

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA  
E ENGENHARIA DE MATERIAIS

ESTUDO DO BIOPOLÍMERO POLI ( $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO) PARA APLICAÇÃO  
NA FIXAÇÃO E REGENERAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO

Francisco Vieira de Oliveira

Campina Grande  
AGOSTO / 2013

**ESTUDO DO BIOPOLÍMERO POLI ( $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO) PARA APLICAÇÃO  
NA FIXAÇÃO E REGENERAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO**

**Autor**

**Francisco Vieira de Oliveira**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Silveira Rabello**

**Co-orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook**

**CAMPINA GRANDE**

**AGOSTO / 2013**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIÓTECA CENTRAL DA UFCCG

O48e

Oliveira, Francisco Vieira de.

Estudo do biopolímero poli ( $\beta$ -hidroxibutirato) para aplicação na fixação e regeneração de tecido ósseo / Francisco Vieira de Oliveira. – 2013.  
180 f. : il. Color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.

"Orientação: Prof. Dr. Marcelo Silveira Rabello, Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook".

Referências.

1. PHB. 2. Bioatividade. 3. *Apatita*. 4. Tecido Ósseo. I. Rabello, Marcelo Silveira. II. Fook, Marcus Vinícius Lia. III. Título.

CDU 678.7(043)

**ESTUDO DO BIOPOLÍMERO (POLI (  $\beta$  - HIDROXIBUTIRATO) PARA  
APLICAÇÃO NA FIXAÇÃO E REGENERAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO.**

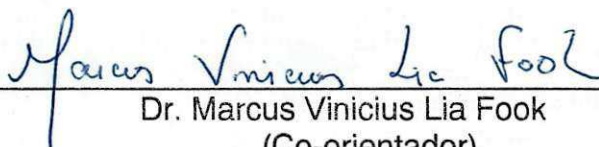
**Francisco Vieira de Oliveira**

Tese Aprovada em 15/08/2013 pela banca examinadora constituída dos seguintes  
membros:



---

Dr. Marcelo Silveira Rabello  
(Orientador)  
UAEMa/UFCG



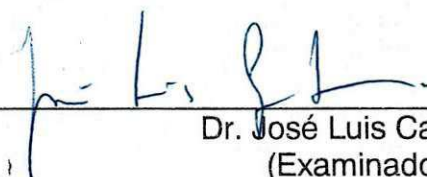
---

Dr. Marcus Vinicius Lia Fook  
(Co-orientador)  
UAEMa/UFCG



---

Dr.ª Eliana Cristina da Silva Rigo  
(Examinadora Externa)  
USP



---

Dr. José Luis Cardozo Fonseca  
(Examinador Externo)  
UFRN



---

Dr. Hélio de Lucena Lira  
(Examinador Interno)  
UAEMa/UFCG



---

Dr.ª Suédina Maria de Lima Silva  
(Examinadora Interna)  
UAEMa/UFCG



**FRANCISCO VIEIRA DE OLIVEIRA**

**CURRICULUM VITAE**

- 3º GRAU (GRADUAÇÃO)      UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CAMPUS II – CCBS CAMPINA GRANDE-PB  
PERÍODO: 1981 – 1987 (JULHO)  
CURSO DE MEDICINA  
DIPLOMA: REGISTRO Nº. 387 LIVRO 1 FOLHAS 387  
PROCESSO Nº. 005508/87
- 3º GRAU (PÓS-GRADUAÇÃO)      UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS  
PERÍODO: MAR/2007 - DEZ/2008  
MESTRADO (TÍTULO: Modificação da superfície do PEUAPM com depósito de apatita para osteossíntese)
- RESIDÊNCIA MÉDICA (ESPECIALIZAÇÃO)      HOSPITAL CENTRAL DO IASERJ – RIO DE JANEIRO-RJ  
ESPECIALIDADE: ORTOPEDIA /TRAUMATOLOGIA  
PERÍODO: 1988 – 1990  
APROVAÇÃO EM CONCURSO PÚBLICO  
PUBLICADO NO DIÁRIO OFICIAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
EM 11 DE FEVEREIRO DE 1988, ANO XIV      Nº. 26 – PARTE I. PODER EXECUTIVO.

TÍTULO DE ESPECIALISTA PELA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA E ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA EM 11 DE JANEIRO DE 1993.

MEMBRO TITULAR DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA EM 11 DE JANEIRO 1996.

### .III. ATIVIDADES DIDÁTICAS E TÉCNICO-ADMINISTRATIVAS

PROFESSOR PELA UNIVERSIDADE FEDERAL DE C. GRANDE.  
RETIDE CAMPUS I – CCBS – CAMPINA GRANDE-PB  
DISCIPLINA: ORTOPEDIA / TRAUMATOLOGIA  
PERÍODO: ABRIL DE 1993 (PORTARIA / R / SRH  
Nº. 687/93).

FOI MEMBRO EFETIVO DO CONSELHO SUPERIOR DE ENSINO,  
EXTENSÃO E PESQUISA.

PERÍODO: AGOSTO DE 1997 A AGOSTO DE 1999

TRABALHOS AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DO POLI  
PUBLICADOS (HIDROXIBUTIRATO) VISANDO APLICAÇÕES ORTOPÉDICAS  
VIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE CAMPINA GRANDE. CAMPINA GRANDE - 2011.

RECOBRIMENTO BIOMIMÉTICO EM POLI (HIDROXIBUTIRATO)  
12º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS (12ºCBPol).  
FLORIANÓPOLIS SC – SET/2013.

### IDENTIFICAÇÃO

NACIONALIDADE.....BRASILEIRA  
NATURALIDADE.....SOUSA – PB  
ESTADO CIVIL.....CASADO  
NASCIMENTO.....15 DE DEZEMBRO DE 1961  
PROFISSÃO.....MÉDICO E PROF. UNIVERSITÁRIO  
FILIAÇÃO.....ANTONIO ADELINO DE OLIVEIRA  
MARIA NASARÉ VIEIRA  
ENDEREÇO.....RUA JOSÉ DE ALENCAR, 871 APT.801 BAIRRO  
PRATA CAMPINA GRANDE-PB  
TELEFONE.....(83) 3341.8535 9971.3486  
DOCUMENTAÇÃO.....CARTEIRA DE IDENTIDADE 724.04 SSP-PB  
CPF: 281.780. 924 – 68  
EMAIL.....FVIEIRA.OLIVEIRA@UOL.COM.BR

## DEDICATÓRIA

À Deus, por ser a energia maior que nos fortalece.

A minha esposa, Luciana Rabello e aos nossos filhos: Lucas, Letícia e Lorena,  
pelo apoio e compreensão.

Ao meu pai (in memoriam) e minha mãe, responsáveis pelos primeiros passos  
desta grande caminhada.

Ao Professor Fernando Rabello, pelo incentivo e motivação, na concretização  
deste trabalho. E a Professora, Maria Luiza Rabello (in memoriam), pelo  
exemplo e dedicação ao ensino.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Silveira Rabello, pela dedicação e seriedade no exercer desta árdua função de educador.

Ao co-orientador, Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook, pelo exemplo de doação e perseverança a uma causa tão nobre, a educação.

Aos Professores Doutores: Suédina Maria e Hélio de Lucena, pela contribuição grandiosa na evolução e concretização desta obra.

A todo corpo docente, deste programa de pós-graduação, que direto ou indiretamente, participaram na construção do conhecimento necessário, para realização desta tese.

A Profa. Dra. Kaline Melo, que mesmo a distância, cumpriu seu papel de Professora preparada e motivadora.

Ao Dr. Rossemberg Cardoso, através do qual, agradeço a todos os Doutores (as) pesquisadores (as) do laboratório CERTBIO.

Ao Doutorando Wladymyr Jefferson B. de Sousa, deste modo representando, todos os doutorandos (as) e mestrandos (as) desta pós-graduação.

A Magna, pela sua maturidade e equilíbrio no convívio do dia a dia, como pesquisadora iniciante.

A Leticia Rabello pelo trabalho cuidadoso na formatação dos gráficos e tabelas.

A todos os funcionários que fazem diuturnamente, com dedicação e prazer o laboratório CERTBIO.

As secretárias, Márcia e Mila, pela presteza e eficiência as funções que exercem e através delas, quero agradecer também a todos os funcionários que fazem a Engenharia de Materiais.

## RESUMO

Esta tese tem como objetivo propor a utilização de um material polimérico biodegradável, o PHB (poli ( $\beta$ -hidroxibutirato)) para osteosíntese e regeneração de tecido ósseo. Para isto, realizou-se um estudo investigativo do desempenho do PHB, analisando fatores como: bioatividade, biodegradação, biocompatibilidade, propriedades mecânicas e térmicas. Para a avaliação da bioatividade do PHB, este foi submetido ao contato com um ambiente, mimetizando o meio biológico, a solução de SBF (Simulated Body Fluid), determinando a morfologia, a composição química e a hidrofiliçidade destas placas de PHB após a interação com este meio. Para o estudo da biodegradação, o PHB foi submetido ao contato com uma solução tampão (PBS) e lisozima. A avaliação das propriedades mecânicas foi realizada antes e após as placas serem submersas na solução tampão com lisozima. A biocompatibilidade foi determinada por meio do teste de viabilidade celular, utilizando o método do MTT e da produção de óxido nítrico (NO). As amostras do PHB foram caracterizadas estrutural e morfológicamente, através das análises de DRX, FTIR, MEV, EDS, MO, MFA, ângulo de contato, TG/DTG, DSC, TMA e ensaios de tração e flexão. Após a avaliação dos resultados obtidos *in vitro*, conclui-se que: o PHB mesmo sendo um polímero hidrofóbico, mostrou que após o ataque com peróxido de hidrogênio, ficou mais receptiva, adquirindo um comportamento bioativo; apresentou discreta biodegradação superficial sem comprometimento estrutural e manteve as propriedades mecânicas próximas do PHB original ao final do período de 180 dias de exposição ao ambiente biodegradável. Por fim, comprovou-se que o PHB é um polímero biocompatível, pois através da determinação da porcentagem da viabilidade celular e a determinação da produção de óxido nítrico (NO), apresentou um resultado de 87,22% e 3,5 respectivamente, muito próximo às médias dos grupos controles realizados.

Palavras-chaves: PHB, bioatividade, apatita, tecido ósseo.

## ABSTRACT

This thesis aims to propose the use of a biodegradable polymeric material PHB (poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate)) for osteosynthesis and bone tissue regeneration. For this, we carried out an investigative study about performance of PHB, analyzing factors such as bioactivity, biodegradability, biocompatibility, mechanical and thermal properties. To evaluate the bioactivity of PHB, it has been subjected to a contact with an environment mimicking the biological environment, the SBF solution, determining the morphology, chemical composition and hydrophilicity of these plates PHB after interacting with these medium. For the biodegradation study, the PHB was subjected to a contact with a buffer solution (PBS) and lysozyme. The evaluation of mechanical properties was performed before and after that the plates were immersed in the buffer solution with lysozyme. The biocompatibility was determined by the cell viability test using the MTT method and nitric oxide (NO) production. The PHB samples were characterized structurally and morphologically through the analysis of XRD, FTIR, SEM, EDS, OM, AFM, contact angle, TG / DTG, DSC, TMA and tensile and bending trials. After the evaluation of the results obtained *in vitro*, it is concluded that: PHB even being a hydrophobic polymer, showed that after the attack with hydrogen peroxide, became more receptive, acquiring a bioactive behavior, has presented slight surface degradation without structural compromising and remained mechanical properties near the original PHB in the end of the period of 180 days of exposure to biodegradable ambient. Finally, it was proved that PHB is a biocompatible polymer, because by determining the percentage of cell viability and determination of nitric oxide (NO), had a score of 87,22% and 3.5 respectively, very close to the mean of the control groups performed.

**Keywords:** PHB, bioactivity, apatite, bone tissue.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1.1 Objetivos</b> .....	26
1.1.1 Objetivo Geral .....	26
1.1.2 Objetivos Específicos.....	26
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	27
<b>2.1 Estrutura óssea</b> .....	27
2.1.1 Células do tecido ósseo .....	30
2.1.2 Tipos de tecido ósseo.....	32
2.1.3 Histogênese.....	34
2.1.4 Crescimento e remodelação dos ossos.....	35
2.1.5 Reparação das Fraturas .....	38
2.1.6 Papel metabólico do tecido ósseo .....	39
2.1.7 Propriedades mecânicas do osso .....	40
2.1.8 Classificação das fraturas.....	42
2.1.9 Biomecânica das fraturas.....	43
<b>2.2 Biomateriais</b> .....	44
2.2.1 Biomateriais cerâmicos .....	51
2.2.2 Biomateriais metálicos .....	57
2.2.3 Materiais poliméricos.....	61
2.2.3.1 Poli (hidroxialcanoatos) (PHA).....	71
2.2.3.2 Poli (hidroxibutirato) (PHB) .....	72
<b>2.5 Polímeros utilizados na reparação óssea</b> .....	78
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	88
<b>3.1 Materiais e Reagentes</b> .....	88
<b>3.2 Métodos</b> .....	89
3.2.1 Avaliação da Bioatividade .....	89
3.2.1.1. Caracterização.....	92
3.2.1.1.1 Difração de raios X (DRX).....	93

3.2.1.1.2 Espectroscopia da região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	94
3.2.1.1.3 Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) .....	95
3.2.1.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	96
3.2.1.1.5 Microscopia ótica (MO) .....	96
3.2.1.1.6 Microscopia de força atômica (AFM) .....	97
3.2.1.1.7 Ângulo de contato / molhamento .....	98
<b>3.2.2 Avaliação da biodegradabilidade</b> .....	100
<b>3.2.2.1 Caracterização</b> .....	101
3.2.2.1.1 Determinação da perda de massa .....	103
3.2.2.1.2 Termogravimetria (TG) / Termogravimetria derivada (DTG) .....	103
3.2.2.1.3 Calorimetria diferencial exploratória (DSC) .....	104
3.2.2.1.4 Análise termomecânica (TMA) .....	104
3.2.2.1.5 Viscosimetria .....	105
3.2.2.1.6 Espectroscopia da região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	107
3.2.2.1.7 Propriedades mecânicas .....	107
3.2.2.1.8 Microscopia de força atômica (AFM) .....	109
<b>3.2.3 Avaliação da biocompatibilidade</b> .....	109
3.2.3.1 Avaliação da viabilidade celular .....	109
3.2.3.1.1 Método de MTT .....	109
3.2.3.1.2 Método da determinação da produção de óxido nítrico (NO) .....	111
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	113
<b>4.1 Avaliações da Bioatividade</b> .....	113
4.1.1 Primeira etapa: PHB Puro e sem ataque. ....	113
4.1.1.1 Difração de Raios X (DRX) .....	113
4.1.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). ....	115
4.1.1.3 Espectroscopia por energia dispersiva (EDS) .....	116
4.1.2 Segunda etapa: PHB Puro e atacados. ....	118
4.1.2.1 Difração de raios X (DRX) .....	118
4.1.2.2 Espectroscopia da região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	120



4.1.2.3 Espectroscopia por energia dispersiva (EDS).....	121
4.1.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	123
4.1.2.5 Microscopia ótica (MO) .....	125
4.1.2.6 Microscopia de força atômica (AFM).....	128
4.1.2.7 Ângulo de contato/ molhamento.....	133
<b>4.2 Avaliação da biodegradabilidade .....</b>	<b>136</b>
4.2.1 Procedimento (A) .....	136
4.2.1.1 Determinação da perda de massa (Peso).....	136
4.2.1.2 Termogravimetria (TG/DTG) .....	137
4.2.1.3 Calorimetria diferencial exploratória (DSC) .....	142
4.2.1.4 Análise termomecânica (TMA) .....	143
4.2.1.5 Viscosimetria.....	145
4.2.1.6 Espectroscopia da região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	147
4.2.1.7 Propriedades mecânicas.....	149
4.2.2 Procedimento (B) .....	153
4.2.2.1 Variação de massa (Peso) .....	154
4.2.2.2 Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	155
4.2.2.3 Microscopia de força atômica (AFM).....	156
<b>4.3 Avaliação da biocompatibilidade.....</b>	<b>161</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>164</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>165</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação do módulo de elasticidade e resistência à tração dos metais, cerâmicas e polímeros com os tecidos rígidos. ....	47
Tabela 2. Propriedades de fosfatos de cálcio biologicamente importantes. ....	55
Tabela 3: Fosfatos de cálcio em sistemas biológicos .....	56
Tabela 4: Poli ( $\alpha$ -hidroxi ácidos), polímeros sintéticos bioabsorvíveis. ....	67
Tabela 5: Principais famílias de bioplásticos. ....	70
Tabela 6: Algumas propriedades físico-químicas do PHB, PHB-HV, PP e PVC. ....	73
Tabela 7: Propriedades físicas de alguns biopolímeros .....	75
Tabela 8. Concentração iônica do plasma sanguíneo humano e da solução que simula o fluido corporal (SBF) .....	90
Tabela 9. Quantidade e sequência operacional de adição dos sais utilizados para a preparação da solução (SBF) nas concentrações de 1,0 e 1,5M. ....	90
Tabela 10: Amostras de PHB e as condições experimentais estudadas. ....	92
Tabela 11: Ângulos e condições de molhamento. ....	98
Tabela 12: Quantidade de recipientes e corpos de prova no primeiro ensaio, procedimento (A) de biodegradação <i>in vitro</i> . ....	100
Tabela 13: Quantidade de recipientes e corpos de prova no segundo ensaio, procedimento (B) de biodegradação <i>in vitro</i> . ....	101
Tabela 14: Análise química por energia dispersiva das amostras de PHB estudadas. ....	118
Tabela 15: Variação percentual de massa no ensaio de biodegradação .....	136
Tabela 16. Coeficiente de expansão térmica. ....	144
Tabela 17. Massa molar viscosimétrica das amostras submetidas à biodegradação. ....	145

Tabela 18. Propriedades mecânicas em tração do PHB.....	150
Tabela 19. Propriedades mecânicas em tração das amostras de PHB submetidas à biodegradação. ....	151
Tabela 20: Resultados do ensaio de flexão do PHB. ....	153
Tabela 21: Viabilidade celular quando em contato com o PHB em relação ao grupo controle. ....	162
Tabela 22: Produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos quando em contato com PHB e grupo controle. ....	163

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo da estrutura óssea. ....	30
Figura 2: Representação da estrutura interna de um osso longo.....	33
Figura 3: Esquema simplificado da remodelação óssea. ....	37
Figura 4: Mecanismo simplificado de osteoclastogênese. ....	38
Figura 5: Célula humana em crescimento em superfície de hidroxiapatita .....	52
Figura 6: Rede Cristalina da hidroxiapatita .....	54
Figura 7: Artefatos metálicos usados na Ortopedia e Odontologia .....	59
Figura 8: Fratura de placa metálica do fêmur.....	60
Figura 9: Polímeros usados como biomateriais. ....	63
Figura 10: A bactéria Burkholderi a sacchari e a produção do PHB. ....	69
Figura 11: Estrutura geral dos poli (hidroxialcanoatos).....	71
Figura 12: Produção do PHB. ....	76
Figura 13: Tipo de implante utilizado atualmente (a) e situação proposta (b)..	77
Figura 14: Placas poliméricas de PHB utilizadas nesta tese. ....	88
Figura 15: Metodologia experimental utilizada para a avaliação da Bioatividade.....	93
Figura 16: Planos cristalinos formados por átomos ordenados.....	94
Figura 17: Observação do ângulo de contato formado entre um sólido e um líquido .....	99
Figura 18: Determinação do ângulo de contato. (a) Equipamento utilizado para a determinação do ângulo de contato, vista geral do equipamento, (b) detalhe do porta amostra. ....	99
Figura 19: Metodologia experimental utilizada para biodegradabilidade, procedimento (A).....	102

Figura 20: Metodologia experimental utilizada para biodegradabilidade, procedimento (B).....	102
Figura 21: Gráfico para a determinação da viscosidade intrínseca de um polímero.....	106
Figura 22: Difração de raios X da amostra PHB Puro.....	114
Figura 23: Difração de raios X da amostra PHB/1,0 SBF.....	114
Figura 24: Difração de raios X da amostra PHB/1,5 SBF.....	115
Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura da amostra PHB/1,0 SBF....	115
Figura 26: Microscopia eletrônica de varredura da amostra PHB/1,5 SBF....	116
Figura 27: Análise química por EDS da amostra PHB/1,0 SBF.....	117
Figura 28: Análise química por EDS da amostra PHB/1,5 SBF.....	117
Figura 29: Difractogramas das amostras de PHB estudadas: (a) PHB puro, (b) PHB atacado com $H_2O_2$ , (c) PHB atacado com $H_2O_2$ e exposto à SBF 1,0M e (d) PHB atacado com $H_2O_2$ e exposto à SBF 1,5M.....	119
Figura 30: Espectroscopia da região do infravermelho com transformada de Fourier para as amostras de PHB estudadas: PHB Puro (a), PHB atacado (b), PHB atacado e exposto à solução de SBF a 1,0M (c) e PHB atacado e exposto à solução de SBF a 1,5M (d).....	120
Figura 31: Espectroscopia por energia dispersiva da amostra PHB exposto à solução de SBF.....	122
Figura 32: Espectroscopia por energia dispersiva da amostra PHB exposto à solução de SBF 1,5M.....	122
Figura 33: Microscopia eletrônica de varredura da amostra PHB Puro.....	123
Figura 34: Microscopia eletrônica de varredura da amostra PHB atacado e exposto à solução de SBF 1,0M (a e b).....	124
Figura 35: Microscopia eletrônica de varredura da amostra PHB atacado e exposto à solução de SBF 1,5M (a e b).....	124

Figura 36: Microscopia óptica das amostras PHB Puro (a e b).....	126
Figura 37: Microscopia óptica das amostras PHB atacado com solução de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (a e b).....	126
Figura 38: Microscopia óptica das amostras PHB atacado com solução de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e exposto à solução de SBF 1,0M (a e b). ....	126
Figura 39: Microscopia óptica das amostras PHB atacado com solução de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e exposto à solução de SBF 1,5M (a e b). ....	127
Figura 40: Microscopia de força atômica da amostra PHB Puro.....	128
Figura 41: Varredura topográfica da amostra PHB Puro.....	129
Figura 42: Microscopia de força atômica da amostra PHB Atacado .....	130
Figura 43: Varredura topográfica da amostra PHB atacado. ....	130
Figura 44: Microscopia de força atômica da amostra PHB atacado e exposto à solução de SBF 1,0M.....	131
Figura 45: Varredura topográfica da amostra PHB atacado e exposto à solução de SBF 1,0M. ....	132
Figura 46: Microscopia de força atômica da amostra PHB atacado e exposto à solução de SBF 1,5M.....	132
Figura 47: Varredura topográfica da amostra PHB atacado e exposto à solução de SBF 1,5M .....	133
Figura 48: Fotografias ilustrativas da determinação do ângulo de contato das amostras de PHB: .....	134
Figura 49: Resultados da determinação do ângulo de contato das amostras de PHB estudadas. ....	134
Figura 50: Termogravimetria do PHB Puro, que não foi submetido ao ambiente de biodegradação <i>in vitro</i> . ....	137
Figura 51: Termogravimetria das amostras tipo 1 (PHB+PBS) submetidas ao ambiente de biodegradação <i>in vitro</i> : (a) 2 meses e (b) 6 meses.....	138

Figura 52: Termogravimetria das amostras tipo 2 (PHB+PBS+Lisozima) submetidas ao ambiente de biodegradação <i>in vitro</i> : (a) 2 meses e (b) 6 meses. ....	139
Figura 53: Termogravimetria das amostras tipo 3 (PHB+PBS+SBF1,5M) submetidas ao ambiente de biodegradação <i>in vitro</i> : (a) 2 meses e (b) 6 meses. ....	140
Figura 54: Termogravimetria das amostras de PHB tipo 4 (PHB+PBS+SBF 1,5M+lisozima) submetidas ao ambiente de biodegradação <i>in vitro</i> : (a) 2 meses e (b) 6 meses. ....	141
Figura 55: DSC das amostras de PHB Puro e as submetidas ao ambiente de biodegradação <i>in vitro</i> : (a) PHB+PBS+Lisozima e (b) PHB+SBF 1.5 M+PBS+Lisozima.....	143
Figura 56: Gráfico dos resultados dos coeficientes de expansão térmica. ....	144
Figura 57: Massas molares viscosimétricas médias das amostras de PHB submetidas ao ambiente de biodegradação <i>in vitro</i> . ....	146
Figura 58: Espectro FTIR de uma amostra de PHB não biodegradada. ....	147
Figura 59: Espectros FTIR das amostras biodegradadas durante 60, 120 e 180 dias. ....	148
Figura 60: Exemplo de curva Tensão x Deformação do PHB. ....	150
Figura 61: Resistência à tração das amostras de PHB submetidas ao ambiente de biodegradação <i>in vitro</i> . ....	152
Figura 62: Curva da tensão x deformação do PHB em flexão. ....	152
Figura 63: Pesos das amostras de PHB submetidas ao ambiente de biodegradação <i>in vitro</i> . ....	154
Figura 64: DSC da amostra de PHB Puro.....	155
Figura 65: DSC da amostra de PHB atacado com peróxido de hidrogênio. ..	155
Figura 66: DSC da amostra de PHB atacado + PBS + Lisozima (28 dias). ...	156
Figura 67: Microscopia de força atômica da amostra PHB Puro.....	157

Figura 68: Varredura topográfica da amostra PHB Puro.....	157
Figura 69: Microscopia de força atômica da amostra PHB somente atacado.	158
Figura 70: Microscopia de força atômica da amostra PHB somente atacado.	158
Figura 71: AFM das amostras de PHB atacadas com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e submetidas ao ambiente de biodegradação (PBS + Lisozima) <i>in vitro</i> .....	159
Figura 72: Varredura topográfica das amostras de PHB atacadas com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e submetidas ao ambiente de biodegradação (PBS + Lisozima) <i>in vitro</i> . ....	159
Figura 73: Imagem obtida por AFM das amostras de PHB sem ataque superficial com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e submetidas ao ambiente de biodegradação ((PBS + Lisozima) <i>in vitro</i> . ....	160
Figura 74: Varredura topográfica das amostras de PHB sem ataque superficial com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e submetidas ao ambiente de biodegradação (PBS + Lisozima) <i>in vitro</i> . ....	161
Figura 75: Determinação da porcentagem da viabilidade celular, utilizando o método do MTT, quando em contato com o PHB. ....	162
Figura 76: Determinação da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos quando em contato com PHB, controle negativo e LPS. ....	163



## SÍMBOLOS E ABREVIações

ACP	Fosfato de cálcio amorfo
CaP	Fosfato de cálcio
CMP	Metafosfato de cálcio ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )
CPP	Pirofosfato de cálcio
CPPD	Pirofosfato de cálcio dihidratado
CN	Controle negativo
DCP	Mono-hidrogênio fosfato de cálcio
DCPD	Mono-hidrogênio fosfato de cálcio dihidratado
FDA	Food and Drug Administration
FN	Fibronectina
HA	Hidroxiapatita
hBMSC	Células-tronco mesenquimais
HCP	Fosfato heptacálcico
HOB	Osteoblastos humanos
LPS	Lipopolissacarídeos
MCPC	Fosfato monocálcico mono-hidratado
M-CSF	Colônias de macrófagos
OCP	Fosfato octacálcico
OPG	Osteoprotetegerina
P3HB-co-4HB	Poli (3-hidroxi butirato-co-4-hidroxi butirato)
PA	Polímeros de amido
PBS	Phosphate buffered saline
PCL	Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)
PE	Polietileno
PGA	Poli (ácido glicólico)
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Poli ( $\beta$ -hidroxi butirato)
PHB-HV	Poli (hidroxi butirato-co-hidroxi valerato)
PHBVHx	Poli (3-hidroxi hexanoato)

PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PVC	Poli (cloreto de vinila)
RANKL	Ligado ao receptor de ativação do fator nuclear
SBF	Synthetic Body Fluid
TCP	Fosfato tricálcico ( $\alpha$ , $\alpha'$ , $\beta$ )
TDHP	Di-hidrogênio fosfato tetracálcico
TeCP	Fosfato tetracálcico
Tg	Temperatura de transição vítrea de um polímero
Tm	Temperatura de fusão de um polímero
Xan	Xantana

## 1 INTRODUÇÃO

A busca incansável do homem por melhor qualidade de vida e longevidade tem gerado cada vez mais necessidade de alternativas para o reparo e substituição de tecidos vivos, que são vitimados por traumas ou patologias (ORÉFICE et al., 2012).

Segundo Hench e Wilson (2012) à medida que os seres vivos envelhecem, eles começam a se desgastar. Embora muitos fatores responsáveis pelo envelhecimento não sejam compreendidos, as consequências estão bastante claras. Enfermidades odontológicas causam dor, as articulações tornam-se artríticas, ossos ficam frágeis e quebram, a visão e a audição diminuem e podem ser perdidos, o sistema circulatório mostra sinais de bloqueio, e o coração perde controle do seu ritmo vital de bombeamento ou suas válvulas perdem a capacidade de vedação. Tumores aparecem quase aleatoriamente em ossos, pele e órgãos vitais. E, como se estes processos naturais não acontecessem rapidamente o bastante, uma capacidade enorme para mutilar, esmagar, quebrar e desfigurar o corpo humano é alcançada através de veículos motores, armas e ferramentas ou como resultado de participações em práticas esportivas. Uma consequência destas causas naturais e antinaturais de deterioração do corpo humano é que cerca de 2 a 3 milhões de partes artificiais ou protéticas são implantadas em indivíduos nos Estados Unidos a cada ano.

O desafio no campo de biomateriais é que todos os dispositivos de implantes substituam tecidos vivos, cujas propriedades físicas são resultados de milhões de anos de otimização evolutiva e que tenham a capacidade de crescimento, regeneração e reparo. Assim, todos os biomateriais usados para reparo ou restauração do corpo representam um ajuste de características e propriedades. O sucesso ou fracasso relativo de um biomaterial reflete o julgamento científico e de engenharia usados na avaliação deste ajuste (HENCH e WILSON, 2012).

Decorrente destes fatos, a demanda de biomateriais cresce de 5 a 15% a cada ano. O uso de pinos, placas e parafusos de fixação de fraturas chega a 1,5 milhões de procedimentos anuais só nos Estados Unidos, onde se estima

que sejam realizadas mais de quinhentas mil cirurgias anuais de substituição das articulações de quadril e de joelho (ORÉFICE et al., 2012).

A magnitude destes problemas de saúde junto à população tem levado pesquisadores, principalmente dos países mais desenvolvidos, à procura de materiais que possam substituir de forma apropriada os ossos danificados (RATNER et al., 2004). O principal desafio existente no estudo dos biomateriais é o de encontrar um material que seja o mais parecido possível com o tecido vivo, de modo que o organismo possa reconhecê-lo como parte de sua estrutura e não como um agente agressor ao seu meio (RAMAKRISHNA et al., 2001).

Portanto, o recente desenvolvimento e o crescente emprego de novos materiais no corpo humano tornaram necessária a definição desta nova classe de materiais – os biomateriais, como qualquer substância ou combinação de substâncias, exceto fármacos, de origem natural ou sintética, que podem ser usadas durante qualquer período de tempo, como parte ou como sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (AZEVEDO et al., 2007).

Do ponto de vista de dispositivos para fixação óssea, o uso de placas metálicas tem sido a alternativa de escolha para o tratamento, devida fundamentalmente, às suas propriedades mecânicas superiores que oferecem um menor risco de falha. Entretanto, há outros fatores relacionados ao uso de materiais metálicos que são reconhecidos e desfavoráveis. Dentre eles, destacam-se a diferença de módulo de elasticidade, tenacidade e o coeficiente de fricção com relação às propriedades do osso. Estes fatores ocasionam, ainda, situações fisiopatológicas variadas nas áreas limítrofes, osso/placa. Estas diferenças de propriedades mecânicas nas regiões limítrofes quando no movimento, evidenciam-se e surgem as concentrações de tensão, provocando falha/fratura, sendo motivo de reparação, através de intervenções cirúrgicas (PARK e LAKES, 2007). Outro fator preocupante é que a aplicação de fixação interna rígida com estas placas metálicas para facilitar a consolidação primária tem uma consequência. As placas grandes, que eliminam a micromovimentação no local da fratura, também “protegem de esforço” a fratura – isto é, elas absorvem tensões que normalmente seriam suportadas pelo osso. Se o osso não for adequadamente sujeito ao esforço, ele atrofia, e quando a placa fica *in*

*situ* por algum tempo o osso diminui seu diâmetro e é vulnerável à fratura após a retirada do metal (MOYEN et al., 1978; MOYEN et al., 1980).

Potencializando este fato, Oréfice (2012), chama atenção ao efeito danoso que o meio fisiológico circundante oferece e que é altamente agressivo em termos de corrosão, principalmente neste tipo de implante metálico. No caso de implantes articulados, os problemas de desgaste e corrosão também desempenham um papel prejudicial no processo de degradação dos mesmos. Relatos indicam que os detritos originados nesses processos são nocivos aos tecidos circunvizinhos e também reduzem significativamente o desempenho do implante, pois há perda da resistência e também da forma. Esses detritos são de tamanho bastante reduzido e, por isso, podem ser carregados pela corrente sanguínea, instalando-se em órgãos e prejudicando suas funções.

Assim, os polímeros são materiais que vem sendo utilizados com vantagens em implantes, devido à sua facilidade de processamento e pelo fato de apresentarem características mecânicas semelhantes a dos materiais biológicos (BARBANTI et al., 2005).

