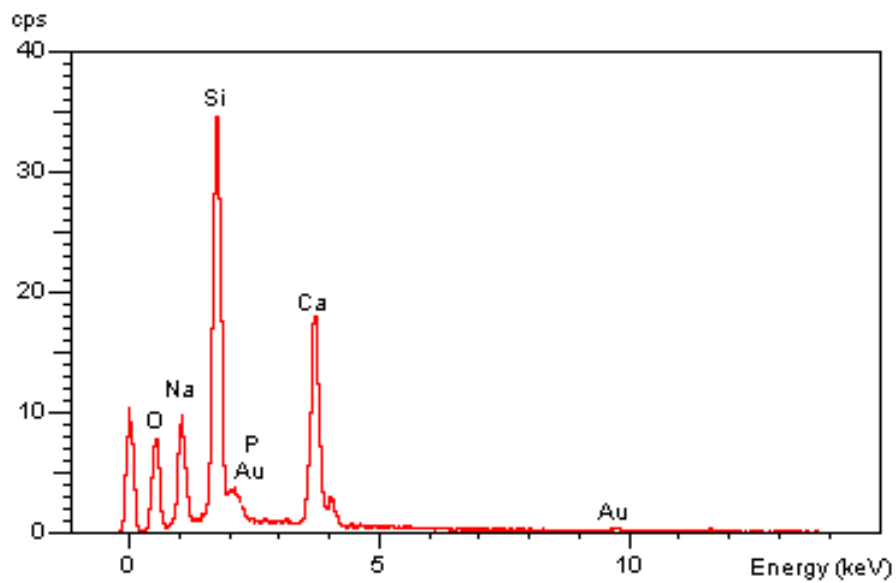
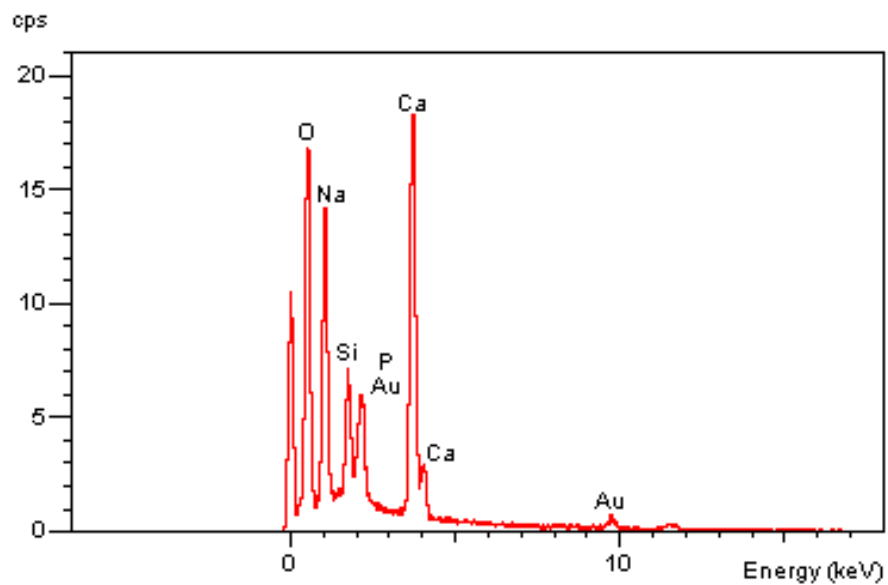


Figura 4.5 - Micrografias obtidas por MEV de amostra do Biosilicato<sup>®</sup> tratada a 900°C por 3h revelando a fase secundária na região intergranular.

A Figura 4.5 confirma a presença da fase secundária nos contornos de grão da fase majoritária em uma amostra tratada a 900°C por 3h. Para detectar diferenças composicionais, as regiões intragranulares e intergranulares foram analisadas por espectroscopia de energia dispersiva (EDS).



(a)



(b)

Figura 4.6 - Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) da região intragranular (a) e intergranular (b).

É importante notar que as regiões intragranulares e intergranulares (Figura 4.6) apresentam diferenças composicionais marcantes nas

concentrações de sódio (Na), cálcio (Ca), silício (Si) e de oxigênio (O), como pode ser observado pelas mudanças nas intensidades dos picos. A fase majoritária é rica em Na, Ca, O e Si, como já previsto. A fase secundária, por sua vez, possui menos Si e é rica em Ca, Na e O. A análise do P foi prejudicada pela presença do recobrimento de Au.

#### 4.1.3. Difração de raios-X

Para a identificação da fase secundária, a amostra de Biosilicato<sup>®</sup> tratada a 900°C por 3h foi analisada por difração de raios-X (Figura 4.7).

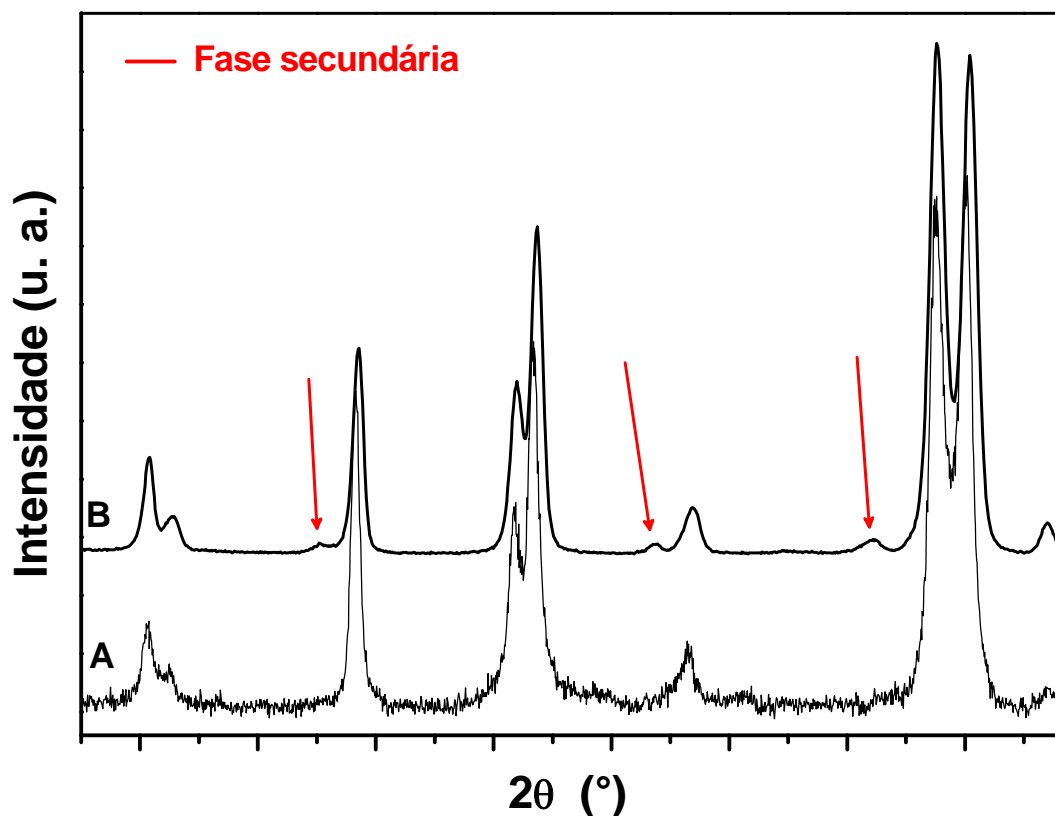


Figura 4.7 - Difratograma do Biosilicato<sup>®</sup> contendo fase secundária em dois equipamentos diferentes A (sem anodo rotativo) e B (com anodo rotativo). Por motivos de segredo industrial, os valores de  $2\theta$  foram omitidos.

É possível notar que os picos referentes à fase secundária, exatamente por serem pouco intensos, se confundem ao ruído, no difratograma A (Figura 4.7), e só são observados em equipamentos cuja razão sinal/ruído é razoavelmente alta, daí a dificuldade em se observar esses picos por difração de raios-X.

Utilizando-se um difratômetro de raios-X com anodo rotativo, foi possível observar três picos relativos à fase secundária (difratograma B). Pela identificação destes picos é possível sugerir uma composição, para a fase secundária. Esta composição, no entanto, não será revelada nesta dissertação, por motivo de segredo industrial. Assim sendo, os valores de  $2\theta$  também foram omitidos na figura 4.7.

#### **4.1.4. Influência da fase secundária na bioatividade do Biosilicato<sup>®</sup>**

Os testes de bioatividade foram realizados e a cristalização de hidroxicarbonato apatita (HCA) na superfície das amostras foi acompanhada por FTIR, onde os picos de maior interesse são os de  $560$  e  $602\text{ cm}^{-1}$ , que correspondem à formação da HCA. Os testes foram realizados para tempos de exposição ao SBF variando de 1 a 48h.

Os espectros de FTIR (Figura 4.8) mostram a evolução das reações superficiais em função do tempo de exposição ao SBF que ocorreram no Bioglass - 45S5 (a), no Biosilicato<sup>®</sup> (b) e no Biosilicato<sup>®</sup> contendo a fase secundária (c). Como pode ser observado, a seqüência de transformações superficiais é a mesma para os três materiais; a diferença reside apenas na cinética com que estas reações ocorrem. Esta seqüência segue os principais estágios (III-V) para a formação da HCA propostos por Hench [13, 58] e comprovados por Peitl et al. [63]. Esta seqüência de reações foi detalhada no item 2.4.

O modo vibracional natural das superfícies não reagidas (0h de exposição ao SBF) é alterado em função do tempo de exposição à solução de SBF (Figura 4.8). Após 1h, uma camada rica em sílica gel começa a ser formada no Bioglass (correspondente ao estágio III) e uma camada rica em fosfato de



cálcio ( $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ ) amorfo começa a precipitar (correspondente ao estágio IV). O mesmo processo também ocorre após 1h para o Biosilicato<sup>®</sup> (b) e para o Biosilicato<sup>®</sup> contendo a fase secundária (c). A existência da camada rica em  $\text{SiO}_2$  é confirmada pelo duplo pico de estiramento da ligação Si-O-Si a 1250 e  $1095\text{ cm}^{-1}$ , assim como o estreitamento do pico correspondente à ligação Si-O-Si a  $470\text{ cm}^{-1}$ . O pico da ligação Si-O presente no espectro dos materiais não reagidos, desaparece devido ao processo de repolimerização (estagio III).

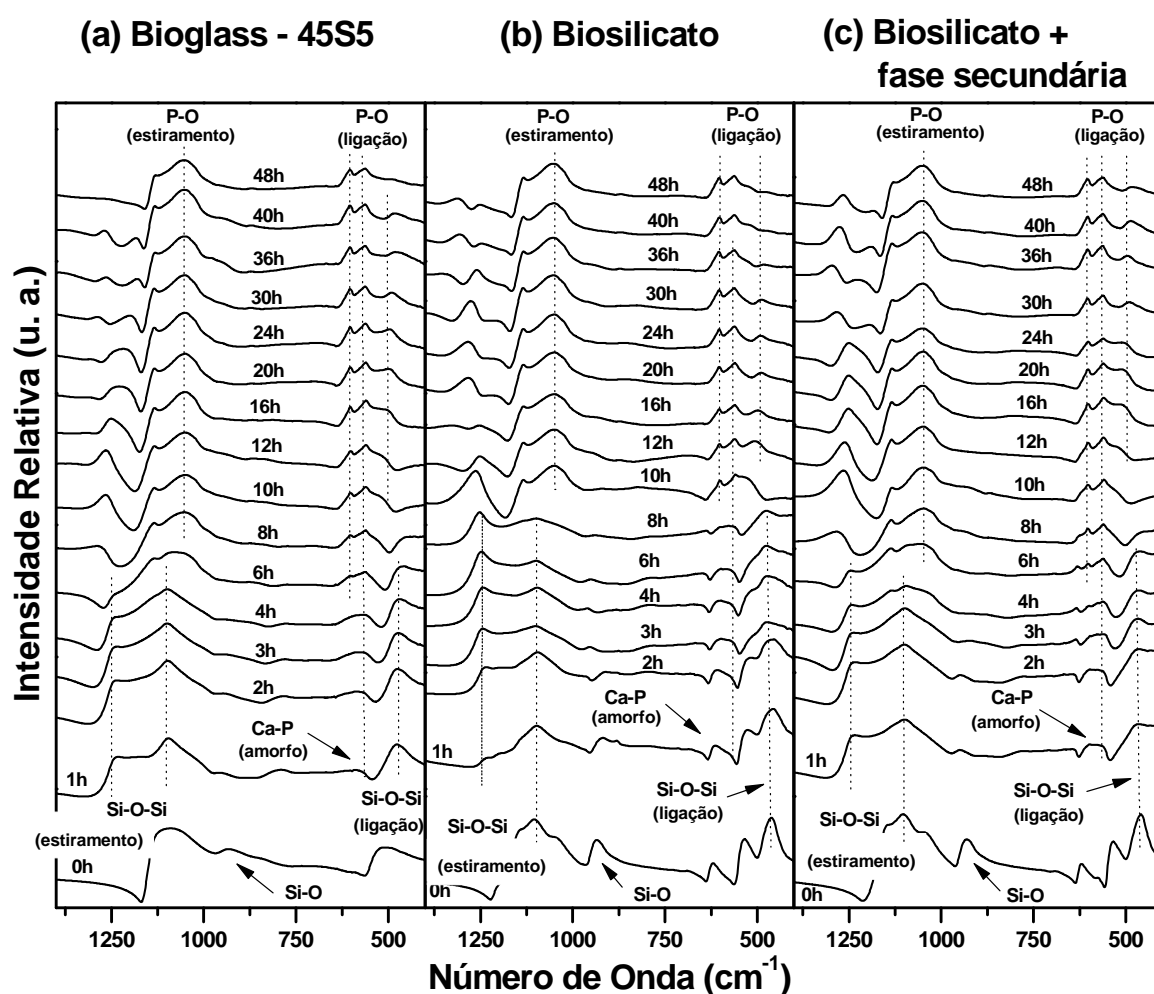


Figura 4.8 - Espectroscopia de Infravermelho para amostras de (a) Bioglass 45S5, (b) Biosilicato<sup>®</sup> e (c) Biosilicato<sup>®</sup> contendo a fase secundária, expostas à solução de SBF durante períodos variando entre 1h e 48h.

A formação de um filme rico em fosfato de cálcio amorfo pode ser observada por um pico largo a  $560\text{ cm}^{-1}$ . Este pico se torna mais definido conforme o tempo de reação aumenta, sendo posteriormente dividido em dois modos, a  $602$  e  $560\text{ cm}^{-1}$ , que são característicos da HCA. A divisão em dois picos indica que o fosfato de cálcio amorfo está começando a cristalizar, formando a HCA. Simultaneamente, a formação da HCA cristalina na superfície das amostras produz um pico relativo ao estiramento da ligação P-O a  $1050\text{ cm}^{-1}$ .

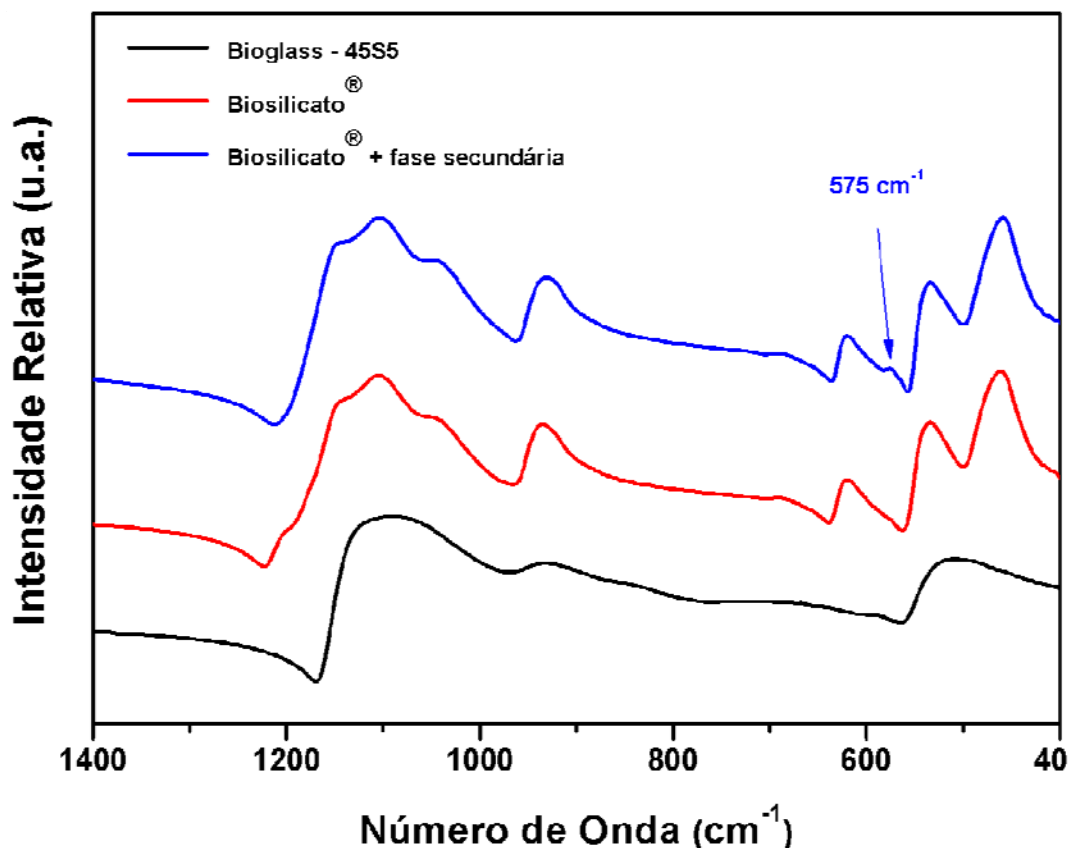


Figura 4.9 - Espectros de FTIR ampliados para o Bioglass, Biosilicato® e Biosilicato® contendo a fase secundária, sem exposição ao SBF-K9.

Conforme a camada cristalina de fosfato de cálcio cresce, os picos duplos referentes à ligação P-O ( $560$  e  $602\text{ cm}^{-1}$ ) e ao estiramento da ligação P-O ( $1050\text{ cm}^{-1}$ ) se tornam mais agudos e passam a “dominar” o espectro. Os picos atribuídos à camada rica em sílica são gradualmente cobertos até desaparecer, em 8h para o Bioglass, em 16h para o Biosilicato® e em 8h para o Biosilicato®.

contendo a fase secundária. Em seguida, surge um terceiro pico referente à ligação P-O a  $490\text{ cm}^{-1}$ , caracterizando uma camada bem cristalizada de HCA. Este terceiro pico surge após 10h para o Bioglass e 12h para o Biosilicato<sup>®</sup> (contendo ou não a fase secundária). Após esse tempo, os espectros de FTIR mostram apenas picos atribuídos à HCA cristalina.

Como pode ser observado em detalhe na Figura 4.9, a única diferença que pode ser notada entre os espectros do Biosilicato<sup>®</sup> contendo ou não a fase secundária (ambos sem exposição ao SBF) é a presença de um “ombro” a  $575\text{ cm}^{-1}$ , que posteriormente desaparece com apenas 1h de exposição ao SBF.

Como dito anteriormente, quando a HCA começa a se cristalizar a partir do fosfato de cálcio amorfo, ocorre o estreitamento do pico largo a  $590\text{ cm}^{-1}$  e um novo pico surge a  $602\text{ cm}^{-1}$ . Desta forma, podemos considerar o tempo para o surgimento deste pico a  $602\text{ cm}^{-1}$  como sendo o tempo necessário para o início da formação da HCA [63]. Através da Figura 4.10, podemos concluir que o início da formação de HCA se dá após 6h de exposição ao SBF no caso do Bioglass, 10h para o Biosilicato<sup>®</sup> e de apenas 4h para o Biosilicato<sup>®</sup> contendo a fase secundária.

Com base nestes resultados pode-se afirmar que o Biosilicato<sup>®</sup> contendo a fase secundária é mais bioativo que o Biosilicato<sup>®</sup> sem a fase secundária, pois o aparecimento da HCA ocorre em tempos menores nas mesmas condições. Desta forma, o nível de bioatividade do Biosilicato<sup>®</sup> seria comparável ao do Bioglass - 45S5, que possui o maior nível de bioatividade dentre os materiais conhecidos atualmente. Este resultado mostra-se surpreendente quando consideramos que a fase secundária está presente em pequena quantidade ( $\alpha < 1,5\%$ ).