Atualmente, os biopolímeros mais promissores são o polihidroxibutirato (PHB) e o polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHB-HV), da família dos polihidroxicanoatos (PHA), devido à abundância e obtenção relativamente fácil de matéria prima e um conjunto de propriedades, tais como: tensão de ruptura, temperatura de transição vítrea, densidade e cristalinidade se assemelharem a características de outros termoplásticos já comercializados como o polipropileno (PP) e o poli (cloreto de vinila) (PVC) (COUTINHO et al., 2004). Além destas propriedades serem semelhantes a estes polímeros de origem petroquímica, que vem contemplando atualmente as necessidades do mercado, o PHB apresenta um grande diferencial, a biodegradabilidade, que o torna ainda mais atraente, do ponto de vista tecnológico e ambiental (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

Mediante as qualidades citadas, o material escolhido nesta pesquisa para substituição de artefatos metálicos foi um biopolímero natural, o PHB, que se mostra mais favorável à aplicação como implantes de fixação óssea, devido também às suas propriedades mecânicas, uma vez que essas propriedades são mais próximas as do osso, comparadas as dos metais, reduzindo o risco de

falha/fratura nos pontos de concentração de tensão no tecido ósseo. O uso deste polímero eliminará os problemas relacionados à corrosão que acontece com os materiais metálicos, bem como, a desnecessária retirada, após a consolidação da fratura, de modo a evitar a exposição do paciente a um novo risco de uma intervenção cirúrgica. Ademais, este osso reduzirá a desmineralização óssea por realizar esforços mecânicos, evitando o surgimento de osteoporose e diminuição do diâmetro no seguimento ósseo imobilizado.

Após a observação e análise dos trabalhos relacionados com este tema, fica evidente a necessidade da continuidade de novas pesquisas investigativas com relação à utilização de biopolímeros, como substitutos de implantes ortopédicos e na regeneração de tecido ósseo. Vê-se que ainda precisa-se avaliar questões como: biocompatibilidade, osteocondução, osseointegração, biodegradação e propriedade mecânica, pois o que se tem observado é que ainda são poucos os trabalhos voltados para ensaios, tanto *in vitro* como *in vivo*, destes biopolímeros da família dos PHA (poli (hidroxialcanoatos)).

Este trabalho tem como propósito estudar a viabilidade de implantação do PHB, polímero biodegradável, de origem natural, de elevado interesse comercial, em substituição aos materiais metálicos (placas, hastes intramedulares, fios e parafusos), usados na osteossíntese, como também na regeneração de perdas de massa óssea. Espera-se que a utilização do PHB contribua com a redução das complicações cirúrgicas indesejáveis, provocadas por estes materiais atualmente implantados.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo Geral

Propor a utilização do biopolímero PHB (poli ( $\beta$ -hidroxibutirato)) sem e com ataque superficial com peróxido de hidrogênio para aplicação na osteossíntese e regeneração de tecidos ósseos, analisando vários fatores como: bioatividade, biodegradação, biocompatibilidade, propriedades mecânicas e térmicas.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar estrutural e morfológicamente as placas de PHB adquiridas;
- Avaliar a receptividade do PHB, após ser submetido ao contato com um ambiente, mimetizando o meio biológico (SBF – *Synthetic Body Fluid*);
- Determinar a morfologia e a composição química destas placas de PHB após a interação com estas interfaces;
- Avaliar a hidrofiliabilidade, através da molhabilidade da superfície das placas de PHB;
- Estudar a biodegradação do PHB, quando submetido ao contato com uma solução tampão (PBS - *Phosphate buffered saline*) com lisozima, mimetizando também o meio biológico;
- Avaliar as propriedades mecânicas das placas de PHB, antes e após serem submersas na solução tampão (PBS) com lisozima.
- Analisar a biocompatibilidade das placas de PHB, através da viabilidade celular;
- Sugerir condições de utilização das placas de PHB, a partir das condições pesquisadas, para fixação óssea *in vivo*.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

O ordenamento da revisão da literatura desta tese foi baseado no envolvimento que o poli (hidroxibutirato) terá, direta ou indiretamente com os materiais contidos nesta pesquisa, sejam eles naturais ou artificiais. Tem-se como objetivo primordial, emergir o conhecimento, de forma concisa, os assuntos interligados na aplicabilidade deste biopolímero.

O osso é o primeiro material a ser estudado. Trata-se de um composto natural, constituído por uma parte cerâmica, o fosfato de cálcio, e outra polimérica, o colágeno. Neste assunto está descrito: a sua estrutura, o seu metabolismo, a formação e reabsorção óssea, as classificações e mecanismos de fratura, e por fim, sua regeneração óssea.

Dentro do capítulo de biomaterias, foram divididos vários subitens: os biomateriais cerâmicos, os biomateriais metálicos e os biomateriais poliméricos, este, como sendo a classe de material que contém o objeto deste estudo, foi demandado um detalhamento mais aprofundado no conhecimento da família dos polihidroxialcanoatos, na qual, se encontra o PHB. E, por fim, concluindo esta revisão, encontra-se no item 2.5, uma série de resumos de trabalhos científicos, relacionados com reparo e regeneração óssea.

### **2.1 Estrutura óssea**

O osso é considerado por si só um órgão, visto ser constituído por diversos tecidos diferentes que atuam em conjunto: tecido ósseo, cartilagem, tecido conjuntivo denso, epitélio, tecido hematopoiético, tecido adiposo e tecido nervoso. O tecido ósseo e o sistema esquelético são responsáveis por várias funções básicas, tais como: suporte, proteção, armazenamento de minerais, produção de células sanguíneas e armazenamento de energia química. As suas características ao nível da rigidez, elasticidade (moderada), plasticidade (muito limitada) e fragilidade fazem dele um tecido apropriado, tanto para o movimento como para o suporte e para a proteção dos tecidos moles (LÚCIO, 2008).



O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. As células são: os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, produtores da parte orgânica da matriz; e os osteoclastos, células gigantes, móveis e multi-nucleadas que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelação dos ossos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A matriz óssea é constituída por uma parte orgânica e outra inorgânica. A parte orgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea. Ela é formada por fibras colágenas (95%) constituídas de colágeno do tipo I e por pequena quantidade de proteoglicanas e glicoproteínas. As glicoproteínas do osso podem ter alguma participação na mineralização da matriz. A parte inorgânica é constituída por vários íons, sendo o fosfato e o cálcio os mais encontrados. Há também bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades. O cálcio e o fósforo formam cristais que, por análise de difração de raios X, mostraram ter a estrutura próxima da hidroxiapatita, com a seguinte composição:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Os íons da superfície do cristal de hidroxiapatita são hidratados, existindo, portanto, uma camada de água e íons em volta do cristal, essa camada é denominada capa de hidratação. Ela facilita a troca de íons entre o cristal e o líquido intersticial. Os cristais da matriz óssea mostram imperfeições e não são exatamente iguais à hidroxiapatita que se encontra nos minerais das rochas. A associação de hidroxiapatita com fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo. Após a remoção do fosfato de cálcio, os ossos mantêm sua forma intacta, porém tornam-se tão flexíveis quanto os tendões. A destruição da parte orgânica, que é principalmente colágeno, pode ser realizada por incineração, e também deixa o osso com sua forma intacta, porém tão quebradiço que dificilmente pode ser manipulado sem se partir (TUREK, 1991; ROCKWOOD et al., 1993; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

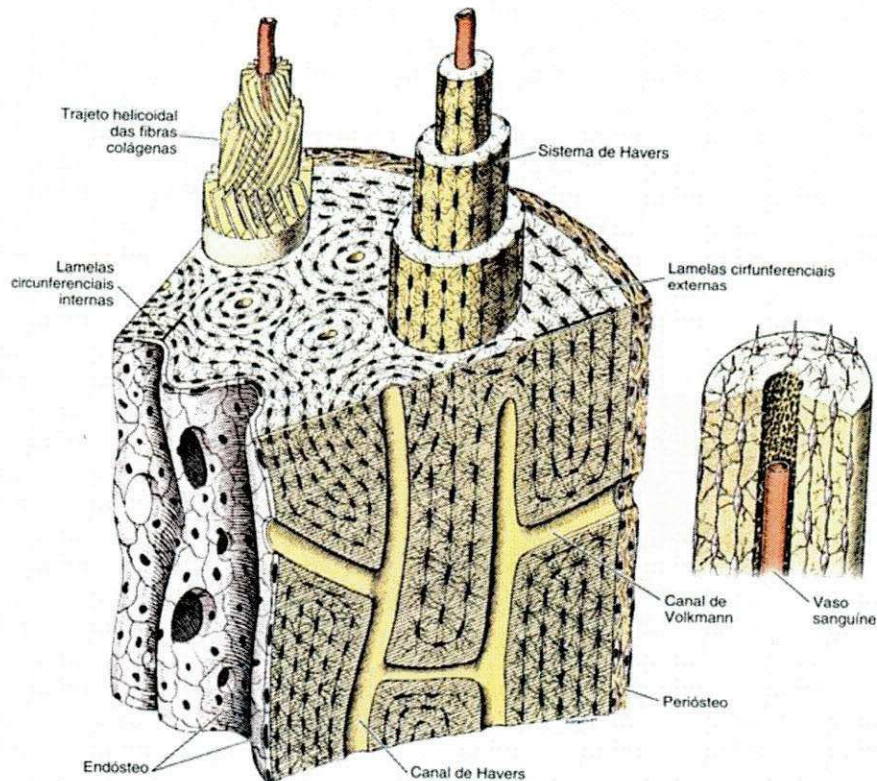
As superfícies internas e externas dos ossos são recobertas por células osteogênicas do tecido conjuntivo, que constituem o endóstio e o perióstio, respectivamente. A camada mais superficial do perióstio contém principalmente fibras colágenas e fibroblastos. Na sua porção profunda, o perióstio é mais celular e apresenta células osteoprogenitoras,

morfologicamente parecidas com os fibroblastos. As células osteoprogenitoras se multiplicam por mitose e se diferenciam em osteoblastos, desempenhando papel importante no crescimento dos ossos e na reparação das fraturas. O endóstio é geralmente constituído por uma camada de células osteogônicas achatadas revestindo as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Havers e os de Volkmann. As principais funções do endóstio e do perióstio são a nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de novos osteoblastos, para o crescimento e recuperação do osso (TUREK, 1991; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os sistemas circunferenciais externos, como seus nomes indicam, são constituídos por lamelas ósseas paralelas entre si, formando duas faixas: uma situada na parte interna do osso, em volta do canal medular, a outra na parte mais externa, próxima ao perióstio (Figura 1). O sistema circunferencial externo é mais desenvolvido do que o interno. Entre os dois sistemas circunferenciais encontram-se os inúmeros sistemas de Havers e grupos irregulares de lamelas, geralmente de forma triangular. São os sistemas intermediários, que provêm principalmente de sistemas de Havers, que foram parcialmente destruídos durante o crescimento do osso.

Os elementos celulares remodelam continuamente o osso de modo a permitir o seu crescimento e a sua adaptação às tensões de carregamento aplicadas. Consideram-se quatro tipos de células presentes no tecido ósseo: células osteogênicas, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. As células osteogênicas diferenciam-se em osteoblastos e encontram-se na porção interna do perióstio e no endóstio; os osteoblastos são responsáveis pela formação do osso e estão localizadas na superfície deste, sintetizando colágeno e outros componentes orgânicos necessários para formar o tecido ósseo; os osteócitos, que se diferenciam a partir dos osteoblastos, são as células mais abundantes no osso e são responsáveis pela manutenção do metabolismo diário do osso, nomeadamente a troca de nutrientes e produtos catabólicos com o sangue; os osteoclastos são células de grandes dimensões que possuem enzimas lisossomais que participam na destruição da matriz óssea, num processo denominado reabsorção (LÚCIO, 2008).

Figura 1: Esquema ilustrativo da estrutura óssea.



Fonte: Junqueira e Carneiro, 2004.

### 2.1.1 Células do tecido ósseo

As células osteogênicas (células osteoprogenitoras) são encontradas normalmente apostas à superfície óssea na camada profunda do periosteio de repouso e também compreendem o endosteio, no qual são igualmente apostas à superfície óssea. Durante o período de crescimento as células osteogênicas do periosteio proliferam e dão origem a osteoblastos que acrescentam osso novo a superfície, respondendo por seu crescimento em largura. Da mesma forma, a membrana endóstea pode dar origem a osteoblastos. Entretanto, em sua superfície, frequentes cavidades ósseas de reabsorção contendo osteoclastos sugerem que essas células multinucleadas podem originar-se da fusão de células osteogênicas do endosteio ou de uma célula primitiva comum. As células osteogênicas retêm, durante toda a vida, seu potencial de diferenciação em

condroblastos ou osteoblastos e, talvez, osteoclastos (TUREK, 1991; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Dispõem-se sempre nas superfícies ósseas, lado a lado, num arranjo que lembra um epitélio simples. Uma vez aprisionado pela matriz recém-sintetizada, o osteoblasto passa a ser chamado de osteócito. A matriz se deposita ao redor do corpo da célula e de seus prolongamentos, formando assim as lacunas e os canalículos. Os osteoblastos em fase de síntese mostram as características ultraestruturais das células produtoras de proteínas. A matriz óssea recém-formada, adjacente aos osteoblastos ativos e que não está ainda calcificada, recebe o nome de osteóide (TUREK, 1991; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os osteócitos são as células encontradas no interior da matriz óssea, ocupando as lacunas das quais partem canalículos. Cada lacuna contém apenas um osteócito. Dentro dos canalículos os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contatos através de junções comunicantes, por onde podem passar pequenas moléculas de íons de um osteócito para o outro. A pequena quantidade de material extracelular presente no espaço entre os osteócitos (e seus prolongamentos) e a matriz óssea (colágeno tipo I e fosfato de cálcio) também constitui uma via de transporte de nutrientes e metabólitos entre os vasos sanguíneos e os osteócitos. Os osteócitos são células achatadas, com forma de amêndoa, que exibem pequena quantidade de retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi pequeno e núcleo com cromatina condensada. Embora essas características ultraestruturais indiquem pequena atividade sintética, os osteócitos são essenciais para a manutenção da matriz óssea. Sua morte é seguida por reabsorção da matriz (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, extensamente ramificadas, com partes dilatadas que contêm vários núcleos. As ramificações são muito irregulares, com forma e espessura variáveis. Como os cortes histológicos revelam apenas pequenas porções dos osteoclastos, a morfologia destas células só recentemente foi esclarecida, através do microscópio eletrônico de varredura. Frequentemente, nas áreas de reabsorção de tecido ósseo



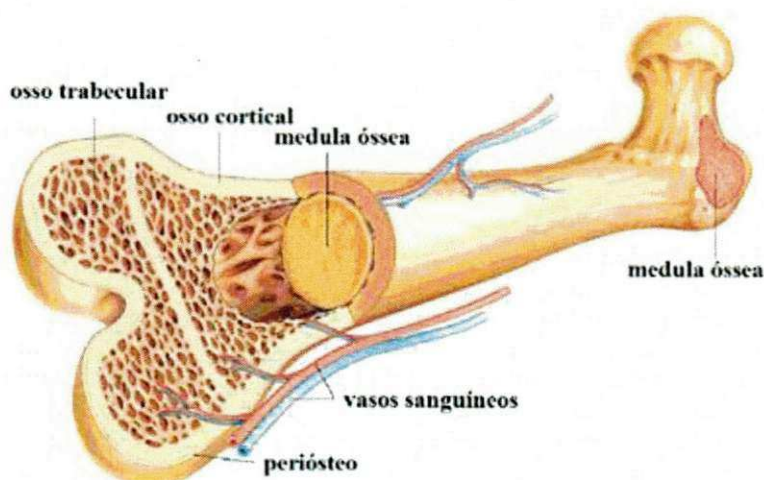
encontram-se porções dilatadas dos osteoclastos, colocadas em depressões da matriz escavadas pela atividade dos osteoclastos e conhecidas como lacunas de Howship. A superfície ativa dos osteoclastos, voltada para a matriz óssea, apresenta prolongamentos vilosos irregulares. A maioria desses prolongamentos tem a forma de folhas ou pregas que se subdividem. Circundando essa área com prolongamentos vilosos, existe uma zona citoplasmática, a zona clara, pobre em organelas, porém contendo muitos filamentos de actina. A zona clara é um local de adesão do osteoclasto com a matriz óssea e cria um microambiente fechado, onde tem lugar a reabsorção óssea. Os osteoclastos secretam, para dentro desse microambiente fechado, ácido, colagenase e outras hidrolases que atuam localmente digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de sais de cálcio. A atividade dos osteoclastos é coordenada por citocinas (pequenas proteínas sinalizadoras que atuam localmente) e por hormônios como calcitonina, produzido pela glândula tireóide e paratormônio, secretado pelas glândulas paratireóides (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

### **2.1.2 Tipos de tecido ósseo**

Observando-se anatomicamente a estrutura de um osso longo em um corte longitudinal, verifica-se que ele é formado por partes sem cavidades visíveis, o osso compacto, e por partes com muitas cavidades intercomunicantes, o osso esponjoso. Essa classificação é macroscópica e não histológica, pois o tecido compacto e os tabiques que separam as cavidades do esponjoso têm a mesma estrutura histológica básica. Nos ossos longos, as extremidades, ou epífises, são formadas por osso esponjoso, ou trabecular, com uma delgada camada superficial compacta. A diáfise (parte cilíndrica) é quase totalmente compacta, com pequena quantidade de osso esponjoso na sua parte profunda, delimitando o canal medular. Principalmente nos ossos longos, o osso compacto é chamado também de osso cortical (Figura 2). Os ossos curtos têm o centro esponjoso, sendo recobertos em toda a sua periferia por uma camada compacta. Nos ossos chatos, que constituem a abóbada craniana, existem duas

camadas de osso compacto, a tábua interna e externa, separadas por osso esponjoso que, nesta localização, recebe o nome de diploe. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Figura 2: Representação da estrutura interna de um osso longo.



Fonte: Lúcio, 2008.

As cavidades do osso esponjoso e o canal medular da diáfise dos ossos longos são ocupados pela medula óssea. No recém-nascido, toda a medula óssea tem cor vermelha, devido ao alto teor de hemácias e pela atividade da produção de células do sangue (medula óssea hematogena). Pouco a pouco, com a idade, vai sendo infiltrada por tecido adiposo, com diminuição da atividade hematogena (medula óssea amarela) (TUREK, 1991; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: o imaturo ou primário; e o maduro, secundário ou lamelar. Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz. O tecido primário é o que aparece primeiro, tanto no desenvolvimento embrionário como na reparação das fraturas, sendo temporário e substituído por tecido secundário. No tecido ósseo primário as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida, porém no tecido ósseo secundário, ou lamelar, essas fibras se organizam em lamelas, que adquirem uma disposição muito peculiar. O tecido ósseo secundário é a variedade geralmente encontrada no adulto. Sua principal característica é

possuir fibras colágenas organizadas em lamelas de 3 a 7  $\mu\text{m}$  de espessura, que ficam paralelas umas às outras, ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando os sistemas de Havers ou ósteons. As lacunas, contendo osteócitos, estão em geral situadas entre as lamelas ósseas, porém algumas vezes estão dentro delas. Em cada lamela, as fibras colágenas são paralelas umas às outras. Separando grupos de lamelas, ocorre frequentemente o acúmulo de uma substância cimentante que consiste em matriz mineralizada, porém com muito pouco colágeno (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

### **2.1.3 Histogênese**

O tecido ósseo é formado por um processo chamado de ossificação intramembranosa, que ocorre no interior de uma membrana conjuntiva, ou pelo processo de ossificação endocondral. Este último se inicia sobre um molde de cartilagem hialina, que gradualmente é destruído e substituído por tecido ósseo formado a partir de células do tecido conjuntivo adjacente. Tanto na ossificação intramembranosa como na endocondral, o primeiro tecido ósseo formado é do tipo primário. Este é pouco a pouco substituído por tecido secundário ou lamelar. Portanto, durante o crescimento dos ossos pode-se ver, lado a lado, áreas de tecido primário, áreas de reabsorção e áreas de tecido secundário. Uma combinação de formação e remoção de tecido ósseo persiste durante o crescimento do osso. Isto também acontece no adulto, embora em ritmo muito mais lento (TUREK, 1991; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A ossificação endocondral tem início sobre uma peça de cartilagem hialina, de forma parecida a do osso que se vai formar, porém de tamanho menor. Este tipo de ossificação é o principal responsável pela formação dos ossos curtos e longos. A ossificação endocondral consiste essencialmente em dois processos. Primeiro, a cartilagem hialina sofre modificações, havendo hipertrofia dos condrócitos, redução da matriz cartilaginosa a finos tabiques, sua mineralização e a morte dos condrócitos. Segundo, as cavidades previamente



ocupadas pelos condrócitos são invadidas por capilares sanguíneos e células osteogênicas vindas do conjuntivo adjacente. Essas células diferenciam-se em osteoblastos, que depositarão matriz óssea sobre os tabiques de cartilagem calcificada. Desse modo, aparece tecido ósseo onde antes havia tecido cartilaginoso sem que ocorra a transformação deste tecido naquele; os tabiques de matriz calcificada da cartilagem servem apenas de ponto de apoio à ossificação (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Não existe ainda uma hipótese para o mecanismo de calcificação que seja universalmente aceita. Sabe-se que a calcificação começa pela deposição de sais de cálcio sobre as fibrilas colágenas, um processo que parece ser induzido por proteoglicanas e glicoproteínas da matriz. A deposição dos sais de cálcio é também influenciada pela concentração desses minerais em vesículas do citoplasma dos osteoblastos. Essas vesículas são expelidas para a matriz (vesículas da matriz). Além disso, existe ainda a participação da enzima fosfatase alcalina sintetizada pelos osteoblastos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

#### **2.1.4 Crescimento e remodelação dos ossos**

O crescimento dos ossos consiste na formação de tecido ósseo novo, associada à reabsorção parcial de tecido já formado; deste modo, os ossos conseguem manter sua forma enquanto crescem. Os ossos chatos crescem por formação do tecido ósseo pelo perióstio situado entre as suturas e na face externa do osso, enquanto ocorre reabsorção na face interna. Sendo extremamente plástico, o tecido ósseo responde, por exemplo, ao crescimento do encéfalo, formando uma caixa craniana do tamanho adequado. Havendo deficiência no crescimento do encéfalo, a caixa craniana será pequena. Ao contrário, nas crianças com hidrocefalia, por exemplo, cujo encéfalo é muito volumoso, a caixa craniana é também muito maior do que o normal. Nos adultos também existe remodelação dos ossos, um processo fisiológico que ocorre simultaneamente em diversas partes do esqueleto. Nesse caso a remodelação não está relacionada com o crescimento e é muito mais lenta. Estima-se que a



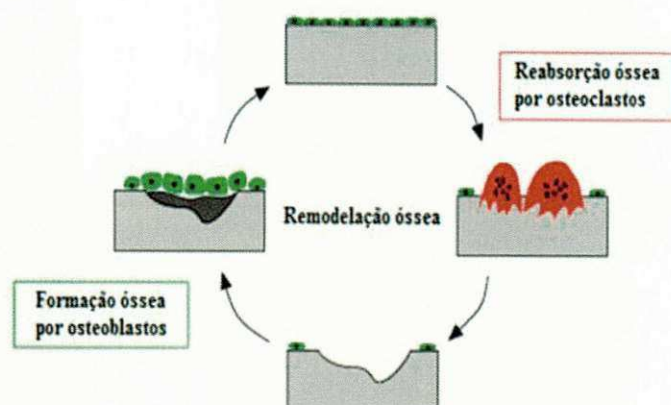
remodelação nas crianças pequenas seja 200 vezes mais rápida do que nos adultos (ROCKWOOD et al., 1993; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Apesar da sua resistência às pressões e da sua dureza, o tecido ósseo é muito plástico, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações nas forças às quais está submetido (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Como já foi mencionado, o osso é um tecido dinâmico, que está constantemente a ser remodelado, mesmo depois do crescimento do esqueleto estar completo. A remodelação do osso é uma função normal do mesmo e assegura o equilíbrio do metabolismo do cálcio e do fósforo e também a reparação de micro danos do osso. Este processo é baseado na ação conjugada de células que reabsorvem localmente osso velho, os osteoclastos, e células que formam o novo osso, os osteoblastos.

O processo de remodelação tem início após a sinalização entre a matriz óssea e os osteoclastos, geralmente determinado por micro traumatismos ósseos. Os osteoblastos aderem à matriz do tecido ósseo, e formam uma interface osso/osteoclasto. O osteoclasto cria assim um microambiente isolado, acidificado, para onde liberam enzimas proteolíticas, que induz a destruição da matriz orgânica e inorgânica do osso. Pouco depois deste processo de reabsorção terminar, os osteoblastos surgem na mesma superfície, formando novo osso, preenchendo as lacunas de reabsorção produzidas pelos osteoclastos com nova matriz óssea, inicialmente não mineralizada, designada por osteóide. Alguns dos osteoblastos são encapsulados na matriz orgânica extracelular e diferenciam-se em osteócitos. Os osteoblastos restantes continuam a sintetizar osso e revestem completamente a superfície óssea recentemente formada (Figura 3) (LÚCIO, 2008).

Figura 3: Esquema simplificado da remodelação óssea.

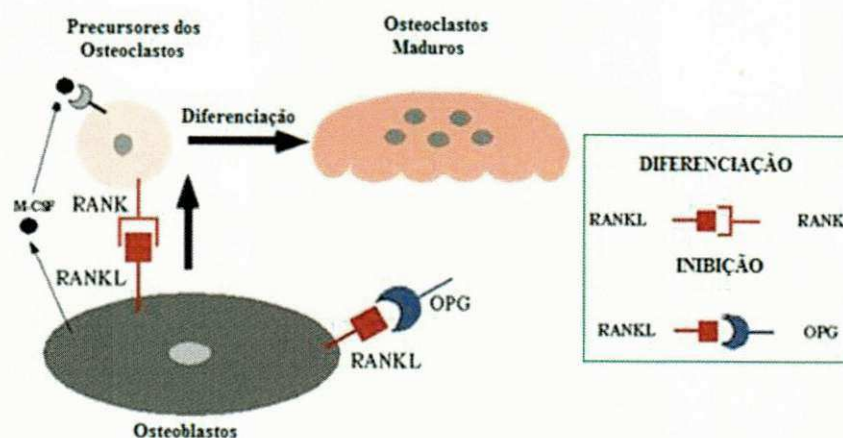


Fonte: Lúcio, 2008.

Lúcio (2008) afirma que a remodelação óssea é regulada por hormônios sistêmicos e fatores locais, que afetam tanto a atuação dos osteoclastos como dos osteoblastos. O conceito atual de remodelação óssea está baseada na idéia de ativação e diferenciação dos precursores osteoclásticos, iniciando-se assim o processo de reabsorção óssea. A regulação da osteoclastogênese, isto é, a diferenciação do osteoclasto, é modelada pelo fator de estimulação das colônias de macrófagos (M-CSF) e pelo RANKL (ligado ao receptor de ativação do fator nuclear kB, RANK) produzido pelos osteoblastos.

O RANKL liga-se ao RANK presente na membrana do osteoclasto, estimulando a diferenciação do precursor do osteoclasto em osteoclasto maduro. Em contraste, a osteoprotetegerina (OPG), produzida também pelo osteoblasto, bloqueia a formação de osteoclastos, ligando-se ao RANKL, com o qual tem grande afinidade, impedindo que este se ligue ao RANK e inibindo a osteoclastogênese (Figura 4). O balanço entre a produção de RANKL e de OPG determina a quantidade de osso que é reabsorvida. Existem outros agentes participantes neste processo, nomeadamente o hormônio paratireoideano (PTH) e a vitamina D, que modelam o comportamento dos osteoblastos (Lúcio, 2008).

Figura 4: Mecanismo simplificado de osteoclastogênese.



Fonte: Lúcio, 2008.

### 2.1.5 Reparação das Fraturas

Além das excelentes propriedades mecânicas, o osso revela um potencial único para reparação de fraturas. O tecido ósseo é capaz de reparar fraturas ou defeitos locais por meio do processo de regeneração, com a formação de um novo tecido com a mesma organização estrutural do tecido anterior, sem a formação de cicatrizes. Após uma lesão óssea, uma sequência de eventos dinâmicos ocorre com o objetivo de restaurar a forma e a função do osso. Muitos desses mecanismos biológicos celulares ainda não foram completamente identificados, porém sabe-se que o processo é ativado pela liberação de fatores de crescimento e citocinas no local. A reparação óssea é semelhante tanto para pequenas quanto para grandes torções, fraturas ósseas e defeitos cirúrgicos (AMADEI et al., 2006).

Nos locais de fratura óssea ocorre hemorragia pela lesão dos vasos sanguíneos, destruição de matriz e morte de células ósseas. Para que a reparação se inicie, o coágulo sanguíneo e os restos celulares e da matriz devem ser removidos pelos macrófagos. O periósteo e o endósteo próximos à área fraturada respondem com uma intensa proliferação, formando um tecido muito rico em células osteoprogenitoras que constitui um colar em torno da



fratura e penetra entre as extremidades ósseas rompidas. Nesse anel ou colar conjuntivo, bem como no que se localiza entre as extremidades ósseas fraturadas, surge tecido ósseo imaturo, tanto pela ossificação endocondral de pequenos pedaços de cartilagem que aí se formam, como também por ossificação intramembranosa. Pode ser encontradas no local de reparação, ao mesmo tempo, áreas de cartilagem, áreas de ossificação intramembranosa e áreas de ossificação endocondral. Esse processo evolui de modo a aparecer, após algum tempo, um calo ósseo que envolve a extremidade dos ossos fraturados. O calo ósseo é constituído por tecido ósseo imaturo que une provisoriamente as extremidades do osso fraturado (TUREK, 1991; ROCKWOOD et al., 1993; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

As trações e pressões exercidas sobre o osso durante a reparação da fratura, e após o retorno do paciente a suas atividades normais, causam a remodelação do calo ósseo e sua completa substituição por tecido ósseo lamelar. Se essas trações e pressões forem idênticas às exercidas sobre o osso antes da fratura, a estrutura do osso volta a ser a mesma que existia anteriormente. Ao contrário dos outros tecidos conjuntivos, o tecido ósseo, repara-se sem a formação de cicatriz (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

### **2.1.6 Papel metabólico do tecido ósseo**

O esqueleto contém 99% do cálcio no organismo e funciona como uma reserva desse íon, cuja concentração no sangue (calcemia) deve ser mantida constante, para o funcionamento normal do organismo. Há um intercâmbio contínuo entre o cálcio do plasma sanguíneo e o dos ossos. O cálcio absorvido da alimentação e que faria aumentar a concentração sanguínea deste íon é depositado rapidamente no tecido ósseo, e, inversamente, o cálcio dos ossos é mobilizado quando diminui sua concentração no sangue. Existem dois mecanismos de mobilização do cálcio depositado nos ossos. O primeiro é a simples transferência dos íons dos cristais de hidroxiapatita para o líquido intersticial, do qual o cálcio passa para o sangue. Esse mecanismo, puramente físico, é favorecido pela grande superfície dos cristais de hidroxiapatita e tem

lugar principalmente no osso esponjoso. As lamelas ósseas mais jovens, pouco calcificadas, que existem mesmo no osso adulto, devido à remodelação contínua, são as que recebem e cedem  $\text{Ca}^{2+}$  com maior facilidade. Essas lamelas são mais importantes na manutenção da calcemia do que as lamelas antigas, muito calcificadas e cujos papéis principais são de suporte e proteção (TUREK, 1991; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

### **2.1.7 Propriedades mecânicas do osso**

As cargas aplicadas num osso podem ser analisadas como tendo um efeito similar às cargas aplicadas em uma viga simples. O osso apresenta um limite de deformação elástica e um ponto crítico que delimita o alcance da deformação de uma variação elástica ou não elástica. O osso não tem um comportamento linear nem inteiramente elástico na porção inicial da curva tensão x deformação, mas deforma-se lentamente. Portanto o osso está sujeito a uma deformação não recuperável, mas pode ceder a subtensão e se recuperar da deformação dentro do seu limite (porção elástica da curva tensão deformação). Não obstante, o osso não exibe uma alta recuperação de deformação quando ocorre uma significativa perda de energia ou uma histerese que ocorre durante uma carga e descarga (GOULD, 1993).

O osso não é dúctil nem frágil, e sim uma combinação de ambos, sendo a parte mineral mais frágil e a parte orgânica mais flexível.

Quando comparado ao ferro fundido, o osso é três vezes mais leve e dez vezes mais flexível, porém ambos os materiais possuem aproximadamente a mesma resistência à tração. O osso é um material com duas fases que consistem na matriz, que é principalmente colágeno, e no mineral ósseo. O mineral ósseo (hidroxiapatita) é mais rígido que o osso, com um módulo de 114 GPa em comparação com 18 GPa do osso. E é mais forte em compressão que em tensão. O colágeno ósseo, por outro lado, não oferece qualquer resistência à compressão, mas possui uma resistência à tração cinco vezes a do osso. Parece que este composto deve sua resistência à tração ao seu colágeno e sua rigidez e resistência à compressão ao seu conteúdo mineral. O osso possui uma

resistência à tração de cerca, de  $140 \text{ Nm/m}^2$  e uma resistência à compressão de  $200 \text{ Nm/m}^2$ . A disposição dos cristais de apatita estreitamente agregados, porém em unidades individualizadas, pode proteger o osso da propagação de fissura, porque uma fissura atravessando um cristal encontrará uma interface, assim formando uma fissura em forma de T que dissipa energia e impede a fissura de estender-se (mecanismo de Cook-Gordon). Este é o mesmo mecanismo observado quando da propagação de uma rachadura em uma estrutura de madeira é interrompida quando um furo é feito na extremidade de avanço da rachadura. Além disso, a rigidez e a resistência estática aumentam com o grau de mineralização do osso, de tal modo que sua resistência final é três vezes maior com mineralização de 70% do que a 60%. Uma curva de esforço-deformação do osso mostra que ele é dúctil; porém, sendo anisotrópico, sua resistência à tração e seu módulo de Young são maiores quando o osso é carregado no seu eixo longitudinal do que em outras direções. O osso pode ser deformado 0,75% antes que ocorra deformidade plástica, e a deformação de ruptura é 2% a 4%. Durante a deformação plástica ele é capaz de absorver seis vezes mais energia antes de fraturar do que durante a fase elástica. Isto é conhecido como o *efeito Poisson* (ROCKWOOD et al., 1993).

Contudo, Rockwood et al., (1993) observou ainda que o osso não é uma substância elástica simples como o aço doce. Se carregarmos uma mola, a deformação será imediata e não importando durante quanto tempo a carga seja aplicada, não haverá nenhuma alteração na deformação a não ser que a carga seja alterada. O osso é um material viscoelástico e a adição da viscosidade introduz um elemento de dependência da velocidade nos efeitos do carregamento. Sendo o osso um material viscoelástico, a velocidade de aplicação do esforço constitui um fator importante na determinação do grau de lesão do osso e tecidos moles, quando ocorrem fraturas. Quanto mais alta a velocidade de carregamento, menor a capacidade do osso de absorver energia; entretanto, se o carregamento for levado até à falha, a quantidade de energia grandemente aumentada, quando dissipada, descarrega uma devastação no osso. As fraturas de baixa energia são geralmente lineares sem muito desvio, mas com quantidades cada vez maiores de energia a diminuição e o desvio das

fraturas aumentarão, bem como a lesão dos componentes de tecidos moles da extremidade.

O osso, quando testado no laboratório, não possui um limite de resistência padrão e falhará quando submetido a ciclos suficientes. Porém, o osso *in vivo*, diversamente dos outros materiais, possui a propriedade de auto-reparação, de modo que repouso e proteção de esforço permitirão a essas fraturas que elas consolidem. A resistência do osso é dependente da densidade do osso, do seu conteúdo mineral e da qualidade e quantidade de colágeno (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

### **2.1.8 Classificação das fraturas**

As fraturas podem ser classificadas de vários modos: (1) pela localização anatômica (terço proximal, médio ou distal da diáfise; supracondiliana; subtrocanteriana); (2) pela direção da linha de fratura (transversa, oblíqua, espiral); e (3) conforme a fratura seja linear ou cominutiva (isto é, com múltiplas extensões, dando origem a muitos fragmentos pequenos). Fraturas em galho verde, tão comuns em crianças, raramente, se jamais, são encontradas em adultos, mas ocasionalmente pode ser vista uma fratura incompleta. Quando a diáfise de um osso longo foi impulsionada para dentro da sua extremidade esponjosa, diz-se que ela foi "impactada". Isto é comum em fraturas do úmero superior, mas acredita-se que a chamada fratura impactada do colo do fêmur é na realidade uma denominação errada para uma fratura incompleta ou parcial (ROCKWOOD et al., 1993).

As fraturas são ditas "expostas" quando os tecidos moles subjacentes foram rompidos, expondo a fratura ao ambiente exterior, ou "fechadas" quando a pele ainda está intacta. Uma fratura patológica é aquela na qual um osso é quebrado através de uma área enfraquecida por doença preexistente, por um grau de esforço que teria deixado intacto um osso normal. Osteoporose de qualquer causa pode ser uma fonte de fratura patológica e constitui um dos fatores importantes implicados na alta incidência de fraturas no idoso. Embora as fraturas, através de qualquer tipo de lesão, possam aceitavelmente ser



chamadas patológicas, algumas vezes o termo é usado em um sentido mais restrito para descrever uma fratura através de uma lesão maligna, tal como uma metástase óssea ou um tumor primário (por exemplo, mieloma). O osso, como outros materiais, reage ao carregamento repetido. Ocasionalmente, ele fatiga e desenvolve uma fenda, que pode levar a uma fratura completa – uma fratura por estresse. Estas fraturas são vistas mais frequentemente em instalações militares onde recrutas são submetidos a treinamento rigoroso. Entretanto, elas às vezes são encontradas em dançarinos de ballet e atletas, e nenhum grupo etário ou ocupacional estão imunes (ROCKWOOD et al., 1993).

### **2.1.9 Biomecânica das fraturas**

A biomecânica das fraturas para muitos profissionais da área de saúde constitui um assunto inerentemente desinteressante. Porém, aos que participam da elaboração de projetos, desde a constituição química e estrutural do material até o design do produto, realizado por uma equipe multidisciplinar de engenheiros, químicos e de designer industrial, esta temática é extremamente vital para a fabricação de próteses, placas, hastes, fixadores externos, etc. Todavia, é aconselhável ao cirurgião compreender princípios básicos necessários para tratar fraturas racionalmente.

Evans (1973) listou as propriedades do osso que são importantes na determinação da sua suscetibilidade à fratura, que são: a capacidade de absorção de energia, o módulo de elasticidade (módulo de Young), a resistência à fadiga e a densidade.

O módulo de elasticidade e a resistência à flexão do osso cortical variam de acordo com o local analisado (região distal, central ou proximal), sendo que a resistência à flexão do osso cortical do fêmur é ligeiramente inferior na região proximal. A porção mineral promove maior influência no módulo de elasticidade do osso do que a porção orgânica. A resistência no limite elástico é determinada pela composição e distribuição da fase mineral na matriz de colágeno (MORA, 2000).



De acordo com Frankel e Burstein (1970), a energia absorvida para produzir a falha de um colo femoral foi determinada experimentalmente como sendo 60 kg/cm (Livro de Rockwood, C. A. Jr. 3ª Edição, pag. 4). Entretanto, nas quedas é produzida energia cinética muitíssimo acima deste nível. Esta energia – se ela puder ser dissipada pela ação muscular, deformação elástica e plástica dos tecidos moles, e outros mecanismos – não produzirá uma fratura. Na idade avançada, estes mecanismos tornam-se progressivamente prejudicados, sendo este um potente fator na produção de fraturas no idoso.

As fraturas ósseas, com perda ou não de material, são uma constante na vida de profissionais que tentam restabelecer a anatomia e a função do osso fraturado. Os cuidados iniciais se concentram em determinar a extensão, tipo de fratura e definição do procedimento cirúrgico para favorecer a criação de um meio biológico que permita, ao máximo, os processos normais de reparação do osso. Um dos principais objetivos do tratamento é evitar as complicações que podem acompanhar a lesão musculoesquelética e restabelecer sua anatomia, estética e sua função (DIAS et al., 2010).

## **2.2 Biomateriais**

Vários achados arqueológicos comprovaram que a preocupação do homem em restaurar ou substituir partes danificadas do tecido ósseo é uma prática muito antiga. Como exemplo, pode-se citar a utilização do ouro na odontologia por romanos e chineses há aproximadamente 2000 anos e os astecas usavam há 700 anos. Implantes de ferro também foram encontrados em um cadáver na Europa, o qual foi datado como sendo do ano 200 d.C. Outros dados demonstraram que os maias já produziam dentes obtidos de conchas do mar em torno do ano 600 d.C. Foi demonstrado que alguns tipos de implantes promoveram a integração com o osso (RATNER, 2004).

Os materiais têm sido convenientemente agrupados em três classificações básicas: metais, cerâmicas e polímeros. Esse esquema está baseado principalmente na composição química e na estrutura atômica, e a maioria dos materiais se encaixa em um ou outro grupamento distinto, embora

existam alguns materiais intermediários. Adicionalmente, existem três outros grupos de materiais importantes na engenharia: compósitos, semicondutores e biomateriais. Os compósitos consistem em combinações de dois ou mais materiais diferentes, enquanto os semicondutores são utilizados devido às suas características elétricas peculiares; os biomateriais são materiais que têm contato com o meio biológico humano ou animais (CALLISTER, 2012).

O critério de seleção de biomateriais é baseado principalmente na aplicação a que se destinam. Para dispositivos de aplicações em tecidos moles, os materiais se propõem a aumentar ou redefinir o tecido, por exemplo: implantes de seios e implantes faciais. Em aplicações ortopédicas e odontológicas, os materiais são componentes de implantes estruturais (próteses de articulações e implantes de raiz de dentes) ou são usados para reparar defeitos ósseos (parafusos, placas e pinos inseridos em osso) (PARK e LAKES, 2007). Esta seleção do material a ser utilizado deve levar em consideração também as propriedades físicas, químicas e mecânicas do material.

A ciência dos biomateriais é uma área multidisciplinar, seu objetivo geral não engloba apenas o desenvolvimento de compostos a serem utilizados como substitutos de tecidos lesados, mas também o entendimento das interações destes com o organismo receptor. Tal fato tem levado diferentes pesquisadores, das mais variadas áreas, à criação e ao aperfeiçoamento de dispositivos que sejam simultaneamente biocompatíveis e funcionais (SANTOS JR., 2001). A evolução atual dos biomateriais depende assim dos avanços das diversas áreas, de maneira global da biotecnologia e da ciência dos materiais.

O primeiro conceito de biomateriais surgiu no I Simpósio Internacional de Biomateriais, realizado na Universidade de Clemson, Carolina do Norte, 1967, ou seja, biomateriais são definidos como materiais sintéticos utilizados no corpo. Posteriormente, a Conferência da Sociedade Europeia de Biomateriais, realizada em março de 1987, em virtude do desenvolvimento de novos materiais e tecnologias que possibilitaram novas fronteiras de uso biológico, propôs um conceito que pudesse de forma ampla atender a estas novas possibilidades. Como resultado obteve-se o conceito de biomaterial como um material desenvolvido com o propósito de interagir com a interface de sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou

função no corpo humano, produzido ou modificado artificialmente (NICHOLSON, 2002; PARK E LAKES, 2007).

Para Helmus (1995), biomaterial é qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural, que possa ser utilizada por um período de tempo completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo.

Para Oréfice et al. (2006), algumas propriedades importantes estão relacionadas à físico-química dos biomateriais, como a biocompatibilidade e bioatividade, onde o mesmo conceitua:

Biocompatibilidade é a interação tecido-biomaterial. Depende não só das características intrínsecas do material (por exemplo: composição química e cristalinidade), mas também do ambiente de implantação e da funcionalidade para a qual foi produzido. A biofuncionalidade é específica para cada biomaterial em determinada região do organismo;

Bioatividade é a capacidade de biomateriais interagirem com tecidos vivos, promovendo a sua integração no organismo receptor. Baseia-se na estimulação de processos físico-químicos inerentes a sistemas biológicos, integrando o biomaterial. A bioatividade é uma propriedade específica, que varia de acordo com o ambiente orgânico onde o biomaterial é implantado.

Vert et al. (1992), reafirmam a importância destas propriedades a serem consideradas na escolha e no desenvolvimento de um Biomaterial que são a biocompatibilidade e a bioatividade. Para ser biocompatível, o material deve apresentar teor de citotoxicidade nulo ou muito baixo, não registrando ação imunogênica (a menos que esta seja desejada), não deve ser mutagênico nem trombogênico. A bioatividade é avaliada pelas características químicas, físicas, físico-químicas, térmicas e biológicas, pela facilidade de manejo do material, pela possibilidade de esterilização, pela estabilidade ao ser estocado bem como pela taxa de degradação controlada e pela bioreabsorção.

A Tabela 1 apresenta a comparação do módulo de elasticidade e da resistência à tração dos tecidos rígidos com as classes de materiais utilizados como biomateriais.

Tabela 1. Comparação do módulo de elasticidade e resistência à tração dos metais, cerâmicas e polímeros com os tecidos rígidos.

	<b>Módulo (GPa)</b>	<b>Resistência à Tração (MPa)</b>
<b>Tecido Rígido</b>		
Osso Cortical (direção longitudinal)	17,7	133
Osso Cortical (direção transversa)	12,8	52
Osso Trabecular	0,4	7,4
Esmalte	84,3	10
Dentina	11	39,3
<b>Metais</b>		
Aço	190	586
Liga Co-Cr	280	1085
Liga Ti	116	965
Amálgama	300	58
<b>Cerâmica</b>		
Alumina	360	300
Zircônia	220	820
Biovidro	35	42
HA	95	50
<b>Polímeros</b>		
PEUAPM	0,88	35
PU	0,02	35
PTFE	0,5	27,5
PA	2,1	67
PMMA	2,55	59
PET	2,85	61
PEEK	3,3	110
SR	0,008	7,6

Fonte: Park e Lakes, 2007.

Segundo Silva (2010), as principais propriedades de um biomaterial são: resistência à tração, módulo de elasticidade, fadiga, rugosidade, taxa de permeação, absorção de água, bioestabilidade, esterilização.

Fonseca et al., (2005), resumiu, dizendo que um biomaterial deve possuir as seguintes propriedades: biocompatibilidade, não toxicidade ou carcinogenicidade, estabilidade mecânica, peso e densidade adequados, baixo custo, fácil fabricação e estimular reações biológicas favoráveis em relação à sua função de uso.

Os biomateriais utilizados clinicamente induzem diferentes respostas do tecido e, em função do tipo de interface tecido/implante desenvolvido, podem ser classificados em:

### **Bioinertes**

São materiais que são tolerados pelo organismo e que praticamente não liberam nenhum tipo de componente. No entanto, esses materiais tendem a ser envolvidos por uma cápsula fibrosa que o isolam do meio vivo. A espessura da camada fibrosa depende de muitos fatores, como as condições do implante, tecido e carga mecânica existente na interface (HENCH e WILSON, 1993, CASTNER e RATNER, 2002). Não existem materiais totalmente inertes, há sempre uma resposta dos tecidos a qualquer corpo estranho quando inserido no corpo humano. Alterando algumas propriedades dos materiais é possível minimizar ou controlar a resposta do tecido.

### **Bioativos**

São os materiais que favorecem a ligação química entre o material implantado e o tecido ósseo (osteointegração), sem a presença de invólucros fibrosos. Em função da similaridade química entre tais materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a eles, permitindo a osteocondução por meio de recobrimento do implante por células ósseas. Quando o material bioativo é implantado no corpo, uma série de reações bioquímicas e biofísicas ocorrem na interface implante/tecido. Essas reações eventualmente resultam em uma ligação interfacial de natureza química e não física (HENCH e WILSON, 1993). Os materiais bioativos podem ainda ser classificados em:



**1) Materiais Osteoindutores** - são materiais que promovem uma resposta intracelular e extracelular na interface. Por meio desse processo uma superfície bioativa é colonizada pelas células-tronco livres no ambiente defeituoso, como resultado que acontece em intervenções cirúrgicas. Como exemplo estão os biovidros que podem ligar-se com tecido macio e também com o osso.

**2) Materiais osteocondutores** - Os materiais osteocondutores promovem uma superfície biocompatível que favorece o desenvolvimento das células ósseas. Isso ocorre quando um material promove somente uma resposta extracelular na interface. Como exemplo pode-se citar a hidroxiapatita sintética (CAO e HENCH, 1996).

### **Reabsorvíveis**

Implantes reabsorvíveis são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo após certo período de contato com o tecido. Esses materiais são muito importantes em aplicações clínicas em função de serem desnecessárias novas intervenções cirúrgicas para a retirada do material implantado. São exemplos desses materiais os fosfatos tricálcico (HENCH e WILSON, 1993) e os biopolímeros sintéticos e naturais biodegradáveis.

Segundo Shirliff e Hench (2003) a classificação de biomateriais em bioinertes ocorreu na primeira geração de biomateriais cuja meta principal era conseguir uma combinação das propriedades que fossem próximas as do tecido que seria substituído, de forma a provocar a mínima reação tóxica possível. Já os materiais reabsorvíveis e bioativos pertencem à segunda geração de biomateriais. Desde então, vários materiais foram enquadrados em uma dessas categorias, o que promoveu um avanço na produção de dispositivos para aplicações biomédicas e conseqüentemente, uma melhora na qualidade de vida das pessoas. Apesar desse avanço, observou-se que tais materiais possuíam vida curta em relação à média de expectativa de vida atual e falhavam em torno de 10-25 anos depois de implantado, o que levava o paciente a outra intervenção cirúrgica. Além disso, eles não respondem a uma mudança fisiológica ou estímulo bioquímico, como acontece no tecido vivo. Devido a essas limitações, surgiu recentemente uma geração de biomateriais que tem

como foco principal melhorar a capacidade de regeneração do tecido pela estimulação de genes, os quais iniciam o reparo do tecido danificado ou doente.

As interpretações cronológicas dos perfis de biocompatibilidade para biomateriais sintéticos mostraram que, na década de 60, os estudos se focalizaram sobre os produtos de degradação dos metais, suas ligas e polímeros. Na década de 70, foi dada ênfase às características químicas e falta de reatividade bioquímica (materiais bioinertes). Dez anos mais tarde, tiveram destaque o controle das interações e a integração entre biomateriais e tecidos (bioatividade e biointegração). A partir dos anos 90, atentou-se para as combinações de materiais e compósitos que fornecessem substratos anisotrópicos químicos e mecanicamente mais similares ao tecido a ser repostado (RATNER et al., 1996).

Segundo Vert (1992), biorreabsorção é a característica atribuída aos materiais que mostram total degradação pela diminuição de tamanho da cadeia, tendo seus subprodutos eliminados pelas rotas metabólicas do organismo. Tal conceito reflete a eliminação total do material, sem efeitos colaterais. A biodegradação é o termo utilizado para materiais que, devido à degradação macromolecular, sofrem dispersão no organismo. Seus subprodutos são retirados do local de ação, mas não são necessariamente eliminados pelo organismo. São ideais para a recuperação de tecidos danificados por certo período de tempo. Durante o processo de reparo, o novo tecido se forma substituindo, progressivamente, o implante nas funções requeridas.

A composição e comportamento do meio como: pH, presença de cátions e ânions, temperatura, e ainda tecidos ao redor do implante, devem ser levadas em conta quando sugerida a aplicação de um novo artifício terapêutico, já que esses fatores influenciam diretamente na aceitação do material pelo organismo. Porém, tais características são frequentemente negligenciadas pela literatura, provavelmente devido à sua grande complexidade. Tal negligência muitas vezes impossibilita a comparação entre os materiais já bem sucedidos como implantes em relação os novos (VERT, 2007).

Além dos biomateriais bioinertes, existem os biodegradáveis, que são aqueles que se degradam quando em contato com os fluidos orgânicos ou inorgânicos. A taxa de degradação deve permitir a substituição gradual do novo

tecido, transferindo progressivamente a tensão para o tecido em recuperação, evitando assim uma segunda intervenção cirúrgica para a remoção do implante (FERREIRA, 2002).

### 2.2.1 Biomateriais cerâmicos

Materiais cerâmicos são compostos inorgânicos, não metálicos, tipicamente duros, frágeis, com altas temperaturas de fusão, baixa condutibilidade elétrica e térmica e boa estabilidade química. Estes materiais têm uma ampla faixa de aplicações. Na área médica e odontológica tem se intensificado o uso deste material (ORÉFICE et al., 2006).

Biomateriais cerâmicos satisfazem necessidades tão diversas quanto: baixos coeficientes de atrito para a lubrificação de próteses articulares, superfícies de válvulas de coração que evitam coagulação do sangue, materiais que estimulem o crescimento ósseo e aqueles que podem prender espécies radioativas para tratamentos terapêuticos. Estes materiais podem ser encontrados na forma de microesferas, camadas ou coberturas finas em implantes metálicos, redes porosas, compostos com componentes poliméricos (compósitos). Materiais que podem ser classificados como biocerâmicas incluem alumina, zircônia, fosfatos de cálcio, vidros ou vidros cerâmicos à base de sílica e carbonos pirolíticos (AZEVEDO et al., 2007).

Existe uma série de cerâmicas de fosfato de cálcio consideradas biocompatíveis. Destas, a maioria é reabsorvível e dissolverá quando expostas aos ambientes fisiológicos. Em ordem crescente de solubilidade estes materiais incluem: tetrafosfato de cálcio ( $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ ), fosfato de cálcio amorfo,  $\alpha$ -fosfato tricálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ),  $\beta$ -fosfato tricálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) e hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (FOOK, 2007).

As propriedades mecânicas da hidroxiapatita não a tornam aconselhável para aplicações onde há um aumento de solicitações de carga, como é necessário em ortopedia. Porém, é utilizada como material para preenchimento e/ou recobrimento em materiais como titânio e ligas de titânio, onde suas



propriedades bioativas contribuem efetivamente para que haja uma maior osteointegração entre o metal e osso. Neste caso, o componente metálico contribui com a resistência mecânica suportando a carga. Estes recobrimentos usando hidroxiapatita são aplicados por pulverização à plasma. No entanto, é preciso um grande controle dos parâmetros de processamento para evitar decomposição térmica da hidroxiapatita em seus fosfatos de cálcio solúveis, devido às altas temperaturas de processamento utilizadas (AZEVEDO et al., 2007).

Azevedo et al. (2007), relata que, ao contrário dos outros fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita são mais resistentes sob condições fisiológicas. De fato, é termodinamicamente estável em pH fisiológico e participa ativamente na regeneração óssea, formando ligações químicas fortes com o osso em volta. Esta propriedade tem sido explorada para recuperação óssea rápida após traumas mais complexos.

A Figura 5 ilustra o crescimento de uma célula humana (osteoblasto) ao longo de uma superfície de hidroxiapatita.

Figura 5: Célula humana em crescimento em superfície de hidroxiapatita



Fonte: Azevedo et al., 2007.

Os fosfatos de cálcio de relevância biológica são: fosfato de cálcio amorfo, brushita, monetita, fosfato octacálcio, fosfato tricálcio, pirofosfato de cálcio e apatita. Dentre as fases minerais presentes em calcificações normais,

ou seja, não patológicas, as apatitas são as mais comumente encontradas. Os membros do grupo das apatitas são diferenciados com base nos seus ânions predominantes, isto é: fluorapatita (F), hidroxiapatita (OH) ou cloroapatita (Cl), dentre outros. A hidroxiapatita pura é um sal duplo de fosfato tricálcico e hidróxido de cálcio e tem estequiometria  $\text{Ca}_2\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  ou  $(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Cada membro pode fazer uma série de substituições isomórficas catiônicas ou aniônicas, levando à formação dos correspondentes isomorfos ou soluções sólidas. Estas substituições podem ser isoiónicas ou heteroiónicas (SILVA, 2008). A HA [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] (Figura 6) possui razão Ca/P de 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos. A HA pura cristaliza-se sob a forma monoclinica com espaçamento de grupo P21/b, no entanto, a temperaturas acima de 250°C, existe a transição da forma monoclinica para hexagonal (AOKI, 1994).

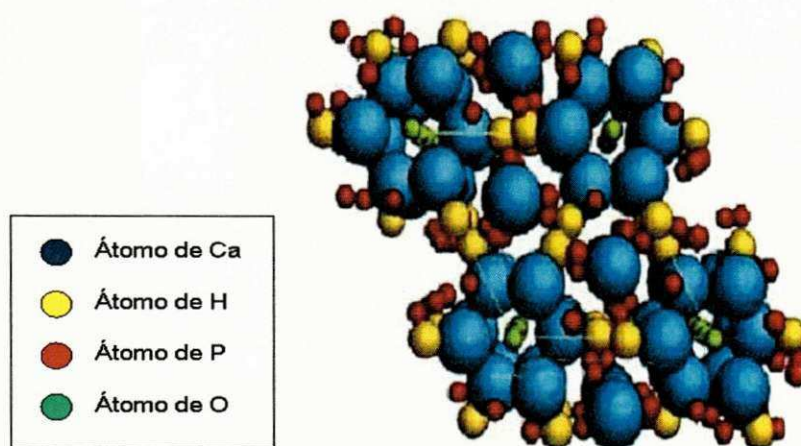
Apatita é o nome de uma vasta série de minerais isomorfos. O nome “apatites”, do grego, enganadora, justifica as dificuldades envolvidas na sua identificação devido à sua falta de estequiometria. As apatitas são formadas sob condições variadas, mas comumente ocorrem como minerais agregados às rochas ígneas. Elas também ocorrem em rochas sedimentares marinhas formadas por deposição química, em fósseis e em rochas metamórficas. Variam amplamente em tonalidade, desde o transparente, passando pelo amarelo, verde, marrom, vermelho e azul. Algumas apatitas exibem uma fluorescência amarela sob luz ultravioleta. Os cristais são hexagonais, prismáticos e podem se tornar alongados sempre terminando em faces bipiramidais (SILVA, 2008).

As apatitas são definidas pela fórmula química  $\text{M}_{10}(\text{Y})_6\text{Z}_2$  e formam uma gama variada de soluções sólidas como resultado da substituição de sítios  $\text{M}^{2+}$ ,  $\text{XO}_4^{3-}$  ou Z. As espécies  $\text{M}^{2+}$  são tipicamente cátions metálicos divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  ou  $\text{Cd}^{2+}$ . As espécies  $\text{Y}_3$  são tipicamente um dos seguintes ânions trivalentes:  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{VO}_4^{3-}$ ,  $\text{CrO}_4^{3-}$  ou  $\text{MnO}_4^{3-}$ . Os ânions monovalentes Z são geralmente  $\text{F}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Br}^-$  ou  $\text{Cl}^-$ . O ânion divalente  $\text{CO}_3^{2-}$  no lugar de  $\text{Z}_2$  dá origem às carbonatoapatitas (SILVA, 2008).

A forma de degradação da hidroxiapatita é mais uma de suas vantagens. Envolve um processo correspondente à degradação natural do tecido ósseo, por osteoclastos, sugerindo a possibilidade de completa degradação durante o

remodelamento normal do osso, o que seria ideal (Borges et al., 2000; Rumpel et al., 2006). Foi observado que ocorre mais rapidamente quando em contato com osso trabecular e medula óssea do que com o osso cortical (IMAIZUMI et al., 2006).

Figura 6: Rede Cristalina da hidroxiapatita



Fonte: Almqvist et al., 1999.

Algumas impurezas, ou substituições parciais da hidroxila por íons cloreto ou fluoreto, estabilizam a forma hexagonal à temperatura ambiente. Por esse motivo, monocristais naturais de HA geralmente exibem uma conformação hexagonal. Sua densidade é de  $3,16 \text{ Kg/m}^3$  e os parâmetros de rede são  $a=b=0,9423 \text{ nm}$  e  $c=0,6875 \text{ nm}$  (FERNANDEZ et al., 1999).

Os arranjos atômicos da fluorapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$  e da cloroapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$ , onde o fluoreto (F) e o cloreto (Cl), respectivamente, substituem o grupo (OH) na estrutura da apatita são similares. As substituições na estrutura das apatitas nos grupos (Ca),  $(\text{PO}_4)$  ou (OH) resultam em alterações nos parâmetros de rede e em algumas propriedades como solubilidade e morfologia, sem mudança significativa na simetria hexagonal. A maior estabilidade da fluorapatita é relacionada à uma dificuldade de difusão mássica através do canal formado pelos íons  $\text{Z}^-$  (SILVA, 2008).



Tabela 2. Propriedades de fosfatos de cálcio biologicamente importantes.

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ca/P
Fosfato tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato tricálcico ( $\alpha$ , $\alpha'$ , $\beta$ , $\gamma$ ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	$\text{CaHPO}_4$	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Fonte: Fernandez et al., 1999.

Além da solubilidade, a razão Ca/P, cristalinidade, sinterização e presença de poros são parâmetros que diferenciam a maior parte desses fosfatos. Para compostos quimicamente puros, a razão Ca/P varia entre 0,5 e 2,0 sendo que quanto menor é a razão, maior a sua acidez e a sua solubilidade em água (DOROZHKIN e EPPLE, 2002), como exposto anteriormente na Tabela 2.

Existe uma grande quantidade de fosfatos de cálcio na natureza e vários desses sais são vistos em calcificações normais e patológicas no corpo humano. As apatitas biológicas, que compõem as fases minerais dos tecidos calcificados (esmalte, dentina e ossos) e algumas calcificações patológicas (cálculos renais) são geralmente referidas a hidroxiapatitas de cálcio, HA. Porém, diferem da hidroxiapatita pura em estequiometria, composição, cristalinidade e em outras propriedades físicas e mecânicas. As apatitas

biológicas são deficientes em cálcio e apresentam substituição pelo carbonato. Estas apatitas apresentam substituições do tipo B associadas a substituições do  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Na}^+$ . Esta dupla substituição é necessária para que haja um balanço de cargas. Em algumas espécies de peixe ósseos e cartilagosos, as substituições são do tipo B associada a  $\text{OH}^-$  por  $\text{F}^-$  (SILVA, 2008). A Tabela 3 mostra a ocorrência dos fosfatos de cálcio em sistemas biológicos.

Tabela 3: Fosfatos de cálcio em sistemas biológicos

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Ocorrência
Apatita	$(\text{Ca},\text{M})_{10}(\text{PO}_4,\text{Y})_6\text{Z}_2$	Esmalte, dentina, osso, cálculo dental, rochas, cálculo urinário, calcificações em tecido mole.
Octacálcio fosfato, OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Cálculo dental e urinário
Brushita, fosfato dicálcico di-hidratado, DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cálculo dental, condrocalcinose, crystalluria, ossos decompostos
Whitlockita, fosfato tricálcico, $\beta$ -TCP	$(\text{Ca},\text{Mg})_9(\text{PO}_4)_6$	Cálculo dental e urinário, pedras salivarias, cáries em dentina, cartilagem artrítica, calcificações em tecido mole
Pirofosfato de cálcio di-hidratado	$\text{CaP}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Pseudo depósito de fluidos sinoviais

Fonte: Silva, 2008.

As cerâmicas de fosfato de cálcio têm merecido lugar de destaque entre as biocerâmicas. Sua utilização na substituição de tecido ósseo ocorre em consequência da identidade em termos de composição que existe entre estas cerâmicas e matriz óssea. Tal similaridade favorece a interação entre o tecido vivo e o material, com a formação de uma ligação biomaterial-tecido (PEREIRA et al., 2012).

Segundo Kokubo et al. (2003), um dos pré-requisitos para um material ligar-se ao osso é a formação de uma camada de apatita biologicamente ativa na interface material/osso, usualmente conhecida como "*bone-like apatite*". Tal camada de apatita é similar à fase mineralizada do tecido ósseo, em composição e estrutura. Acredita-se que ela atua como sinalizadora de

proteínas e células para iniciar a cascata de eventos que resulta na formação da estrutura óssea. Ou seja, os osteoblastos, células ósseas responsáveis pela produção do tecido ósseo, proliferam preferencialmente e se diferenciam produzindo apatita e colágeno sobre a camada de apatita formada anteriormente, o que favorece a união do implante com o osso. Quando isso ocorre, uma ligação química é formada entre o osso e a camada de apatita, reduzindo a energia interfacial entre elas.

Desde então, vários trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de avaliar *in vitro*, por meio de testes de bioatividade, a capacidade de formação da camada de apatita biológica sobre a superfície de diversos materiais, prevendo, assim, o potencial bioativo de cada um deles. Os testes *in vitro* de bioatividade se tornaram muito populares a partir da década de 90 pela sua relativa simplicidade. Entretanto, os resultados nem sempre apresentam uma boa reprodutividade, o que dificulta bastante o estabelecimento de uma relação de unicidade entre os resultados *in vitro* e o comportamento *in vivo*. Um teste usual de bioatividade consiste na utilização de uma solução que simula o fluido corpóreo acelular ou ainda de soluções supersaturadas de íons cálcio e fósforo. Contudo, a simulação do comportamento dos materiais *in vitro* desconsidera vários fatores devido à dificuldade de reproduzir fielmente os parâmetros biológicos. Apesar dessa dificuldade, os testes *in vitro* são imprescindíveis por questões éticas e econômicas, bem como por serem capazes de estabelecer possíveis mecanismos da interação interfacial entre o implante e o tecido ósseo (MASUDA et al., 1998, FUJIBAYASHI et al., 2003). As informações obtidas nestes ensaios são particularmente úteis como uma etapa preliminar à realização dos testes *in vivo*.

### **2.2.2 Biomateriais metálicos**

Entre os materiais utilizados para confecção de implantes destacam-se os materiais metálicos, devido à sua boa resistência mecânica e elevada tenacidade. A maioria dos elementos metálicos como Fe, Cr, Co, Ni, Ti, Ta, Mo, utilizados na confecção de implantes pode ser tolerada pelo corpo em

quantidades limitadas, sendo alguns até essenciais para funções celulares ou metabólicas. Entretanto, elementos metálicos não são bem aceitos pelo corpo em quantidades elevadas. Como o ambiente fisiológico é altamente agressivo para este tipo de material, tornando a corrosão metálica passível de ocorrer, isto poderá levar a uma desintegração e liberação sem controle destes elementos no organismo, sendo este um dos tópicos essenciais no estudo de biomateriais metálicos. O potencial de corrosão e os produtos de corrosão são, portanto, os principais fatores que limitam o tipo de metal que poderá ser empregado como biomaterial. A corrosão pode ainda levar à deterioração das propriedades mecânicas do material, comprometendo o desempenho da função (ORÉFICE et al., 2012).

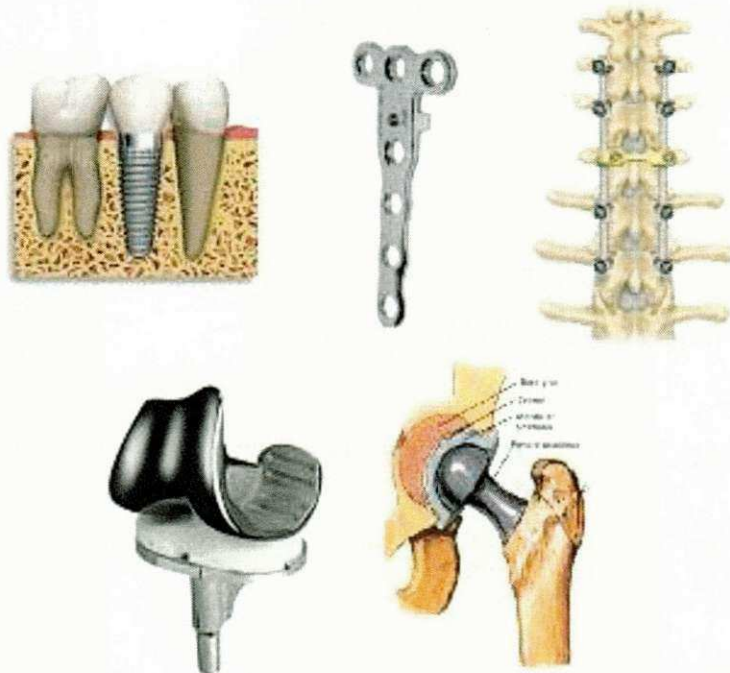
Os produtos comercializados para aplicação médica devem ser rigorosamente testados quanto à composição química e características estruturais e mecânicas, para garantir que estão de acordo com os padrões estabelecidos por normas específicas para implantes metálicos. Dentre os biomateriais metálicos, os aços inoxidáveis, principalmente os austeníticos do tipo 316L (ASTM F138), ligas Co-Cr-Mo (ASTM F75, F799), Co-Ni-Cr-Mo (ASTM F562), titânio puro, Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb (ASTM F67, F136 e F1295), são os mais usados. Eles possuem uma ampla aplicação em ortopedia, principalmente na confecção de próteses articuladas e ainda como elementos estruturais na fixação de fraturas, nas osteosínteses (ORÉFICE et al., 2012).