Uma possível explicação para o aumento da bioatividade seria que a fase secundária é mais solúvel e os íons P são liberados na solução de forma mais rápida, criando um “micro-ambiente” favorável à nucleação e crescimento da HCA; isso quer dizer que as etapas IV e V da reação de formação da HCA ocorrem localmente de forma mais rápida.

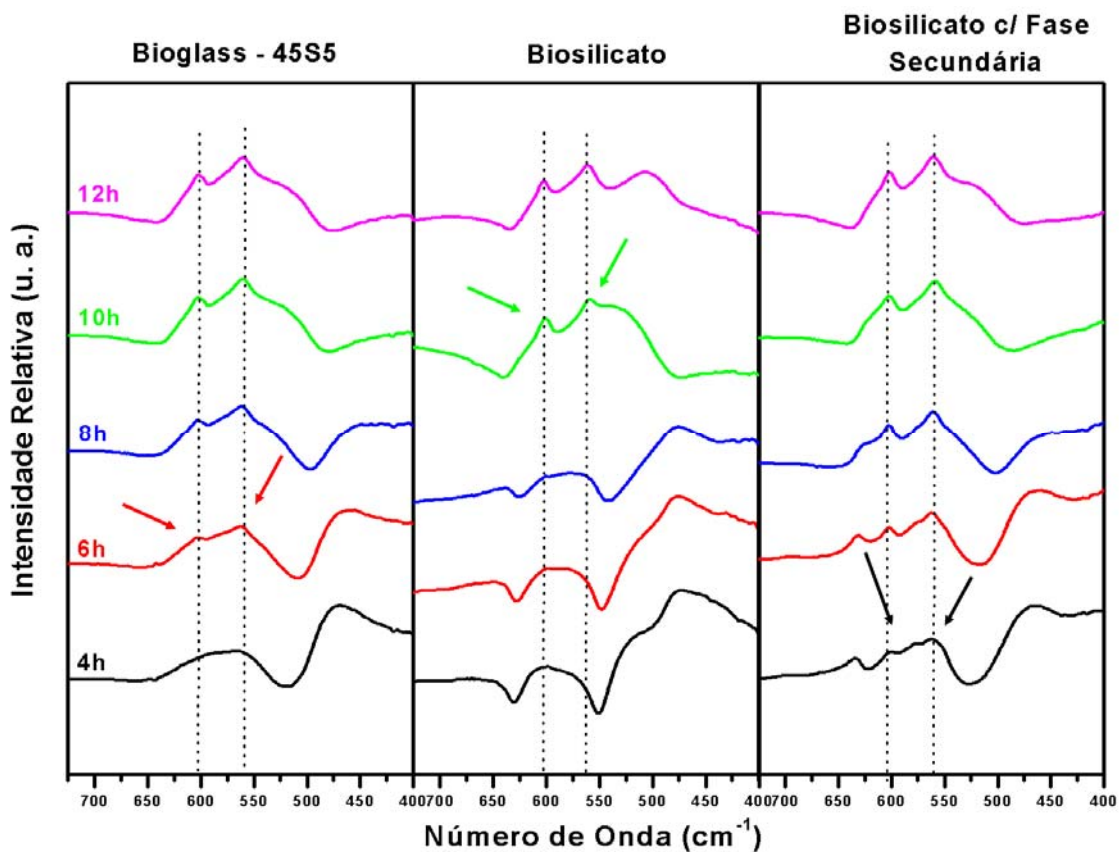


Figura 4.10 - Espectros de FTIR para o Bioglass, Biosilicato<sup>®</sup> e para o Biosilicato<sup>®</sup> contendo a fase secundária, para tempos de exposição ao SBF variando de 4 a 12h.

#### 4.2. Estimava da densidade teórica do Biosilicato<sup>®</sup> contendo a fase secundária

Conhecendo-se as duas fases cristalinas presentes, suas respectivas densidades teóricas e quantidades relativas, é possível estimar a densidade do Biosilicato<sup>®</sup> através do modelo de Voigt para compósitos. Assim, no caso do Biosilicato<sup>®</sup>, podemos reescrever a equação 3.6:

$$\rho_{\text{Biosilicato}} = (\alpha_{\text{Fase1}} \times \rho_{\text{Fase1}}) + (\alpha_{\text{Fase2}} \times \rho_{\text{Fase2}}) \quad 4.2$$

De acordo com a base de dados WebMineral [87], a densidade teórica da fase primária é 2,81 g/cm<sup>3</sup>, enquanto que a densidade teórica da fase secundária é 3,26 g/cm<sup>3</sup>.

Como pode ser observado na figura 4.4, para um tratamento térmico de 3h a 900°C, o Biosilicato® passa a ser constituído de aproximadamente 1,3% em volume da fase secundária, sendo o restante representado pela fase primária. Assim sendo, é possível estimar a densidade teórica do Biosilicato® através da equação 4.2:

$$\rho_{\text{Biosilicato}} = (0,987 \times 2,81) + (0,013 \times 3,26) = 2,816 \text{ g / cm}^3$$

O valor obtido para a densidade teórica do Biosilicato® (2,816 g/cm<sup>3</sup>) foi utilizado posteriormente na equação 3.5 para o cálculo da porosidade total dos *scaffolds* (item 4.5).

#### 4.3. Distribuição do tamanho de partículas do Biosilicato®

A distribuição de tamanho de partículas do Biosilicato® moído (conforme procedimento descrito no item 3.6.1) foi obtida em analisador de partículas (Horiba LA-930).

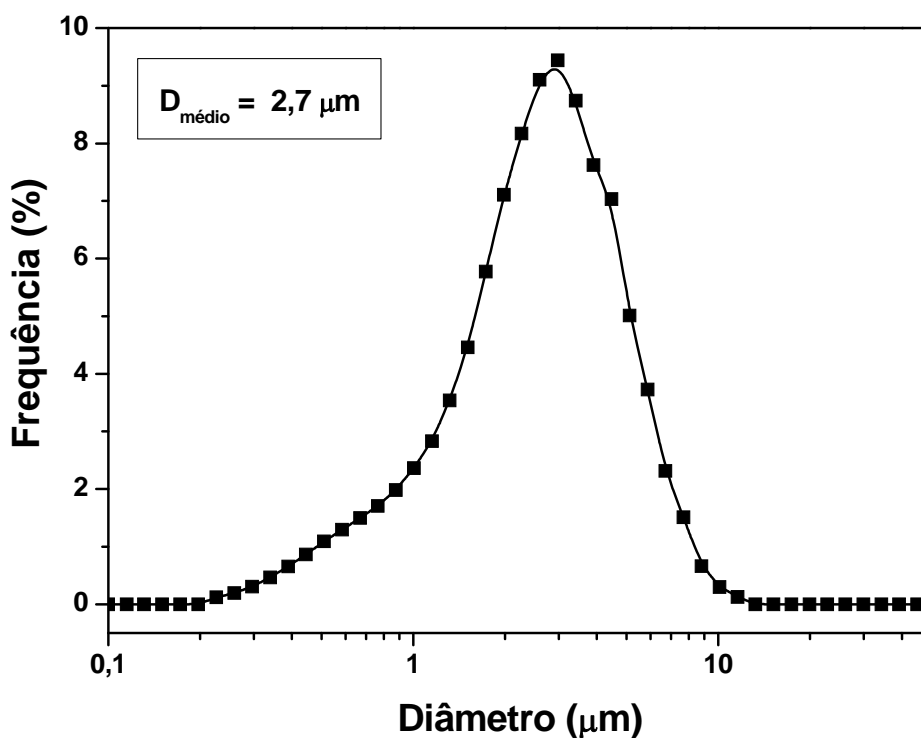


Figura 4.11 - Distribuição do tamanho de partículas do Biosilicato® após processo de moagem.

As partículas de Biosilicato<sup>®</sup> possuem uma distribuição larga (Figura 4.11), variando entre 0,2 e 12  $\mu\text{m}$ , com tamanho médio de partículas de 2,7  $\mu\text{m}$ . Este pó foi utilizado na confecção de amostras para os testes de sinterização e na fabricação de *scaffolds*.

#### 4.4. Testes de sinterização

Os testes de sinterização foram realizados para temperaturas entre 800° e 1100°C com a finalidade de se determinar as melhores condições de sinterização do Biosilicato<sup>®</sup>, ou seja, o compromisso entre temperatura e tempo que proporcionam uma densificação rápida e eficiente.

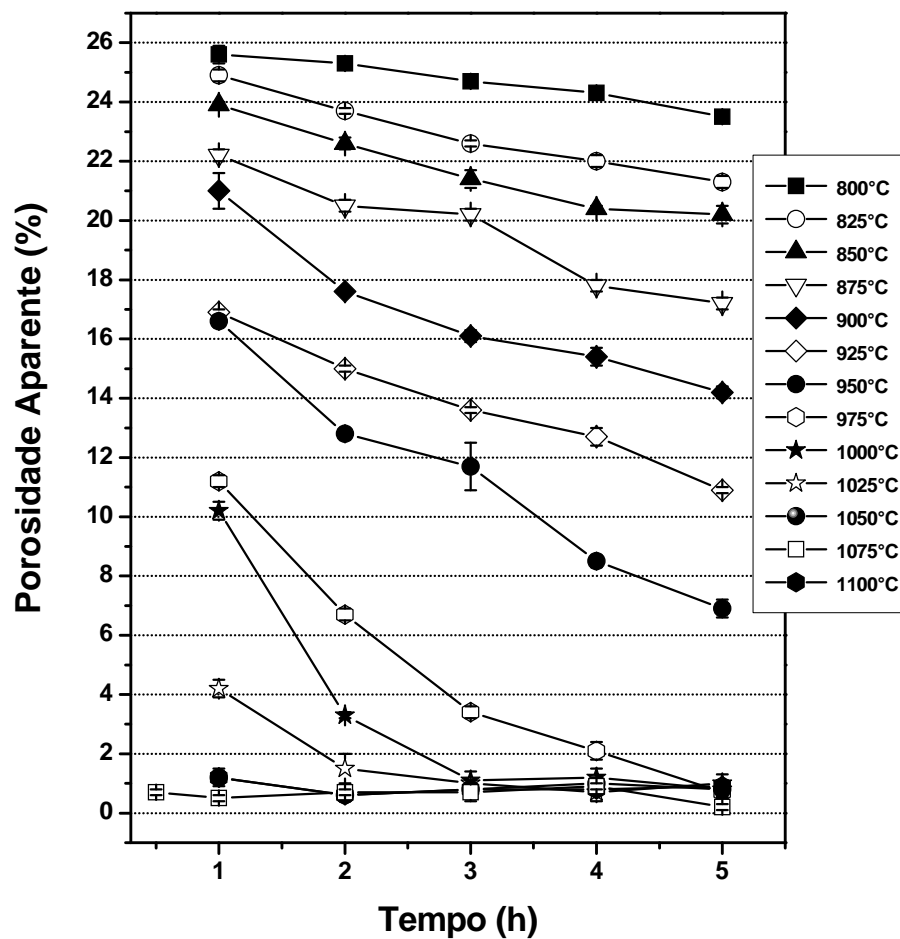


Figura 4.12 - Porosidade aparente (Pap) em função do tempo de tratamento térmico, para temperaturas variando entre 800 e 1100°C.

Para estes testes utilizaram-se as amostras prensadas conforme descrito no item 3.6.1, que possuíam densidade a verde de aproximadamente  $1,99 \pm 0,06 \text{ g/cm}^3$ . Foram calculadas a porosidade aparente (Pap), a densidade aparente (Dap), a retração linear axial (RLA) e a retração linear diametral (RLD), conforme descrito em materiais e métodos (item 3.6.3).

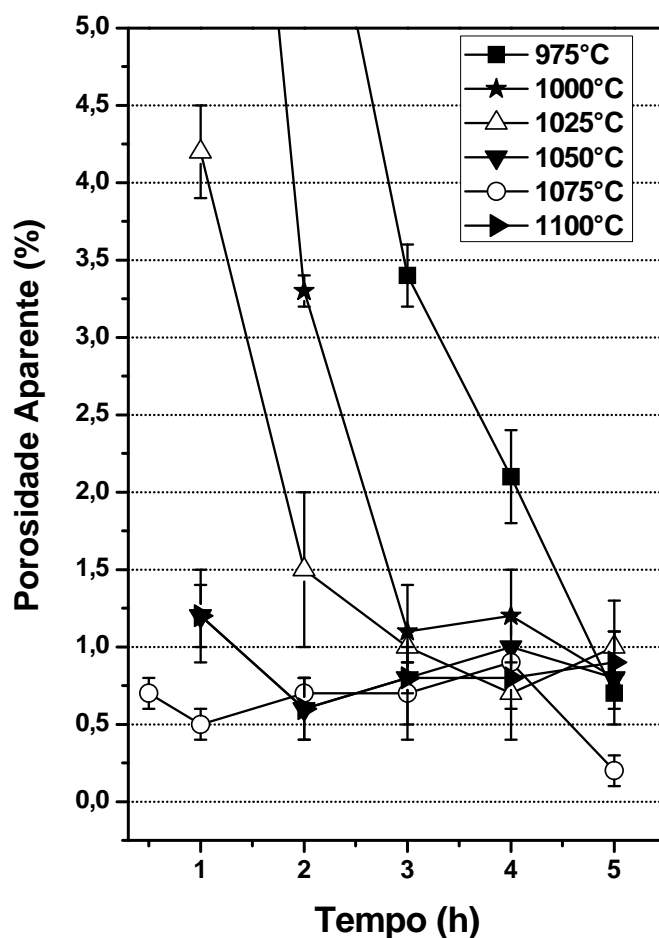


Figura 4.13 - Porosidade aparente (Pap) em função do tempo de permanência, para temperaturas variando entre 975 e 1100°C.

Cada ponto do gráfico (Figura 4.12) representa a média aritmética de três medidas, realizadas em três amostras diferentes de Biosilicato<sup>®</sup> sinterizado. Estes valores foram obtidos utilizando-se a equação 3.1. As barras de erro correspondem ao desvio padrão destas três medidas. Como pode ser observado, a faixa de temperatura de interesse reside entre 975 e 1100°C, onde uma porosidade aparente menor do que 2% pode ser alcançada. O

comportamento da porosidade aparente para esta faixa de temperatura pode ser mais bem visualizado na Figura 4.13.

Observa-se que com apenas 1h de permanência nas temperaturas de 1050, 1075 e 1100°C, é possível obter uma porosidade aparente menor do que 1,5% (Figura 4.13). Para se obter valores de porosidade abaixo de 1,5% nas temperaturas de 1025, 1000 e 975°C, por sua vez, são necessários tempos de permanência de 2h, 3h e 5h, respectivamente. Para a faixa de temperatura em questão (1000 - 1100°C), os valores de porosidade aparente obtidos após um tempo de permanência de 3h são muito próximos. A leitura em conjunto destes resultados indica que a temperatura ótima de sinterização está na faixa de 1050 a 1100°C.

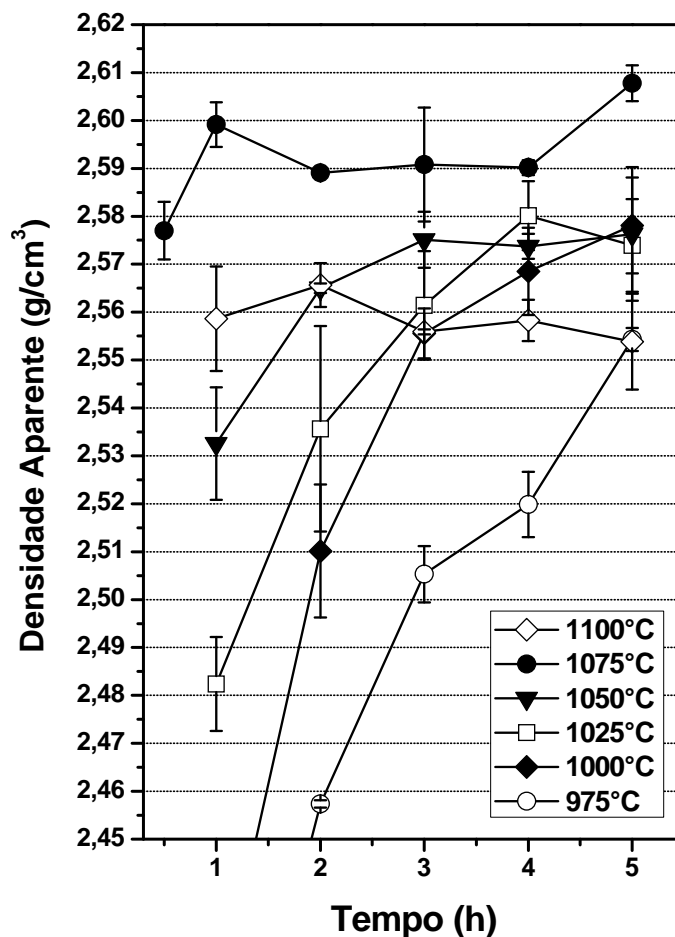


Figura 4.14 - Densidade aparente (Dap) em função do tempo de permanência, para temperaturas variando entre 975 e 1100°C.



Utilizando a equação 3.2, foi possível calcular a densidade aparente das amostras sinterizadas. O cálculo foi realizado para a faixa de interesse (975 – 1100°C); os resultados são apresentados na Figura 4.14.

O maior valor de densidade aparente foi obtido para a temperatura de 1075°C (Figura 4.14). Mesmo com o aumento do tempo de permanência a esta temperatura, a densidade aparente não apresentou aumento substancial, residindo em torno de 2,59 g/cm<sup>3</sup>.

A retração linear axial das amostras sinterizadas também foi medida, e os resultados apresentados na Figura 4.15:

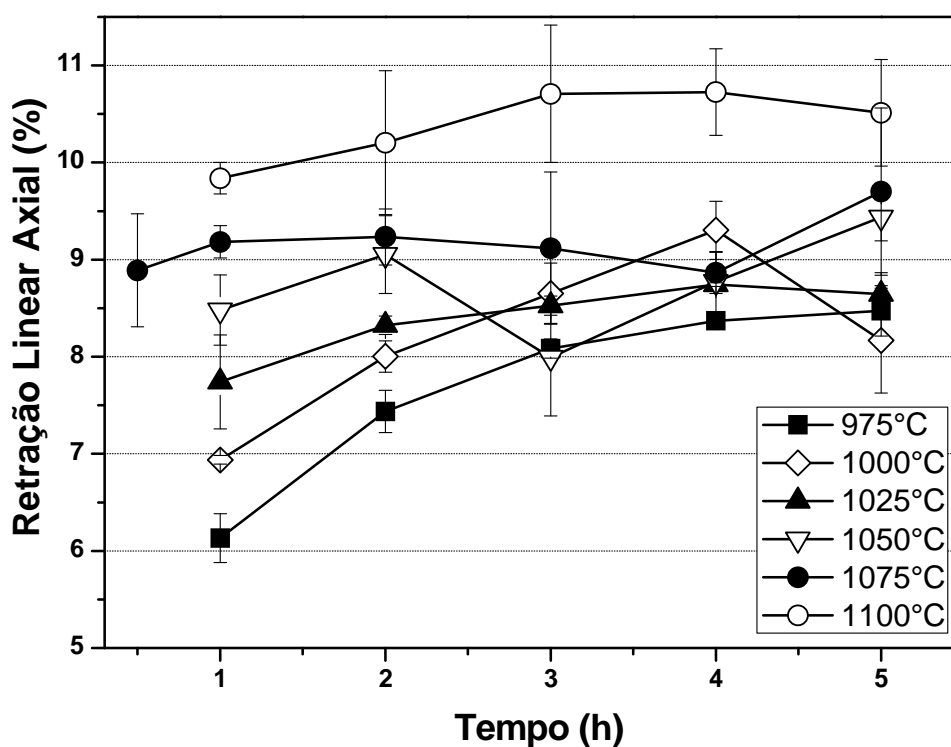


Figura 4.15 - Retração linear axial em função do tempo de permanência, para temperaturas variando entre 975 e 1100°C.