Alguns materiais artificiais implantados no osso tendem a ser encapsulados com tecidos fibrosos que os isolam do contato direto com a matriz óssea. Consequentemente, eles não aderem ao osso devido à ausência de ligação química na interface material/tecido ósseo. Dentre os materiais que apresentam tais características estão os já citados: titânio e suas ligas, o aço inoxidável, as ligas de Co-Cr-Mo e mais o polietileno, que são considerados bioinertes (KOKUBO et al., 2004).

A Figura 7 ilustra alguns artefatos metálicos bioinertes usados na ortopedia e odontologia.



Figura 7: Artefatos metálicos usados na ortopedia e odontologia



Fonte: [www.algarvemedicaltourism.com/http://www.cliquefacil.net/](http://www.algarvemedicaltourism.com/http://www.cliquefacil.net/) e  
[www.gilmarvasconcelos.blogspot.com.br/](http://www.gilmarvasconcelos.blogspot.com.br/)

A osteossíntese é um procedimento entendido no conceito médico, como: intervenção cirúrgica da fratura óssea com colocação de placas, parafusos e fio de cerclagem, possibilitando a estabilização duradoura destes fragmentos, durante um período de tempo necessário para a consolidação óssea desta fratura (MULLER et al., 1980).

Para o idealizador da técnica cirúrgica e designer das placas metálicas difundidas hoje no mundo inteiro, Prof. Dr. Maurice E. Muller, “uma osteossíntese completa sua missão, somente, quando se precede de uma fixação aberta e quando possibilita os movimentos ativos e indolores de músculos e articulações” (MULLER et al., 1980).

O implante fabricado pode ser submetido a métodos de modificação superficial e de acabamento, que dependem do metal, da aplicação e do fabricante. Alguns procedimentos que podem ser usados incluem: aplicação de uma camada de recobrimento poroso ou microporoso, implantação iônica, nitretação, polimento, limpeza química e passivação. As características



superficiais finais do implante serão muito importantes no desempenho biológico do mesmo (ORÉFICE et al., 2012).

Para uma confirmação de fato, a Figura 8 ilustra uma falha/fratura que ocorreu em uma osteossíntese de fêmur, após a colocação de uma placa metálica. Mesmo sabendo da grande resistência mecânica e elevada tenacidade que são apontadas como importantes vantagens dos implantes metálicos, pode-se deduzir que são falíveis e carecem de reavaliação. Dentre as quais uma substituição deste biomaterial por outro que seja bioativo, biocompatível e que possua propriedades mecânicas semelhantes ao do tecido ósseo danificado.

Figura 8: Fratura de placa metálica do fêmur. Foto do autor.



Estes implantes, como outros componentes estruturais estão sujeitos a falhas, oriundas das fraturas mecânicas do implante, desgaste e corrosão e ainda, de maneira mais agressiva, pela combinação desses eventos. Neste contexto, propriedades como resistência à corrosão, fadiga, desgaste e tenacidade a fraturas ainda são requisitos importantes para um biomaterial (PEREIRA et al., 2012).

Outras desvantagens de implantes metálicos incluem: a interferência com alguns tipos de técnicas de diagnóstico por imagem, a migração e colapso após algum tempo de implantação e a sensibilidade ao calor ou frio (OLIVEIRA, 2005; SARGEANT e GOSWAMI, 2007). Para eliminar essas desvantagens uma alternativa é a remoção do implante após a consolidação óssea, procedimento

que envolve a realização de nova cirurgia, com todos seus inconvenientes, custos e potenciais complicações (WEILER et al., 2000).

A busca por um material semelhante ao tecido vivo e que viabilize a recuperação do tecido danificado, como já mencionado, aumenta a necessidade para desenvolver artefatos diferentes para a fixação e regeneração ósseas.

### **2.2.3 Materiais poliméricos**

Polímeros são macromoléculas formadas pela simples repetição de unidades menores, onde *poli* significa “muito”, e *meros*, significa “parte”. São sintetizados através de simples moléculas chamadas *monômeros* por um processo chamado de polimerização (STEVENS, 1999; WESSEL, 2004). Como os metais e cerâmicas, os polímeros seguem os princípios da Ciência dos Materiais, que é a ciência que estuda as relações entre a estrutura e as propriedades, assim como a relação entre a estrutura dos materiais e seus processamentos. Os polímeros são materiais que integram uma variedade de dispositivos, sejam eles de uso comum (recipientes, embalagens, etc.) ou aqueles chamados de avançados, como dispositivos eletrônicos, biomateriais, etc. (ORÉFICE et al., 2006).

Os materiais poliméricos plásticos podem ser sintetizados por processos industriais (sintéticos) ou por plantas e microrganismos (naturais). Os materiais sintéticos podem ser obtidos a partir de fontes renováveis (plantas ou microrganismos) ou de fontes não renováveis (petróleo, gás, carvão) (STEVENS, 1999).

O material ideal seria aquele obtido de fontes renováveis (natural ou sintético) e degradáveis, apresentando propriedades físicas e químicas competitivas e com preço aceitável pelo mercado (GROSS e KALRA, 2002). A característica desejada destes materiais é a degradação em um período necessário à sua funcionalidade.

Os polímeros naturais existem no ambiente e não há relatos de acúmulos significativos, indicando que os microrganismos têm-se adaptado a

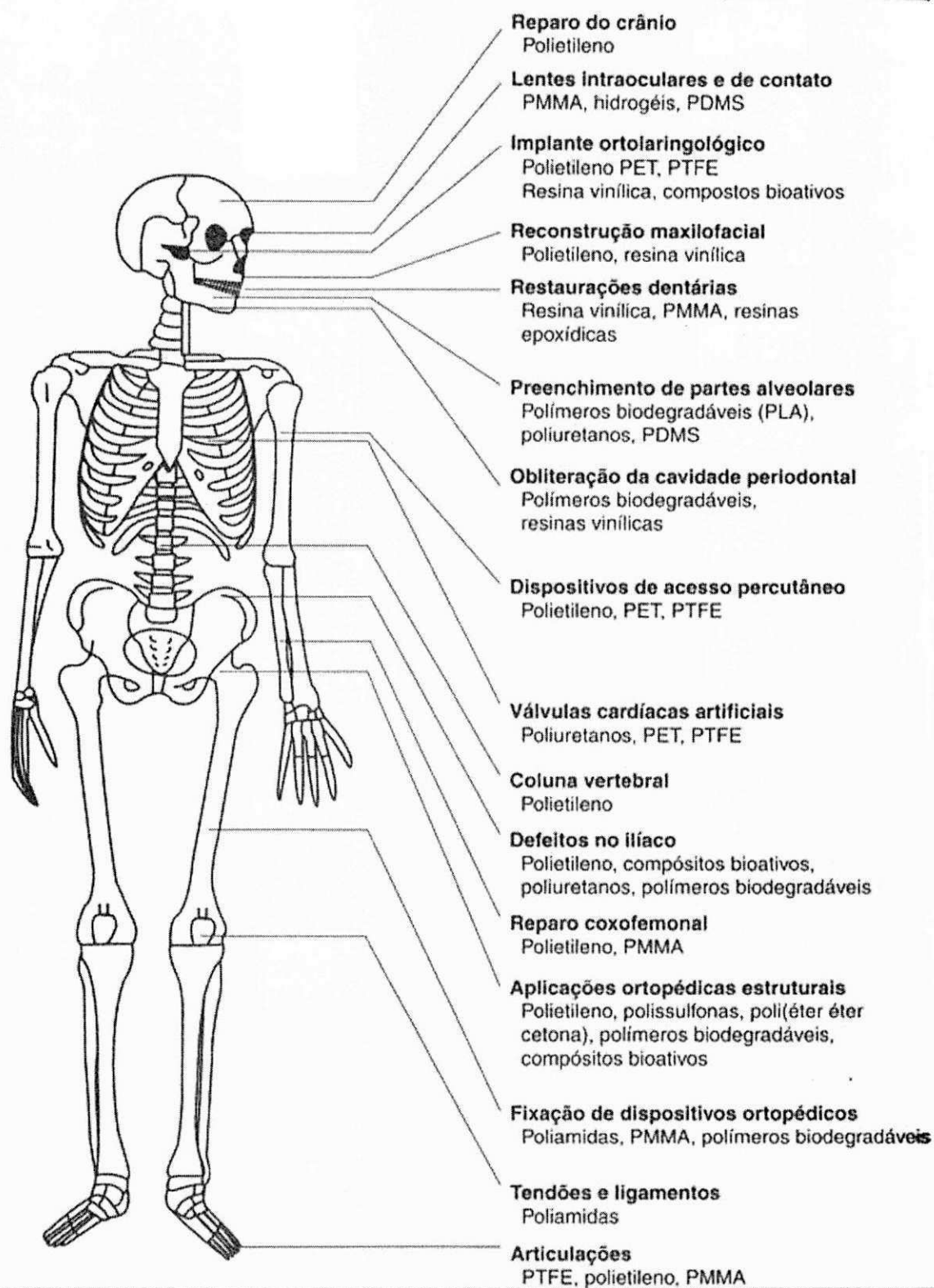
esses substratos, induzindo a produção de enzimas para degradá-los (ALEXANDER, 1973).

Os polímeros vêm sendo usados em aplicações biomédicas há mais de 50 anos. A flexibilidade de se projetar e selecionar polímeros com características únicas capazes de se adequarem às diferentes situações garantiu uma diversidade de aplicações deste tipo de material como biopolímeros. Dentre os biopolímeros, vêm se destacando mais recentemente os polímeros biodegradáveis que podem ser usados na substituição temporária de tecidos (enquanto estes se regeneram) ou como meio para a liberação controlada de fármacos (DEMET, 2011).

Segundo Bispo (2009), o emprego dos polímeros como biomateriais é devido às várias características que apresentam e que os tornam muitas vezes essenciais para desempenhar funções específicas no organismo. Dentre suas características importantes, apresentam-se as propriedades físico-químicas, sua versatilidade estrutural (que permite adequá-los a cada aplicação específica), baixo custo de fabricação de dispositivos, a diversidade de polímeros sintéticos e naturais e a relativa facilidade de obtenção. Existe ainda a possibilidade de alterar um ou outro grupamento químico pertencente à arquitetura macromolecular das cadeias, para viabilizar, por exemplo, o estabelecimento de alguma interação específica entre o biomaterial e o tecido hospedeiro.

Entretanto, todo tipo de material provoca algum tipo de resposta por parte do tecido anfitrião. Polímeros tradicionalmente usados em implantes para terapias, como o polietileno, poli (tereftalato de etileno) e o silicone, que são sintéticos, quando inseridos no corpo, provocam uma reação inflamatória que é resolvida através do encapsulamento do material por uma camada fibrosa rica em colágeno. A espessura da camada, em geral, é reduzida, mas depende das condições de implantação, forma de implante e procedimentos cirúrgicos (BISPO, 2009). A Figura 9 ilustra alguns polímeros utilizados em aplicações médicas.

Figura 9: Polímeros usados como biomateriais.



Fonte: Oréface et al., 2012.



Para Darea (2009), a biocompatibilidade de polímeros envolve normalmente quatro fenômenos:

- 1) Processos de concentração de macromoléculas junto à superfície dos materiais (adsorção), logo após a implantação destes no corpo;
- 2) Resposta local do tecido à presença do biomaterial (observada na forma de respostas inflamatórias e imunológicas);
- 3) Efeito do ambiente corpóreo no material, que pode ser visualizado, por exemplo, pelo estabelecimento de processos de degradação do polímero;
- 4) Resposta do corpo como um todo à presença do biomaterial, que pode ser percebida através do aparecimento de tumores, alergias, imperfeições generalizadas etc.

Os polímeros biodegradáveis têm sido extensivamente pesquisados e utilizados como biomateriais, visto que não precisam ser removidos e não causam efeitos indesejáveis em longo prazo. Existem várias aplicações para estes tipos de biopolímeros, tais como: suturas, dispositivos para liberação de fármacos, fixação de dispositivos ortopédicos, vasos sanguíneos temporários e matriz para engenharia de tecidos. Eles devem ser um meio adequado para o crescimento dos tecidos, guiando a resposta tissular, favorecendo a fixação e proliferação celular e controlando a resposta inflamatória e imunológica (DAREA et al., 2009).

Os fatores que afetam a biodegradação de materiais poliméricos são amplos e diretamente relacionados às condições ótimas para a expressão da degradação. De modo geral, a biodegradação é afetada pelas condições ambientais, pelas características do polímero e pelo potencial metabólico dos microrganismos. O ambiente pode afetar a degradação abiótica e biótica de materiais poliméricos em função das condições para que ocorram as reações químicas e bioquímicas. Entre estas condições ambientais destacam-se: a) a presença de nutrientes; b) temperatura adequada; c) umidade; d) aeração; e) pH neutro; f) pressão osmótica não muito elevada; h) potencial redox positivo; i) disponibilidade do polímero (ATLAS e BARTHA, 1998).

A estrutura do polímero afeta a capacidade de degradação. Entre as características estruturais, destacam-se: a) massa molar; b) ramificações laterais; c) polaridade e regularidade espacial; d) cristalinidade. Em relação à

massa molar, verifica-se que, à medida que esta aumenta, diminui a biodegradação do polímero. A massa molar muito elevada reduz a solubilidade do polímero, impede a sua absorção pelos microrganismos e dificulta as reações de oxidação via mono-oxigenases. A presença de ramificações no polímero diminui a sua degradação e os grupamentos laterais também podem aumentar a recalcitrância (ATLAS e BARTHA, 1998).

Os plásticos biodegradáveis, ou biopolímeros, ao contrário dos sintéticos derivados do petróleo, sofrem biodegradação com relativa facilidade, integrando-se totalmente à natureza. Devido a isso, institutos de pesquisas das universidades, muitas vezes ligados ao setor industrial, trabalham há alguns anos em linhas de pesquisa que visam desenvolvê-los. Uma substância é biodegradável se os microrganismos presentes no meio ambiente forem capazes de convertê-la em substâncias mais simples, existentes naturalmente em nosso meio (CANGEMI et al., 2005).

Para Darea (2009), os biopolímeros, também denominados como polímeros biodegradáveis, são aqueles que apresentam uma redução da massa molar quando em contato com o ambiente corpóreo. A degradação pode ser vista como um conjunto de processos, estimulados por agentes externos, que levam a modificações da estrutura dos polímeros, as quais ocasionarão alterações também nas propriedades do material. As degradações podem ser originadas tanto da atuação de entidades biológicas como de células, microrganismos, enzimas, quanto do ataque de espécies iônicas, radicais livres ou água. Em meio biológico, as formas mais comuns de degradação são a hidrólise e a degradação por enzimas. A degradação por enzimas pode ser variável de pessoa para pessoa, pois os níveis enzimáticos podem diferir bastante.

O estudo da biodegradação de polímeros tem dois caminhos opostos. Por um lado, existem muitas aplicações nas quais a resistência dos materiais aos ataques biológicos é necessária. Nessas aplicações, o polímero é exposto ao ataque de vários microrganismos e deve resistir a estes o máximo possível. Implantes dentais, ortopédicos e outros implantes cirúrgicos são expostos ao ataque biológico no corpo humano. Isolantes e pinturas também são objetos de ataque de microrganismos. Para todas essas aplicações, espera-se que o

polímero tenha uma vida útil e longa. Ele deve ser biorresistente. Por outro lado, tem-se uma necessidade cada vez maior de plásticos biodegradáveis, já que para minimizar o impacto ambiental são requeridos polímeros que possam ser degradados e desapareçam por completo em menor tempo possível, pela ação de microrganismos (CANGEMI et al., 2005).

Ainda, segundo Pradella (2006), biopolímeros são materiais poliméricos classificados estruturalmente como polissacarídeos, poliésteres ou poliamidas. A matéria-prima principal para sua manufatura é uma fonte de carbono renovável, geralmente um carboidrato derivado de plantios comerciais de larga escala como cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), milho (*Zea mays*), batata (*Solanum tuberosum*), trigo (*Triticum aestivum*) e beterraba (*Beta vulgaris*) ou um óleo vegetal extraído de soja (*Glicine may*), girassol (*Helianthus annuus*), e palma (*Jubaea chilensis*). Dentre os biopolímeros destacam-se como os de maior importância os seguintes: polilactato (PLA), polímeros de amido (PA), xantana (Xan) e poli (hidroxialcanoato) (PHA).

Destes, os biopolímeros que já estão em plena fase de comercialização, são os sintéticos biodegradáveis e bioabsorvíveis, os poli ( $\alpha$ -hidroxi ácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, os quais fazem parte o poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) e seus copolímeros (BARBANTI et al., 2005, SANTOS e WADA, 2007). Além disso, por serem biocompatíveis e facilmente absorvidos pelo organismo humano, podem ser empregados na área médico-farmacêutica, prestando-se à fabricação de fios de sutura, próteses ósseas e cápsulas que liberam gradualmente medicamentos na corrente sanguínea (BOHMERT et al., 2002).

O polilactato ou poli (ácido láctico) (PLA) é um poliéster produzido por síntese química a partir de ácido láctico obtido por fermentação bacteriana de glicose extraída do milho, além da aplicação supra citada, pode ser usado potencialmente na confecção de embalagens, itens de descarte rápido e fibras para vestimentas e forrações. Já os polímeros de amido (PA) por sua vez, são polissacarídeos, modificados quimicamente ou não, produzidos a partir de amido extraído de milho, batata, trigo ou mandioca (*Manihot esculenta*). Podem ser utilizados na produção de embalagens e itens de descarte rápido, em



blendas com polímeros sintéticos e na confecção de filmes flexíveis. A Xantana (Xan) é um exopolissacarídeo produzido por microrganismos a partir de carboidratos extraídos de milho ou cana-de-açúcar, com ampla utilização na área de alimentos e uso potencial na de cosméticos e na exploração de petróleo. Por fim, o polihidroxialcanoato (PHA) constitui uma ampla família de poliésteres, dentre eles o PHB (Poli (hidroxibutirato)), produzidos por bactérias através da biossíntese direta de carboidratos de cana-de-açúcar, de milho, ou de óleos vegetais extraídos principalmente de soja e palma. Dependendo da composição monomérica, podem ser utilizados na produção de embalagens, itens de descarte rápido e filmes flexíveis (PRADELLA, 2006).

A Tabela 4 apresenta algumas características dos principais polímeros sintéticos bioabsorvíveis.

Tabela 4: Poli ( $\alpha$ -hidroxi ácidos), polímeros sintéticos bioabsorvíveis.

Polímero	Sigla	Fórmula	Tg (°C)	Tm (°C)	Módulo de Elasticidade (GPa)	Tempo de Degradação (meses)
Poli(ácido glicólico)	PGA		35-40	225-230	8,4	6-12
Poli (L-ácido láctico)	PLLA		60-65	173-178	2,7	> 24
Poli(D,L-ácido láctico)	PDLLA		55-60	Amorfo	1,9	12-16
Poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico)	PLGA		45-50	Amorfo	2,0	1-2
Poli( $\epsilon$ -caprolactona)	PCL		(-65)-(-60)	58-63	0,4	24-36

Fonte: Barbanti et al., 2005

Pesquisas em torno do plástico biodegradável vêm ocorrendo em todo o mundo, nas quais se tem testado material proveniente de plantas: como o uso de óleo de mamona, cana-de-açúcar, beterraba, ácido láctico, milho e proteína de soja. Algumas aplicações já começam a sair dos laboratórios e, dentre elas, podemos citar duas experiências brasileiras bem sucedidas, como o poliuretano

obtido a partir do óleo de mamona e o PHB obtido a partir do bagaço da cana. Do ponto de vista estritamente técnico, os plásticos biodegradáveis ainda não apresentam toda a versatilidade dos convencionais. As novas pesquisas visam justamente aprimorar as características dos novos plásticos. Do ponto de vista econômico, eles ainda são mais caros que os derivados de petróleo (de duas a três vezes), mas têm se mostrado bastante competitivos em algumas aplicações, especialmente na área médica, graças à sua biocompatibilidade. Esta possui em sua composição química uma cadeia de ácidos graxos cuja estrutura molecular está presente nas gorduras existentes no corpo humano; por isso mesmo, quando esse material é utilizado em implantes, as células não “*enxergam*” o mesmo como um corpo estranho e não o repelem. O Grupo de Química Analítica e Tecnologia de Polímeros do Instituto de Química de São Carlos da USP, coordenado pelo professor Gilberto O. Chierice vem desenvolvendo esta pesquisa, com grande diferencial comparativo existente no mercado, em relação aos biodegradáveis, por ser formulada a partir do óleo de mamona, que é uma matéria-prima renovável e de origem natural. O óleo de mamona é um triglicerídeo derivado do ácido ricinoléico e é obtido da semente da planta *Ricinus communis*, encontrada em regiões tropicais e subtropicais, sendo muito abundante no Brasil (CANGEMI et al., 2005).

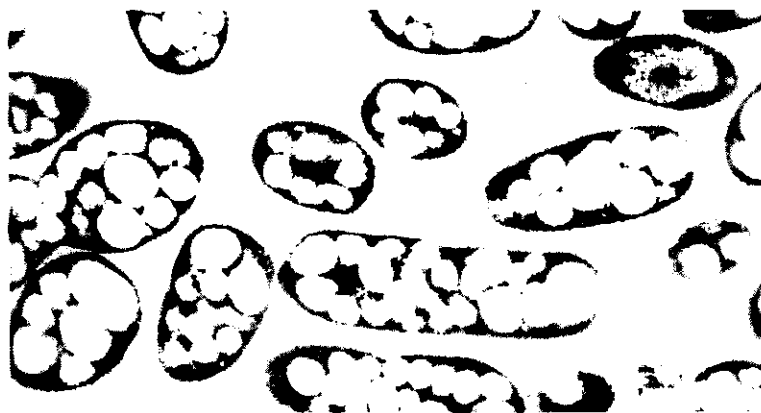
Na última década, destacam-se outros estudos de aplicação da mamona na medicina, como cimento ósseo para recuperação de falhas ósseas e para confecção de próteses. O material recebeu, em junho de 2003, a aprovação da Food and Drug Administration (FDA), a agência do governo norte-americano responsável pela liberação de novos alimentos e medicamentos. Esse certificado abriu as portas para o maior mercado do mundo na área de saúde e garante visibilidade científica e comercial deste biomaterial em todo o planeta. (CANGEMI et al., 2005).

A outra inovação bem sucedida na pesquisa brasileira é o PHB no sentido de substituir os derivados de petróleo, com a finalidade de amenizar o impacto ao meio ambiente que estes provocam. Como também, na aplicação da área médica.

Uma das recentes descobertas deste produto é de autoria de pesquisadoras da divisão de Química do Agrupamento de Biotecnologia do IPT

(Instituto de Pesquisas Tecnológicas). Elas desenvolveram uma técnica que usa bagaço de cana para produzir plástico biodegradável por meio da ação de bactérias que se alimentam deste bagaço e formam, dentro de si, o PHB, que pode ser usado na fabricação de utensílios domésticos, sacolas plásticas e na aplicação de pesquisas para uso da área médica. A bactéria é a *Burkholderi a sacchari* (Figura 10), que transforma o bagaço de cana em algo que pode ir para as prateleiras dos supermercados ou para implantes no corpo humano. Foi descoberta pelo próprio IPT, que já está trabalhando desde 2000 na fabricação de PHB diretamente a partir do açúcar, em uma usina em Serrana – SP. A planta piloto produz de 50 a 60 toneladas por ano de PHB, que é exportado para o Japão, EUA e Europa (CANGEMI et al., 2005). Neste sentido, o açúcar e o álcool deixaram de ser os únicos produtos de importância comercial extraídos da cana-de-açúcar. Agora, se junta a estes a produção de plástico biodegradável a partir do açúcar.

Figura 10: A bactéria *Burkholderi a sacchari* e a produção do PHB.



Fonte: Cangemi et al., 2005.

Outra aplicação de sucesso dos plásticos biodegradáveis na área médica é como veículo para a liberação controlada de drogas no organismo. E como exemplo temos os biopolímeros bioabsorvíveis, contendo alguns hormônios. O recipiente plástico é degradado (bioabsorvido) progressivamente e, com isso, a substância é absorvida pelo paciente no ritmo determinado pelas necessidades terapêuticas (CANGEMI, et. al., 2005). Outros exemplos na

aplicação deste biopolímero são: nas suturas cirúrgicas, dispositivos para fixação óssea (PLA e o PGA), enxertos vasculares e pele artificial.

Existem hoje trabalhos que mencionam vários materiais que podem ser produzidos, pelo menos em parte, a partir de matérias-primas renováveis e que são biodegradáveis, ou parcialmente biodegradáveis, em ambientes microbiologicamente ativos. Aqueles que já estão sendo produzidos em escala comercial ou semi-comercial (piloto), estão apresentados na Tabela 5 numa tentativa de classificar as principais famílias de bioplásticos atualmente produzidas.

Tabela 5: Principais famílias de bioplásticos.

<b>Bioplástico</b>	<b>Tipo de polímero</b>	<b>Estrutura/ Método de produção</b>
1. Polímeros de amido	Polissacarídeo	Polímero natural modificado.
2. Polilactatos (PLA)	Poliéster	Ácido láctico produzido por fermentação seguido de polimerização.
3. Polihidroxialcanoatos (PHAs)	Poliéster	Produzido por fermentação direta de fontes de carbono por microorganismos ou em vegetais geneticamente modificados.
4. Poliésteres alifáticos – aromáticos (PAA) Politrimetilenotereftalato (PTT) Polibutilenotereftalato (PBT) Polibutilenosuccianato (PBS)	Poliéster	1-3 propanodiol produzido por fermentação seguido de copolimerização com AT (ou DMT) 1-4 butanodiol produzido por fermentação seguido de copolimerização com AT, 1-4 butanodiol copolimerizado com ácido succínico, ambos produzidos por fermentação.
5. Poliuretanas (PURs)	Poliuretano	Polimerização de poliois obtidos por fermentação ou purificação química com isocianatos petroquímico.
6. Nylon Nylon 6 Nylon 66 Nylon 69	Poliamidas	Caprolactama produzida por fermentação, Ácido adípico produzido por fermentação, Monômero obtido por transformação química do ácido oléico.

Fonte: Pradella, 2006.

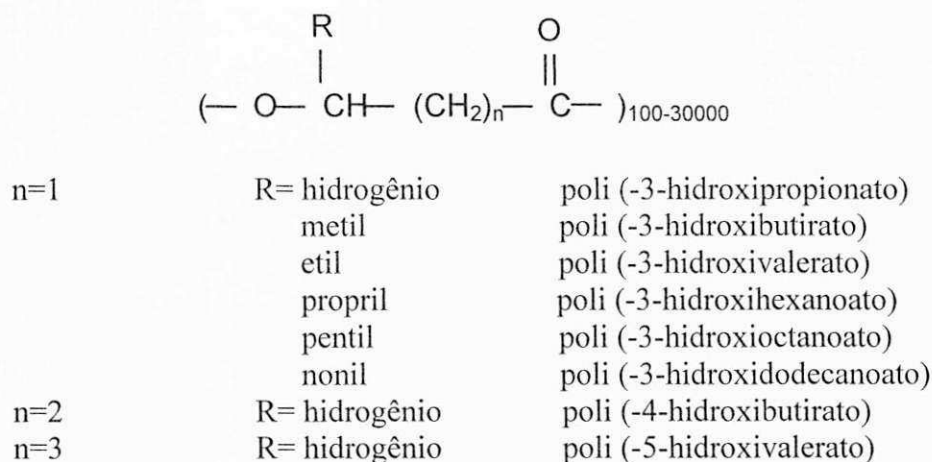
### 2.2.3.1 Poli (hidroxialcanoatos) (PHA)

Poli (hidroxialcanoatos) são poliésteres lineares, compostos por monômeros do tipo ácido (R)-3-hidroxi graxos, sintetizados por várias bactérias gram-positivas e negativas. Nestes polímeros o grupo carboxil de um monômero forma uma ligação do tipo éster com o grupo hidroxil de outro monômero (MADISON e HUISMAN, 1999).

Estas macromoléculas constituem uma forma de estocagem de carbono e energia e são produzidas em condições limitantes de nutrientes (ANDERSON e DAWES, 1990). Além deste papel, os PHAs podem proteger as células em diferentes condições de estresse como, por exemplo, choque térmico, irradiação por UV, exposição a agentes oxidantes e choque osmótico (KADOURI et al., 2003). A massa molar destes polímeros varia entre  $2 \times 10^5$  a  $3 \times 10^6$  Daltons dependendo do tipo de microrganismo e das condições de crescimento (BYROM, 1994).

A estrutura final dos PHAs varia de acordo com o número de carbonos (1-13) do grupo alquil (R) na posição C3 do monômero (Figura 11). Estes polímeros subdividem-se em duas classes de acordo com o comprimento do grupo alquil de cada monômero: PHAs de cadeia lateral curta [C3-C5] (ssc-PHA ou PHA<sub>scL</sub> = *short chain lenght*) ou PHAs de cadeia lateral média [C6-C14] (msc-PHA ou PHA<sub>mCL</sub> = *medium chain lenght*) (MADISON e HUISMAN, 1999).

Figura 11: Estrutura geral dos polihidroxialcanoatos



Fonte: Ojumu et al., 2004.

Os Poli (hidroxialcanoatos) são poliésteres completamente biodegradáveis em ambientes microbiologicamente ativos, além de serem biocompatíveis. Podem ser biossintetizados por bactérias a partir de diversas fontes de carbono renováveis ou não renováveis ou por plantas geneticamente modificadas. Os polímeros biodegradáveis mais conhecidos e promissores atualmente são o Polihidroxibutirato (PHB) e o Polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHB-HV), da família dos Polihidroxialcanoatos (PHA) (PRADELLA, 2006).

Os polímeros biodegradáveis, sintetizados em culturas bacterianas, não foram descobertos e nem estudados recentemente. Em 1925, Maurice Lemoigne observou a presença de grânulos refratários no interior de células da bactéria *Bacillus Megaterium*, que eram solúveis em clorofórmio. Mais tarde esse material foi identificado como PHB. O interesse pelo PHB só aumentou após a década de 50, quando foram realizados estudos sobre as propriedades físicas e químicas deste biopolímero, incluindo, ponto de fusão, diferentes métodos e fontes de extração e massa molar. Sua estrutura cristalina foi observada, assim como a morfologia do grânulo e suas propriedades foram analisadas (ALMEIDA, 2005).

### **2.2.3.2 Poli (hidroxibutirato) (PHB)**

O PHB, um PHA de cadeia curta, apresenta-se como um poliéster linear saturado, totalmente biodegradável, que se comporta como um termoplástico convencional. Algumas de suas propriedades físico-químicas e mecânicas estão listadas na Tabela 6 em comparação com as propriedades do copolímero PHB-HV, do Polipropileno (PP) e do Policloreto de vinila (PVC).

O PHB é insolúvel em água e solúvel em alguns solventes polares como o clorofórmio. O PHB é um material semicristalino (80% de cristalinidade), o que dificulta seu processamento e o torna extremamente quebradiço, limitando seu uso como plástico comercial. No processo de cristalização, o PHB forma estruturas esferulíticas compostas por uma fase amorfa e outra cristalina.



Tabela 6: Algumas propriedades físico-químicas do PHB, PHB-HV, PP e PVC.

Propriedades	PHB	PHB-HV	PP	PVC
T <sub>m</sub> (°C)	175	157-102	176	-
Cristalinidade (%)	80	69-39	70	-
T <sub>g</sub> (°)	4	2 a (-8)	(-10)	84
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,25	1,2	0,905	1,4
Tensão de ruptura (MPa)	40	36-22	38	51
Alongamento na ruptura (%)	4	-	> 250	18,2

Fonte: Almeida, 2005.

A degradação do polímero ocorre primeiramente na fase amorfa e, subsequentemente, na fase cristalina. A taxa de degradação é influenciada pelo grau de cristalinidade do material assim como sua morfologia. O tamanho dos esferulitos influencia diretamente as propriedades mecânicas do polímero, quanto maiores essas estruturas, mais quebradiço o material, assim como influenciam também a taxa de degradação do polímero. O número de esferulitos e o seu tamanho dependem da temperatura de cristalização; grandes estruturas são formadas em temperaturas próximas de sua temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>), enquanto uma grande quantidade de pequenos esferulitos é formada em temperaturas mais baixas (ALMEIDA, 2005).

As principais razões que tornam o PHB quebradiço conforme ALMEIDA (2005) são:

- A cristalização secundária, que ocorre durante o armazenamento à temperatura ambiente, formando novas lamelas na fase amorfa;
- Baixa densidade de nucleação, formando grandes esferulitos que provocam rachaduras inter-esferulíticas, deteriorando as propriedades mecânicas;
- Possuir temperatura de transição vítrea próxima à temperatura ambiente.

Uma forma de melhorar as propriedades mecânicas do PHB é através da adição de plastificantes, lubrificantes e agentes de nucleação, ou misturando o PHB com outros polímeros. Adicionando agentes de nucleação ao PHB, o número de pequenos esferulitos cresce, diminuindo a cristalização secundária, o que torna o PHB menos quebradiço. Com a adição de certos plastificantes, aumenta-se o movimento molecular e, conseqüentemente, diminui-se a

temperatura de transição vítrea. Além de o PHB ser muito quebradiço, ele tem um custo muito alto de produção quando comparado aos polímeros convencionais. Misturar os polímeros biodegradáveis, como o PHB, com polímeros convencionais já conhecidos, apresenta-se como uma alternativa para a obtenção de materiais com propriedades mecânicas satisfatórias para o comércio, a um custo não muito alto. Deste modo, é possível formar misturas poliméricas capazes de substituir polímeros não degradáveis, diminuindo o impacto ambiental causado por esses materiais, porém preservando as propriedades necessárias para certa utilização industrial (ALMEIDA, 2005).

Do ponto de vista industrial, atualmente as bactérias são o sistema de escolha e as fontes de carbono renováveis preferidas. A biossíntese de PHA por bactérias ocorre em biorreatores quando há excesso de fonte de carbono e a limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células (N, P, Mg, Fe, etc.) e quando o polímero é acumulado dentro das células bacterianas em forma de grânulos, chegando a atingir cerca de 90% de sua massa em base seca. O material é em seguida extraído à quente por solventes, filtrado para remoção dos restos celulares, precipitado, dessolventizado e seco. Posteriormente, é convenientemente formulado para vários tipos de aplicações. Uma rota alternativa é a extração do polímero através do uso de enzimas. Neste caso, a biomassa produzida é tratada com enzimas hidrolíticas para remoção da porção não PHA da célula. Liberando desta maneira os grânulos do polímero. Este material é então precipitado e seco (PRADELLA, 2006).

Suas propriedades físicas permitem que sejam utilizados como substitutos dos plásticos convencionais de origem petroquímica na sua grande maioria de aplicações, como peças feitas por termoformagem e injeção em moldes, filmes extrudados, fios, entre outros. Além disso, por ser biocompatível, encontra na área médica aplicações como fios de sutura, moldes para engenharia de tecidos, próteses ósseas (COUTINHO et al., 2004) e matriz para liberação controlada de fármacos. As propriedades físicas de PHA, bem como suas aplicações, dependem em grande parte de sua composição monomérica e do tamanho da cadeia. Por outro lado, a composição de PHA e sua massa molar, dependem da natureza química da matéria-prima oferecida como fonte de carbono, das condições ambientais de operação do biorreator e do tipo da

bactéria empregada. Desta maneira, as características do polímero podem ser racionalmente moduladas no biorreator de produção (PRADELLA, 2006).

Os poli (hidroxialcanoatos) possuem propriedades físicas que se assemelham aos polímeros convencionais (Tabela 7), podendo, portanto, substituí-los potencialmente em diversas aplicações.

Tabela 7: Propriedades físicas de alguns biopolímeros

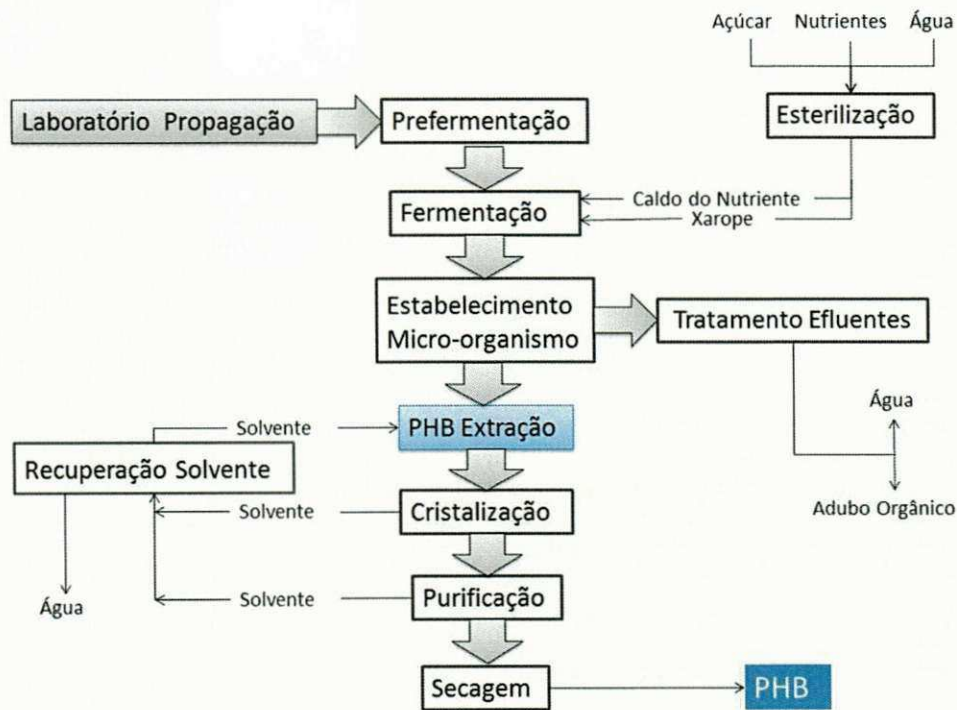
Propriedades	Tipo de polímero biodegradável			
	PLA	PGA	PCL	PHB
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,21-1,25	1,50-1,71	1,11-1,15	1,18-1,23
Tensão de ruptura (MPa)	21-60	60-99,7	20,7-42	40
Módulo de Young (GPa)	0,35-3,5	6-7	0,21-0,44	3,5-4
Deformação (%)	2,5-6	1,5-20	300-1000	5-8
Tg (°C)	45-60	35-45	-65-(-60)	5-15
Tm (°C)	150-162	220-233	58-65	168-182

Fonte: Oréfice et al., 2012.

No ano 2000 com a criação da empresa PHB Industrial S/A, o projeto-piloto que teve início em 1992, através da parceria da COPERSUCAR (Centro de Tecnologia COPERSUCAR - CTC) / Usina da Pedra / Instituto de Pesquisa Tecnológica do Estado de São Paulo - IPT / Universidade de São Paulo – USP, e depois em 1995 com um plano de produção na Usina da Pedra, em Serrana, no Estado de São Paulo, foi remodelado e adequado, operando em uma capacidade de 60 ton./ano. Quando inicialmente era para apenas 2,0 toneladas. O plástico biodegradável em questão é composto basicamente por carbono, oxigênio e hidrogênio e denomina-se polihidroxibutirato (PHB) e dele pode derivar um copolímero polihidroxibutirato-valerato (PHB-HV), sendo os dois pertencentes à família dos polihidroxialcanoatos (PHA). Os dois são descritos como poliésteres de origem natural similar, em termos de aplicação e propriedades físico-químicas apresentam características semelhantes ao polietileno (PE) e ao polipropileno (PP) (FILHO, 2003).

As propriedades mais realçadas neste plástico são a sua produção como matéria-prima renovável, tal qual a cana-de-açúcar, e a sua completa biodegradabilidade (não poluidora) além de sua capacidade de ser produzido por processos que usam tecnologia limpa. Este plástico é um produto biocompatível e ecologicamente correto. Sua produção é feita por meio da fermentação (microorganismos da espécie *alcaligenos s.p.*) do açúcar da cana-de-açúcar que inicialmente é invertido por um processo enzimático transformando-se em um xarope. No processo também se utiliza um álcool superior como solvente, que é empregado como extrator do biopolímero, de acordo com o fluxograma (Figura 12). No seu processo de produção, o bagaço da cana-de-açúcar é usado como fonte para a produção de energia elétrica e de vapor. Os efluentes são basicamente água e matéria orgânica da bactéria que, por sua vez, é lançada na lavoura de cana-de-açúcar como fertilizante orgânico (FILHO, 2003).

Figura 12: Produção do PHB.



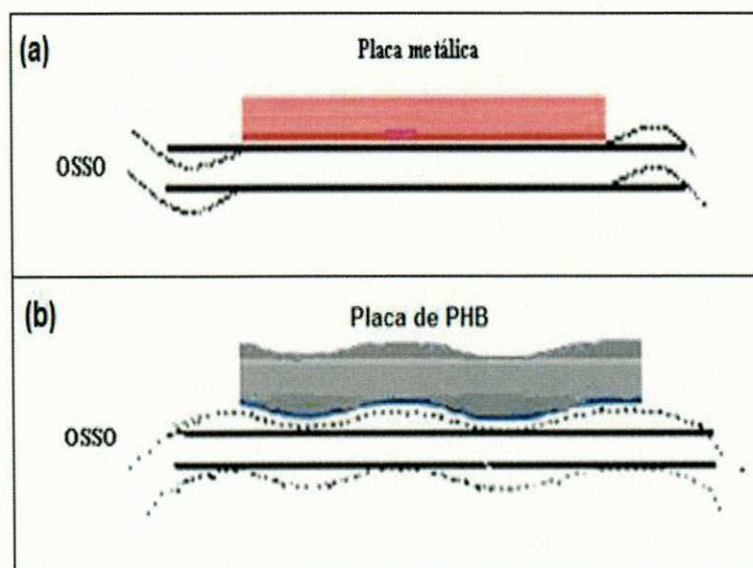
[www.biocycle.com.br/fluxograma.htm](http://www.biocycle.com.br/fluxograma.htm)



Muitos biopolímeros têm sido alvo de pesquisas relacionadas à sua utilização na área ortopédica com o objetivo de utilizar estes materiais como um auxiliar na reparação/restauração óssea. Isto se deve a vários fatores, dentre eles o módulo de elasticidade destes é mais próximo ao módulo de elasticidade do osso quando comparado ao de um material metálico, como é o caso dos implantes de aço inox 315 L e titânio utilizados atualmente. Grandes diferenças no módulo de elasticidade do implante e do osso, como a degradabilidade daquele, podem acarretar o comprometimento deste, ocasionando a necessidade de uma nova cirurgia no seguimento danificado. Como também, por ser biodegradável.

A Figura 13 ilustra o tipo de implante que é utilizado atualmente e a situação proposta deste estudo. Na situação (a), é mostrado o segmento do osso reforçado pela placa metálica onde houve uma fratura óssea e a imobilidade do tecido ósseo adjacente, de propriedade mecânica diferente. Levando a um concentrador de tensão nas suas extremidades. A situação proposta (b) apresenta uma placa do PHB, que está em contato com o osso, após fratura, mostrando a distribuição de tensão ao longo deste segmento ósseo, minimizando as concentrações de forças nas extremidades.

Figura 13: Tipo de implante utilizado atualmente (a) e situação proposta (b). Fonte do autor



A aplicação de biomateriais poliméricos, como exemplo, o polietileno de ultra-alto peso molecular (PEUAPM), tem sido investigada não só no campo das pesquisas, mas já como objeto de análise de resultados relacionados à sua utilização na área ortopédica há cinco décadas. Enquanto que a utilização dos biopolímeros naturais e biodegradáveis ainda está em fase de pesquisa e iniciando sua aplicação. Desta forma, a melhor maneira de viabilizar sua implantação, é fomentar as pesquisas no sentido de dar continuidade aos estudos *in vitro* e *in vivo*, com o objetivo de prever as reações que os mesmos podem manifestar em humanos, como também, a adequação das propriedades mecânicas às quais este biopolímero se propõe a atuar.

## **2.5 Polímeros utilizados na reparação óssea**

A seguir, estão relacionados alguns trabalhos que utilizaram biopolímeros em regeneração de tecidos ósseos.

Chierice et al. (2002) investigaram a utilização da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea de cães. Para a realização deste trabalho foram utilizados 18 cães, onde foram produzidas falhas ósseas com dimensões de 1,0cm de diâmetro por 0,8cm de profundidade nas metáfises distais dos fêmures e proximais das tíbias bilateralmente, que foram preenchidas com a poliuretana da mamona. Todos os animais foram sacrificados após três, seis e doze meses após a cirurgia. Macroscopicamente, ao longo do tempo, observou-se aderência maior dos corpos-de-prova no interior dos defeitos ósseos, especialmente nos porosos. As avaliações radiográficas evidenciaram aspectos semelhantes aos obtidos pela tomografia computadorizada, com formação de uma linha de menor radio-densidade entre o implante e o tecido ósseo. Os dados obtidos com a microscopia ótica demonstraram a formação de um tecido conjuntivo fibroso na interface osso-poliuretana, que não diminuiu de espessura ao longo do tempo e que penetrou superficialmente nos corpos-de-prova de maior porosidade, especialmente com maior tempo de evolução. Não foi verificada, histologicamente, a presença de reação tipo corpo estranho ou de células



fagocitárias e, na microscopia eletrônica de varredura, não foram observados sinais de irregularidades na superfície da poliuretana em contato com o tecido ósseo, indicativos de reabsorção do material. Assim, concluiu-se que o implante de poliuretana foi biocompatível, mas comportou-se como um espaçador biológico, preenchendo uma cavidade e permanecendo biotolerante ao longo do tempo, sem osteointegração.

Pyles (2003) avaliou em seu estudo a eficácia dos implantes bioabsorvíveis de poli (ácido lático) (PLLA) na fixação interna de fraturas induzidas no osso sesamóide proximal lateral esquerdo de equinos. Foram realizadas cirurgias de osteossíntese do sesamóide proximal lateral de quatro animais do grupo GI, os quais receberam implantes bioabsorvíveis, e de quatro animais do grupo GII, os quais receberam implantes metálicos. Os animais selecionados foram submetidos a exames clínicos e radiográficos, antes de serem anestesiados e submetidos à cirurgia. Durante o ato cirúrgico dos animais de ambos os grupos, foi realizada a osteotomia do sesamóide proximal lateral do membro anterior esquerdo, exame radiográfico, fixação dos fragmentos com parafuso bioabsorvível (animais do grupo GI) e metálico (animais do grupo GII), e após a cirurgia, novo exame radiográfico, ferrageamento e imobilização com gesso sintético. Após a recuperação anestésica, cada animal foi deslocado para uma baia individual, na qual permaneceu confinado por 30 dias. Quando foi realizada a remoção do gesso, foram feitos novo ferrageamento e novo exame radiográfico. Os quatro animais de cada grupo foram submetidos a acompanhamento radiográfico, realizado em 30, 60, 90 e 120 dias. No exame radiográfico realizado após 30 dias dos implantes, foi observado em todos os animais do grupo GII o preenchimento do foco de fratura de aspecto radiopaco, porém com densidade reduzida. Nos animais do grupo GI, tal preenchimento apresentou-se de qualidade superior quando comparado com o grupo GII. Após a remoção do gesso, cada animal permaneceu confinado em baia por mais trinta dias (60 de observação), com uso de bandagem no local e então foram soltos em piquetes, onde permaneceram até o final do experimento. Após 120 dias, os animais do grupo GII apresentaram ao exame radiográfico, a reparação do foco de fratura em sua quase totalidade e, ao exame clínico, uma diminuição na flexão metacarpofalangeana e uma claudicação de grau I. Os quatro animais

do GI apresentaram ao exame radiográfico a reparação do foco de fratura em sua quase totalidade, pontos de esclerose ao redor do implante bioabsorvível e não apresentaram claudicação. Logo, pode-se concluir que, sob à análise radiográfica, os implantes bioabsorvíveis de PLLA possibilitaram remodelamento ósseo de melhor qualidade quando comparados com os implantes metálicos.

Leonel et al. (2004) realizaram um estudo para avaliar a ação da poliuretana da mamona (registrado no Brasil como composto ósseo de ricinus – COR) durante a neoformação óssea, devido à importância da cicatrização dos defeitos que venham a acometer os tecidos ósseos. Para a realização deste estudo foi utilizado um grupo de 45 ratos. Realizou-se a formação de um defeito ósseo na região do arco zigomático de todos os animais, sendo que todos estes defeitos foram preenchidos com o polímero de mamona. Decorridos períodos de 15, 30, 60, 90 e 120 dias, os animais foram sacrificados e seguiram-se as tramitações laboratoriais de rotina para análise histológica. Os resultados mostraram que o polímero de mamona auxiliou no processo cicatricial. Por meio da análise dos resultados verificou-se que o polímero de mamona mostrou-se como um material auxiliar ao processo regenerativo dos defeitos ósseos criados experimentalmente no arco zigomático de ratos, levando à formação de tecido ósseo maduro. A neoformação óssea ocorrida deveu-se principalmente ao fenômeno biológico da osteocondução, uma vez que o polímero de mamona permitiu o crescimento tecidual em meio a seus poros e sobre sua superfície externa desde os períodos iniciais de observação, atuando assim como um agente osteocondutor.

Bolson et al. (2005) realizaram um estudo de análise clínica, radiológica, macroscópica e histológica do úmero de codornas domésticas (*Coturnix japonica*), submetido ao implante da poliuretana derivada do polímero de mamona (*Ricinus communis*). Para isso, foram utilizadas 20 codornas, machos e fêmeas, separadas aleatoriamente em quatro grupos de cinco animais, os quais receberam o implante no úmero esquerdo, com exame clínico diário durante o período pós-operatório, avaliação radiológica imediata e quinzenal e macroscópica e histológica aos 15, 30, 60 e 90 dias. Clinicamente não foram observadas alterações locais, regionais nem sistêmicas. Ao exame radiológico, notou-se aumento de densidade local, sem sinais de alteração óssea, dos

tecidos circunjacentes, e de sacos aéreos. A análise macroscópica revelou que a poliuretana de mamona não foi absorvida em nenhum dos quatro grupos, permanecendo implantada no seio do osso pneumático, porém, notou-se alteração em sua resistência. O exame histopatológico mostrou inicialmente uma mínima reação inflamatória, discreta fibrose ao redor do implante e osteointegração pela presença de trabéculas e medula óssea no interior do implante. Concluiu-se que a poliuretana derivada do polímero de mamona é biocompatível em aves, podendo ser utilizada na cirurgia ortopédica, ocorrendo osteointegração.

Barros et al. (2006) estudaram blendas biodegradáveis e bioabsorvíveis de policaprolactona (PCL) e Nafion<sup>®</sup> (copolímero baseado no tetrafluoroetileno sulfonado) para serem utilizadas como materiais de implantes em tíbias de ratos. A policaprolactona possui alta cristalinidade, o que garante um processo de degradação relativamente lento quando implantada em sistemas biológicos. A utilização do Nafion<sup>®</sup> teve por finalidade a avaliação da influência de um polímero condutor iônico sobre a taxa de deposição de células que constituem o tecido ósseo e, portanto, sua restauração. Neste trabalho, testou-se a utilização de blendas de PCL e Nafion<sup>®</sup> obtidas pelo processo sol-gel na presença do 3-aminopropiltriethoxissilano (3-APTEOS). As blendas foram utilizadas como material de reposição óssea em fraturas com perda de massa óssea em tíbias de rato. Esse sistema polimérico tem sido investigado também quanto às suas propriedades físico-químicas, onde as blendas foram caracterizadas por testes de solubilidade, análise termogravimétrica e calorimetria diferencial de varredura. Para este estudo foram realizados testes *in vivo* com as blendas contendo 90% e 70% em massa de policaprolactona como materiais de implantes em fraturas ósseas em ratos. Os resultados mostraram que a utilização da blenda PCL/ Nafion<sup>®</sup> como implante em fraturas com perda óssea foi realizada com sucesso em ratos, não se observando reações inflamatórias crônicas no período de testes. Verificou-se também que a composição das blendas mostrou-se essencial no desenvolvimento de tecido ósseo com os implantes de composição 70/30 policaprolactona/Nafion<sup>®</sup>. Foi observada ao final de 32 semanas, a presença de osso neoformado dentro do polímero, atuando, assim, como estrutura de suporte temporário. Entretanto, nos implantes

realizados com a blenda contendo 90% de policaprolactona não se observou a presença de osso neoformado no interior do polímero. Logo, a blenda de composição 90/10 policaprolactona/Nafion<sup>®</sup> não favoreceu a migração e o crescimento celular e, nas condições testadas, a blenda na composição PCL/Nafion<sup>®</sup> 70/30 mostrou-se a mais adequada, atuando como suporte temporário e facilitando a neoformação óssea.

Pinto et al. (2006) realizaram um estudo com o intuito de analisar histologicamente a blenda PLLA/PCL poli (ácido láctico/poli ( $\epsilon$ - caprolactona) na composição 70/30 com 3% de plastificante para aplicação como prótese de menisco. Para isto, foi realizado um estudo *in vivo* em coelhos, os quais foram submetidos à remoção total do menisco medial do joelho, sendo que em um dos joelhos foi implantada a prótese da blenda e o outro, sem implante, serviu como controle. Após 8, 16 e 24 semanas, foram recolhidos deles a prótese juntamente com o tecido ao seu redor, o côndilo femural da prótese e o côndilo femural controle. Os materiais foram submetidos à análise histológica por microscopia óptica. Os resultados mostraram que, após 24 semanas, ocorreu a formação de um tecido do tipo fibrocartilagem, indicando que a blenda estudada apresenta grande potencial para ser utilizada para aplicação em questão, já que o material favorece a formação de um tecido muito semelhante ao do menisco.

Fernandes et al. (2007) avaliaram, histologicamente a biocompatibilidade e osteointegração do polímero PDOM, uma poliuretana derivada do óleo de mamona (*Ricinus communis*) usado como substituto no preenchimento de falha óssea, provocada na diáfise proximal da tíbia de cães. Para isto, foi realizado um estudo experimental utilizando-se 20 cães, clinicamente saudáveis, que foram separados em dois grupos de dez, cada. O grupo 1 recebeu tratamento com a poliuretana de mamona (PDOM) e o grupo 2, sem tratamento, foi utilizado como controle. Retirou-se um fragmento ósseo na tíbia com cerca de 10 x 5 mm de tamanho e a falha óssea provocada foi preenchida no grupo 1 com a poliuretana derivada do óleo de mamona. Para análises histológicas, dois animais de cada grupo foram eutanasiados aos 8, 30, 60, 120 e 180 dias após a cirurgia. No exame histológico não foi observada integração do PDOM no grupo tratado. O reparo do defeito dos animais do grupo controle ocorreu aos 30 dias. Não foi observada reação tipo corpo

estranho nem completo reparo dos defeitos tratados com o polímero. Assim conclui-se que nas condições do presente estudo e com base nos resultados obtidos, histologicamente, não há rejeição ao polímero nos animais tratados, caracterizando biocompatibilidade, e não ocorre reparação óssea nas lesões preenchidas com o polímero.

Liu e Wang (2007) estudaram a bioatividade e a biodegradabilidade de compósitos de HA e PHB para aplicação em reparo de tecido ósseo. O processamento dos compósitos foi realizado por meio de injeção e a carga de HA adicionada ao PHB foi de 40% em volume. A caracterização das amostras de compósito obtidas foi feita por meio de análises de DSC e MEV. Por meio dos resultados obtidos, verificou-se que o compósito obtido apresentou distribuição homogênea das partículas de HA, sendo um indicativo de que este compósito apresentará boas propriedades mecânicas e biológicas para a reparação do tecido ósseo.

Reis et al. (2009) avaliaram-se a biocompatibilidade, a osseointegração, a osseocondução e a biodegradação de compósitos de 50% hidroxiapatita (HAP-91<sup>®</sup>) e 50% poli (hidroxibutirato). O compósito foi implantado em defeitos ósseos em 12 coelhos (grupo experimental), sendo comparado a defeitos não preenchidos (grupo-controle, de igual número). Os parâmetros clínicos dor, claudicação, infecção, deiscência e edema foram avaliados nos primeiros oito dias após a cirurgia e aos 45 e 90 dias. Radiografias foram realizadas aos oito, 45 e 90 dias após a cirurgia em quatro animais por grupo que, em seguida, foram submetidos à eutanásia para coleta de amostras destinadas a análises histológicas e histomorfométricas. Não ocorreram diferenças entre os grupos para todos os parâmetros clínicos. Radiografias demonstraram um compósito com radiopacidade semelhante à do osso vizinho e contato direto entre osso e compósito aos 45 e 90 dias. Uma diferença significativa foi observada entre a porcentagem dos tecidos ósseo e conjuntivo dentro do defeito nos dias oito, 45 e 90, assim como na interface aos 45 e 90 dias. Foram observadas projeções dos tecidos ósseo e conjuntivo no interior do compósito e sinais de biodegradação na ausência de infiltrado inflamatório. Com base nos resultados obtidos nas condições deste experimento, pode-se concluir que o compósito de



50% HAP-91<sup>®</sup> e 50% polihidroxibutirato é biocompatível, osseocondutor, integra-se ao tecido ósseo e é degradado *in vivo*.

Mendonça et al. (2009) realizaram um estudo sobre adsorção de fibronectina a arcabouços de polihidroxibutirato para aplicação na engenharia óssea. Para a realização deste trabalho, a fibronectina sérica humana foi adicionada à superfície de arcabouços de polihidroxibutirato (PHB) a fim de otimizar a adesão de osteoblastos humanos (HOB). Visando criar sítios para a imobilização de fibronectina (FN), os arcabouços foram previamente tratados por meio de reação com etilenodiamina. Os autores constataram que o tratamento modificou a morfologia e a composição química dos arcabouços de PHB, possibilitando um aumento no teor de FN adsorvido à superfície. Imagens de microscopia de força atômica (AFM) mostraram que as moléculas de FN assumiram conformações distintas, de acordo com a superfície na qual foi imobilizada. Com isso, houve um aumento na adesão de HOB a estes materiais. Por outro lado, a FN na superfície dos arcabouços previamente tratados possivelmente apresentou-se na forma compacta, suprimindo a adesão de HOB.

Alves et al. (2010) avaliaram o compósito de poli-hidroxibutirado (PHB) 70% e hidroxiapatita (HA) 30% na forma de placas para fixação óssea em gatos. Foram usadas placas do compósito com 60 mm de comprimento por 10 mm de largura e espessura variando de 3 mm no centro a 5 mm nas extremidades, com seis orifícios. A placa do compósito foi empregada na fixação de osteotomia de fêmur em quatro gatos, totalizando seis intervenções. Verificou-se a ruptura de cinco placas (83,3%) até o quarto dia e de uma placa (16,7%) aos 21 dias, quando se observou um calo ósseo exuberante. O resultado da implantação da placa do compósito PHB (70%) e HA (30%) evidenciou que o mesmo, pelo menos na proporção de PHB/HA utilizada, não possui resistência suficiente para ser utilizado como placa de fixação óssea em fêmur de gatos devido à falha por ruptura do implante, o que ressalta que a ductilidade do material é importante e deve ser considerada na proposição de compósitos para utilização em fixação de fraturas.

Wang et al. (2005) ressaltam que os PHAs têm sido estudados para aplicações médicas, principalmente por apresentarem boas propriedades mecânicas e tolerância à biodegradabilidade *in vivo*. Um novo membro da

família dos PHAs é um copolímero de 3-hidroxiбутирато, 3-hidroxiуалерато e 3-hidroxiуеханоато (PHBVHHx). Baseando-se nisto, os referidos autores realizaram um estudo comparativo com os biopolímeros PLA e PHBVHHx na forma de *arcabouço e filmes*, para avaliar o seu comportamento quanto à proliferação de células-tronco mesenquimais (hBMSC). Após a análise dos resultados, verificou-se que os *arcabouços* promoveram maior diferenciação de células hBMSC do que os filmes dos biopolímeros estudados, provavelmente pela presença de poros da ordem de 30-60  $\mu\text{m}$  nos primeiros. Assim, conclui-se que tais polímeros podem ser utilizados para diferenciação de células humanas com o objetivo de reproduzir tecidos, principalmente em se tratando de tecido ósseo.

Alves et al. (2011) realizaram um estudo avaliativo da resposta biológica de um compósito 70% polihidroxiбутирато e 30% hidroxiapatita, sob a forma de um implante ósseo em fêmures de gatos. As amostras do compósito foram implantadas por via subcutânea na região dorso-lombar do fêmur direito dos animais. O estudo utilizou 12 gatos adultos castrados de raça mista, pesando em média 3,5 kg. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: GI, GII e GIII, de acordo com a duração do período de avaliação, 15, 30 e 45 dias (GI); 30, 60 e 90 dias (GII) e grupo controle (GIII). As reações biológicas dos compósitos foram caracterizadas por inflamação granulomatosa com predominância de macrófagos e células gigantes. Os resultados mostraram que os compósitos desencadearam uma mínima reação inflamatória local, e com isso sendo um material de aceitação clínica.

Zhijiang et al. (2012) prepararam *arcabouços com* o biocompósito poli (3-hidroxiбутирато-co-4-hidroxiбутирато) /celulose bacteriana. As características estruturais e morfológicas dos *arcabouços-compósitos* foram investigadas através de MEV, FTIR, DRX, medição do ângulo de contato e ensaios de tração. Testes de biodegradação foram realizados para *arcabouços* de P(3HB-co-4HB) puro e para *arcabouço* do compósito P(3HB-co-4HB) /BC em solução tampão (SBF) e solução de enzima. A biocompatibilidade do compósito foi preliminarmente avaliada por estudos de adesão celular, utilizando células pulmonares de fibroblastos de hamster chinês (CHL). Os autores observaram

que as células incubadas no *arcabouço-compósito* durante 48h foram capazes de viabilizar a proliferação e a adesão celular, e que mostrou uma melhor biocompatibilidade do que o *arcabouço* P(3HB-co-4HB) puro. Desta forma, os autores concluíram que o *arcabouço* preparado com o P(3HB-co-4HB) / BC foi bioativo e é adequado para utilização em aplicações que requerem a adesão/fixação celular, sugerindo que estes suportes podem ser utilizados para engenharia de tecidos, mais precisamente na reparação óssea.

Sadat-Shojai et al. (2013) estudaram a síntese de nanocompósitos baseados em polihidroxibutirato (PHB) e hidroxiapatita (HA) para aplicação na reparação e regeneração óssea. Partindo-se do pressuposto de que a propriedade mais importante de um biomaterial é a sua capacidade de interagir com as células, os referidos autores realizaram uma investigação da biocompatibilidade deste nanocompósito, em que se tentou explorar o efeito das nanopartículas de HA na resposta celular do nanocompósito PHB/HA. Por meio dos resultados obtidos nos estudos *in vitro* verificou-se um aumento significativo na proliferação e diferenciação de células MC3T3-E1 nos nanocompósitos em comparação com o PHB puro. As análises de microscopia de força atômica indicaram que a topografia e a composição química da superfície do nanocompósito são fatores determinantes na proliferação celular. Comparando-se a diferenciação celular ocorrida no PHB puro e no nanocompósito com 15% em peso de HA, este último exibiu uma diferenciação mais acentuada, provavelmente resultante da alta rugosidade da superfície e grande quantidade de HA exposta. Segundo os referidos autores, estes resultados sugerem que as partículas de HA têm um papel muito importante no desempenho biológico do PHB.

Esposito et al. (2010), estudaram a citocompatibilidade de blendas de poli (p-dioxanona) / poli (hidroxibutirato) (PPD/PHB) para aplicações em engenharia de tecido cartilaginoso, buscando estratégias que repercutam na melhoria da interação entre materiais poliméricos biorreabsorvíveis e o crescimento celular. O presente estudo *in vitro* teve como objetivo estudar a influência de blendas de PPD/PHB na adesão celular e crescimento de fibrocondrócitos, obtidos a partir de cultura primária. As blendas de PPD/PHB foram preparadas pelo método de evaporação de solvente nas composições

100/0, 60/40 e 50/50 e caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Observações ultraestruturais mostraram alterações na morfologia celular, sugerindo que os fibrocondrócitos podem responder a alterações no substrato, modificando seu perfil fenotípico. As análises com MTT demonstraram que as blendas não apresentaram citotoxicidade e permitiram a adesão e proliferação dos fibrocondrócitos sobre os substratos em todas as suas composições. O ensaio colorimétrico com Sirius Red evidenciou a capacidade de manutenção da síntese de matriz extracelular colágena sobre as amostras, concluindo-se que as blendas de PPD/PHB podem ser indicadas para o cultivo celular.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais e Reagentes

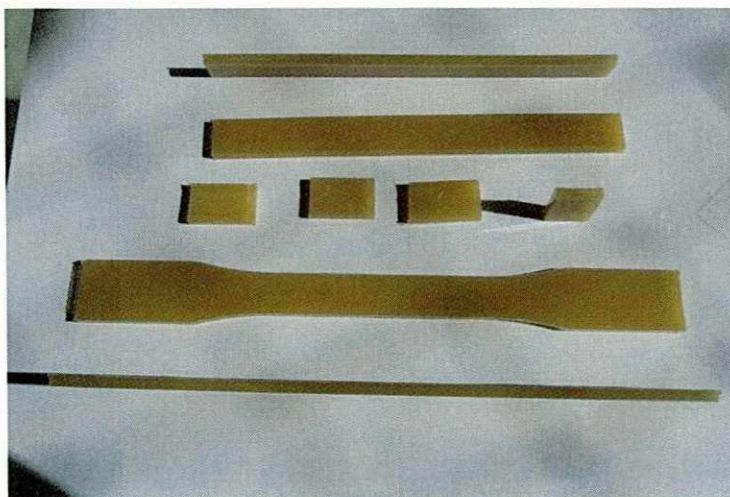
Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais e reagentes:

- Placas poliméricas de PHB (poli ( $\beta$ -hidroxibutirato)), moldadas por injeção e de dimensões variadas, como ilustrada na Figura 14. Estas placas foram doadas pela empresa PHB Industrial S.A. (Biocycle<sup>®</sup>), localizada na cidade de Serrana/SP.

Todos os reagentes foram fornecidos pelo Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais – CERTBIO da UFCG (Universidade Federal de Campina Grande/PB – UAEMa (Unidade Acadêmica de Engenharia e Materiais).

- Peróxido de hidrogênio VETEC 35%.
- Reagentes listados na Tabela 9 utilizados na solução SBF (*Synthetic Body Fluid*).
- Lisozima e solução tampão PBS adquiridos do fornecedor Sigma Aldrich<sup>®</sup>.
- MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromide).

Figura 14: Placas poliméricas de PHB utilizadas nesta tese.