Neste caso, a maior retração linear (~10,7%) foi obtida para a temperatura de 1100°C. Da mesma forma, foi possível medir a retração linear diametral, como pode ser observado na Figura 4.16:

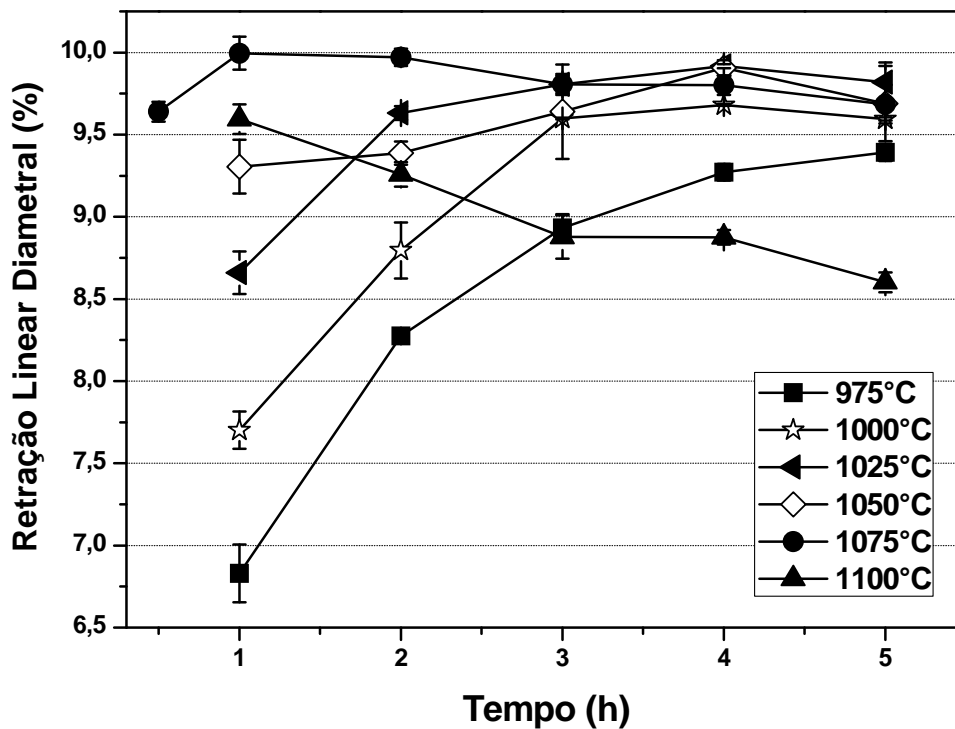


Figura 4.16 - Retração linear diametral em função do tempo de permanência, para temperaturas variando entre 975 e 1100°C.

Após 3h de tratamento térmico, as amostras sinterizadas em temperaturas na faixa de 1000 - 1075°C apresentam valores de retração próximos, em torno de 9,75%. No caso da temperatura de 1100°C, a retração linear sofre uma redução considerável passando de 9,6% (1h de permanência) para 8,6% (5h de permanência). A maior retração linear (~10%) foi alcançada para a temperatura de 1075°C por 1h. A esta temperatura também é possível notar uma pequena diminuição da retração linear com o tempo de sinterização, passando de 10% com 1h de para 9,7% com 5h. Uma possível explicação para a diminuição da retração linear com o tempo de permanência nestas duas temperaturas (1075 e 1100°C) seria a formação de fase líquida e o aumento de sua quantidade com o tempo de sinterização, provocando um “abaulamento” lateral nas amostras (Figura 4.17). Este abaulamento ocorreria em decorrência da presença da fase líquida e da ação da força da gravidade. Neste caso, o efeito da ação da gravidade é concorrente e sobrepõe-se ao efeito da retração devido à sinterização.

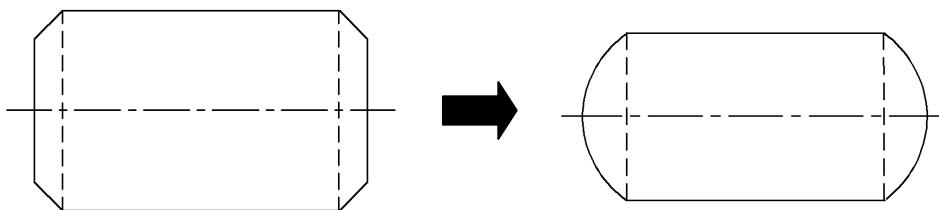


Figura 4.17 - Representação esquemática do abaulamento lateral em amostra sinterizada devido à possível formação de fase líquida.

A retração linear axial não apresenta este mesmo comportamento, pois no sentido vertical, a retração devido à sinterização e a fluência devido à força da gravidade atuam conjuntamente. De forma a comprovar a hipótese da presença da fase vítrea, amostras sinterizadas a 900°C, 1075°C e a 1100°C (1h) foram caracterizadas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) (Figura 4.18).

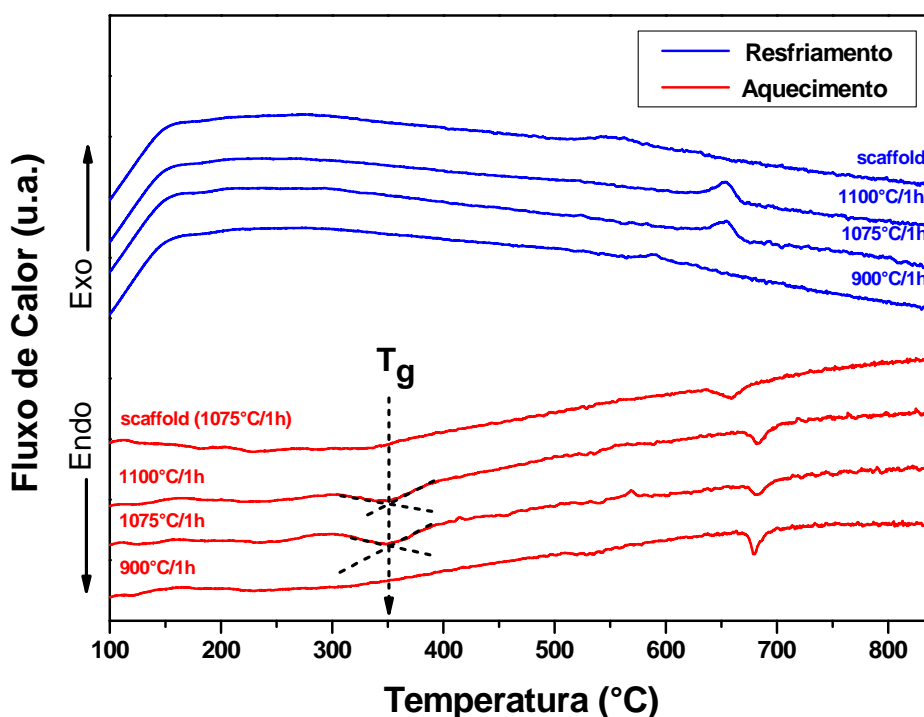


Figura 4.18 - DSC de amostras sinterizadas isotermicamente a 900°C/1h, 1075°C/1h e 1100°C/1h, e de um *scaffold* sinterizado a 1075°C/1h de maneira não-isotérmica.

As amostras sinterizadas a 1075°C e 1100°C apresentam uma mudança na linha base no sentido endotérmico na temperatura de 350°C (Figura 4.18), que pode ser atribuído à transição vítrea, confirmando a presença de fase vítrea. Esta mudança não é observada na amostra sinterizada a 900°C. Todas as amostras analisadas apresentam um pico endotérmico a aproximadamente 675°C, que estaria relacionado a uma transformação alotrópica de alta temperatura; esta transformação é reversível, como observado nas curvas de resfriamento.

A presença de fase vítrea também foi confirmada por microscopia ótica:

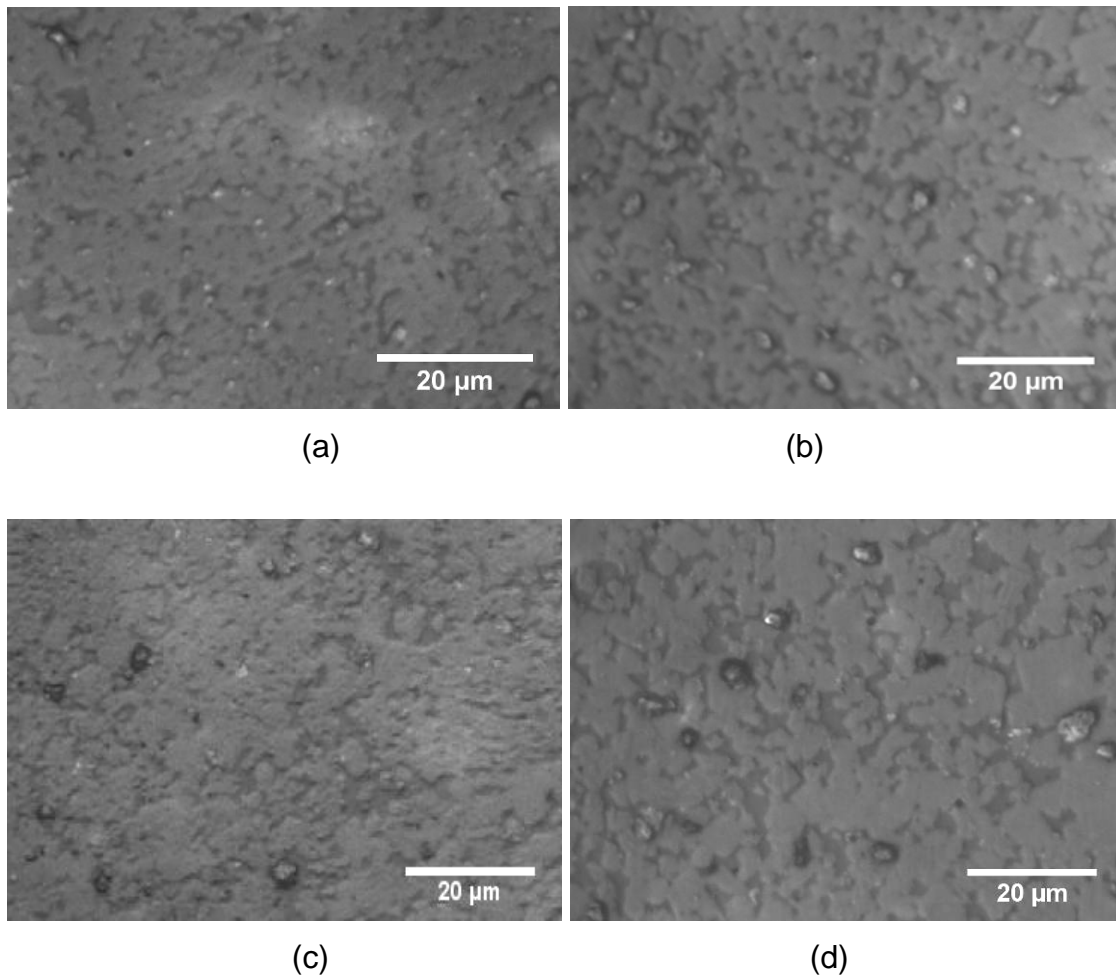


Figura 4.19 - Imagens obtidas por microscopia ótica mostrando a evolução da fase vítrea nas amostras sinterizadas a 1075°C/1h (a), 1075°C/5h (b), 1100°C/1h (c) e 1100°C/5h (d).

As regiões de coloração ligeiramente mais escura nas imagens a-d (Figura 4.19) representam a fase vítrea presente nos contornos de grão da fase majoritária. A quantidade de fase vítrea aumenta ligeiramente com o tempo de sinterização.

Os resultados de porosidade e densidade aparente sugerem que a melhor temperatura de sinterização é de 1075°C. De forma a minimizar a quantidade de fase vítrea formada, amostras foram sinterizadas a 1075°C por 30 minutos. Porém, a densidade aparente obtida foi menor do que a densidade obtida para as amostras sinterizadas a 1075°C por 1h (Figura 4.14). Portanto, o tempo de sinterização escolhido para a queima dos *scaffolds* foi de 1 hora.

Como será mostrado adiante (item 4.4.5), a queima dos *scaffolds* ocorre de maneira não-isotérmica; assim sendo, a maior parte de fase vítrea formada deve cristalizar-se durante o lento resfriamento dos *scaffolds*. Esta hipótese é confirmada através da análise de DSC do *scaffold*, cuja curva apresenta uma ligeira mudança da linha base relativa à transição vítrea na temperatura de 350°C (Figura 4.18).

## **4.5. Caracterização dos agentes porogênicos**

### **4.5.1. Distribuição do tamanho de partículas**

Uma vez que o índice de refração das partículas é desconhecido, o tamanho médio e a distribuição do tamanho das partículas foram determinados diretamente através de análise de imagens obtidas por microscopia ótica. Para cada agente porogênico, foram medidas 1500 partículas a fim de se obter uma estatística confiável.

Com a exceção das microesferas de polietileno, os agentes porogênicos apresentam distribuições de tamanho de partículas bem próximas (Figura 4.20). As microesferas de polietileno apresentam uma distribuição ligeiramente mais estreita, porém com tamanho médio de partículas próximo ao do amido de

milho (~ 430  $\mu\text{m}$ ). O amido de mandioca e o negro de fumo apresentam um tamanho médio de partículas em torno de 455  $\mu\text{m}$ .

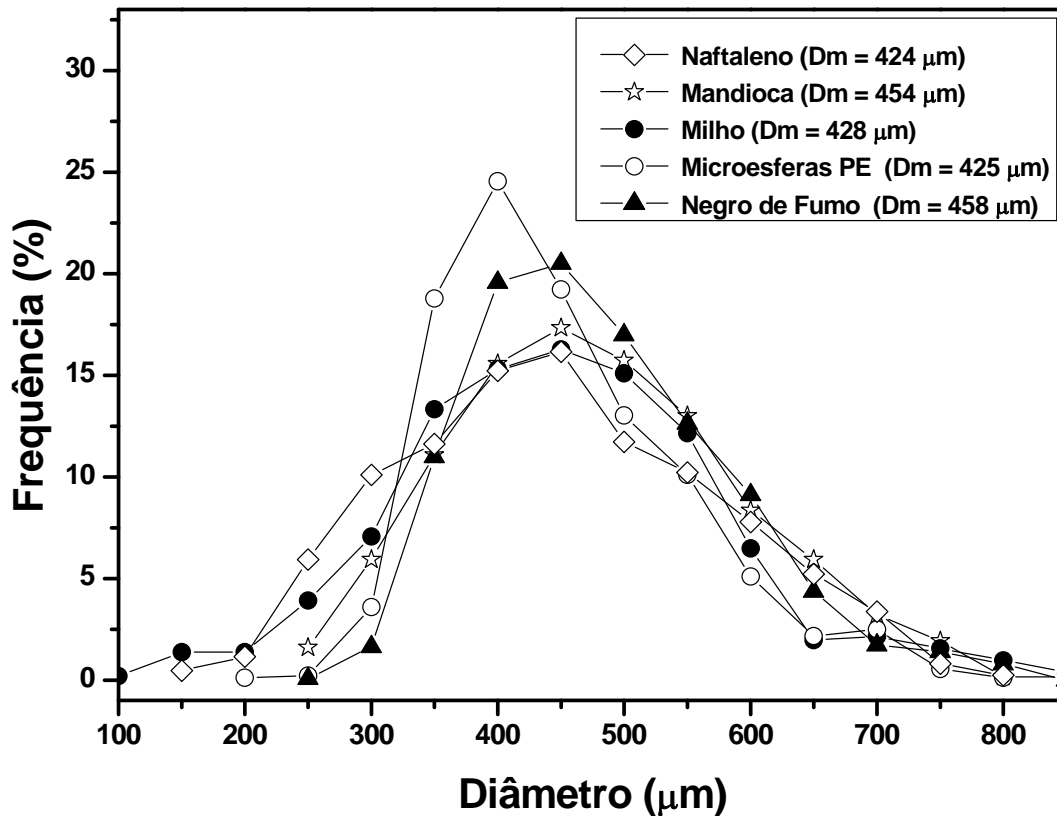


Figura 4.20 - Distribuição do tamanho de partículas dos agentes porogênicos.

#### 4.5.2. Morfologia dos agentes porogênicos

Para uma observação da morfologia, os agentes porogênicos, com a exceção do naftaleno, foram analisados por microscopia eletrônica de varredura.

O amido de milho (Figura 4.21 a-b) é composto por partículas irregulares, sendo que algumas destas possuem a forma de placas. Todas as partículas observadas possuíam “estruturas” menores aderidas na superfície (Figura 4.21 c-d); sugere-se que estas sejam colônias de microorganismos que se desenvolveram no material, embora este tenha sido secado em estufa a 80°C e mantido em dessecador de vidro.

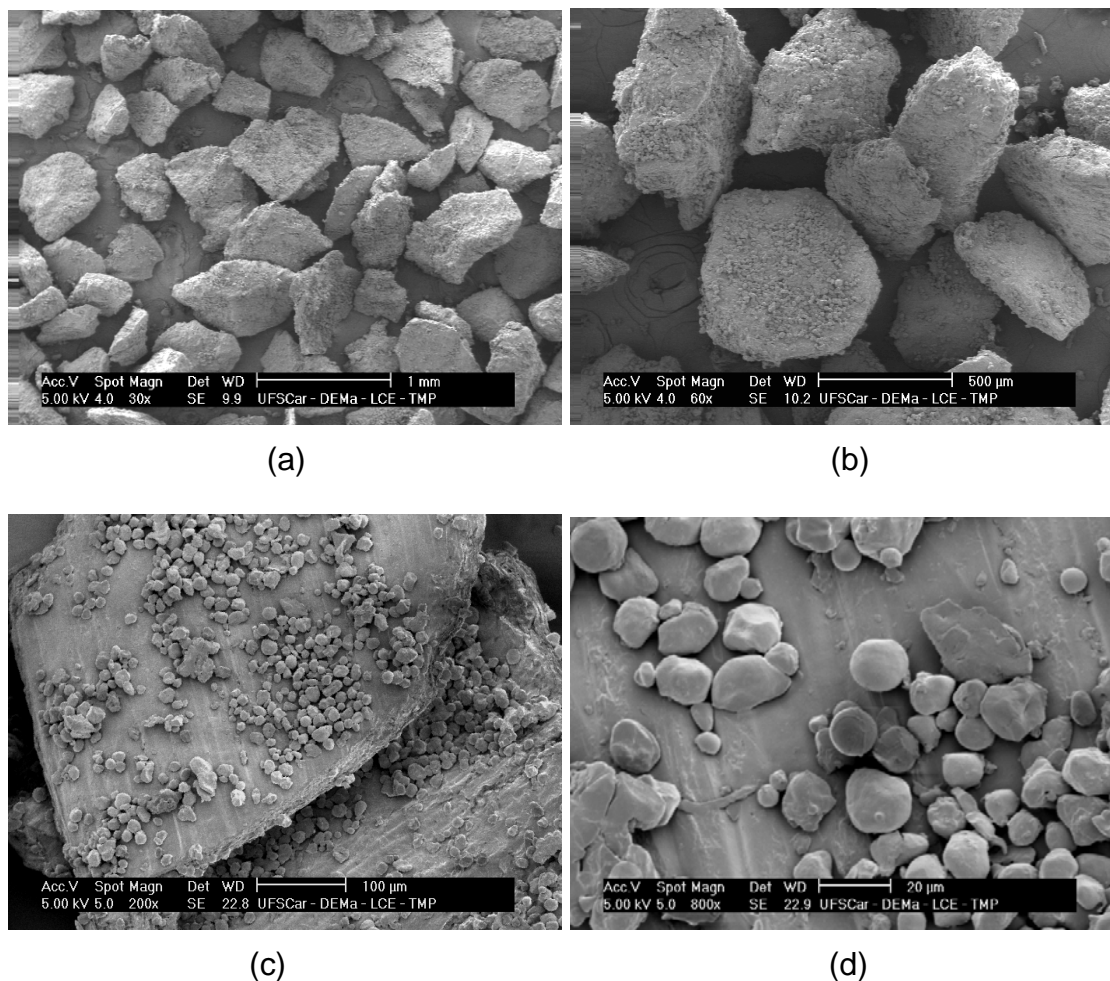


Figura 4.21 - Microscopia eletrônica de varredura do amido de milho.

A Figura 4.22 mostra que, além de possuir partículas irregulares, o amido de mandioca é também constituído por fibras com aproximadamente 72  $\mu\text{m}$  de espessura e vários milímetros de comprimento, que podem prejudicar o empacotamento no momento da conformação por prensagem.

De maneira similar ao caso do amido de milho, microorganismos aderidos à superfície das partículas do amido de mandioca puderam ser novamente observados (Figura 4.22 c-d). Diferentemente do que se pensava, uma boa parte das microesferas de polietileno é constituída por partículas irregulares (Figura 4.23), originadas pela fusão de partículas esféricas menores.

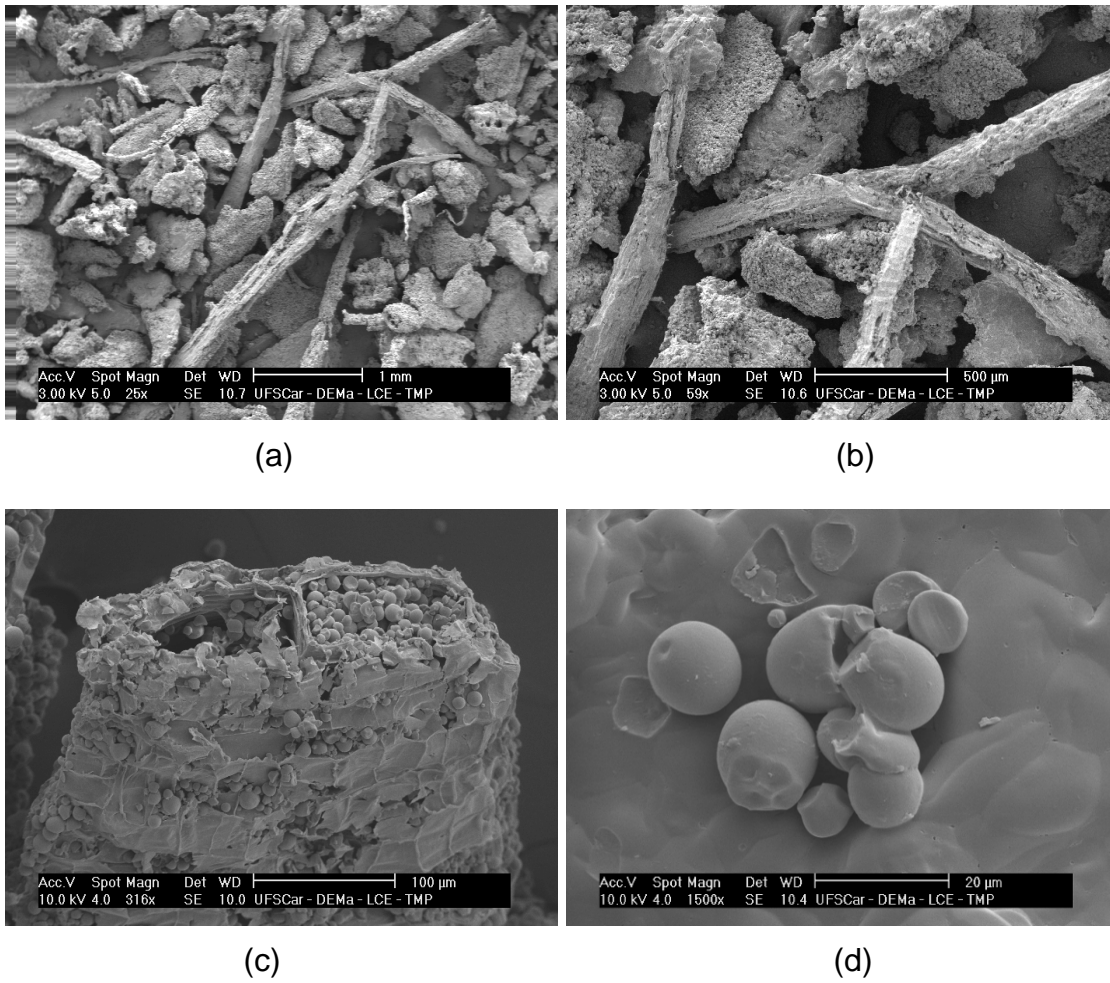
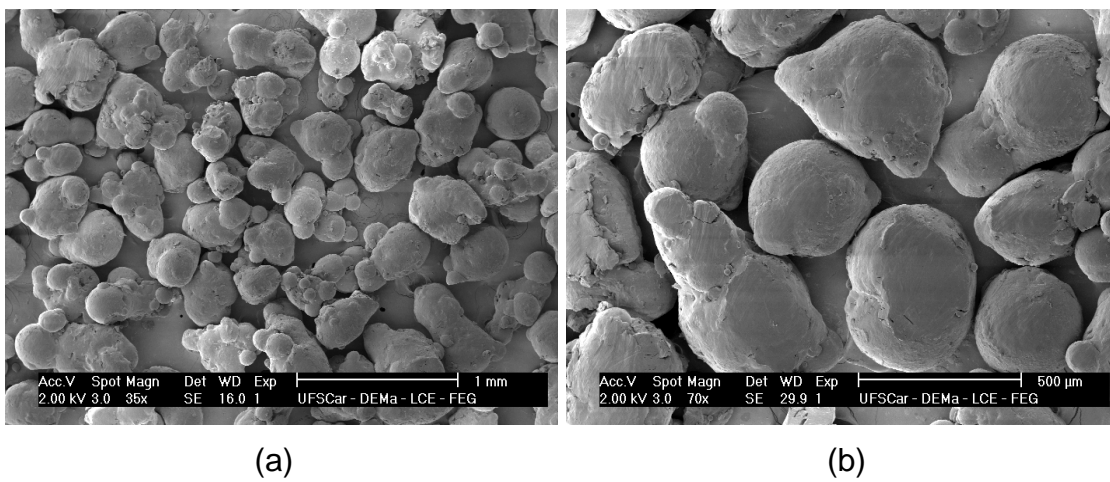


Figura 4.22 - Microscopia eletrônica de varredura do amido de mandioca.



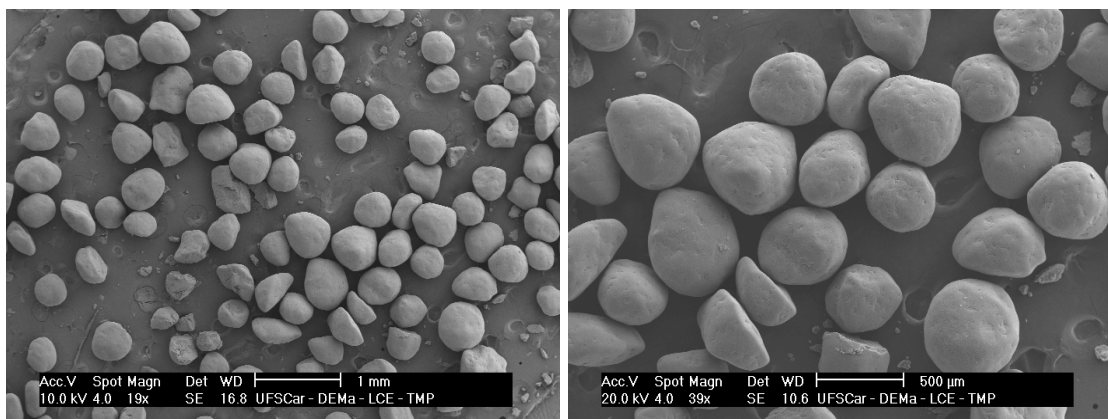




(c)

Figura 4.23 - Microscopia eletrônica de varredura das microesferas de polietileno.

O negro de fumo por sua vez, é formado por grânulos de forma predominantemente arredondada (Figura 4.24). Apesar dos grânulos não seremocos, apresentam baixa resistência mecânica, devendo ser manipulados com cautela.



(a)

(b)

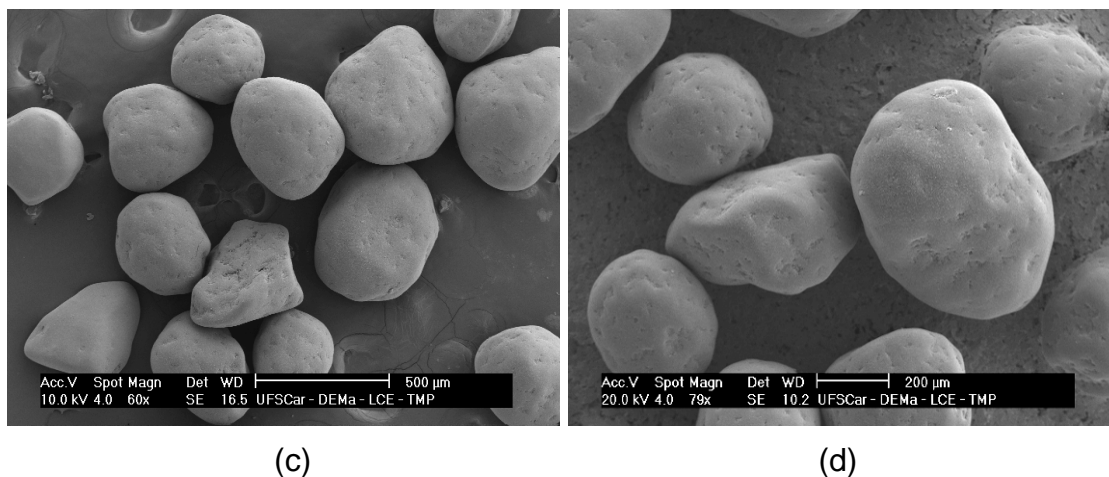


Figura 4.24 - Microscopia eletrônica de varredura dos grânulos de negro de fumo.

#### 4.5.3. Picnometria de hélio

Para os cálculos de formulação das barbotinas, era necessário conhecer as densidades de todos os materiais utilizados em sua preparação, incluindo os agentes porogênicos. Desta forma, as densidades foram determinadas por picnometria de hélio. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3:

Tabela 3 – Densidade dos agentes porogênicos determinada através de picnometria de hélio.

Material	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )
Naftaleno	1,167 ± 0,003
Amido de Mandioca	1,417 ± 0,003
Amido de Milho	1,474 ± 0,003
Negro de Fumo	1,945 ± 0,003
Microesferas de Polietileno	0,917 ± 0,002
Biosilicato <sup>®</sup>	2,787 ± 0,003
PVB – B98	1,134 ± 0,001

Para a determinação da densidade do Biosilicato<sup>®</sup>, utilizou-se o pó obtido através do procedimento de moagem descrito no item 3.1. Outros estudos [88] reportam que a densidade do Biosilicato<sup>®</sup> está em torno de 2,74 g/cm<sup>3</sup>; porém este valor foi obtido através da medida de amostras densas, utilizando-se a técnica de imersão em líquido. A medida por picnometria de hélio foi repetida três vezes e valores muito próximos ao apresentado na tabela 3 foram obtidos.

#### 4.5.4. Preparação das barbotinas contendo Biosilicato<sup>®</sup>

##### 4.5.4.1. Via adição de agentes porogênicos

Como foi dito na seção 3.13.1, para a preparação das barbotinas estabeleceu-se uma suspensão contendo 30% em volume de sólidos, 3% vol. de PVB e 67% vol. de álcool isopropílico.

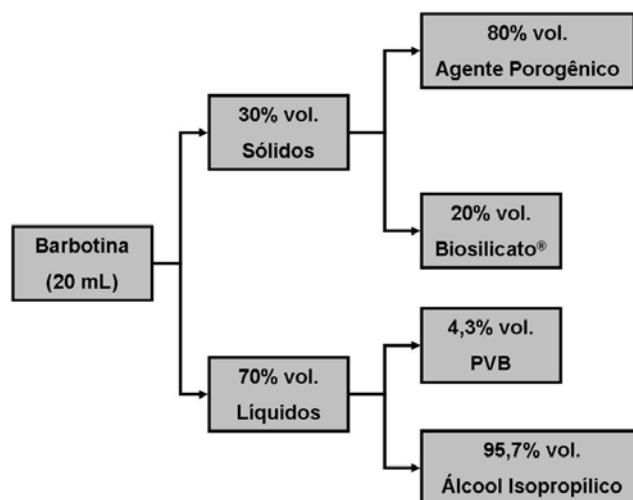


Figura 4.25 - Representação da composição das barbotinas.

A porcentagem referente à parte sólida (30% vol.) foi constituída por 80% vol. do agente porogênico e 20% vol. de Biosilicato<sup>®</sup>, visando à obtenção de *scaffolds* com uma macroporosidade de 80% em volume. Neste

procedimento, o PVB foi considerado como parte do líquido, uma vez que estaria dissolvido no álcool (Figura 4.25).

A tabela 4 apresenta os dados calculados para um volume de 20 ml para cada tipo de barbotina, contendo os diferentes tipos de agentes porogênicos:

Tabela 4 - Barbotinas: composições e dados.

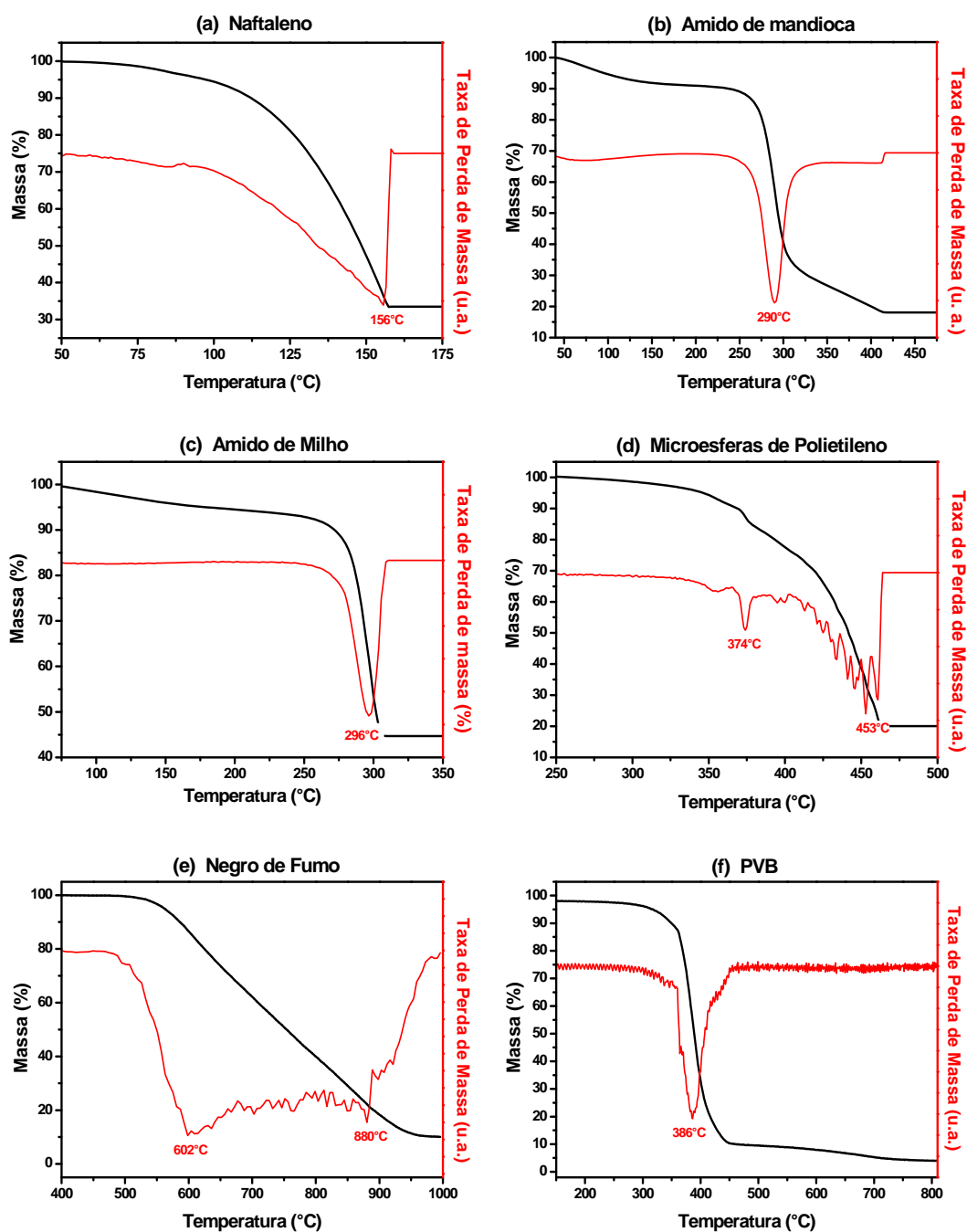
Componentes		Barbotina 1	Barbotina 2	Barbotina 3	Barbotina 4	Barbotina 5
Naftaleno	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	1,167	-	-	-	-
	Vol. (mL)	4,8	-	-	-	-
	Massa (g)	5,6016	-	-	-	-
Amido Milho	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	-	1,474	-	-	-
	Vol. (mL)	-	4,8	-	-	-
	Massa (g)	-	7,0752	-	-	-
Amido Mandioca	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	-	-	1,417	-	-
	Vol. (mL)	-	-	4,8	-	-
	Massa (g)	-	-	6,8016	-	-
Microesferas PE	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	-	-	-	0,917	-
	Vol. (mL)	-	-	-	4,8	-
	Massa (g)	-	-	-	4,4016	-
Negro de Fumo	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	-	-	-	-	1,945
	Vol. (mL)	-	-	-	-	4,8
	Massa (g)	-	-	-	-	9,336
Biosilicato®	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	2,787	2,787	2,787	2,787	2,787
	Vol. (mL)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
	Massa (g)	3,3444	3,3444	3,3444	3,3444	3,3444
PVB	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	1,134	1,134	1,134	1,134	1,134
	Vol. (mL)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
	Massa (g)	0,6804	0,6804	0,6804	0,6804	0,6804
Álcool Isopropílico	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
	Vol. (mL)	13,4	13,4	13,4	13,4	13,4
	Massa (g)	10,586	10,586	10,586	10,586	10,586

#### 4.5.4.2. Método da réplica

No caso do método da réplica, foi preparada 100 ml de uma barbotina contendo 40% em peso de Biosilicato®, 57% em peso de álcool isopropílico e 3% em peso de PVB. Este procedimento é similar ao utilizado por Boccaccini et al. [32] para a preparação de uma barbotina contendo Bioglass®. Porém, utilizou-se o álcool isopropílico como meio líquido e o PVB como ligante, ao invés de água destilada e PVA.

#### 4.5.5. Análise termogravimétrica

Com o objetivo de determinar a melhor temperatura de remoção dos agentes porogênicos, estes foram submetidos a análises termogravimétricas; os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.26. Estes dados foram de fundamental importância no planejamento da queima dos *scaffolds*.



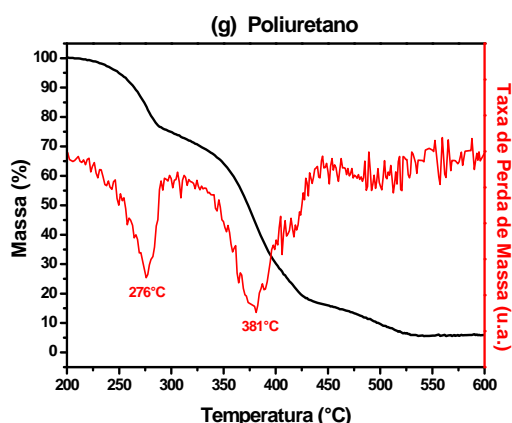


Figura 4.26 - Análises termogravimétricas do naftaleno (a), amido de mandioca (b), amido de milho (c), microesferas de polietileno (d), negro de fumo (e), do PVB (f) e da espuma de poliuretano (g).

Na Figura 4.26 destacam-se o intervalo de temperatura onde os agentes porogênicos sofrem a maior perda de massa e o pico da derivada termogravimétrica, que indica a máxima taxa de decomposição. Estabeleceu-se o pico da derivada como sendo a temperatura ótima para a remoção rápida dos agentes porogênicos, que corresponde a 156°C para o naftaleno, 296°C para o amido de milho e 290°C para o amido de mandioca. No caso das microesferas de polietileno, existem dois picos de máxima decomposição: um a 374°C e outro a 453°C. A curva de perda de massa do negro de fumo não apresenta um ponto de inflexão bem definido; mas a derivada da curva revelou dois eventos de máxima decomposição, o primeiro a 602°C e o segundo a 880°C. O PVB apresenta um pico de máxima decomposição na temperatura de 386°C.