## 3.2 Métodos

Para um melhor entendimento da sequência experimental das placas do PHB utilizadas nesta tese, a metodologia foi dividida em três avaliações, a saber:

- Avaliação da bioatividade.
- Avaliação da biodegradabilidade.
- Avaliação da biocompatibilidade.

### 3.2.1 Avaliação da Bioatividade

Vários procedimentos *in vitro* foram propostos para se testar a bioatividade de biomateriais devido às dificuldades experimentais e éticas inerentes aos procedimentos *in vivo*. Estudos pioneiros deste tipo foram realizados por Hench et al., (1974) *in vitro*, os quais mostraram o crescimento da camada de fosfato de cálcio em vidros que liberavam íons de cálcio e fósforo para o meio, ao imergir em uma solução de água destilada tamponada com tris-hidroximetil-amino-metano e HCl (tampão tris) a um pH de 7,25 e temperatura de 37°C. Entretanto, quando outros tipos de vidros, que não continham cálcio e fósforo em sua composição original, mas que apresentavam bioatividade *in vivo* eram imersos no tampão tris, não ocorria o crescimento da camada deste fosfato (SALINAS et al., 2000).

Em 1990, Kokubo et al. propuseram uma nova solução aquosa para testes de bioatividade contendo concentrações de íons semelhantes às aquelas presentes no plasma humano e tamponamento com tris-hidroximetil-amino-metano ( $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ). Tal solução foi capaz de induzir mudanças estruturais na superfície de materiais bioativos semelhantes às apresentadas *in vivo*, ou seja, formava-se uma camada de HA. Esta solução, chamada “Simulated Body Fluid” (SBF), é acelular, livre de proteínas e apresenta um pH de 7,40. Sua composição é comparada à composição iônica do plasma sanguíneo, mostrado na (Tabela 8). O procedimento atualmente mais usado para teste de bioatividade *in vitro* consiste em imergir o material a ser testado nesta solução

SBF por períodos de tempo entre 3 a 15 dias e verificar se houve formação de HA na superfície do material.

Tabela 8. Concentração iônica do plasma sanguíneo humano e da solução que simula o fluido corporal (SBF)

	Concentração iônica (mM)							
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
<b>SBF</b>	142,0	5,0	2,5	1,5	147,8	4,2	1,0	0,5
<b>Plasma humano</b>	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5

Fonte: Kokubo et al. 1990.

Este método baseia-se na obtenção de uma fase cerâmica sintética similar à fase fosfato de cálcio que constitui o osso. Em condições de supersaturação dos íons desta solução, é possível obter o recobrimento da superfície com variadas morfologias em diversas classes de materiais, desde que estejam estabelecidas condições químicas e termodinâmicas favoráveis. Tratamentos térmicos posteriores podem ainda favorecer a predominância da fase desejada. Os componentes da solução de SBF, sua sequência de adição dos reagentes (sais) e suas respectivas quantidades estão listados na Tabela 9, proposta por Kokubo em 1990 e modificada por Aparecida et al. 2009.

Tabela 9. Quantidade e sequência operacional de adição dos sais utilizados para a preparação da solução (SBF) nas concentrações de 1,0 e 1,5M.

Ordem	Substância	Quantidade	
		1,0M	1,5M
1	NaCl	8,0030 g	12,0045 g
2	NaHCO <sub>3</sub>	0,3500 g	0,5250 g
3	KCl	0,2240 g	0,3360 g
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1740 g	0,2610 g
5	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,0710 g	0,1065 g
6	HCl	40,00 mL	60,00 mL
7	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,3680 g	0,5520 g
8	MgCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,3050 g	0,4575 g
9	NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	6,0570 g	9,0855 g

Fonte: Aparecida et al. 2009.

Todos estes reagentes contidos na Tabela 9 (coluna 1.0M e para outra solução mais concentrada à 1.5M), foram adicionados em um recipiente polimérico contendo inicialmente 500 ml de água deionizada, um a um, na ordem apresentada na tabela sob agitação constante e temperatura de 36,5°C. O pH da solução SBF foi mantido em 7,4 com a adição do tampão (NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>) e do ácido clorídrico. Logo após, acrescentou-se água deionizada até completar 1000 ml da solução.

Para avaliação desta análise foram preparadas vinte e quatro placas poliméricas medindo 1,5 cm de comprimento, 1,2 cm de largura e 0,3 cm de altura, conforme ilustração anterior na Figura 14. Destas, 12 placas divididas em 4 potes de 3 unidades cada, foram submetidas a um ataque químico por imersão, em uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peróxido de hidrogênio) à 30% e 30ml de volume por 24 horas, chamada de PHB atacadas. O propósito da modificação de superfície destas amostras é aumentar a energia livre na superfície destas placas poliméricas pesquisadas, através da oxidação, de forma a reduzir a diferença das tensões superficiais destas placas e a solução SBF. Com isso, espera-se melhorar a viabilidade de adesão da fase cerâmica às placas de PHB. As doze restantes (4 potes de 3 unidades) que não foram submetidas a nenhum ataque químico, foram chamadas de PHB sem ataque. O método biomimético utilizado neste ensaio, objetivando este recobrimento da superfície das placas poliméricas, foi realizado mediante o emprego da solução de SBF com concentrações iônicas molares equivalentes a 1,0M e 1,5M.

Em quatro destes recipientes, dois atacados (6 unidades) e dois sem ataque (6 unidades), colocou-se a solução SBF de concentração de 1,0 M (50 ml em cada recipiente), o qual foi levado para estufa a 36,5°C (+/- 0,5°) permanecendo por sete dias. Em seguida, após a solução ser descartada, foi colocada na estufa a 60°C por 24h. Nos outros quatro recipientes restantes (dois atacados e dois sem ataques), colocou-se a solução SBF 1,0M por um período de 24h, nas mesmas condições anteriores e, logo após, as mesmas placas foram colocadas na solução SBF 1,5 M trocando a solução a cada 48 horas até completar sete dias. Após este tempo, a solução foi eliminada e as placas poliméricas foram, também, colocadas na estufa a 60°C por 24h. Para análise comparativa deste ensaio, separamos uma placa do PHB, conforme recebida do

fabricante, com as mesmas dimensões das demais, chamadas de PHB Puro. Analisamos também três placas deste biopolímero, que foram colocadas em um recipiente contendo o peróxido de hidrogênio na mesma concentração e volume usados nas demais e que não tiveram contato com o SBF, a que chamamos de PHB atacado.

A Tabela 10 traz a identificação e quantidades das amostras, e as condições experimentais estudadas.

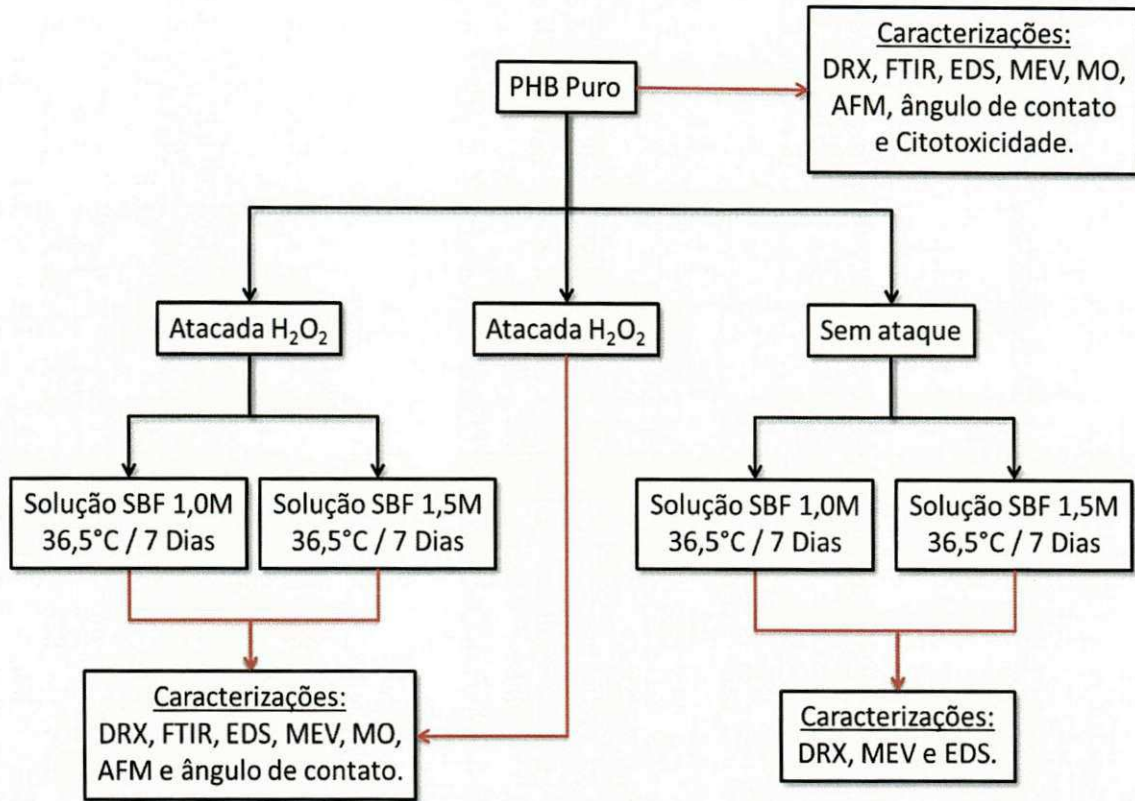
Tabela 10: Amostras de PHB e as condições experimentais estudadas.

<b>Amostra</b>	<b>Nº de placas</b>	<b>Condições experimentais</b>
PHB puro	1	Placa polimérica conforme recebida do fabricante
PHB atacado	3	Placa polimérica com superfície atacada com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sem contato com a solução de SBF
PHB – atacado – 1,0M SBF	6	Placa polimérica com superfície atacada com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> submetida ao contato com a solução de SBF a 1,0M
PHB – atacado – 1,5M SBF	6	Placa polimérica com superfície atacada com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> submetida ao contato com a solução de SBF a 1,5M
PHB – s/ ataque 1,0M SBF	6	Placa polimérica sem imersão na solução H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> submetida ao contato com a solução de SBF a 1,0M
PHB – s/ ataque 1,5M SBF	6	Placa polimérica sem imersão na solução H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> submetida ao contato com a solução de SBF a 1,5M

### 3.2.1.1. Caracterização

A seguir serão descritos todos os ensaios de caracterização feitos na avaliação da bioatividade das placas poliméricas puras, atacadas e sem ataques, submetidas ao contato com a solução de SBF a 1,0M e 1,5M. Todos foram realizados com equipamentos pertencentes e operando no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais – CERTBIO da UFCG (Universidade Federal de Campina Grande/PB – UAEMa (Unidade Acadêmica de Engenharia e Materiais). A Figura 15 traz um fluxograma das atividades realizadas nesta etapa.

Figura 15: Metodologia experimental utilizada para a avaliação da Bioatividade



### 3.2.1.1.1 Difração de raios X (DRX)

A técnica da difratometria de raios X permite a análise microestrutural dos materiais. É bastante utilizada para materiais cristalinos e semicristalinos, pois depende da regularidade do material para identificar os raios X difratados pelo plano cristalino no qual ocorreu a difração. Nesta técnica de caracterização é possível determinar as fases presentes no material a ser analisado utilizando-se a lei de Bragg, descrita na equação (1) e no esquema da difração na Figura 16.

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen} \theta \quad (1)$$

Onde:

$n$  – é o número do plano no qual ocorreu a difração

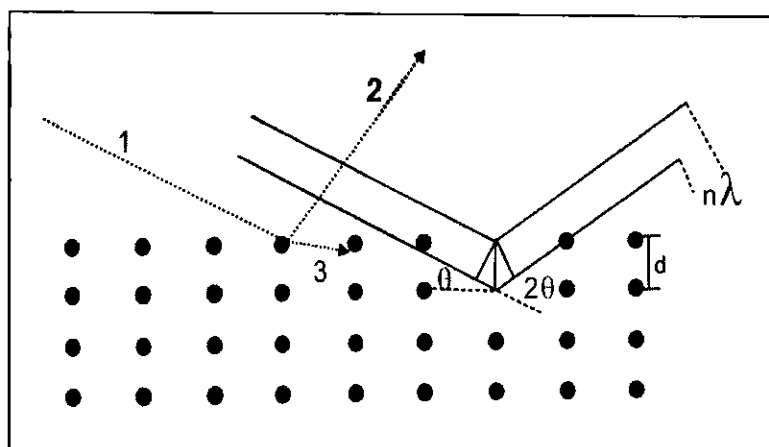
$\lambda$  – é o comprimento de onda utilizado



$d$  – distância entre os planos

$\theta$  – ângulo de difração

Figura 16: Planos cristalinos formados por átomos ordenados.



Fonte: Canevarolo Jr., 2004.

A análise de DRX foi conduzida em temperatura ambiente (18°C a 22°C), utilizando um equipamento Shimadzu XRD-7000, nas seguintes condições: radiação Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 0,154\text{nm}$ , 40kV e 30mA), um intervalo de varredura de  $2\theta$  (entre 10 e 70 graus) a uma taxa de 2°/min.

### 3.2.1.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier é usada para identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nos materiais, podendo utilizar a faixa espectral de baixo, médio e alto comprimento de onda.

O espectro do infravermelho se estende do limite superior da faixa do micro-ondas até o começo da região visível, com comprimento de ondas compreendidos entre 0,7 $\mu\text{m}$  e 500  $\mu\text{m}$  (14000  $\text{cm}^{-1}$  e 20  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente). A banda espectral mais utilizada corresponde ao infravermelho médio que cobre as frequências de 50  $\mu\text{m}$  e 2,5  $\mu\text{m}$  (200  $\text{cm}^{-1}$  e 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) (WILLIARD et al., 1979 e TADDEI et al., 2001).

Os aparelhos usados para se obter o espectro IR, são de dois tipos: espectrofotômetro dispersivo (em desuso) e espectrômetro por transformada de Fourier (FTIR). Esta análise foi realizada em um espectrômetro modelo Spectrum 400 FT Mid-IR Perkin Elmer e com varredura de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.2.1.1.3 Espectroscopia por energia dispersiva raios X (EDS)

A espectroscopia por energia dispersiva é uma técnica que permite a determinação da composição química de uma amostra quando esta é simultaneamente analisada sob Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Assim, a EDS é um equipamento acessório ao MEV.

Em 1913 Moseley observou que a frequência de emissão dos raios X característicos é função do número atômico dos elementos presentes na amostra. Esta descoberta deu origem à técnica de análise espectroquímica, na qual os elementos presentes numa amostra podem ser identificados através do espectro de raios X emitido pela amostra. A detecção dos raios X emitidos pode ser realizada tanto pela medida de sua energia (EDS) como do seu comprimento de onda (WDS). Os detectores baseados na medida de energia são os mais usados, cuja grande vantagem é a rapidez na avaliação dos elementos. Esta microanálise é um dos mais importantes instrumentos para a análise química de materiais orgânicos e inorgânicos. É uma técnica não destrutiva, podendo determinar quantidades de até 1-2% dos elementos presentes na amostra (MALISKA, 2013).

Este ensaio foi utilizado com o objetivo de determinar a composição química do material depositado sob as placas de PHB submetidas à solução de SBF 1,0 e 1,5M. As análises de EDS foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM 1000 HITACHI, aumento máximo de 10.000X. Acoplado a um sistema para microanálise química por Espectroscopia de Energia Dispersiva – EDS.

#### 3.2.1.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica muito versátil e usada rotineiramente para a análise microestrutural de materiais sólidos. Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de muito fácil interpretação. O aumento máximo conseguido pelo MEV fica entre o microscópio ótico (MO) e o Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), podendo chegar a um aumento de 300.000X. A grande vantagem do MEV em relação ao microscópio ótico é sua alta resolução, na ordem de 2 a 5 nm (20 – 50 Å) - atualmente existem instrumentos com até 1 nm (10 Å) - enquanto que no ótico é de 0,5 µm. Comparado com o MET a grande vantagem do MEV está na facilidade de preparação das amostras. Entretanto, não são apenas estas características que fazem do MEV uma ferramenta tão importante e tão usada na análise dos materiais. A elevada profundidade de foco (imagem com aparência tridimensional) e a possibilidade de combinar a análise microestrutural com a microanálise química são fatores que em muito contribuem para o amplo uso desta técnica.

Este ensaio foi utilizado também com o objetivo de observar detalhadamente a microestrutura da superfície das placas de PHB.

As análises de MEV foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM 1000 HITACHI. Com um aumento máximo de 10.000X, acoplado a um sistema para microanálise química por Espectroscopia de Energia Dispersiva – EDS. As placas de PHB não atacadas foram metalizadas com ouro em um metalizador SC 702, Marca SANYU. Com uma corrente elétrica de 10mA, a vácuo e com tempo de 4 minutos.

#### 3.2.1.1.5 Microscopia ótica (MO)

Para materiais que são opacos à luz visível, como é o caso dos metais, da maioria dos cerâmicos e polímeros, somente a superfície pode ser observada com a finalidade de revelar a sua microestrutura (FOOK, 2005).

O objetivo da utilização deste método de análise é observar a microestrutura da superfície das placas de PHB submetidas à solução de SBF 1,0 e 1,5M com o propósito de verificar se ocorreu a deposição da fase cerâmica. As caracterizações por microscopia ótica foram realizadas em um Microscópio Óptico da marca Hirox, modelo SHX-13M, acoplado a uma estação de análise de imagem. Com uma variação de aumento entre 500X a 2000X.

#### 3.2.1.1.6 Microscopia de força atômica (AFM)

Em princípio, a microscopia de efeito túnel (STM) tornou-se uma ferramenta útil na caracterização de superfícies de metais e semicondutores em escala atômica. A maior limitação deste método é a necessidade da condutividade da amostra. Em 1986, Binnig, Quate, Gerber propuseram um novo microscópio para superar este obstáculo, pois em vez de medirem corrente elétrica, mediram forças em escala atômica. A partir daí, filmes orgânicos frágeis como biomoléculas, cerâmicas, polímeros e vidros foram então alvos de análise por microscopia de força atômica (AFM) (ORÉFICE et al., 2012).

O AFM, ou microscópio de força atômica, ou ainda, SFM (*scanning force microscope*), pode ser operado de diversos modos. Entretanto, seu princípio fundamental é a medida das deflexões de um suporte (de 100 a 200  $\mu\text{m}$  de comprimento) em cuja extremidade livre está montada uma sonda. Estas deflexões são causadas pelas forças que agem entre a sonda e a amostra. As várias técnicas fornecem diversas possibilidades de fazer imagens de diferentes tipos de amostras e para gerar uma ampla gama de informações. Os modos de fazer as imagens, também chamados modos de varredura ou de operação, referem-se fundamentalmente à distância mantida entre a sonda (que chamaremos ponteira) e a amostra, no momento da varredura, e às formas de movimentar a ponteira sobre a superfície a ser estudada. A detecção da superfície realiza-se visando a criação de sua imagem, devido às diferentes interações em função da distância entre a ponteira e a amostra, assim como o esquema de detecção utilizado. A escolha do modo apropriado depende da aplicação específica que se deseja fazer (ORÉFICE et al., 2012).

Esta microscopia opera medindo as forças atrativas e repulsivas entre a ponteira (sonda) e a amostra, permitindo a observação detalhada da topografia da superfície de uma amostra.

A observação da superfície das placas de PHB submetidas à solução de SBF 1,0 e 1,5M, foi a razão desta análise, juntamente com a MO e MEV. As análises de AFM foram realizadas utilizando um microscópio Solver NEXT, modelo NT-MDT. A ponteira defletora operou em modo de contato, em uma temperatura de 22°C e umidade de 45%.

### 3.2.1.1.7 Ângulo de contato / molhamento

A energia de superfície está diretamente relacionada ao grau de molhabilidade da superfície, pois quanto mais alto for a energia de superfície maiores serão as ocorrências de ligações moleculares superficiais. Assim a molhabilidade é um indicativo do quanto a superfície pode interagir em termos moleculares com o meio no qual está sendo inserida. A medida do grau de molhabilidade é um dos parâmetros de avaliação da bioatividade de um material. Tal medida pode ser expressa pelo ângulo de contato que um líquido (geralmente água) forma sobre a superfície do material (LAMPIN et al., 1997).

Esta medida tem sido um parâmetro útil para prever a interação de um biomaterial com um meio biológico. A medida do ângulo de contato de uma gota do líquido (água) sobre a superfície foi usada para caracterizar a molhabilidade da superfície das placas do PHB estudadas.

A Tabela 11 mostra a relação entre o ângulo de contato e a molhabilidade de uma superfície.

Tabela 11: Ângulos e condições de molhamento.

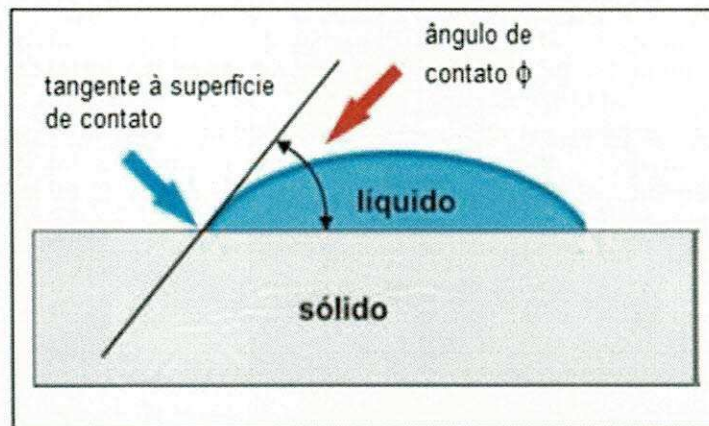
<b>Ângulo de contato</b>	<b>Molhabilidade</b>
$\theta = 0$	Molhamento completo
$0 < \theta < 90^\circ$	Molhamento parcial
$\theta > 90^\circ$	Não há molhamento

Fonte: Park, 2007.



O resultado depende das forças intermoleculares que se estabelecem entre as fases, resultando na medida chamada ângulo de contato (Figura 17). Por meio da medida desse ângulo de contato entre a superfície do sólido e o plano tangencial à superfície líquida, pode-se obter a molhabilidade do líquido sobre um determinado substrato (ALHANATI, 2011).

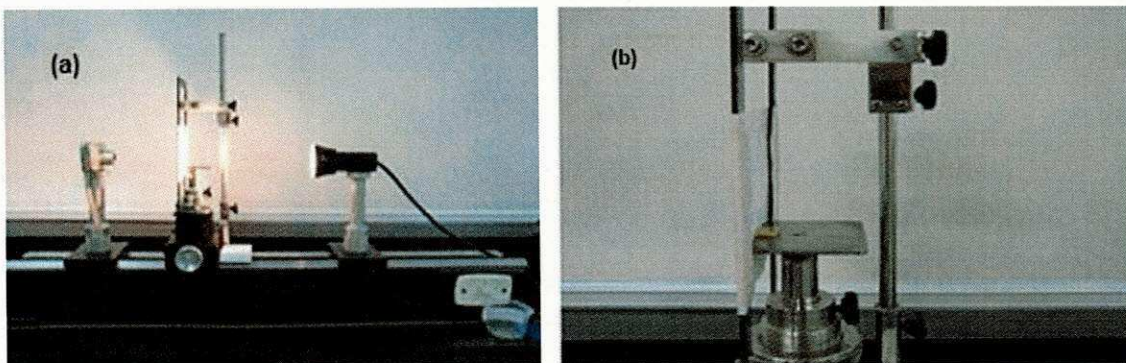
Figura 17: Observação do ângulo de contato formado entre um sólido e um líquido



Fonte: Alhanati, 2011.

O equipamento utilizado foi desenvolvido por alunos de Engenharia Mecânica da UFCG e instalado no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais – CERTBIO da UFCG – UAEMa, o qual encontra-se ilustrado na Figura 18 (a) e 18 (b) .

Figura 18: Determinação do ângulo de contato. (a) Equipamento utilizado para a determinação do ângulo de contato, vista geral do equipamento, (b) detalhe do porta amostra.



### 3.2.2 Avaliação da biodegradabilidade

Para este ensaio de avaliação da biodegradabilidade das placas PHB, foi utilizada a degradação *in vitro*. Dois procedimentos foram empregados. O primeiro procedimento (A) foi dividido em dois grupos de corpos de prova: PHB previamente exposto ao SBF a 1,5M, chamados de PHB com recobrimento (seis recipientes, com seis corpos de prova cada) e PHB sem esta exposição, chamado de PHB sem recobrimento com a mesma quantidade de recipientes e corpos de prova. Estes dois grupos foram expostos a dois ambientes de biodegradação: PBS (solução tampão de fosfato – Sigma (em pó): pH 7.4, P-5368, diluído em 1000mL) e PBS + lisozima (5mg/ml, segundo método de Kumar et al., 2011). Foram, ao todo, 72 corpos de prova previamente pesados e divididos em 12 recipientes (de plásticos bem vedados) com seis unidades cada, contendo 50 ml desta solução tampão com e sem lisozima. Todos foram mantidos em estufa a 36,5°C (equivalente à temperatura corpórea) e foram retirados sequencialmente deste ambiente de biodegradação em tempos de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, com reposição da solução a cada trinta dias, secados em estufa a 50°C por 24h, pesados e caracterizados. A apresentação deste primeiro procedimento, constituído pelos itens: tipo, conteúdo, números de recipientes e de corpos de prova é mostrada na Tabela 12.

Tabela 12: Quantidade de recipientes e corpos de prova no primeiro ensaio, procedimento (A) de biodegradação *in vitro*.

PROCEDIMENTO (A)				
Tipo	Conteúdo	Número de recipientes	Qde de dias / Intervalos	Número de corpos de prova
1	PHB sem recobrimento + PBS	3	180 / 30	18
2	PHB sem recobrimento + PBS + lisozima	3	180 / 30	18
3	PHB com recobrimento (SBF 1,5M) + PBS	3	180 / 30	18
4	PHB com recobrimento (SBF 1,5M) + PBS + lisozima	3	180 / 30	18

No segundo procedimento (B) desta metodologia, outro conjunto de amostras foi analisado - composto por 4 recipientes, idênticos aos anteriores, contendo 6 peças cada um, totalizando 24 corpos de prova. Dois recipientes destes (12 peças) foram submetidos a um ataque químico com Peróxido de Hidrogênio a 30% por 24 horas, definidas como PHB Atacado. Os outros dois recipientes restantes (12 peças), que não tiveram contato com este peróxido, denominou-se PHB sem ataque. Em todos estes recipientes foram colocados 50 mL da solução (PBS + lisozima) e posto na estufa a 36,5°C e retirados deste ambiente de biodegradação em tempos de 7, 14, 21 e 28 dias, com reposição da solução a cada sete dias. As amostras contidas nestes recipientes eram postas na estufa a 50°C por 24h para secagem, para depois serem pesadas e caracterizadas. Este segundo procedimento está representado na Tabela 13.

Tabela 13: Quantidade de recipientes e corpos de prova no segundo ensaio, procedimento (B) de biodegradação *in vitro*.

PROCEDIMENTO (B)			
Conteúdo	Número de recipientes	Qde de dias / Intervalos	Número de corpos de prova
PHB atacado + PBS + Lisozima	2	28 / 7	12
PHB sem ataque + PBS + Lisozima	2	28 / 7	12

### 3.2.2.1 Caracterização

A seguir serão descritos todos os ensaios de caracterização feitos na avaliação da biodegradabilidade *in vitro* das placas poliméricas, os quais foram realizados também no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais – CERTBIO da UFCG – UAEMA. As Figuras 19 e 20 trazem os fluxogramas dos procedimentos de metodologia (A) e (B) respectivamente, realizados nesta avaliação.

As propriedades mecânicas do PHB serão descritas e analisadas neste capítulo de biodegradabilidade.

Figura 19: Metodologia experimental utilizada para biodegradabilidade, procedimento (A).

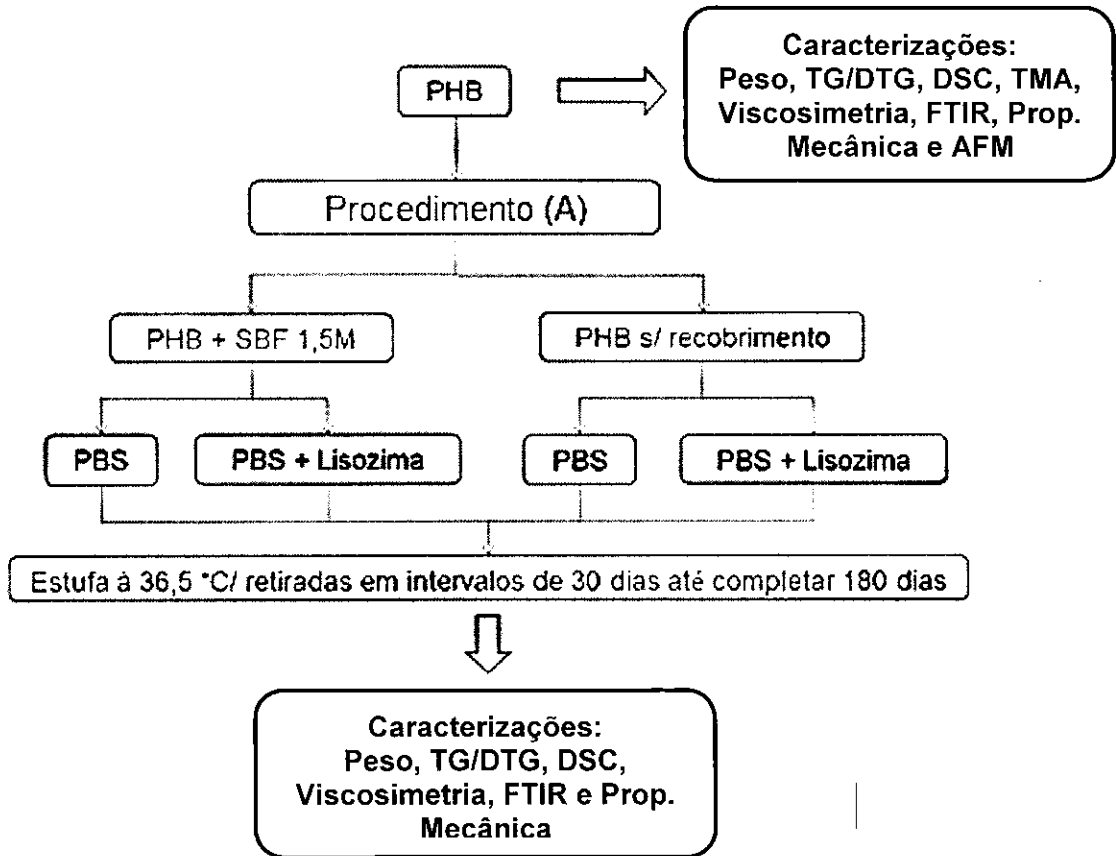
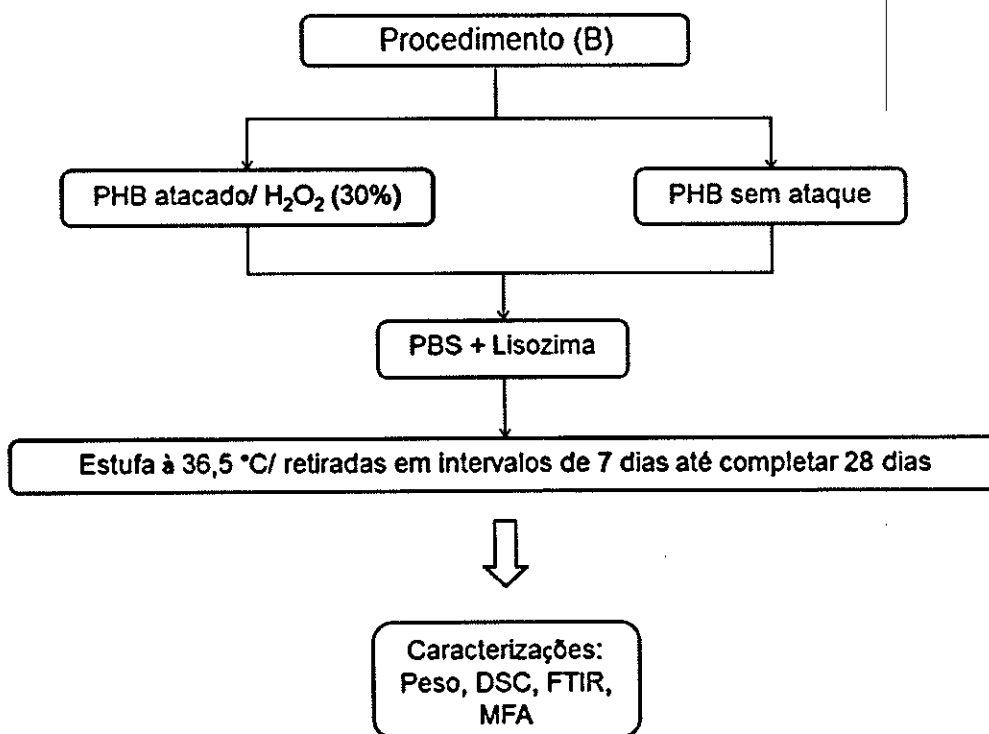


Figura 20: Metodologia experimental utilizada para biodegradabilidade, procedimento (B).





### 3.2.2.1.1 Determinação da perda de massa

Para determinação da massa, foi utilizada uma balança analítica de precisão, com quatro casas decimais. Primeiramente, foram pesados todos os corpos de prova do PHB, tanto para o procedimento (A) como para o (B). Após terem sido submetidos à imersão nas soluções de PBS e PBS com lisozima, as placas pertencentes ao primeiro processo, foram retiradas nos intervalos de 30 dias com troca desta solução, até um total de 180 dias. O recipiente retirado a cada 30 dias, contendo três placas cada, eram lavadas com água destilada e colocadas para secagem na estufa a 50°C por 24 horas. Ao retirar da estufa, estas eram pesadas três vezes cada e após a média de cada uma, obtinha-se a massa final, que era a média dos resultados das três placas. Para o procedimento (B), três corpos de prova também foram retirados, secos e pesados a cada 7 dias, até um total de 28 dias, trocando a solução nos intervalos de 7 dias.