O naftaleno, o amido de milho e o amido de mandioca representam a condição ideal de remoção, ou seja, estes podem ser removidos anteriormente à eliminação do PVB, que seria o responsável por manter a integridade dimensional dos *scaffolds*. A decomposição das microesferas de polietileno ocorre a uma temperatura muito próxima à do PVB; o negro de fumo foi o único agente porogênico utilizado em que sua temperatura ideal de remoção é superior à temperatura de remoção do PVB.

Tendo em vista os resultados obtidos nos testes de sinterização do Biosilicato<sup>®</sup> e nas análises termogravimétricas, adotou-se a seguinte estratégia para a queima dos *scaffolds*:

1. Aquecimento do *scaffold* conformado da temperatura ambiente até a temperatura de máxima taxa de perda de massa do respectivo agente porogênico, a uma taxa de aquecimento de 1°C/min;
2. Tempo de patamar de 1h nesta temperatura;
3. Novo aquecimento a 1°C/min até a temperatura de máxima taxa de perda de massa do PVB (386°C);
4. Tempo de patamar de 1h a esta temperatura;
5. Aquecimento a uma taxa de 5°C/min até a temperatura ótima de sinterização do Biosilicato<sup>®</sup> (1075°C);
6. Tempo de patamar de 1h a 1075°C;
7. Resfriamento a uma taxa de 5°C/min até a temperatura ambiente.

A remoção das microesferas de polietileno e da espuma de poliuretano ocorreu com um patamar adicional de 1h na temperatura correspondente ao segundo pico de máxima decomposição. No caso do negro de fumo, o segundo pico situa-se a 880°C, temperatura onde já ocorre a sinterização do Biosilicato<sup>®</sup>. Assim sendo, ao invés de um novo patamar na temperatura de 880°C, o patamar na temperatura de 602°C foi estendido de 1h para 3h.

#### **4.6. Caracterização dos *scaffolds***

##### **4.6.1. *Scaffolds* obtidos através da adição de agentes porogênicos**

Na Figura 4.27, são apresentadas as micrografias da superfície de fratura dos *scaffolds* obtidos através da utilização do naftaleno como agente porogênico. Para se ter uma melhor idéia da interconectividade dos poros, também foram incluídas micrografias dos *scaffolds* embutidos com resina epóxi.

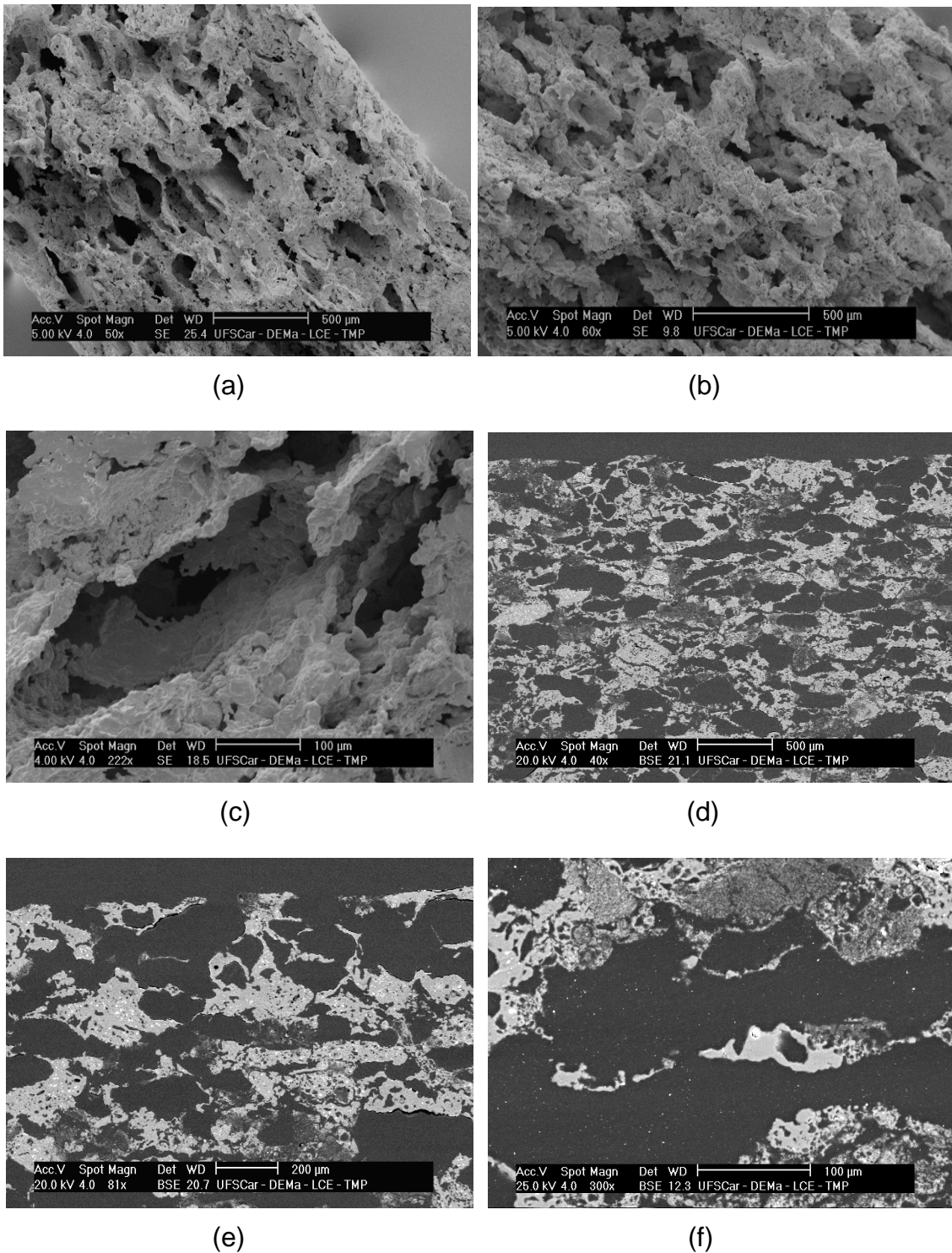


Figura 4.27 - Imagens dos *scaffolds* de Biosilicato<sup>®</sup> obtidos a partir da utilização do naftaleno como agente porogênico: superfície de fratura (a-c) e embutidos em resina epóxi (d-f).

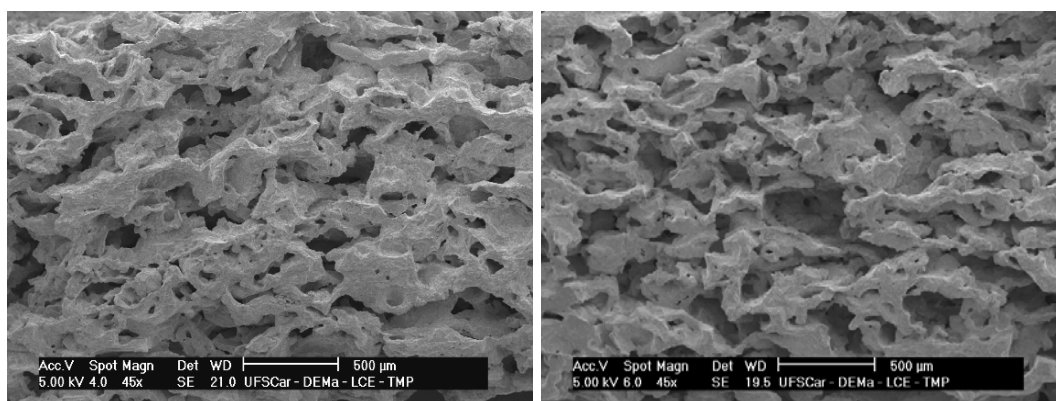


Embora uma baixa pressão (~ 20 MPa) tenha sido usada na 1° etapa de prensagem dos *scaffolds*, esta foi suficiente para promover a deformação do naftaleno. Esta deformação foi responsável pela obtenção de poros “achatados” e parcialmente orientados perpendicularmente à direção de prensagem.

Sabe-se que o naftaleno é parcialmente solúvel em álcool isopropílico, o que causa a diminuição do tamanho das partículas durante a etapa de preparação da barbotina. Além disso, durante a secagem da barbotina, o naftaleno dissolvido no álcool recristaliza na forma de pequenos cristais, dando origem a uma microestrutura composta por poros menores (Figura 4.27 - f). Esta microestrutura porosa mais fina não é interessante no que concerne à vascularização do *scaffold* ou suas propriedades mecânicas.

Foi obtida uma porosidade total ( $P_T$ ) de 70% e uma porosidade aparente ( $P_{ap}$ ) de 62%. Isto significa que aproximadamente 8% da porosidade total é formada por poros fechados, os quais não são interessantes. Neste caso a macroporosidade (MP) não foi calculada, pois não haveria precisão devido à presença dos poros pequenos que escapam ao limite de resolução do software Image-J. Os *scaffolds* obtidos através do uso do naftaleno apresentaram uma retração linear diametral (RLD) média de 20%.

Na Figura 4.28, são apresentadas as micrografias da superfície de fratura dos *scaffolds* obtidos através da utilização do amido de milho como agente porogênico.



(a)

(b)

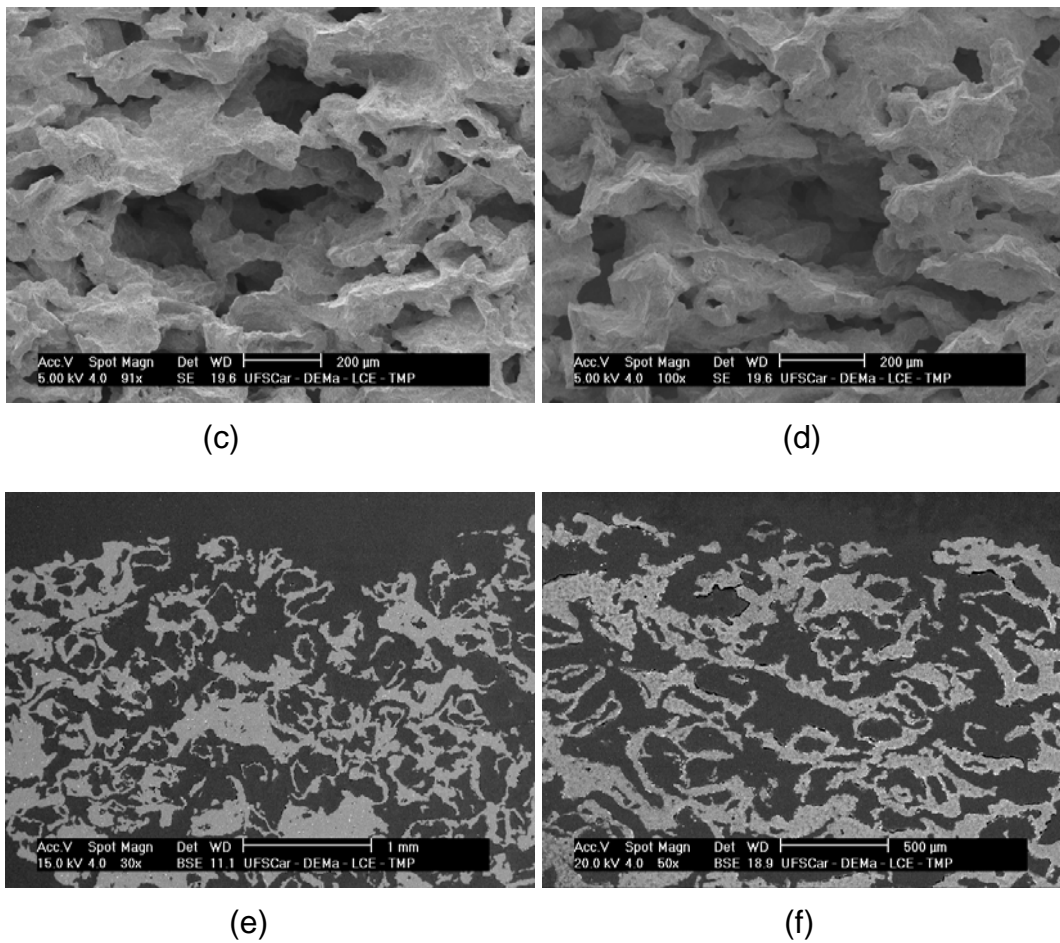


Figura 4.28 - Imagens dos *scaffolds* de Biosilicato<sup>®</sup> obtidos a partir da utilização do amido de milho como agente porogênico: superfície de fratura (a-d) e embutidos em resina epóxi (e-f).

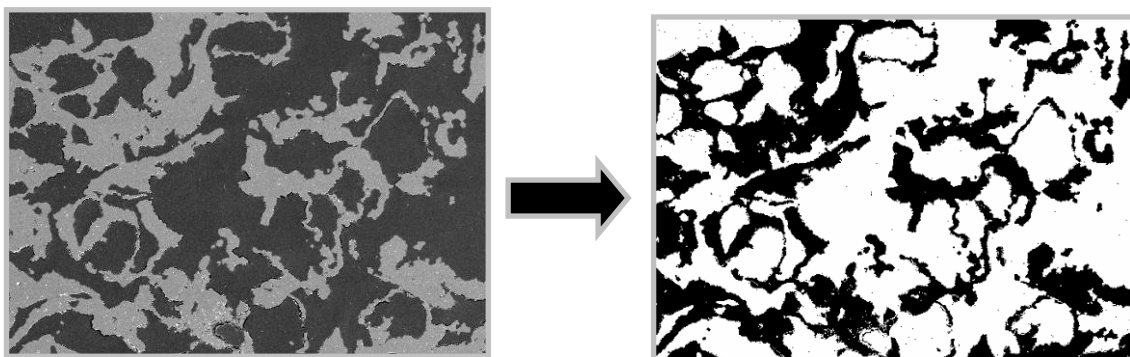
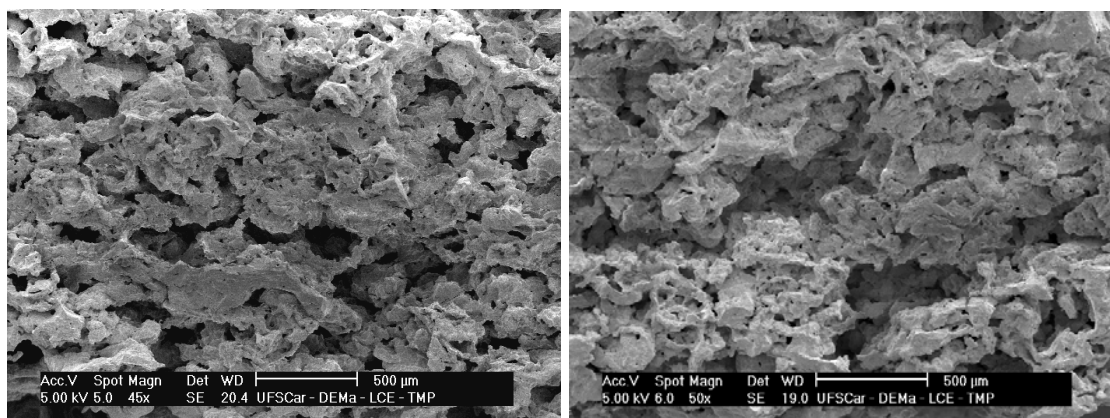


Figura 4.29 - Exemplo de imagem tratada no software Image-J para a determinação da macroporosidade do *scaffold*.

Neste caso, os *scaffolds* apresentaram uma porosidade total de aproximadamente 68% e uma porosidade aparente de aproximadamente 64%. A macroporosidade, ou seja, a porosidade induzida, foi calculada através da manipulação da micrografia do *scaffold* embutido em resina pelo software Image-J (Figura 4.29).

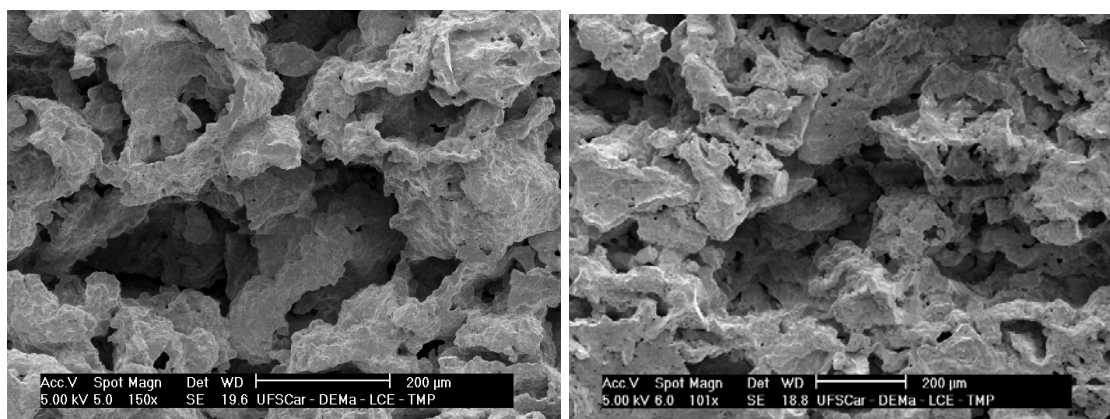
A macroporosidade obtida através da análise das imagens foi de 59%, o que indica que aproximadamente 9% da porosidade total é composta por microporos, que não podem ser identificados pelo software. Os *scaffolds* obtidos através do uso do amido de milho apresentaram uma retração linear diametral média de 32%, 12% superior ao caso do naftaleno.

Na Figura 4.30, são apresentadas as micrografias da superfície de fratura dos *scaffolds* obtidos através da utilização do amido de mandioca como agente porogênico.



(a)

(b)



(c)

(d)

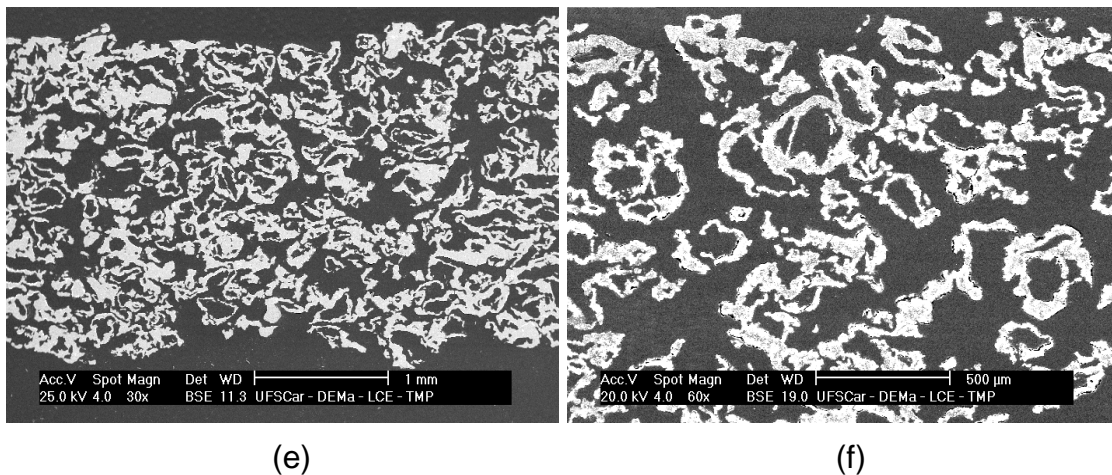
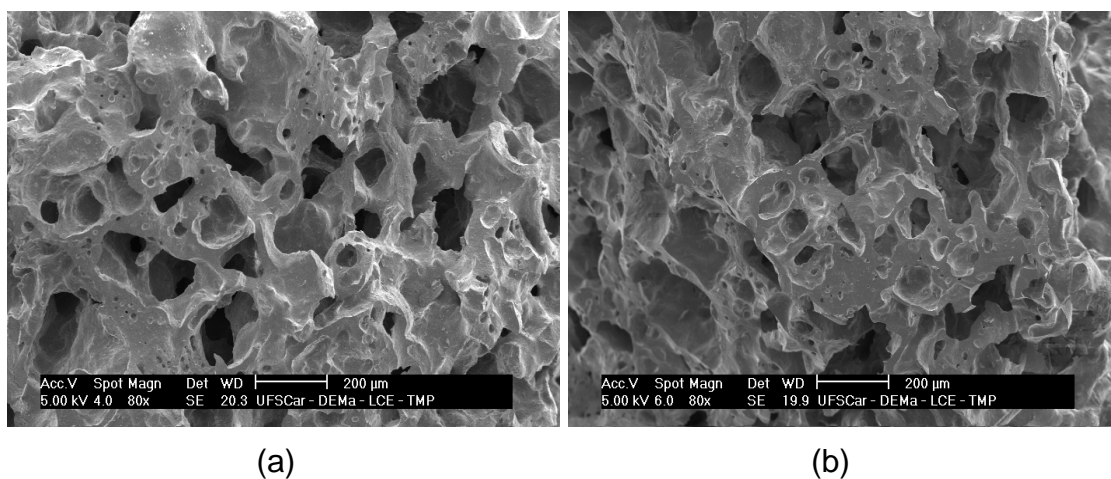


Figura 4.30 - Imagens dos *scaffolds* de Biosilicato<sup>®</sup> obtidos a partir da utilização do amido de mandioca como agente porogênico: superfície de fratura (a-d) e embutidos em resina epóxi (e-f).

Neste caso, foi obtida uma porosidade total de 71% e uma porosidade aparente de 68%. A análise das imagens revelou uma macroporosidade de aproximadamente 60%, indicando que apenas 11% da porosidade total é formada por microporos (poros abaixo de 10  $\mu\text{m}$ ). Como pode ser notado na Figura 4.30 e-f, a interconectividade é ligeiramente superior à do caso anterior. A retração linear diametral obtida foi de 33%.

Na Figura 4.31, são apresentadas as micrografias da superfície de fratura dos *scaffolds* obtidos através da utilização das microesferas de polietileno como agente porogênico.



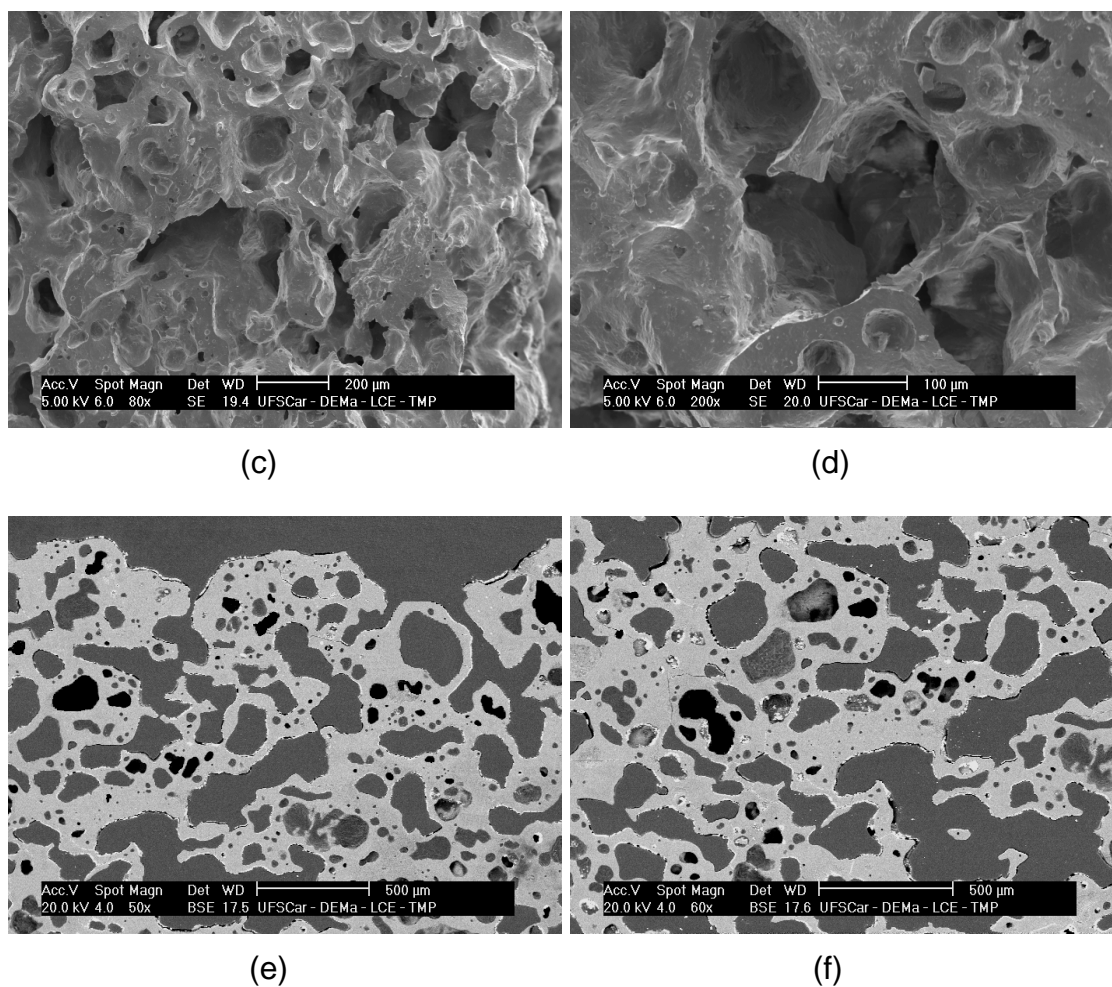


Figura 4.31 - Imagens dos *scaffolds* de Biosilicato<sup>®</sup> obtidos a partir da utilização das microesferas de polietileno como agente porogênico: superfície de fratura (a-d) e embutidos em resina epóxi (e-f).

Neste caso, a porosidade total obtida foi de 67% e a porosidade aparente de 45%, o que indica que aproximadamente 22% da porosidade total é constituída por poros fechados. A análise de imagens revelou uma macroporosidade em torno de 48%, ou seja, 19% da porosidade total corresponde a poros muito pequenos.

A interconectividade dos poros é baixa, sendo que alguns poros não preenchidos pela resina epóxi podem ser observados (Figura 4.31 e-f). A retração linear diametral obtida foi de 37%, sendo a mais alta entre todos *scaffolds*.

Na Figura 4.32, são apresentadas as micrografias da superfície de fratura dos *scaffolds* obtidos através da utilização do negro de fumo como agente porogênico:

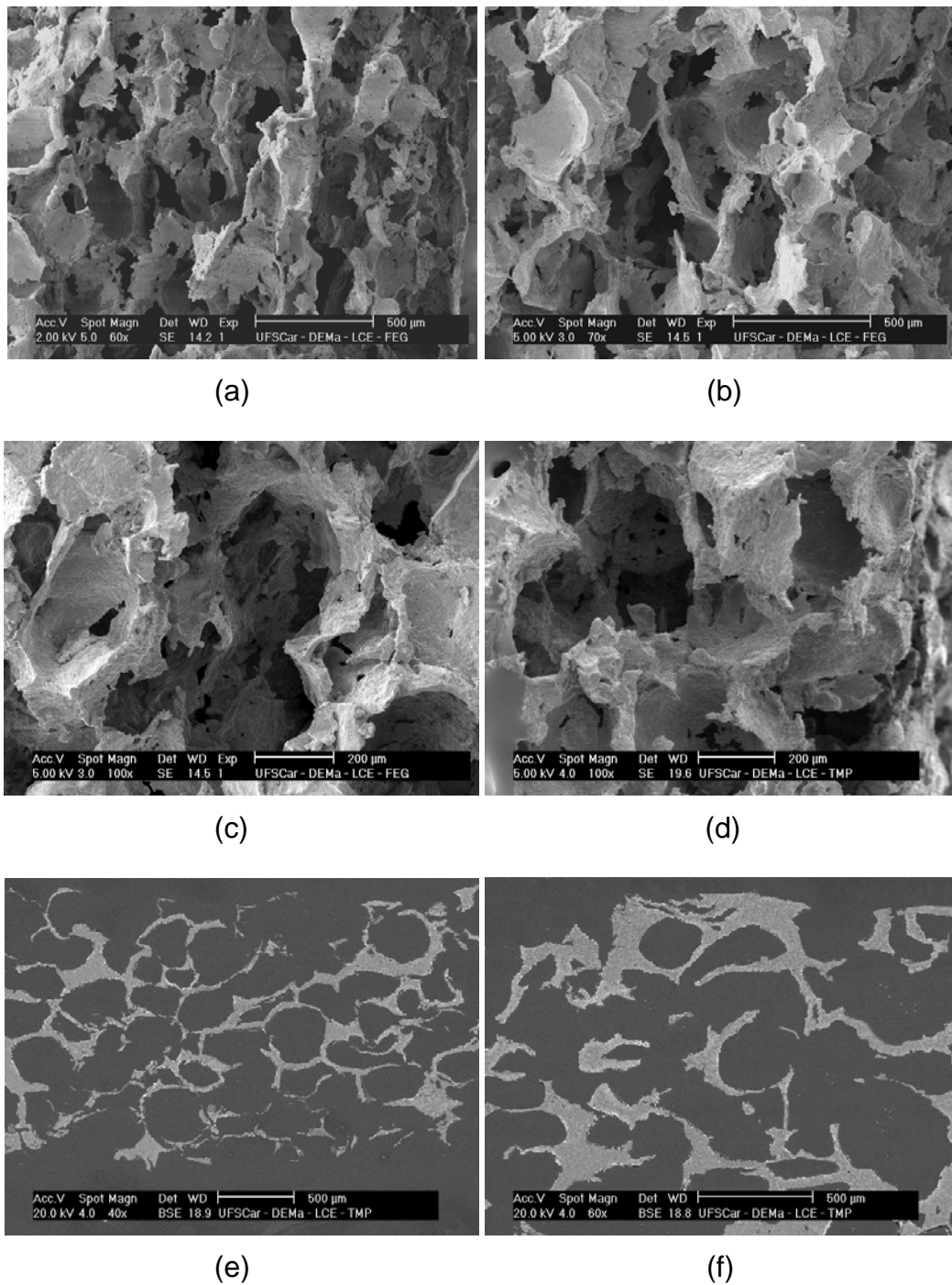


Figura 4.32 - Imagens dos *scaffolds* de Biosilicato<sup>®</sup> obtidos a partir da utilização do negro de fumo como agente porogênico: superfície de fratura (a-d) e embutidos em resina epóxi (e-f).

No caso destes *scaffolds*, a porosidade total é de 87% e a porosidade aparente é de aproximadamente 84%. A análise de imagens revelou uma macroporosidade alta, em torno de 80%. O fato do valor da macroporosidade ser muito próximo da porosidade total indica que a porosidade intrínseca é pequena. Nota-se que a interconectividade dos poros é muito superior aos casos anteriores (Figura 4.32). A retração linear diametral obtida foi de 21%.

Através da metodologia descrita no item 3.15.3, mediu-se a distribuição da abertura dos canais interconectados e a abertura média dos canais interconectados ( $\lambda_{med}$ ) para os *scaffolds* obtidos pela utilização dos diferentes agentes porogênicos. Devido ao aumento utilizado, apenas poros acima de 10  $\mu\text{m}$  puderam ser medidos.

Como pode ser observado na Figura 4.33, o melhor resultado foi alcançado com a utilização do negro de fumo, onde aproximadamente 50% dos poros possuem tamanho ideal ( $> 200 \mu\text{m}$ ). No caso dos demais agentes porogênicos, 10% dos poros estão acima de 200  $\mu\text{m}$ .

A abertura média dos canais interconectados ( $\lambda_{med}$ ) é de aproximadamente 80  $\mu\text{m}$  para os *scaffolds* obtidos a partir do uso do naftaleno e por volta de 100  $\mu\text{m}$  para os *scaffolds* obtidos a partir do uso das microesferas de polietileno e dos amidos como agente porogênico. Os *scaffolds* obtidos através do uso do negro de fumo possuem abertura média de aproximadamente 230  $\mu\text{m}$ , valor considerado satisfatório para a aplicação proposta.

Para efeito de comparação, os parâmetros porosidade total (PT), porosidade aparente (Pap), macroporosidade (MP), abertura média dos canais interconectados ( $\lambda_{med}$ ) e retração linear diametral (RLD) obtidos para os *scaffolds* são apresentados na tabela 5. Os erros destes valores correspondem ao desvio padrão de dez amostras.



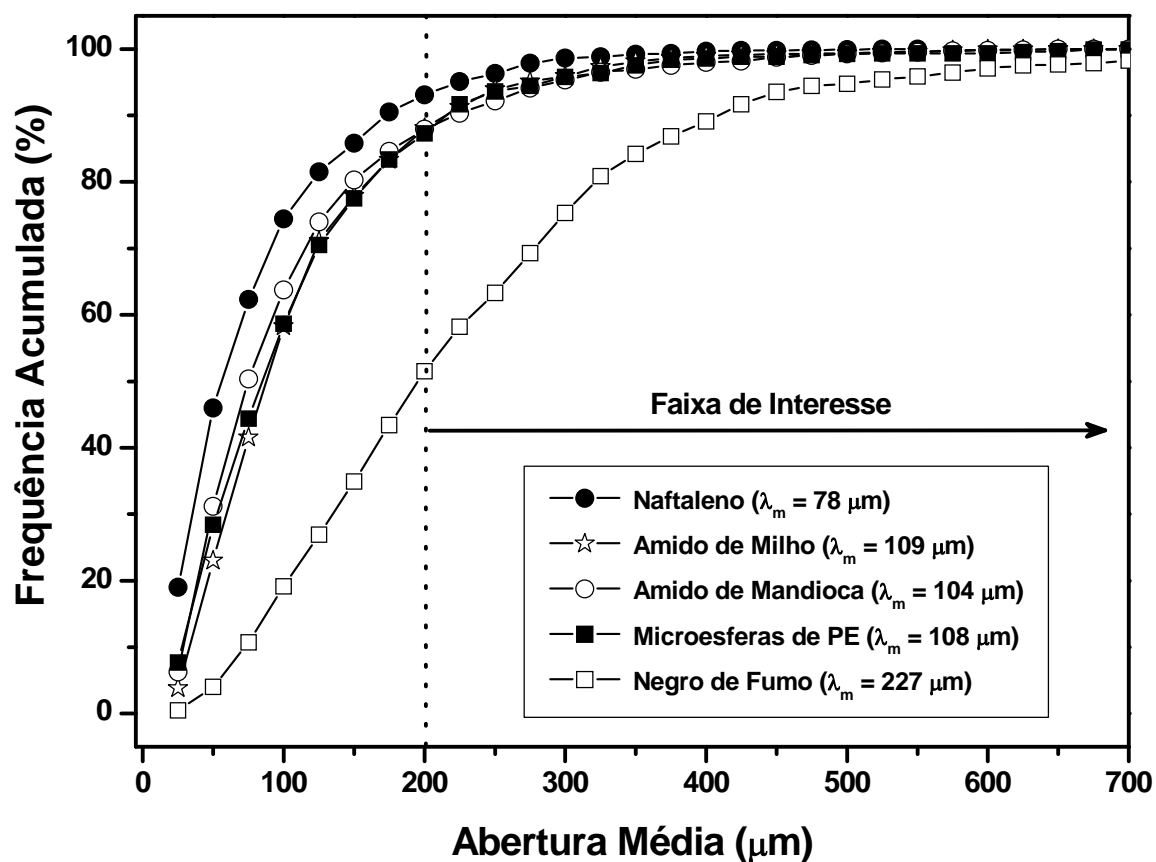


Figura 4.33 - Frequência acumulada (%) em função da abertura média entre os canais para *scaffolds* obtidos através do uso de diferentes agentes porogênicos.

Tabela 5 - Valores de porosidade total, porosidade aparente, macroporosidade, abertura média de canal e retração linear diametral, dos *scaffolds* obtidos através da adição de diferentes agentes porogênicos.

Agente Porogênico	$P_T$ (%)	$P_{ap}$ (%)	MP (%)	$\lambda_{med}$ ( $\mu m$ )	RLD (%)
Naftaleno	$70 \pm 1$	$62 \pm 2$	-	80	$20 \pm 1$
Amido de Milho	$68 \pm 2$	$64 \pm 3$	$59 \pm 4$	110	$32 \pm 1$
Amido de Mandioca	$71 \pm 1$	$68 \pm 2$	$60 \pm 2$	105	$33 \pm 1$
Microesferas de PE	$67 \pm 2$	$45 \pm 3$	$48 \pm 2$	110	$37 \pm 1$
<b>Negro de Fumo</b>	<b><math>87 \pm 2</math></b>	<b><math>84 \pm 3</math></b>	<b><math>80 \pm 4</math></b>	<b>230</b>	<b><math>21 \pm 1</math></b>



Durante o procedimento de queima dos agentes porogênicos para a determinação da perda ao fogo (item 3.16), foi observado que o amido de milho e o amido de mandioca fundem parcialmente e retraem (Figura 4.34 - a), o que pode ter causado a fluência da estrutura do *scaffold* e a reacomodação das partículas de Biosilicato<sup>®</sup>. Isto explicaria a obtenção de uma retração linear superior a 30% e de poros da ordem de apenas 100  $\mu\text{m}$ .

No caso das microesferas de polietileno este efeito é ainda mais pronunciado (Figura 4.34 - b), pois um líquido de baixa viscosidade é gerado a temperaturas baixas como 120°C, levando a uma maior quantidade poros fechados e a uma alta retração linear (~ 37%).

A porosidade dos *scaffolds* obtidos através do uso do negro de fumo pode ser otimizada utilizando-se grânulos com um tamanho médio superior.



Figura 4.34 – Fusão e retração durante a queima do amido de milho (a) e das microesferas de polietileno (b).

#### 4.6.2. Resíduos inorgânicos gerados pelos agentes porogênicos

Com o objetivo de identificar a presença de resíduos inorgânicos, os agentes porogênicos foram queimados através de um procedimento que simula a queima dos *scaffolds*, conforme descrito no item 3.16.

Após a queima do amido de milho, observou-se a formação de uma espécie de “vidrado” (Figura 4.35), possuindo manchas claras e manchas menores avermelhadas, o que a princípio indicaria a presença de grandes

concentrações de sílica. O resíduo corresponde à apenas 0,5 % da massa inicial; isto equivale dizer que a perda ao fogo (para o procedimento de queima descrito) foi de 99,5 %.