### 3.2.2.1.2 Termogravimetria (TG) / Termogravimetria derivada (DTG)

A análise térmica é definida como um grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto esta substância é submetida à uma programação controlada de temperatura e sob uma atmosfera especificada (IONASHIRO, 1980; WENDLANDT, 1986; HAINES, 1995). A propriedade física medida e a técnica correspondente realizada nesta tese foram: massa (TG/DTG), entalpia (DSC) e característica mecânica (TMA).

Para a termogravimetria, técnica termoanalítica na qual a variação de massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura (T) e/ou tempo (t), enquanto a amostra é submetida à uma programação controlada de temperatura. Foi utilizado o equipamento T. A. Instruments SDT 600. Operando de temperatura ambiente a 350°C, sob atmosfera inerte (Nitrogênio-N<sub>2</sub>) e com taxa de aquecimento de 10°C/min. Para uma melhor avaliação das curvas de TG, este equipamento registrou automaticamente, as



derivadas das curvas de TG (DTG). Curvas estas que auxiliam a visualização e esclarecimento dos passos das TG. O procedimento (A), foi realizado com técnicas simultâneas: TG, DTA e DSC.

#### 3.2.2.1.3 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) é uma técnica na qual se mede a diferença entre a energia fornecida a uma amostra, e a fornecida a um material de referência, que é termicamente inerte na faixa de temperatura estudada. Também se pode medir o fluxo de calor entre a amostra analisada e a referência, de modo a manter as substâncias em equilíbrio térmico, enquanto ambas são submetidas à uma programação controlada de temperatura.

A técnica da calorimetria diferencial exploratória foi empregada para observar o comportamento e a estabilidade térmica das amostras poliméricas. Neste ensaio foi utilizado um equipamento DSCQ20 (TA Instruments, EUA), tendo como referência um cadinho tampado e vazio, numa atmosfera dinâmica de nitrogênio ( $50 \text{ ml min}^{-1}$ ), com razão de aquecimento de  $10^\circ\text{Cmin}^{-1}$ . Numa variação de temperatura de  $30^\circ\text{C}$  até  $200^\circ\text{C}$ . As amostras foram pesadas com precisão ( $\pm 0,1 \text{ mg}$ ) e prensadas em cadinhos de alumínio.

#### 3.2.2.1.4 Análise termomecânica (TMA)

É uma técnica para avaliação das mudanças dimensionais de materiais, sob a carga não oscilatória em função de um programa controlado de temperatura, ou do tempo na temperatura constante. O tipo de corpo de prova usado determina o modo de operação do instrumento, a maneira como a força é aplicada à amostra e a quantidade desta tensão. A norma ASTM E8831-86, 1990E, padroniza o método do teste para a determinação do coeficiente da expansão térmica por esta técnica. Para este ensaio foi utilizado um equipamento TA Instruments Q400, pertencente ao laboratório de

Caracterização de Materiais da UFCG/ UAEMa. Com um aquecimento na faixa de 20 a 80°C e uma taxa de 3°C/min.

### 3.2.2.1.5 Viscosimetria

O estudo da viscosidade é um ramo da reologia. Este estudo reológico dos materiais, no estado sólido ou em solução, nos permite obter informações muito importantes a respeito das propriedades de escoamento e deformação dos materiais (PINTO, 2010).

Uma característica de soluções poliméricas diluídas é que a viscosidade é consideravelmente maior que a do solvente puro, ou de soluções diluídas de pequenas moléculas. Isto se deve à grande diferença em tamanho entre as moléculas de polímero e as de solvente; a viscosidade aumenta à medida que aumentam as dimensões das moléculas poliméricas em solução. Nestas soluções, tais medidas permitem obter informações a respeito das dimensões da cadeia, do formato e tamanho da partícula de polímero (volume hidrodinâmico), e de sua massa molar. Este cálculo de massa molar não é absoluto, uma vez que se faz necessário uma técnica secundária de caracterização de massas molares. A viscosidade, representada pela letra grega ( $\eta$ ), pode ser considerada, a medida da resistência de um material à fluência. (PINTO, 2010).

A viscosidade de soluções poliméricas diluídas é medida em capilares, sendo os mais comuns os viscosímetros de Oswald, Cannon Fenske e o de Ubbelohde (MEI, 2011).

Todos os sistemas Newtonianos e os viscosímetros capilares usados na prática seguem a lei de Hagen-Poiseuille (Equação 1):

$$\eta = \frac{\pi r^4 g h \rho t}{8 \cdot l \cdot V} = \frac{\pi r^4 \Delta P_H t}{8 \cdot l \cdot V} = A \rho t \quad (1)$$

Onde: t = tempo,  $\rho$  = densidade do líquido, r = diâmetro do capilar, V = volume do líquido, l = comprimento do capilar,  $\Delta P_H = g h$  = pressão hidrostática, h = altura, g = aceleração da gravidade e A = constante experimental.

Há vários tipos de medidas de viscosidades:

Viscosidade Relativa:  $\eta_{rel} = \frac{t}{t_0}$  (2)

Viscosidade específica:  $\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 = \frac{t - t_0}{t_0}$  (3)

Viscosidade específica reduzida:  $\eta_{esp\ red} = \frac{\eta_{esp}}{c}$  (4)

Viscosidade inerente:  $\eta_{iner} = \frac{\ln(\eta_{rel})}{c}$  (5)

Onde:

t = tempo de escoamento da solução no viscosímetro

t<sub>0</sub> = tempo de escoamento do solvente puro no viscosímetro

c = concentração em gramas de polímero em 100 ml de solução.

Colocando-se em um gráfico [ $\eta_{esp\ red} \times c$ ] e [ $\eta_{iner} \times c$ ] e extrapolando-se para uma concentração igual a zero obtemos o valor da viscosidade intrínseca [ $\eta$ ]. Este gráfico está apresentado na Figura 21.

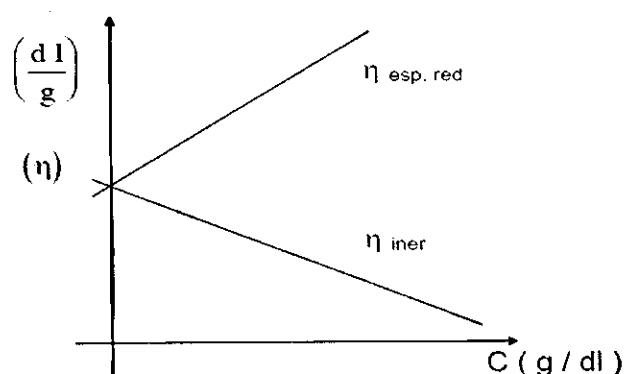
A viscosidade intrínseca de uma solução polimérica está relacionada com a massa molar viscosimétrica média ( $\overline{M}_V$ ), através da equação de *Mark-Houwink* (6):

$$[\eta] = K (\overline{M}_V)^a \quad (6)$$

Onde:

K e a são constantes que dependem do polímero, do solvente e da temperatura.

Figura 21: Gráfico para a determinação da viscosidade intrínseca de um polímero.



Fonte: Mei, 2013.

Em que para o caso específico desta tese, assumem os seguintes valores:  $K = 1,18 \times 10^{-4}$  dL/g e  $a = 0,78$ . Para este ensaio utilizou-se 25 mL de clorofórmio e 0,125 g do PHB.

O viscosímetro de Ostwald (usado neste ensaio) ou o de Cannon-Fenske, permite uma determinação simples do coeficiente de viscosidade, desde que seja conhecida sua constante. No entanto, quando se desconhece a constante, as medidas de viscosidade são feitas por comparação entre o tempo de vazão do líquido, cuja viscosidade se deseja determinar, e de um líquido de viscosidade conhecida, geralmente água. Na mesma temperatura e no mesmo aparelho (TAVARES, 2011).

O motivo da realização deste ensaio nesta avaliação da biodegradação das placas de PHB é que, havendo diferença significativa da massa molar viscosimétrica do polímero antes e após a exposição às soluções de PBS apenas e PBS + lisozima, será um indicativo de ter ocorrido algum grau de biodegradação.

O solvente usado neste experimento foi o clorofórmio e o equipamento utilizado foi um viscosímetro de Ostwald imerso em um banho Ultratermostático, SL 152/10 da marca SOLAB, numa temperatura de  $30^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , pertencente ao laboratório de Caracterização de Materiais da UFCG/ UAEMa.

#### 3.2.2.1.6 Espectroscopia da região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O ensaio de FTIR para as amostras submetidas ao ambiente de biodegradação *in vitro* (soluções de PBS + lisozima) foi o mesmo já descrito anteriormente no item 3.2.1.1.2 da metodologia da avaliação de Bioatividade.

#### 3.2.2.1.7 Propriedades mecânicas

A determinação das propriedades mecânicas de um material é realizada por meio de vários ensaios. Esses ensaios podem ser destrutivos, quando

promovem a ruptura ou inutilização do material, ou não destrutivos em caso contrário. Na primeira categoria estão classificados os ensaios de tração, impacto, flexão, torção, compressão, fadiga e outros. Dentre os ensaios não destrutivos, estão os ensaios com raios X e ultrassom (SOUZA, 1977).

Os ensaios mecânicos também podem ser classificados de acordo com a velocidade de aplicação da carga em estáticos, com baixa velocidade de aplicação da carga, e dinâmicos, onde as cargas são aplicadas com altas velocidades. Dentre os ensaios estáticos estão os ensaios de tração, compressão, torção, cisalhamento e flexão e, dentre os ensaios dinâmicos, estão os ensaios de fadiga e impacto.

Os ensaios de tração foram realizados de acordo com a Norma ASTM-D-638 em uma Máquina Universal Marca EMIC Modelo DL-10000, capacidade máxima de 100KN, seguindo as seguintes condições: temperatura ambiente de 22°C; umidade relativa de 50%; velocidade da garra de 5,0 mm/min e distância entre garras de 115mm. Nesse ensaio foram verificadas as propriedades de resistência à tração ( $\sigma_{max}$ ), alongamento na ruptura ( $\epsilon$ ) e módulo de elasticidade (E).

A determinação das propriedades mecânicas das amostras de PHB foi realizada em amostras com e sem exposição ao ambiente de biodegradação (PBS + lisozima) para avaliar se o PHB, após este contato, alterou sua resistência mecânica à tração. Para isto, foram realizadas os ensaios de tração nos corpos de prova retirados do ambiente de biodegradação em tempos de 30, 60, 90, 150 e 180 dias. Este ambiente foi constituído em um recipiente plástico bem vedado, com capacidade volumétrica de 2 litros, afim de que todas as amostras ficassem submersas nesta solução.

Outro ensaio estático realizado foi o de flexão, para o PHB puro. Em uma Máquina Universal Marca Instron 3366, segundo a norma ASTM D 790 M, com uma distância entre apoios (flexão em três pontos) de 50mm, velocidade 1,3 mm/min e uma carga de 12,5N. Os ensaios foram realizados com corpos de prova injetados com dimensões especificadas também na norma ASTM D 790 M.



#### 3.2.2.1.8 Microscopia de força atômica (AFM)

A descrição deste método de caracterização encontra-se na avaliação de bioatividade, no item 3.2.1.1.6. Para os ensaios de biodegradação este método foi aplicado para as placas poliméricas do PHB, atacadas com peróxido de hidrogênio e imersas na solução tampão (PBS), referenciado no segundo processo de metodologia (B), Figura 20.

### 3.2.3 Avaliação da biocompatibilidade

#### 3.2.3.1 Avaliação da viabilidade celular

##### 3.2.3.1.1 Método MTT

Os ensaios *in vitro* são normalmente efetuados como um teste de triagem inicial na primeira fase da avaliação da biocompatibilidade. Citotoxicidade significa causar efeito tóxico no nível celular. Entre os efeitos tóxicos, podem ser citadas a morte celular, alterações na permeabilidade da membrana, ou a inibição enzimática. A alta biocompatibilidade é uma importante propriedade dos implantes, e seus métodos de análise, na engenharia de tecidos, são realizados através de implantes *in vivo* ou em culturas de células *in vitro*. A necessidade de estudos do comportamento celular *in vitro* sobre a superfície de diferentes materiais é fundamental para o uso racional e seguro na prática médica. No método *in vitro* podem ser observados os processos de crescimento celular diretamente sobre os biomateriais. Características de adequada permeação e excelente adesividade celular são importantes fatores na avaliação de biomateriais. As propriedades físico-químicas dos biomateriais, tanto do aspecto químico ou morfológico, causam efeitos na adesão, na distribuição, na proliferação, na diferenciação e na função celular (MULLER, 2008).

A avaliação da biocompatibilidade das amostras de PHB foi determinada por meio da análise da citotoxicidade através da porcentagem da viabilidade

celular, utilizando o método do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromide) (MOSMANN, 1983) e da determinação da produção de óxido nítrico.

O princípio deste primeiro método consiste na absorção do sal MTT pelas células vivas, sendo reduzido no interior destas células a um produto chamado formazana. Este produto, acumulado dentro da célula, é dissolvido através da adição do solvente álcool isopropílico e quantificado por espectrofotometria, sendo sua quantidade proporcional ao número de células vivas existentes no substrato, quando utilizada uma população homogênea de células. Este procedimento é substancialmente simples, permitindo a análise simultânea do comportamento de um maior número de amostras (DALLAN, 2005).

As etapas realizadas neste ensaio foram: a obtenção das células do exsudato peritoneal de camundongos e a avaliação da viabilidade celular de células peritoneais, descritas a seguir:

#### a) Obtenção das células do exsudato peritoneal de camundongos

Os animais foram previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato de sódio a 3,0% (Sigma), três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. Através de uma incisão na parede abdominal destes animais assepticamente, chegou-se a cavidade abdominal. Posteriormente, foram injetados 5,0 mL de solução PBS estéril com pH de 7,2 nesta cavidade. O líquido peritoneal resultante foi coletado e transferido para um tubo cônico estéril com capacidade de 15 mL (Corning, Inc.) e centrifugado a 1500 rpm durante 5 min a 4°C (Nova técnica), sendo o sedimento celular lavado duas vezes com 5,0 mL de PBS. As células sedimentadas foram ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultura RPMI-1640 contendo 2β-mercaptoetanol a 2x10<sup>-5</sup> M, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 U/mL e 5% de soro fetal bovino, sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-1640-C). O número de células foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer com a utilização de 10 µL da suspensão celular diluída em 90µL do Líquido de Lazarus. As células foram ajustadas à concentração ideal para cada ensaio em meio RPMI-1640-C.

#### b) Avaliação da viabilidade celular de células peritoneais

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método baseado na capacidade das células viáveis de clivar o anel tetrazólico presente no sal de MTT pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa, formando cristais de *formazana* (MOSMANN, 1983).

Em uma placa estéril de 96 cavidades de fundo plano (Corning, Inc.) foram distribuídos 100µL por cavidade das suspensões de célula do exsudato peritoneal de camundongos, ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL em meio de cultura RPMI-1640-C, juntamente com as amostras do PHB a serem testadas. Em poços pré-determinados da placa, com as mesmas condições anteriores foram adicionados 100 µL de LPS (lipopolissacarídeo) a uma concentração de 10mg/µL, apenas como meio de cultura (controle negativo), em duplicata. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após esse período de incubação: o sobrenadante é coletado para posterior quantificação do NO, o material do PHB usado é removido e as células aderentes tratadas com 100µL de uma solução de MTT (Sigma) a 0,5 mg/mL em RPMI-1640-C. A placa foi então incubada por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100µL de isopropanol para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (Perkin Elmer) em UV/visível a 540 nm com filtro de referência de 620 nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade.

#### 3.2.3.1.2 Método da determinação da produção de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é uma molécula reguladora, produzida principalmente por macrófagos ativados, de extrema importância nos processos de resposta imune, inflamação, metabolismo ósseo e apoptose. Esta molécula gasosa pode apresentar efeitos benéficos, tais como atividade antimicrobiana e

modulação da resposta imune. Por outro lado, quando presente em altas concentrações, pode atuar como uma influente molécula citotóxica desencadeando prejuízos aos tecidos adjacentes, incluindo osso alveolar (Kendall et al., 2001).

O sobrenadante obtido anteriormente, após o período de incubação é colocado em uma nova placa de cultura de 96 poços. Em alguns poços que continham estas células, foi adicionado novamente um volume de 100µL de RPMI-1640-C + 100µL da solução de LPS (lipopolissacarídeos) a 10 µg/mL, como agente estimulante e em outras, 100µL da solução de LPS (lipopolissacarídeos) a 10 µg/mL como controle positivo, ou somente de RPMI-1640-C, como controle negativo. Estas placas foram novamente incubadas a 37°C, em estufa com tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24, 48 e 72 horas. Então, alíquotas de 50 µL dos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram transferidas para uma placa de cultura de células, não estéril, contendo 96 poços de fundo plano e acrescidas de igual volume de reagente de Griess. Após 10 minutos de incubação, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi determinada com filtro de 540 nm em espectrofotômetro. As concentrações de NO liberadas nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas, a partir de uma curva padrão, previamente estabelecida, e os valores foram expressos em µmols/mL de nitrito.

O óxido nítrico foi quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura e medido espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess, constituído de 0,1 % de N-1-naftil-etilenodiamina, 1 % de sulfanilamida em solução de ácido fosfórico a 2,5 %, utilizando NaNO<sub>2</sub> como padrão (Green et al., 1982).

Todos estes métodos foram realizados nas instalações do Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais– CERTBIO da UAEMa/UFCG.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliações da Bioatividade

Os resultados das caracterizações realizadas para esta avaliação serão apresentados em duas etapas: A primeira contemplará as amostras do PHB Puro, PHB sem ataque, submetidas ao contato com a solução de SBF a 1,0M e 1,5M. A segunda etapa, composta pelas amostras: PHB Puro, PHB atacado sem contato com a solução de SBF e o PHB atacado e submetido ao contato com a solução de SBF a 1,0 e 1,5M, como mostra a metodologia experimental para bioatividade na Figura 15, pág. 93.

#### 4.1.1 Primeira etapa: PHB Puro e sem ataque.

Os ensaios de caracterização feitos nesta avaliação da bioatividade para as amostras do PHB, que não foram submetidas a nenhum tratamento superficial prévio, denominadas: PHB sem ataque, exposta a SBF a 1,0M e a 1,5M (Tabela 10), foram: DRX, MEV e EDS. Sendo estas analisadas nas mesmas condições técnicas feitas para as amostras com ataque.

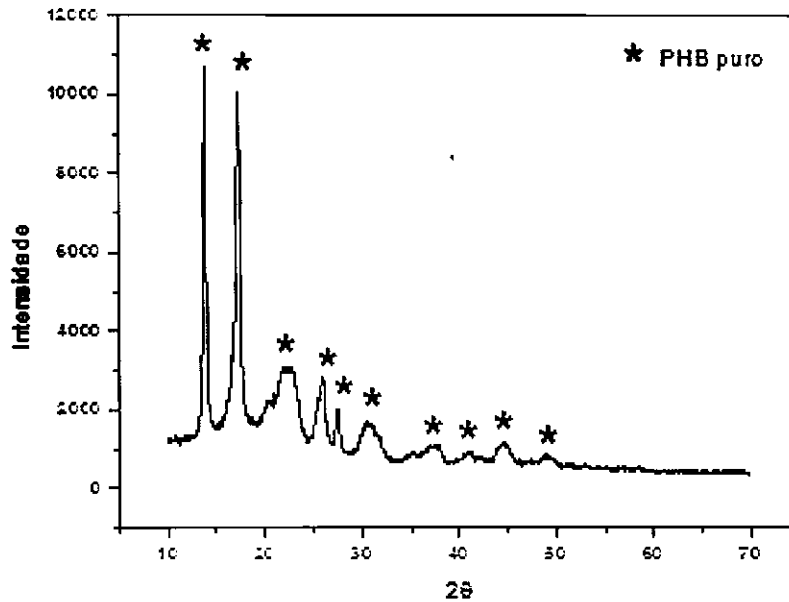
##### 4.1.1.1 Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X obtidos para as diferentes amostras de PHB sem ataque estão apresentados nas Figuras 22 a 24.

Analisando os difratogramas da Figura 22, são observados os picos referentes ao PHB (★) que, de acordo com Barud et. al. (2011) os picos principais e mais intensos ocorrem em  $13,5^\circ$  e  $16,9^\circ$ , os picos achatados em  $21,5^\circ$ ,  $22,5^\circ$ ,  $25,5^\circ$  e  $27,5^\circ$ , e os picos em  $36,5^\circ$ ,  $41,2^\circ$ ,  $44,6^\circ$  e  $49,8^\circ$ .



Figura 22: Difração de raios X da amostra PHB Puro.



Analisando os padrões de difração de raios X das amostras estudadas, pode-se observar que não houve alteração significativa dos difratogramas do PHB quando submetidos à exposição da solução de SBF tanto na concentração de 1,0M (Figura 23) quanto na de 1,5M (Figura 24). Este resultado indica que a camada do recobrimento de fosfato de cálcio, esperada neste ensaio, pode não ter sido suficiente para detecção neste equipamento de difração de raios X.

Figura 23: Difração de raios X da amostra PHB/1,0 SBF.

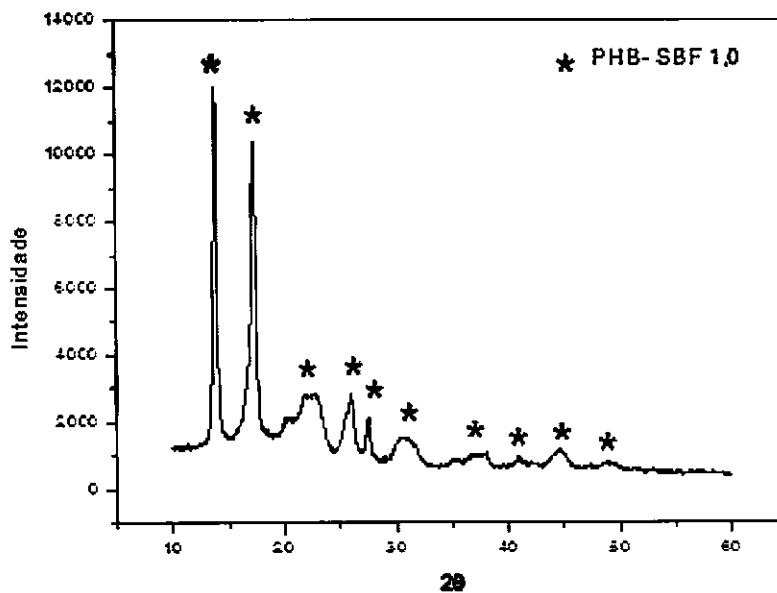
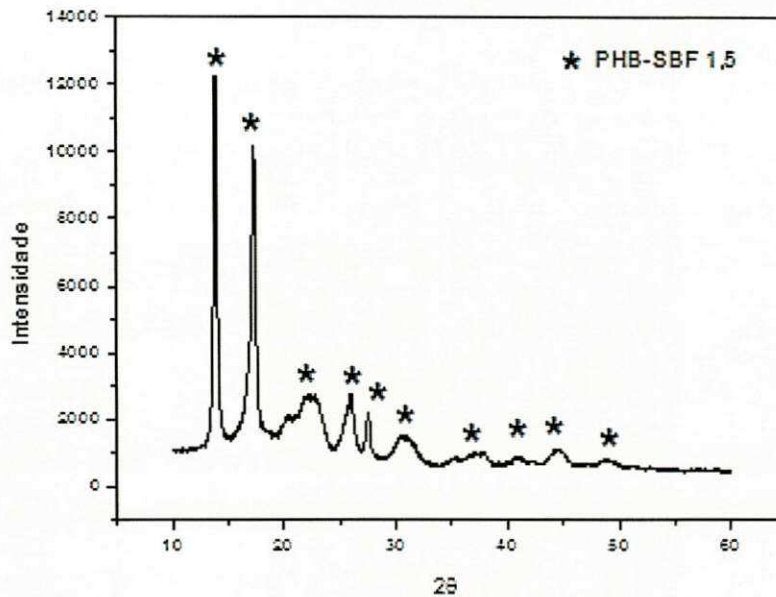


Figura 24: Difração de raios X da amostra PHB/1,5 SBF.



#### 4.1.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As imagens de microscopia eletrônica de varredura, obtidas para as amostras de PHB sem ataque, e expostas à solução de SBF a 1,0M e a 1,5M, estão apresentadas nas Figuras 25 (x2000 e x4000) e 26 (x2000 e x4000).

Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura da amostra PHB/1,0 SBF sem ataque.

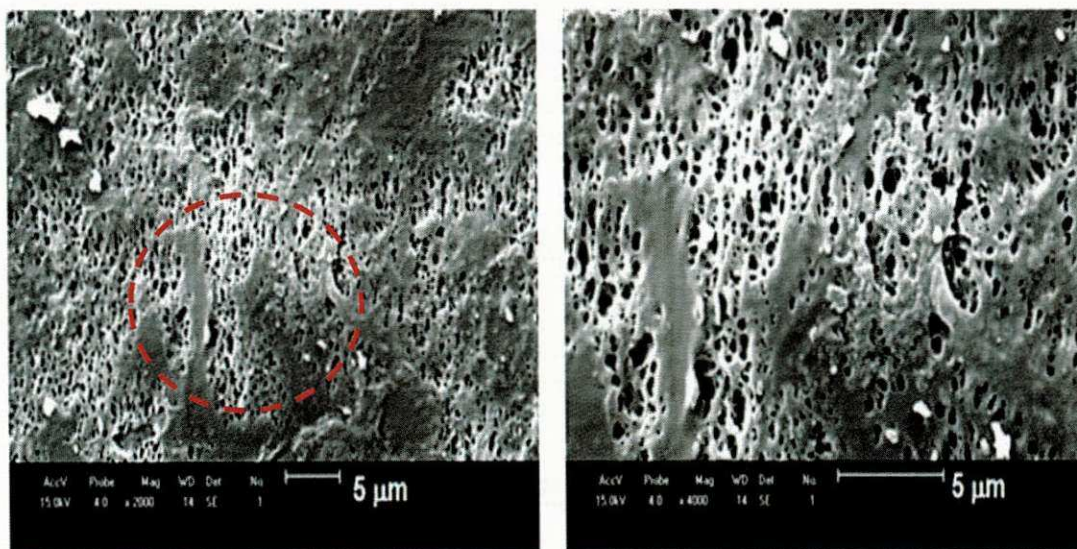
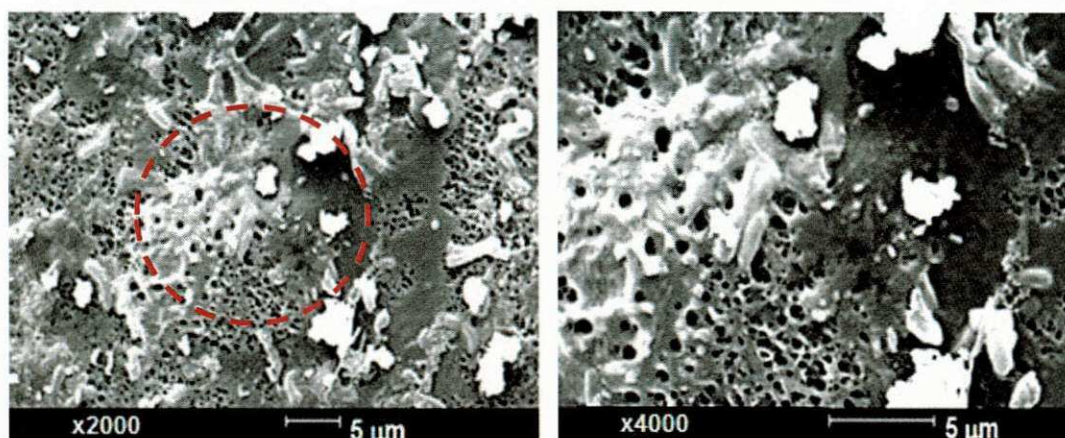


Figura 26: Microscopia eletrônica de varredura da amostra PHB/1,5 SBF sem ataque.



Por meio das imagens de MEV das amostras de PHB+SBF à 1.0M (Fig. 25) e PHB+SBF à 1.5M (Fig. 26), observa-se a presença de um recobrimento de distribuição heterogênea, com algumas regiões de aspecto poroso sobre a superfície do polímero PHB. Observa-se ainda que o aumento da concentração da solução de SBF de 1,0 para 1,5M propiciou um aumento deste recobrimento, com presença de cristalizações pontuais, evidenciado na imagem da Figura 26. Estas imagens não corroboram com as características próprias dos recobrimentos de fosfato de cálcio visto nesta pesquisa, nas Figuras 34 e 35, e em outros trabalhos, Sadat-Shojai et. al. (2013).

#### 4.1.1.3 Espectroscopia por energia dispersiva (EDS).

Para a identificação da composição química deste recobrimento depositado na superfície do PHB, foi realizada uma análise química por energia dispersiva com o auxílio do acessório do EDS acoplado ao MEV. Os resultados desta análise estão apresentados nas Figuras 27 e 28 e na Tabela 14.

A análise química realizada por EDS confirma o não crescimento homogêneo e espesso da camada inorgânica proveniente do contato com a solução de SBF, uma vez que dos elementos químicos presentes neste



recobrimento, não foram encontrados o cálcio e fósforo nas concentrações mínimas esperadas, pelo menos na região onde foi realizada a análise de EDS.

Figura 27: Análise química por EDS da amostra PHB/1,0 SBF.

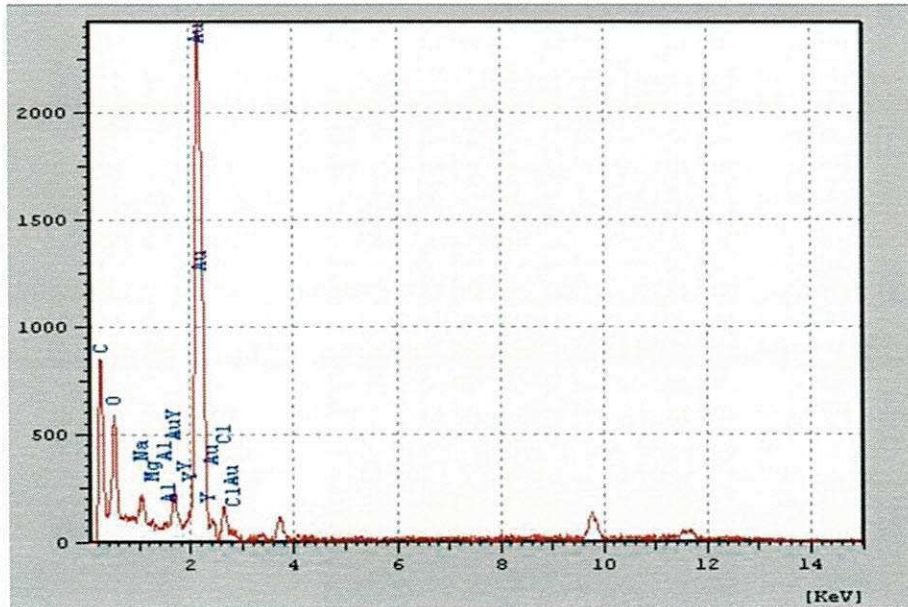


Figura 28: Análise química por EDS da amostra PHB/1,5 SBF.

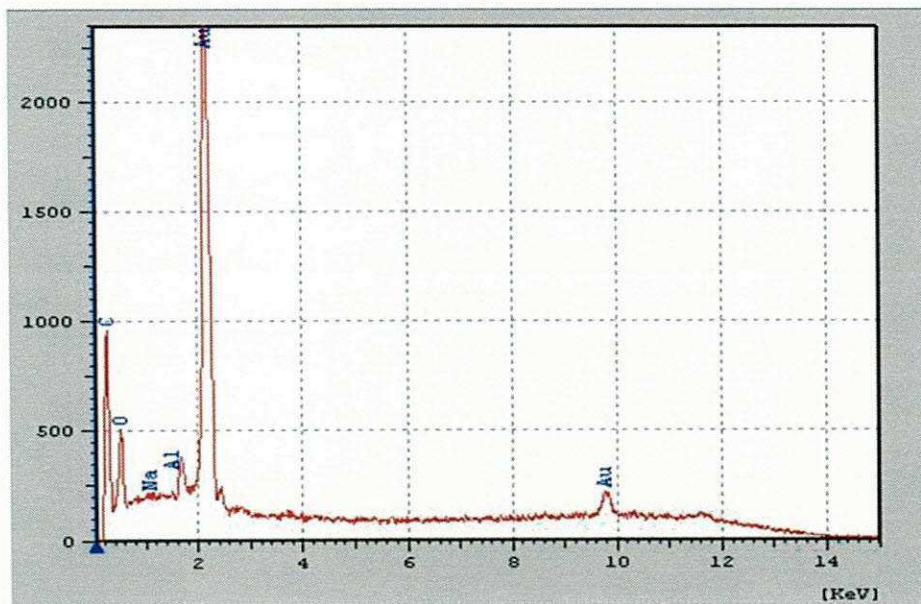


Tabela 14: Análise química por energia dispersiva das amostras de PHB estudadas.

ELEMENTOS PRESENTES	AMOSTRA	
	PHB/1,0 SBF	PHB/1,5 SBF
C	50,614 %	50,443 %
O	43,009 %	46,989 %
Na	2,870 %	1,565 %
Mg	1,048 %	---
Al	0,759 %	1,003
Cl	1,700 %	---

Desta forma, após analisar os resultados destas caracterizações (DRX, MEV e EDS), pode-se afirmar que, nestas condições realizadas, sem ataque do peróxido de hidrogênio, não houve um recobrimento de fosfato de cálcio o suficiente para detectar a presença de fases cerâmicas nesta superfície. Resultado este atribuído à não imersão destas amostras em um meio que levasse a uma modificação da superfície, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio, onde o mesmo proporcionaria uma diminuição da tensão superficial deste polímero, levando-a conseqüentemente a uma superfície mais receptiva e hidrofílica.