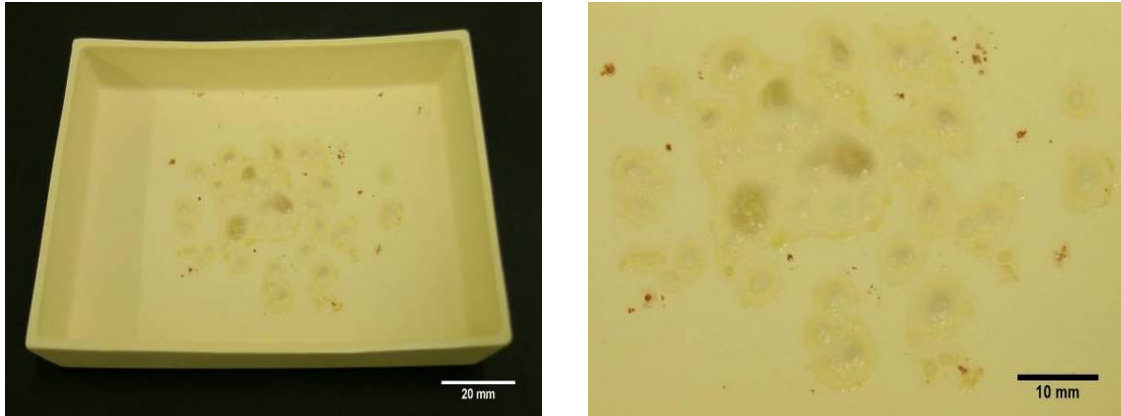
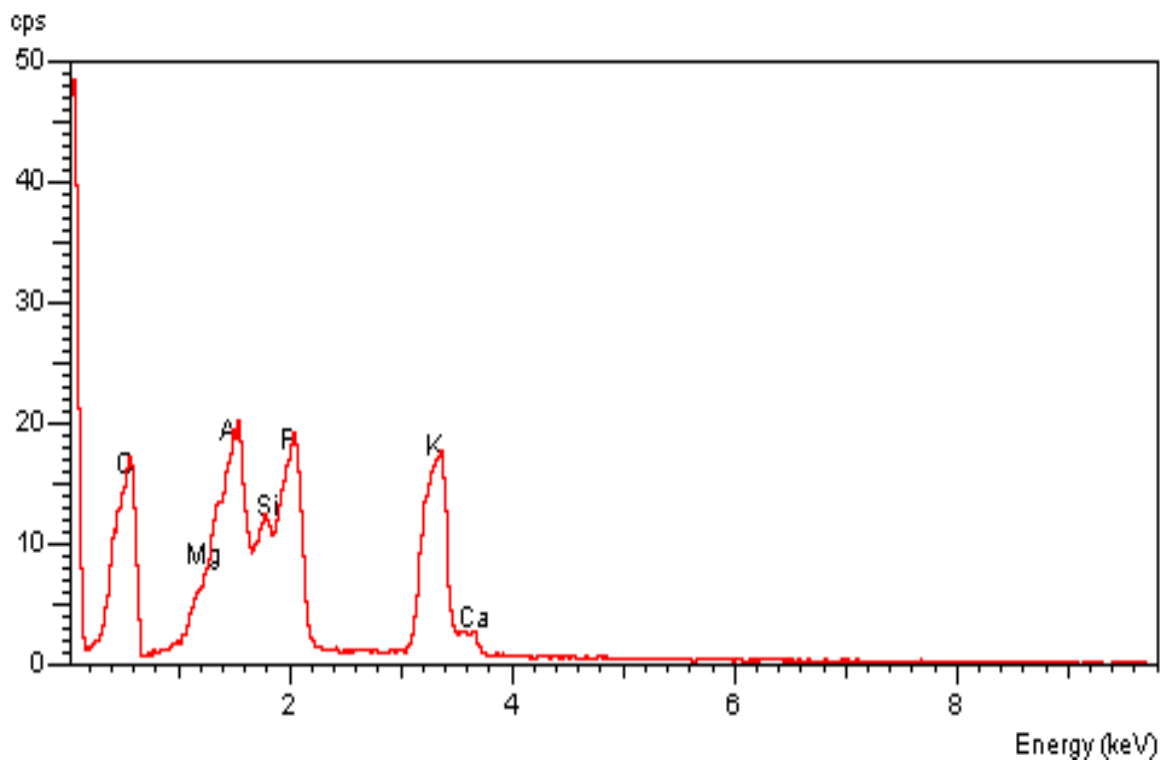
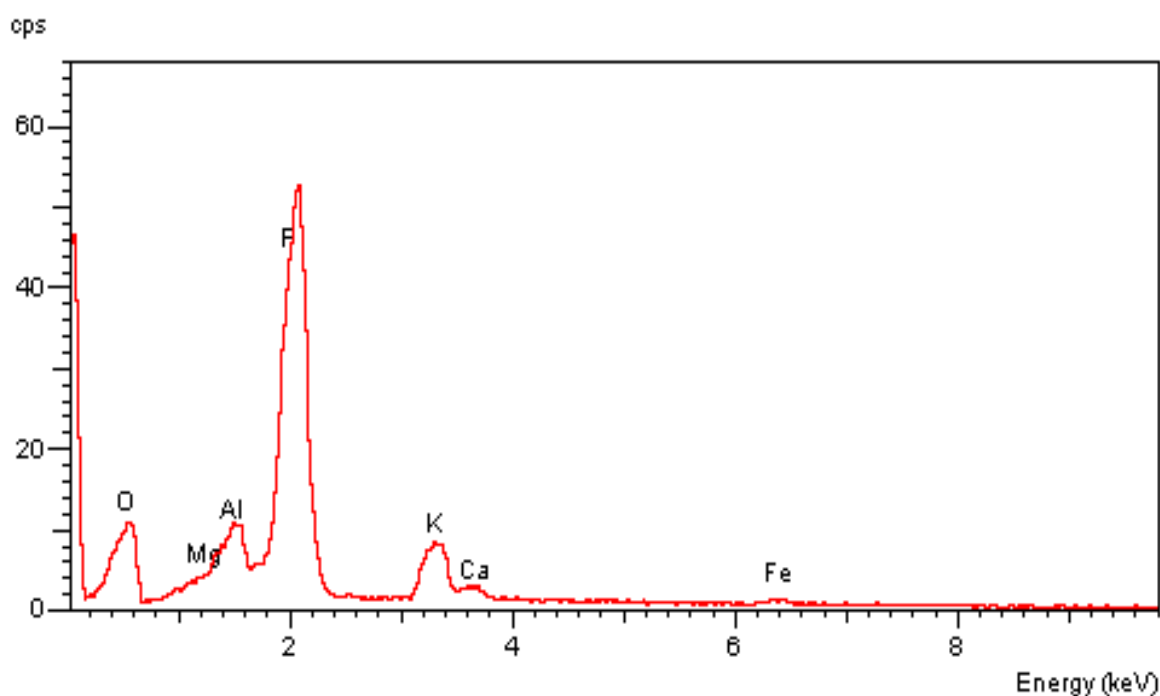


Figura 4.35 - Imagens do resíduo obtido após a queima do amido de milho.



(a)



(b)

Figura 4.36 - Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) da região clara (a) e da região avermelhada (b) do resíduo obtido após a queima do amido de milho.

Para determinar a composição química, o resíduo foi analisado por espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Os resultados revelaram que a região mais clara é rica em O, P, K e Al, contendo pequenas quantidades de Ca, Si e Mg (Figura 4.36 - a).

A região avermelhada, por outro lado, é rica em P, O e N, contendo pequenas quantidades de K, Ca, Al e Fe, sendo este último o possível responsável pela coloração (Figura 4.36 - b). Na região avermelhada, não foram identificados Si ou Mg.

Diferentemente do caso anterior, obteve-se um pó de coloração amarelada após a queima do amido de mandioca (Figura 4.37). O resíduo representou apenas 0,6% da massa inicial, ou seja, a perda ao fogo foi de 99,4%.

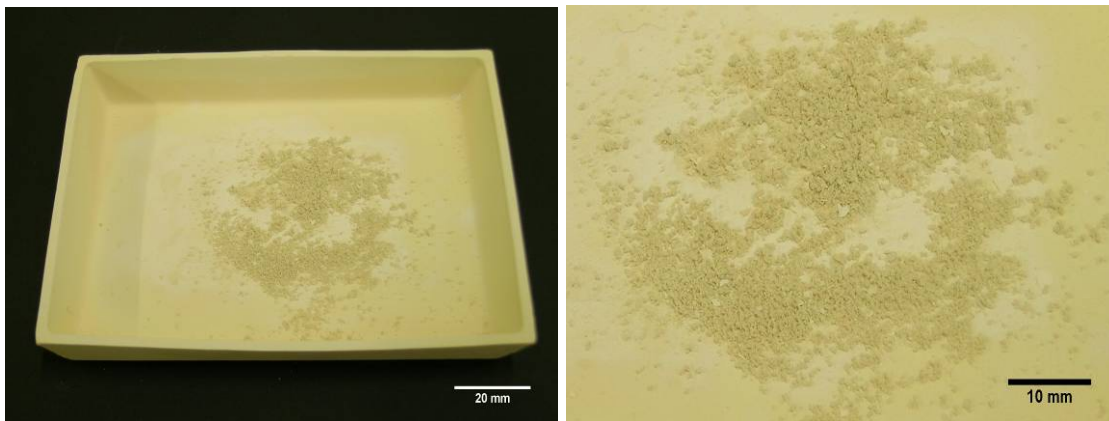


Figura 4.37 - Imagens do resíduo obtido após a queima do amido de mandioca.

Análise por EDS revelou a presença de O, K e Al e de pequenas quantidades de Ca, P e Si (Figura 4.38).

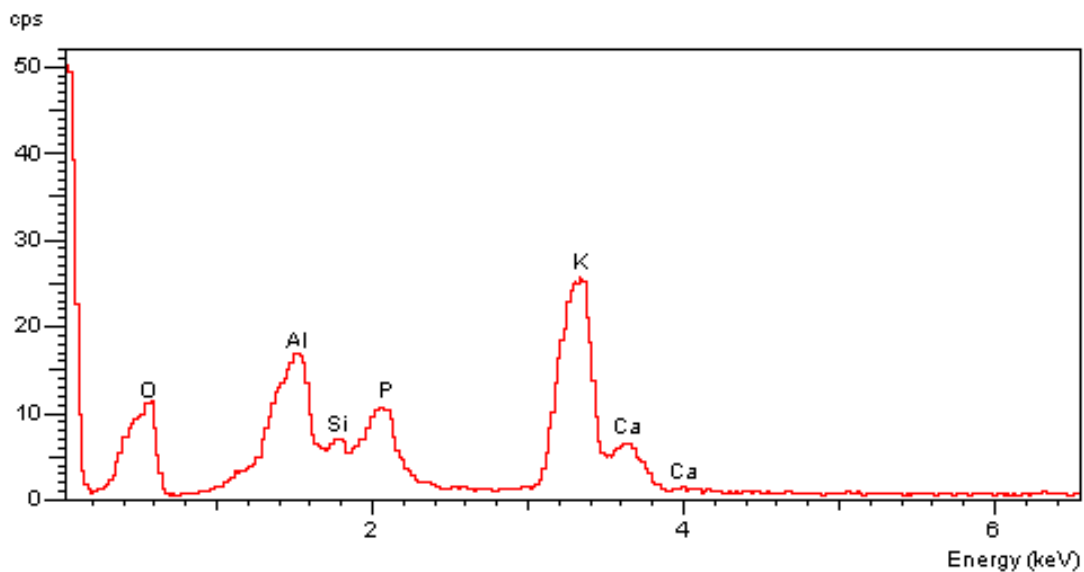


Figura 4.38 - Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) do resíduo obtido após a queima do amido de mandioca.

No caso do negro de fumo, o resíduo obtido após a queima também apresentou-se na forma de pó, porém de coloração mais escura (Figura 4.39). O resíduo representou apenas 0,1 % da massa inicial (perda ao fogo de 99,9 %).

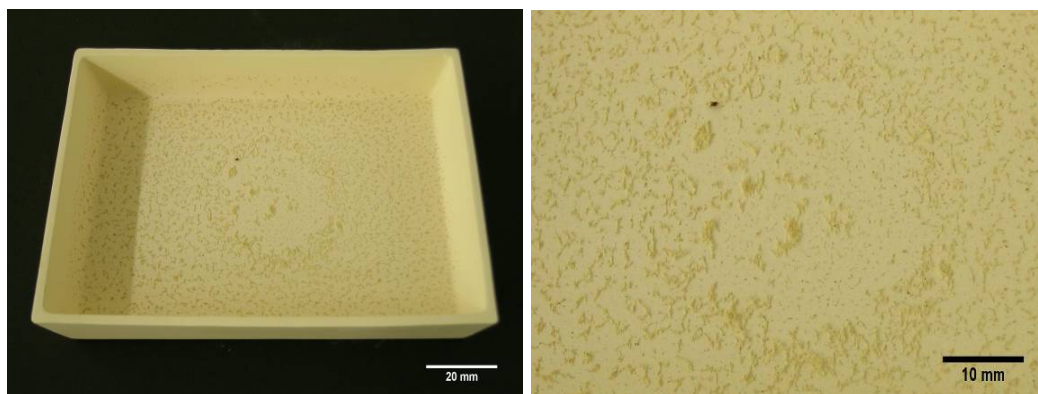


Figura 4.39 - Imagens do resíduo obtido após a queima do negro de fumo.

A análise por EDS apontou a presença de quantidades maiores de O, Si e Al (Figura 4.40). Elementos como K, Na e Ca estão presentes em concentrações menores. Também foram detectados traços de Fe e Ti, possíveis responsáveis pela coloração escura do pó.

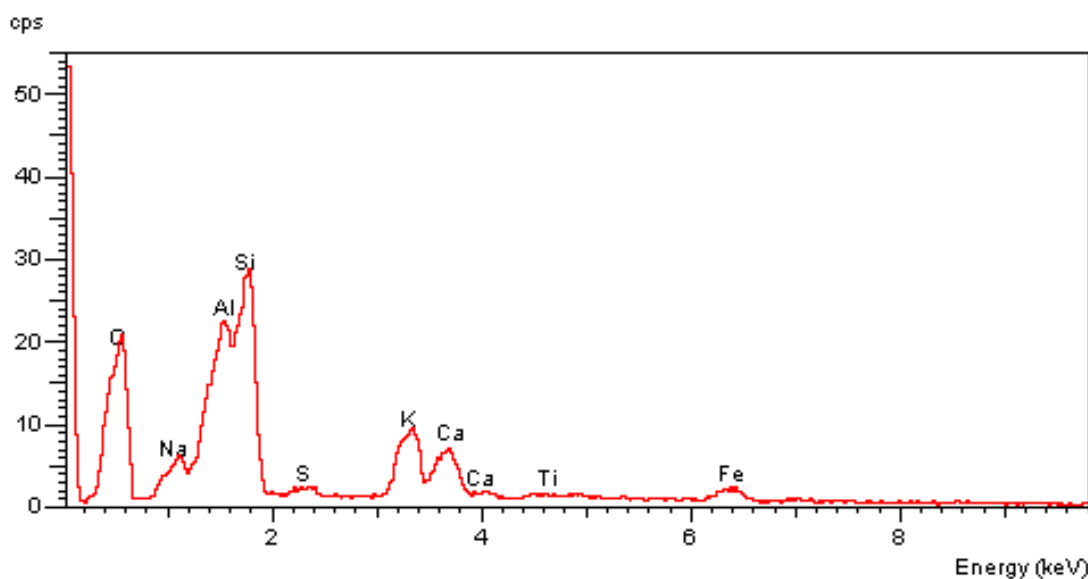


Figura 4.40 - Espectroscopia de energia dispersiva (EDS) do resíduo obtido após a queima do negro de fumo.

Na tabela 6, são apresentados a composição química dos resíduos obtidos após a queima dos agentes porogênicos e os respectivos valores de

perda ao fogo. É necessário ressaltar que a análise por EDS nos fornece apenas uma idéia semi-quantitativa da composição química dos resíduos.

Tabela 6 - Composição química determinada por EDS dos resíduos gerados após a queima dos agentes porogênicos e seus respectivos valores de perda ao fogo.

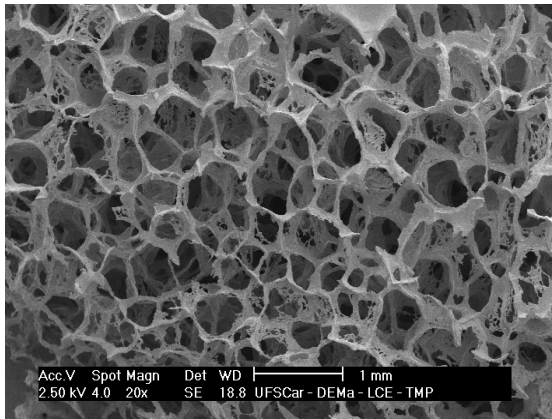
Elementos	Amido de Milho (ppm)		Amido de Mandioca (ppm)	Negro de Fumo (ppm)
	Região Vermelhada	Região Clara		
K	325	560	1085	40
Na	-	-	-	30
Ca	35	25	190	30
Mg	70	110	-	-
Al	280	400	520	70
Si	-	125	50	145
Fe	30	-	-	20
Ti	-	-	-	5
P	790	540	60	-
S	-	-	-	5
O	3470	3250	4090	660
Perda ao Fogo (%)	99,5		99,4	99,9

Não foram observados resíduos após a queima do nafataleno, das microesferas de polietileno e da espuma de poliuretano. Os resíduos não foram observados durante as análises da superfície de fratura dos *scaffolds* por microscopia eletrônica de varredura. Embora os resíduos estejam presentes em pequenas quantidades, testes de citotoxicidade direta devem ser realizados para que se possa concluir se a presença destes é prejudicial ou não.

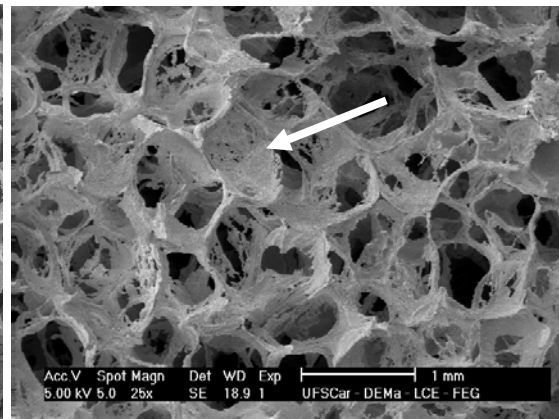
#### 4.6.3. *Scaffolds* obtidos através do método da réplica

Na figura 4.41, são apresentadas as micrografias da superfície de fratura dos *scaffolds* obtidos através do método da réplica. Para se ter uma melhor idéia da interconectividade dos poros e compará-la com os *scaffolds* obtidos via

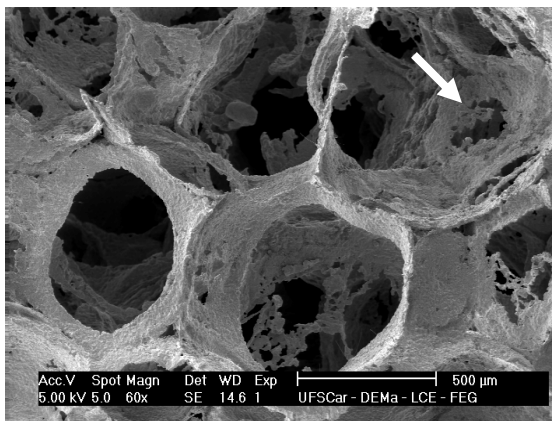
adição de agentes porogênicos, também foram incluídas micrografias dos *scaffolds* embutidos com resina epóxi.



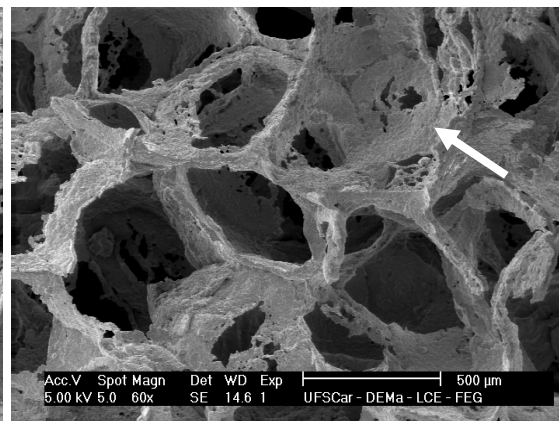
(a)



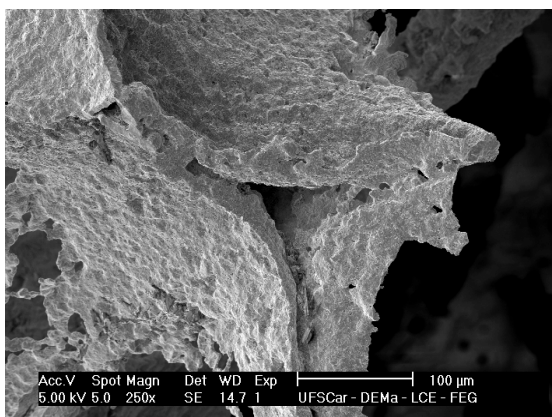
(b)



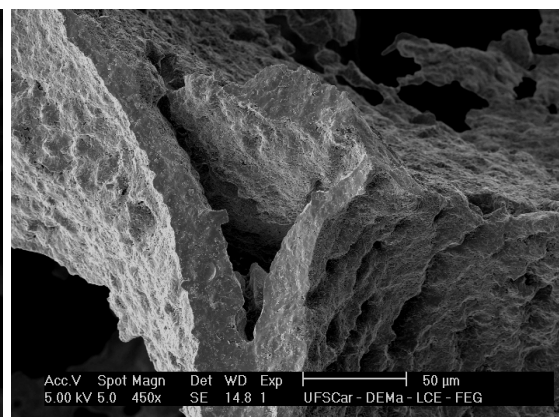
(c)



(d)



(e)



(f)



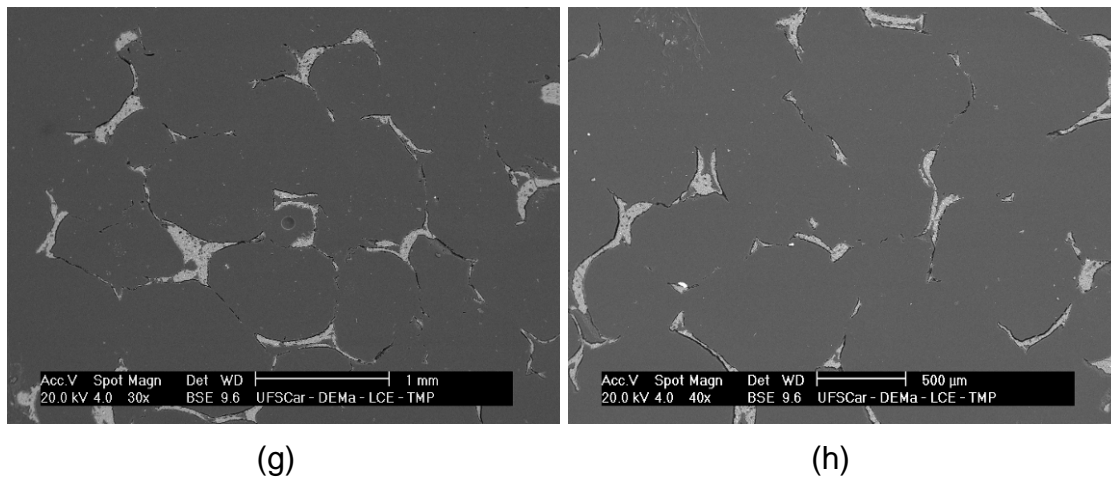


Figura 4.41 - Imagem da superfície de fratura (a-f) e seção transversal dos *scaffolds* de Biosilicato<sup>®</sup> embutidos em resina epóxi (g-h), obtidos a partir do método da réplica. As setas brancas indicam a presença de células fechadas.

Os *scaffolds* obtidos por esta técnica possuem uma estrutura celular altamente porosa e interconectada. No caso destes *scaffolds*, a porosidade total obtida pelo método geométrico é de aproximadamente 96% ( $\pm 3\%$ ). A análise de imagens revelou uma macroporosidade extremamente alta, em torno de 92% ( $\pm 2\%$ ). Por se tratar de uma estrutura celular, não foi aplicada a metodologia descrita no item 3.15.3 para a medida da distribuição da abertura dos canais interconectados; ao invés disso, mediu-se a abertura média das células das imagens da superfície de fratura dos *scaffolds*. Neste caso, a abertura das células está na faixa de 435 - 945  $\mu\text{m}$ , com um valor médio de 650  $\mu\text{m}$ , o que seria mais do que suficiente para garantir a vascularização do *scaffold*.

Pode ser observado em destaque (figura 4.41 b-d) a existência de algumas células parcialmente fechadas, decorrentes da remoção incompleta da barbotina. Observa-se também que a estrutura celular obtida é oca (figura 4.41 e-f), o que também contribui de maneira substancial para a diminuição das propriedades mecânicas do *scaffold*. Isto significa que a retração do Biosilicato<sup>®</sup> ocorrida na queima não é suficiente para eliminar o espaço vazio deixado pela espuma de poliuretano após a queima. Devido à estrutura oca



obtida e ao tamanho de poros excessivamente grande, os *scaffolds* obtidos apresentaram baixa resistência mecânica, chegando a comprometer o manuseio. Tanto a presença de células parcialmente fechadas como a formação de uma estrutura oca representam uma limitação da técnica da réplica já observada por outros autores [32, 45].

A resistência mecânica de *scaffolds* obtidos por esta técnica pode ser maximizada com a utilização de uma espuma com abertura de célula inicial menor ou com a aplicação de um recobrimento polimérico sobre o *scaffold*, utilizando-se polímeros reabsorvíveis como é o caso do poliácido lático (PLA) e do poliácido glicólico (PGA), como sugerido por Chen et al. [8] em seu estudo.



## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. A presença da fase secundária no Biosilicato<sup>®</sup> não é prejudicial, mas torna o nível de bioatividade do Biosilicato<sup>®</sup> ainda maior, chegando a ser comparável ao nível de bioatividade do Bioglass - 45S5. A presença da fase secundária reduziu o tempo para o início de formação da HCA no Biosilicato<sup>®</sup> de 10h para apenas 4h. Este tempo é inclusive inferior ao tempo necessário para a formação da HCA no Bioglass.
2. Uma explicação plausível para o aumento de bioatividade do Biosilicato<sup>®</sup> seria o fato da fase secundária apresentar uma maior solubilidade, de forma que os íons são liberados de forma mais rápida, acelerando as etapas IV e V da reação para a formação da HCA.
3. Foram determinadas as melhores condições de sinterização do Biosilicato<sup>®</sup>: 1075°C/1h. Nesta temperatura ocorre o surgimento de fase líquida que é responsável pela rápida densificação do material; a fase líquida recristaliza-se posteriormente, durante o resfriamento.
4. O naftaleno é parcialmente dissolvido pelo álcool isopropílico e recristaliza na forma de pequenos cristais durante a secagem da barbotina. Estes pequenos cristais ao serem eliminados, dão origem a poros muito pequenos que não são interessantes do que diz respeito às propriedades mecânicas ou vascularização do *scaffold*.
5. Através do uso dos amidos de milho e mandioca como agentes porogênicos, foram obtidos *scaffolds* formados por uma rede de canais altamente interconectados. Todavia, estes canais apresentaram abertura média em torno de 100  $\mu\text{m}$ , considerado um pouco abaixo do ideal para garantir a vascularização do *scaffold*. Isto pode ser explicado pelo fato

destes amidos fundirem parcialmente e retraírem durante a etapa de queima, promovendo a fluência e uma maior retração dos *scaffolds*.

6. O efeito da fusão é ainda mais drástico no caso do uso das microesferas de polietileno como agente porogênico, pois foram obtidos *scaffolds* com uma quantidade maior de poros fechados.
7. O melhor resultado com o método de adição de agentes porogênicos foi alcançado com o negro de fumo, onde foram obtidos *scaffolds* com uma estrutura altamente porosa (com macroporosidade de 80%) e interconectada, com abertura média dos canais de 230  $\mu\text{m}$ . Estas características são consideradas satisfatórias para a aplicação proposta.
8. A queima dos amidos geraram uma pequena quantidade de resíduos inorgânicos, menor do que 0,7% em peso. O negro de fumo gerou uma quantidade ainda menor: apenas 0,1% em peso.
9. Apesar de possuírem uma estrutura celular com poros na faixa de 435 - 945  $\mu\text{m}$  arredondar, os *scaffolds* obtidos pelo método da réplica apresentaram baixa resistência mecânica, chegando a comprometer o seu manuseio.

## 6. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- Pesquisar a possibilidade de modificar a microestrutura da vitrocerâmica do Biosilicato<sup>®</sup> no sentido de obter uma vitrocerâmica com cristais menores, de forma que a fase secundária fique homoganeamente dispersa.
- Estudar a sinterização do Biosilicato<sup>®</sup> no estado vítreo, na tentativa de eliminar a etapa de tratamento térmico do vidro e realizar sua sinterização em temperaturas mais baixas.
- Aperfeiçoar a porosidade dos *scaffolds* utilizando negro de fumo com um tamanho médio de grânulos superior.
- Realizar testes de citotoxicidade para verificar se a pequena quantidade de resíduos gerada pelos amidos e pelo negro de fumo é prejudicial ou não.
- Testar outros agentes porogênicos que não apresentem fusão, como é o caso dos polímeros termofixos.
- Utilizar uma espuma de poliuretano com abertura de células menor e aplicar recobrimento polimérico, utilizando-se polímeros reabsorvíveis como é o caso do poliácido lático (PLA) e do poliácido glicólico (PGA), de forma a maximizar a resistência mecânica dos *scaffolds*.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] RAVAGNANI, C. **Desenvolvimento de processo de produção em escala piloto do biosilicato para dentes sensíveis**. 2007. 228f. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

[2] STEVENS, M. M. Biomaterials for bone tissue engineering. **Materials Today**, v.11, n.5, p.18-25, 2008.

[3] ACKERMAN, L. **Bones and joints**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1976. (Monographs in Pathology).

[4] BAUER, T.W.; MUSCHLER, G.F. Bone graft materials: an overview of the basic science. **Clinical orthopaedics and related research**, v.371, p.10-27, 2000.

[5] SILBER, J.S. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. **Spine**, v.28, n.2, p.134-139, 2003.

[6] LORD, C.F. Infection in bone allografts: incidence, nature and treatment. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.70, n.3, p.369-376, 1988.

[7] GIANNOUDIS, P.V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury**, v.36S, p.S20-S27, 2005.

[8] CHEN, Q. Z.; THOMPSON, I. D.; BOCCACCINI, A. R. 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.27, p.2414-2425, 2006.

- [9] JONES, J.R.; GENTLEMAN, E.; POLAK, J. Bioactive glass scaffolds for bone regeneration. **Elements**, v.3, p.393-399, 2007.
- [10] KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v.26, p.5474-5491, 2005.
- [11] SALGADO, A.J.; COUTINHO, O.P., REIS, R.L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromolecular Bioscience**, v.4, p.743-765, 2004.
- [12] GAUTHIER, O. et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. **Biomaterials**, v.11, n.3, p.133-139, 1998.
- [13] HENCH, L. L.; Bioceramics: from concept to clinics. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.
- [14] MIKOS, A.G.; TEMENOFF, J.S. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, n.2, p.1-5, 2000.
- [15] PEITL, O. **Vitrocerâmica bioativa de alto desempenho mecânico**. 1995. 369f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995.
- [16] VITALE-BROVARONE, C. et al. Development of glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering: characterization, proliferation of human osteoblasts and nodule formation. **Acta Biomaterialia**, v.3, n.2, p.199-208, 2007.



- [17] NAVARRO, M. et al. New macroporous calcium phosphate glass ceramic for guided bone regeneration. **Biomaterials**, v.25, p.4233-4241, 2004.
- [18] SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J.T. Making tissue engineering scaffolds work: review on the applications of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **European Cells and Materials**, v.5, p.29-40, 2003.
- [19] VANDER, A.J.; SHERMAN, J.H.; LUCIANO, D.S. **Human physiology**, New York: McGraw-Hill, 1985.
- [20] GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Textbook of medical physiology**. 3A. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1996.
- [21] JONES, J.; HENCH, L.L. Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v.7, p.301-307, 2003.
- [22] VACCARO, A.R. The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. **Orthopedics**, v.25, p.S571–S578, 2002.
- [23] FREYMAN, T.M.; YANNAS, I.V.; GIBSON, L.J. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. **Progress in Materials Science**, v.46, n. 3-4, p.273-282, 2001.
- [24] HUTMACHER, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v.21, p.2529-2543, 2000.
- [25] HOLLY, C.E.; SCHOICHET, M.S.; DAVIES, J.E. Engineering three-dimensional bone tissue *in vitro* using biodegradable scaffolds: Investigating

initial cell-seeding density and culture period. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.51, n.3, p.376-382, 2000.

[26] AGRAWAL, C.M.; RAY, R.B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 55, n.2, p.141-150, 2001.

[27] LEONG, K.F.; CHEAH, C.M.; CHUA, C.K. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. **Biomaterials**, v.24, n.13, p.3262-3278, 2003.

[28] COWIN, S.C. **Bone mechanics**. Boca Raton, Flórida: CTC Press, 1989.

[29] GIBSON, L.J.; ASHBY, M.F. **Cellular solids: structure and properties**. Oxford: Pergamon, 2ed., 1999.

[30] LOGEART-AVRAMOGLU, D. et al. Engineering bone: challenges and obstacles. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.9, n.1, p.72-84, 2007.

[31] TAMAI, N. et al. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure inhibit superior osteoconduction *in vivo*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.59, p.110-117, 2002.

[32] CHEN, Q. Z.; THOMPSON, I. D.; BOCCACCINI, A. R.; 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.27, p.2414-2425, 2006.

[33] LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue Engineering. **Science**, v.260, p.920-925, 1993.

- [34] AGRAWAL, C.M.; ATHANASIOU, K.A.; HECKMAN, J.D. Biodegradable PLA-PGA polymers for tissue engineering in orthopaedics. **Materials Science Forum**, v.250, p.115-228, 1997.
- [35] SCHIEKER, M. et al. Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering. **European Journal of Trauma**, v.32, n.2, p.114-124, 2006.
- [36] NISHIGUCHI, S. et al. Alkali and heat-treated porous titanium for orthopedic implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.54, n.2, p.198-208, 2001.
- [37] PILLIAR, R. M.; Overview of surface variability of metallic endosseous dental implants: textured and porous surface-structured designs. **Implant Dentistry**, v.7, n.4, p.305-314, 1998.
- [38] VAN DEN DOLDER, J. et al. Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, v.24, n. 0, p.1745-1750, 2003.
- [39] SIKKAVITSAS, V. I. et al. Influence of the *in vitro* culture period on the *in vivo* performance of cell/titanium bone tissue-engineered constructs using a rat cranial size defect model. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v.67, n.3, p.944-951, 2003.
- [40] RUBIN, J. P.; YAREMCHUK, M. J. Complications and toxicities of implantable biomaterials used in facial reconstructive and aesthetic surgery: a comprehensive review of the literature. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.100, n.5, p.1336-1353, 1997.

- [41] MAQUET, V.; JEROME, R. Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation. **Materials Science Forum**, v.250, p.15-42, 1997.
- [42] GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Acta Materialia**, v.48, n.1, p.263-277, 2000.
- [43] SCHLIEPHAKE, H. et al. Enhancement of bone ingrowth into a porous hydroxyl-apatite matrix using a resorbable polylactic membrane: an experimental pilot study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.52, n.1, p.57-63, 1994.
- [44] COLOMBO, P. Conventional and novel processing methods for cellular ceramics. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v.364, p.109-124, 2006.
- [45] STUART, A. R. et al. Processing routes to macroporous ceramics: a review. **Journal of the American Ceramic Society**, v.89, n.6, p.1771-1789, 2006.
- [46] CAMILO, C. C. **Escafolds para implantes ósseos em alumina/hidroxiapatita /biovidro: análises mecânica e *in vitro***. 2006. 145f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- [47] MONARETTI, F. H. **Estudo de método e técnicas de manufatura de corpos porosos estruturais para engenharia de tecidos**. 2005. 92f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) de Mestrado, – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

[48] RAMAY, H. R.; ZHANG, M. Q. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods. **Biomaterials**, v.24, n.19, p.3293-3302, 2003.

[49] EBARETONBOFA, E.; EVANS, J.R.G. High porosity hydroxyapatite foam scaffolds for bone substitute. **Journal of Porous Materials**, v.9, n.4, p.257-263, 2002.

[50] TANCRED, D. C.; CARR, A. J.; MCCORMACK, B.A.O.; Development of a new synthetic bone graft. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.9, n.12, p.819-823, 2004.

[51] JONES, J.R.; BOCCACCINI, A.R. Cellular ceramics in biomedical applications: tissue engineering. In: Scheffler M, Colombo P, editors. **Cellular ceramics: structure, manufacturing, processing and applications**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KgaA; p. 550-573, 2005.

[52] JONES, J.R.; HENCH, L.L. Factors affecting the structure and properties of bioactive foam scaffolds for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v.68, p.36-44, 2004.

[53] SEPULVEDA, P.; HENCH, L.L. Synthesis of bioactive macroporous scaffolds. In: Congresso Brasileiro de Cerâmica, 45, 2001, Florianópolis. Anais. Florianópolis: Associação Brasileira de Cerâmica, 2001. p.1701101-1701111.

[54] HENCH, L.L. et al. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.2, n.1, p.117-141, 1972.

[55] WILSON, J.; NOLETTI, D.; Bonding of soft tissues to bioglass. In: CHRISTEEL, A.; MEUNIER, A.C.J.L. (Ed.). **Biological and Biomechanical**

**Performance of Biomaterials.** Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1986.  
p. 99-104.

[56] BIOXID, O.Y. et al. Use of bioactive silicious glass and new compositions containing bioactive silicious glass. Int. C. C03C003/078, 06 Oct. 1994, 18 Apr. 1996. **U.S. Patent Documents**, n. 5891233.

[57] LITKOWSKI, L.J.; HACK, G.D. GREENSPAN, D.C. Compositions containing bioactive glass and their use in treating tooth hypersensitivity. **U.S. Patent Documents**, n. 5735942, 1998.

[58] HENCH, L.L.; WILSON, J. An introduction to bioceramics. Singapore: **World Scientific**, 1993.

[59] HENCH, L.L.; POLAK, J.M. Third-generation biomedical materials. **Science**, v.295, p.1014-1017, 2002.

[60] 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.55A, p.151-157, 2001.

[61] LI, P. et al. The effect of residual glassy phase in a bioactive glass-ceramic on the formation of its surface apatite layer *in vitro*. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.3, p.452-456, 1992.

[62] PEITL, O.; LA TORRE, G.; HENCH, L.L. Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.30, p.509-514, 1996.

[63] PEITL, O.; ZANOTTO, E.D.; HENCH, L.L. Highly bioactive P2O5-Na2O-CaO-SiO2 glass-ceramics. **Journal of Non-crystalline Solids**, v.292, p.115-126, 2001.

[64] ZANOTTO, E.D. et al. **Processo de preparação de biosilicatos particulados bioativos e reabsorvíveis, composições para preparar ditos biosilicatos, biosilicatos particulados bioativos e reabsorvíveis e uso dos mesmos no tratamento de afecções bucais**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; Universidade de São Paulo, 2003. Classificação Internacional C03C10/00, INPI 03006441.

[65] ZANOTTO, E.D. et al. **Process and compositions for preparing particulate, bioactive or resorbable biosilicates for use in the treatment of oral ailments**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; Universidade de São Paulo, 2004. Classificação Internacional C03C10/00, INPI 03006441.

[66] TIRAPELLI, C.; **Avaliação da eficácia de um biomaterial e conhecidos agentes dessensibilizantes no tratamento da hipersensibilidade dentinária – estudos *in vitro* e *in vivo***. Relatório Técnico da FAPESP, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

[67] CAVANI, J. **Biosilicato<sup>®</sup> para tratamento da hipersensibilidade dentinária**. Relatório técnico do CNPq, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

[68] MOURA, J. et al. *In vitro* osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate<sup>®</sup>). **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 82, p. 545-557, 2007.

- [69] GREENWALD, A.S. et al. Bone-graft substitutes: facts, fictions and applications. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.83, p.S98-S103, 2008.
- [70] Disponível em: <<http://www.curasan.de>>. Acesso em: 21 mai. 2008.
- [71] Disponível em: <<http://www.synthes.com>>. Acesso em: 21 mai. 2008.
- [72] Disponível em: <<http://www.orthovita.com>>. Acesso em: 21 mai. 2008.
- [73] Disponível em: <<http://www.geistlich.com>>. Acesso em: 21 mai. 2008.
- [74] Disponível em: <<http://www.aap.de>>. Acesso em: 21 mai. 2008.
- [75] Disponível em: <<http://www.bionnovation.com.br>>. Acesso em: 22 mai. 2008.
- [76] Disponível em: <<http://www.ceramisis.com>>. Acesso em: 22 mai. 2008.
- [77] Disponível em: <<http://www.eincobio.com.br>>. Acesso em: 22 mai. 2008.
- [78] Disponível em: <<http://www.baumer.com.br>>. Acesso em: 22 mai. 2008.
- [79] Disponível em: <<http://www.novabone.com>>. Acesso em: 22 mai. 2008.
- [80] SOARES, V.O. **Vitrocerâmicas do sistema  $\text{Li}_2\text{O}-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$  (LAS) via sinterização com cristalização concorrente**. 2007. 128 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.



- [81] KOKUBO, T.; KUSHITANI, H. Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A/W. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.24, n.6, p.721-734, 1990.
- [82] SILVA, M.H.P. et al. Porous glass reinforced hydroxyapatite materials produced with different organic additives. **Journal of Non-crystalline Solids**, v.304, n.1-2, p.286-292, 2002.
- [83] RODRIGUES-LORENZO, L.M.; VALLET-REGI, M.; FERREIRA, J.M.F. Fabrication of porous hydroxyapatite bodies by a new direct consolidation method: starch consolidation. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.60, n.2, p.232-240, 2002.
- [84] YANG, L. et al. Preparation of porous hydroxyapatite ceramics with starch additives. **The Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v.15, n.2, p.257-260, 2005.
- [85] DEHOFF, R.T.; RHINES, F.N. **Quantitative microscopy**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1968.
- [86] AMERICAN STANDARD FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM) **Standard test method for stereological evaluation of porous coatings on medical implants (F1854-98)**, Annual Book of ASTM Standards, vol. 03.01, 1998.
- [87] Disponível em: <<http://www.webmineral.com>>. Acessado em: 11 fev. 2008.
- [88] RAVAGNANI, C. **Biosilicato<sup>®</sup> para promoção da saúde oral**. 2003. 161f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.