#### 4.1.2 Segunda etapa: PHB Puro e atacados.

##### 4.1.2.1 Difração de raios X (DRX)

Para identificar as fases cristalina e/ou semicristalina do PHB, como também analisar picos característicos da fase fosfato de cálcio, presentes nas amostras de PHB estudadas nesta fase, foi realizada a difração de raios X das mesmas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 29.

Analisando os difratogramas das Figuras 29a e 29b vemos exatamente os mesmos picos já observados nas Figuras 22 a 24, que são referentes ao PHB (★) como já descritos por Barud et. al. (2011). Logo se verifica que o

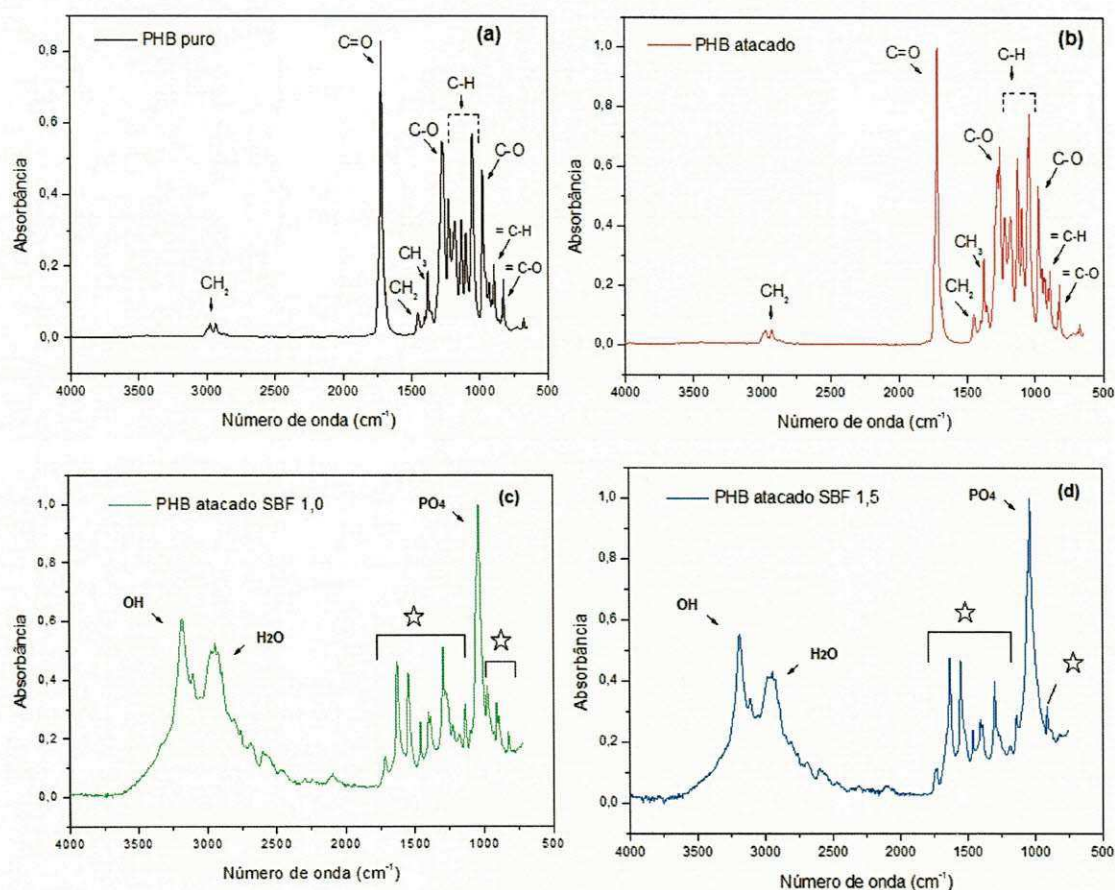




#### 4.1.2.2 Espectroscopia da região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A identificação das bandas características dos grupos funcionais presentes nas amostras de PHB, realizada pela espectroscopia da região do infravermelho com transformada de Fourier nesta caracterização, tem como objetivo confirmar o recobrimento da fase cerâmica (fosfato de cálcio) na superfície destas amostras poliméricas. Os resultados obtidos por FTIR para as placas de PHB estudadas estão apresentados na Figura 30.

Figura 30: Espectroscopia da região do infravermelho com transformada de Fourier para as amostras de PHB estudadas: PHB Puro (a), PHB atacado (b), PHB atacado e exposto à solução de SBF a 1,0M (c) e PHB atacado e exposto à solução de SBF a 1,5M (d).



Analisando os espectros de FTIR da Figura 30a e 30b, observam-se as bandas características dos grupos funcionais referentes ao PHB, são elas: estiramento da ligação C-O ( $1150\text{ cm}^{-1}$ ) e C=O ( $1726\text{ cm}^{-1}$ ) do éster, deformação assimétrica das ligações C-H ( $1460\text{ cm}^{-1}$ ), radicais  $\text{CH}_2$  ( $3000\text{ cm}^{-1}$ ) e radicais  $\text{CH}_3$  ( $1379\text{ cm}^{-1}$ ), estiramento das ligações =C-H ( $950\text{ cm}^{-1}$ ) e =C-O ( $823\text{ cm}^{-1}$ ). Destaca-se que Tripathi et. al. (2013) obtiveram espectros de FTIR semelhantes aos desta tese quando estudaram as propriedades físicas do PHB.

Já nas Figuras 30c e 30d além das bandas características do polímero (★), observam-se bandas características dos fosfatos, a saber: grupo  $(\text{PO}_4)^{3-}$  ( $1087\text{ cm}^{-1}$ ) e da  $\text{HO}^-$  ( $3300\text{ cm}^{-1}$ ), além da banda característica da água livre adsorvida ( $\approx 3000\text{ cm}^{-1}$ ). Vale salientar que estes resultados corroboram com os resultados de Abdul Qader et. al. (2013) e Shiwaku et. al. (2012) quando estudaram fosfatos de cálcio bifásicos (HAp +  $\beta$ -TCP) e o fosfato octacálcico (OCP), respectivamente.

Assim, podemos considerar que nesta segunda caracterização, o PHB, após ter sido atacado, melhorou sua receptividade. Atuando como substrato para obtenção de uma fase cerâmica sintética similar à fase fosfato de cálcio que constitui o osso.

#### 4.1.2.3 Espectroscopia por energia dispersiva (EDS)

Com o objetivo de verificar a composição química do recobrimento depositado sobre as amostras de PHB, previamente definida como fosfato de cálcio, realizou-se a espectroscopia por energia dispersiva das placas de PHB expostas à solução da SBF 1.0M e 1,5M. Os resultados obtidos por EDS para as amostras de PHB estudadas estão apresentados nas Figuras 31 e 32.

Analisando os resultados contidos nas Figuras 31 e 32, confirma-se que a camada depositada sobre as amostras de PHB é derivada da solução da SBF, pois apresenta os elementos constituintes da mesma. Através do EDS foi possível ainda determinar a razão Ca/P dos recobrimentos depositados, confirmando que se trata de fosfatos de cálcio.



A placa de PHB submetida à SBF 1.0M apresentou razão Ca/P de 3,0, referente ao BCP (fosfato de cálcio bifásico – formado pela união das fases HA e  $\beta$ -TCP), enquanto que a submetida à SBF 1,5M apresentou razão Ca/P de 1,33, referente à fase OCP (fosfato octacálcico) (ABDULQADER et. al. 2013 e SUZUKI, 2013).

Figura 31: Espectroscopia por energia dispersiva da amostra PHB exposto à solução de SBF 1,0M

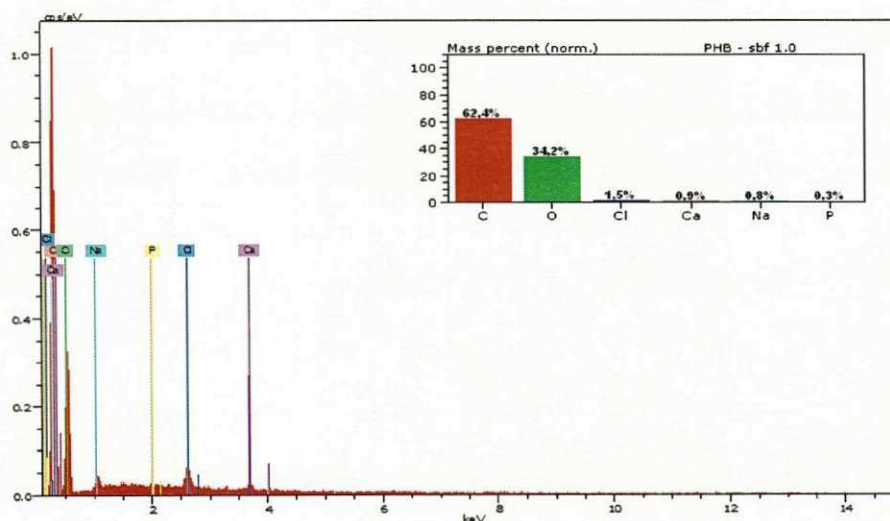
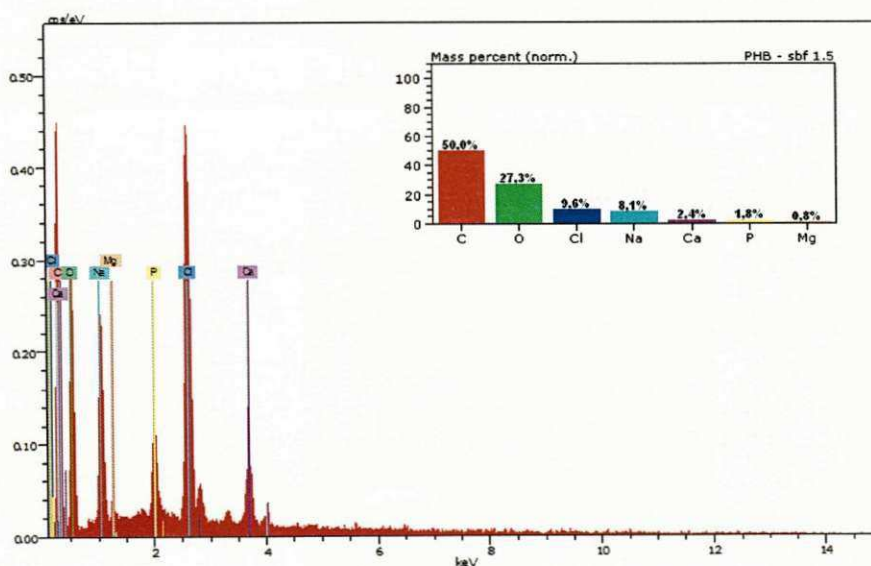


Figura 32: Espectroscopia por energia dispersiva da amostra PHB exposto à solução de SBF 1,5M



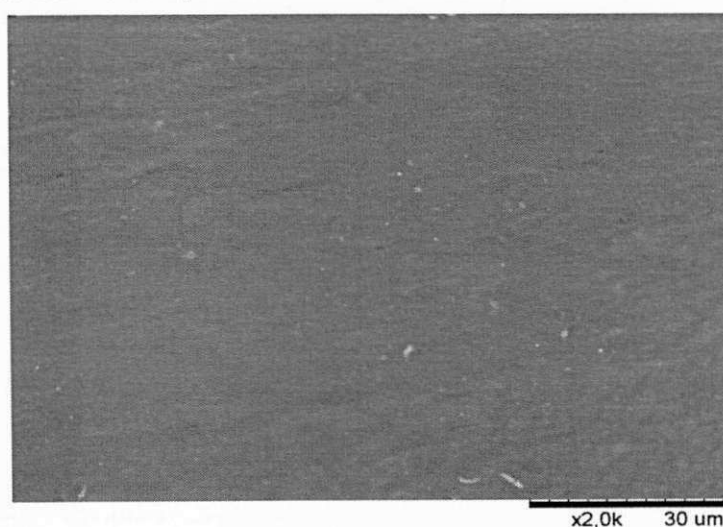
Desta forma, pode-se considerar também que o PHB, após o ataque com o peróxido de hidrogênio, comportou-se como um polímero receptível ao meio biológico, confirmando mais uma vez ser, após este ataque, um substrato eficiente para o crescimento ósseo, permitindo a obtenção de fases cerâmicas similares àquela presente no tecido ósseo (fosfatos de cálcio) sobre sua superfície. Após verificar os resultados destas três primeiras caracterizações, podemos afirmar que o PHB atacado, torna-se mais receptivo a este meio.

#### 4.1.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas nas amostras de PHB Puro, PHB atacadas e submetidas à solução da SBF 1.0M e 1,5M, para inferir se houve deposição de material sobre estas amostras. As micrografias (MEV) das amostras de PHB estudadas estão apresentadas nas Figuras 33 (escala 30 $\mu$ m com aumento de X2000), 34 (X500 e X4000) e 35 (x500 e x4000), com escalas de 20 $\mu$ m e 5 $\mu$ m respectivamente.

O PHB Puro está apresentado nesta caracterização pela micrografia da Figura 33, onde mostra a topografia da superfície deste polímero e que servirá também como referencial para as amostras estudadas.

Figura 33: Microscopia eletrônica de varredura da amostra PHB Puro.





Por meio das imagens de MEV da Figura 34a nota-se um recobrimento sobre a superfície das placas de PHB, verificando que este recobrimento é de distribuição heterogênea na forma de aglomerados de tamanhos distintos e que a maioria está na faixa inferior a  $20\ \mu\text{m}$ , com poucos elementos maiores do que  $20\ \mu\text{m}$ . Por meio da observação da Figura 34b, verifica-se que estes aglomerados são porosos e formados por partículas de tamanho em torno de  $5\ \mu\text{m}$ . Podemos inferir que este recobrimento é de fosfato de cálcio, baseado nas três primeiras caracterizações realizadas (DRX, FTIR e EDS).

Figura 34: Microscopia eletrônica de varredura da amostra PHB atacado e exposto à solução de SBF 1,0M (a e b).

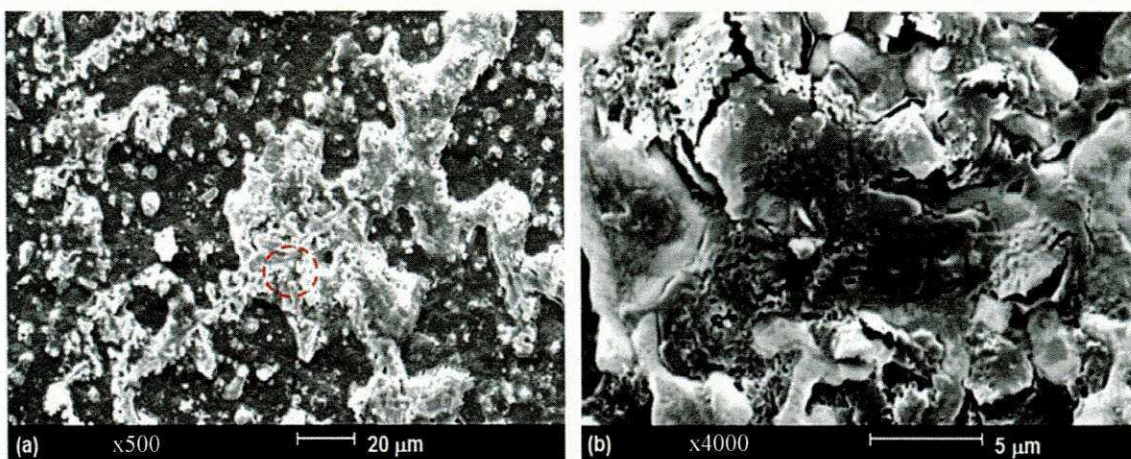
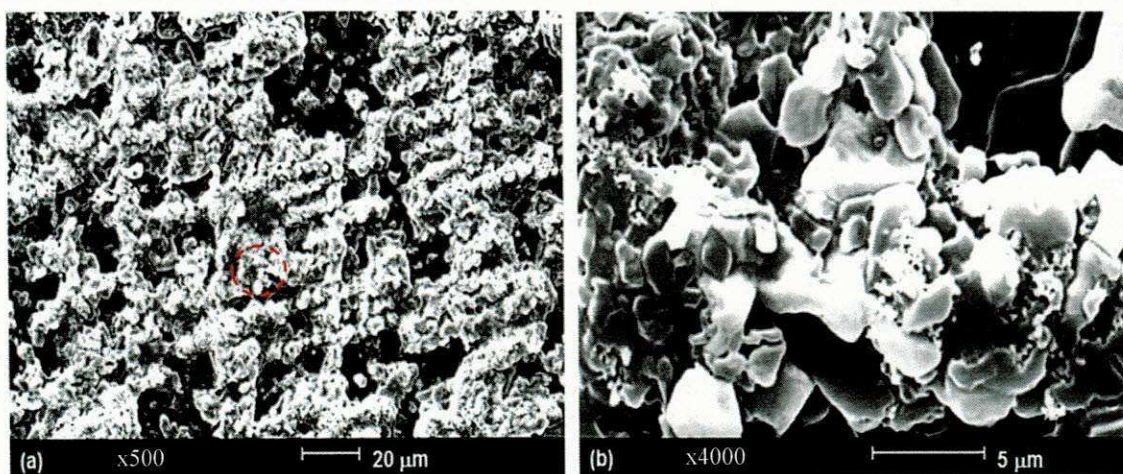


Figura 35: Microscopia eletrônica de varredura da amostra PHB atacado e exposto à solução de SBF 1,5M (a e b).



De acordo com as imagens de MEV da Figura 35a, é confirmada novamente a deposição de um recobrimento sobre a superfície das placas de PHB, sendo este um recobrimento com distribuição homogênea e na forma de aglomerados de tamanhos na faixa de 20  $\mu\text{m}$ . Por meio da observação desta Figura 35b, verifica-se que estes aglomerados são formados por partículas de tamanho menor que 5  $\mu\text{m}$ . Podemos inferir que este recobrimento é de fosfato de cálcio, baseado também nos mesmos princípios considerados anteriormente, em que as três primeiras caracterizações realizadas (DRX, FTIR e EDS), confirmam este fato.

Assim, afirma-se que o aumento da concentração da solução de SBF de 1,0 para 1,5M, propiciou um aumento da camada do recobrimento cerâmico evidenciado na Figura 35a, pelo crescimento de cristais em maior concentração do que o observado na Figura 34a.

Destaca-se que micrografias semelhantes à da Figura 35a foram obtidas por Sadat-Shojai et al. (2013) também para amostras de PHB expostas à solução de SBF.

#### 4.1.2.5 Microscopia ótica (MO)

As imagens de microscopia ótica foram realizadas nas amostras de PHB Puro (Figura 36), PHB atacado com a solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 37), PHB atacado e submetido à solução da SBF 1,0 e 1,5M (Figuras 38 e 39 respectivamente), para também inferir se houve deposição de material sobre as amostras do PHB.

As imagens obtidas para as diferentes amostras de PHB estudadas estão apresentadas nas Figuras 36 a 39, divididas em (a) e (b), para destacarem o aumento de X350 e X2100 respectivamente, com escalas iguais de 50 $\mu\text{m}$ .



Figura 36: Microscopia óptica das amostras PHB Puro (a e b).

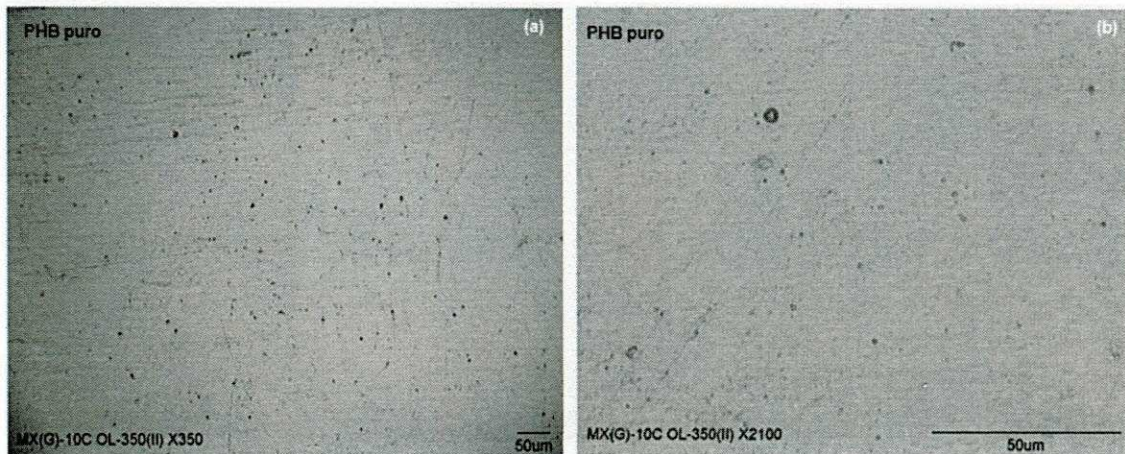


Figura 37: Microscopia óptica das amostras PHB atacado com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a e b)

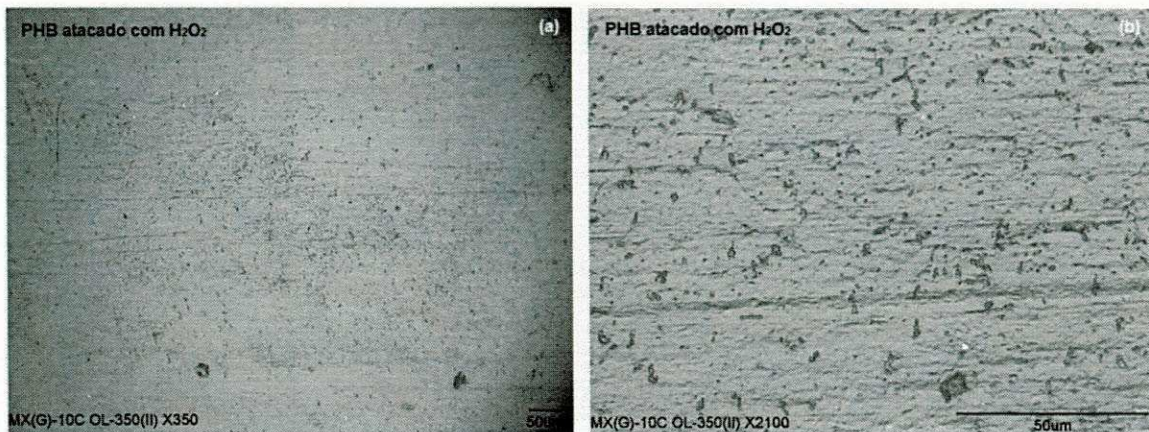


Figura 38: Microscopia óptica das amostras PHB atacado com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e exposto à solução de SBF 1,0M (a e b).

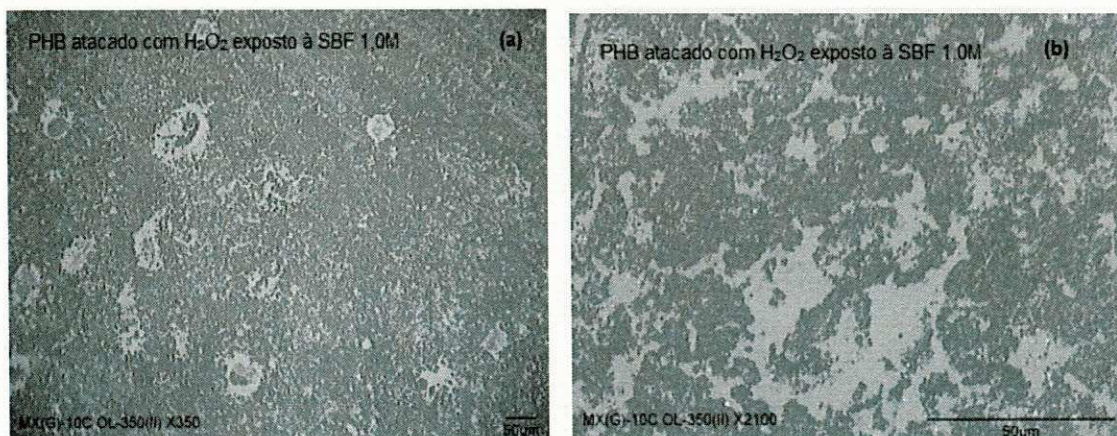
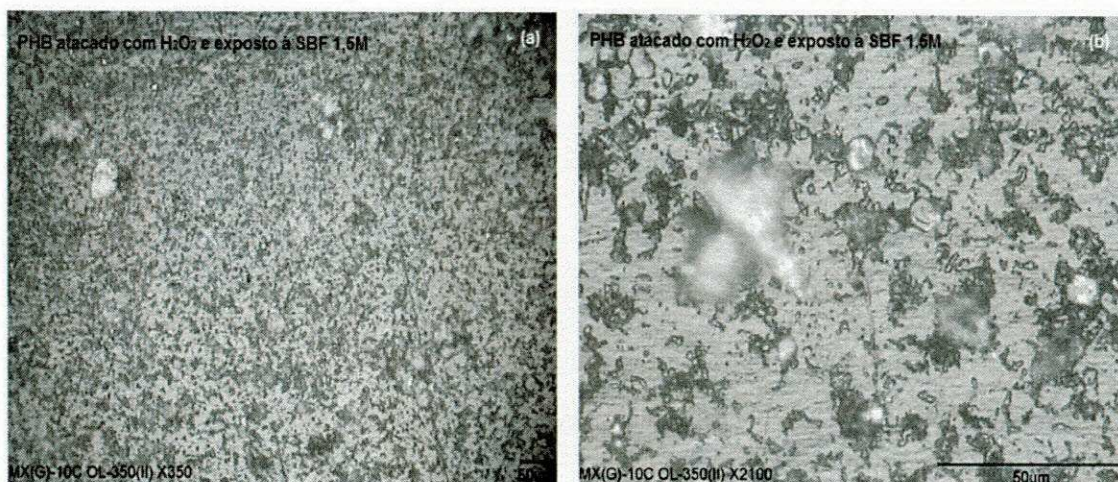




Figura 39: Microscopia óptica das amostras PHB atacado com solução de  $H_2O_2$  e exposto à solução de SBF 1,5M (a e b).



Analisando as micrografias, verifica-se que após a exposição do polímero à solução de SBF, tanto na concentração de 1,0M e 1,5M, houve a formação de uma camada superficial nas amostras de PHB. Sendo que para concentração da SBF a 1,5M desta solução (Figura 39), encontrou-se uma deposição mais homogênea em relação à concentração de 1,0M (Figura 38), resultado semelhante ao que foi detectado na microscopia eletrônica de varredura (MEV). Desta forma, pode-se inferir mais uma vez que a obtenção deste recobrimento sobre estas é um indicativo de que o mesmo melhorou sua interação com o meio biológico, e mais, comporta-se como um substrato eficiente para o crescimento ósseo, uma vez que a solução de SBF representa um fluido corporal inorgânico sintético composto pelos elementos da fase cerâmica presente no tecido ósseo (fosfatos de cálcio).

É oportuno salientar que os resultados da microscopia ótica encontram-se de acordo com os resultados obtidos nos ensaios anteriormente, que confirmam a presença de um recobrimento de fosfato de cálcio sobre as amostras de PHB atacado.

#### 4.1.2.6 Microscopia de força atômica (AFM)

As imagens de microscopia de força atômica foram realizadas em todas as amostras do PHB citadas nesta primeira etapa de avaliação da bioatividade. Isto, não só para inferir um recobrimento sobre o PHB, mas também para verificar a alteração topográfica da sua superfície, principalmente quanto a sua rugosidade. As micrografias desta análise estão representadas nas Figuras 40 a 47. As imagens estão apresentadas em três dimensões, enquanto que os gráficos se encontram nos eixos “x” e “y”. Todos padronizados em unidades micrométricas.

As Figuras estão assim apresentadas: a 40 e 41, PHB Puro; 42 e 43, PHB atacado; 44 e 45, PHB atacado + SBF a 1.0M e finalmente 46 e 47, PHB atacado + SBF a 1.5M.

Figura 40: Microscopia de força atômica da amostra PHB Puro

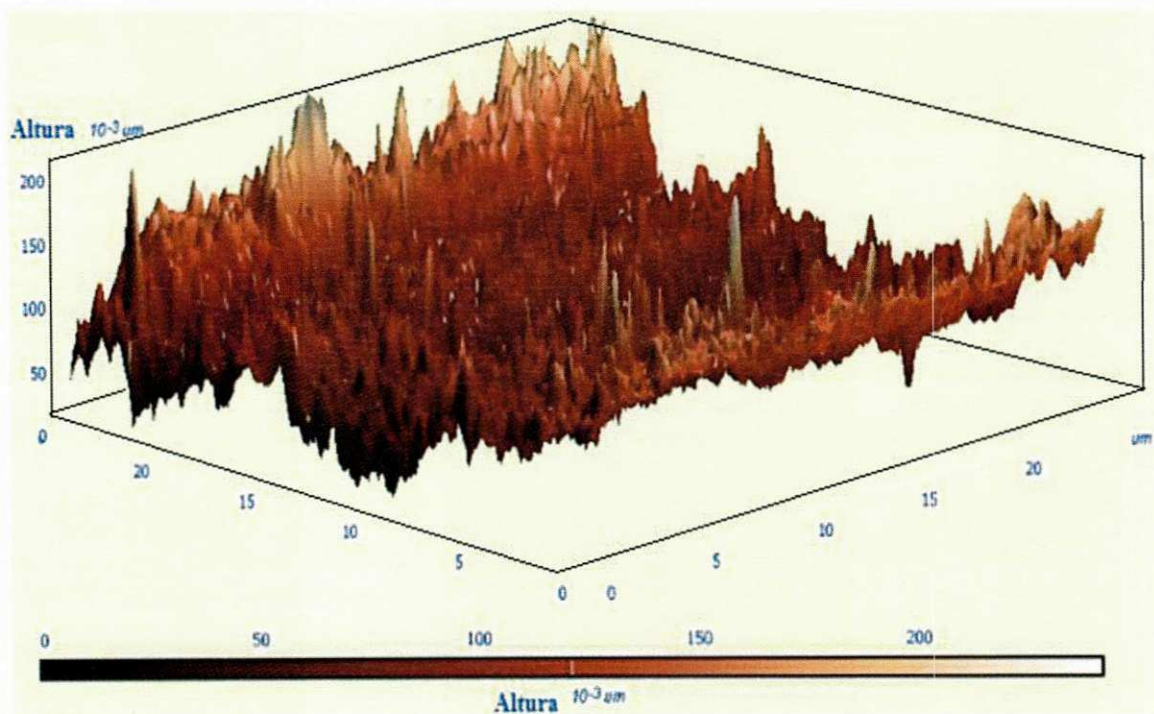
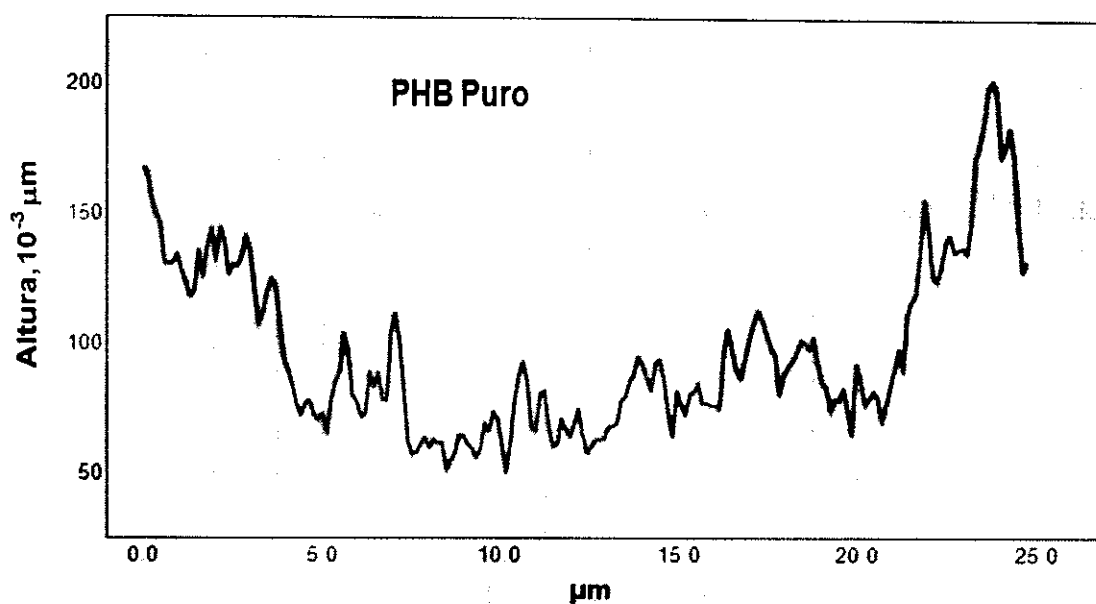




Figura 41: Varredura topográfica da amostra PHB Puro.



Observando a Figura 40, verifica-se que a superfície da amostra de PHB Puro é constituída por uma topografia irregular, com espículas pontiagudas de variadas dimensões em toda sua extensão, constatando de que se trata de uma superfície rugosa. Na representação gráfica desta amostra, Figura 41, pode-se medir a altura destas elevações, partindo do ponto mais profundo até o mais alto, que para esta amostra foi de 0,20μm, com um traçado correspondente à rugosidade desta superfície.

A Figura 42 ilustra a superfície da amostra de PHB que foi submetida ao ataque químico com a solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Verifica-se então que a superfície do polímero apresenta-se ainda com topografia irregular, rugosa, porém com um arredondamento nas espículas pontiagudas, onde claramente verifica-se que a altura destas espículas e sua profundidade diminuíram em relação ao PHB Puro. Ficando em torno de 0,12μm, como ilustra a Figura 43. Atribuindo a esta solução uma ação niveladora desta superfície.

Figura 42: Microscopia de força atômica da amostra PHB Atacado

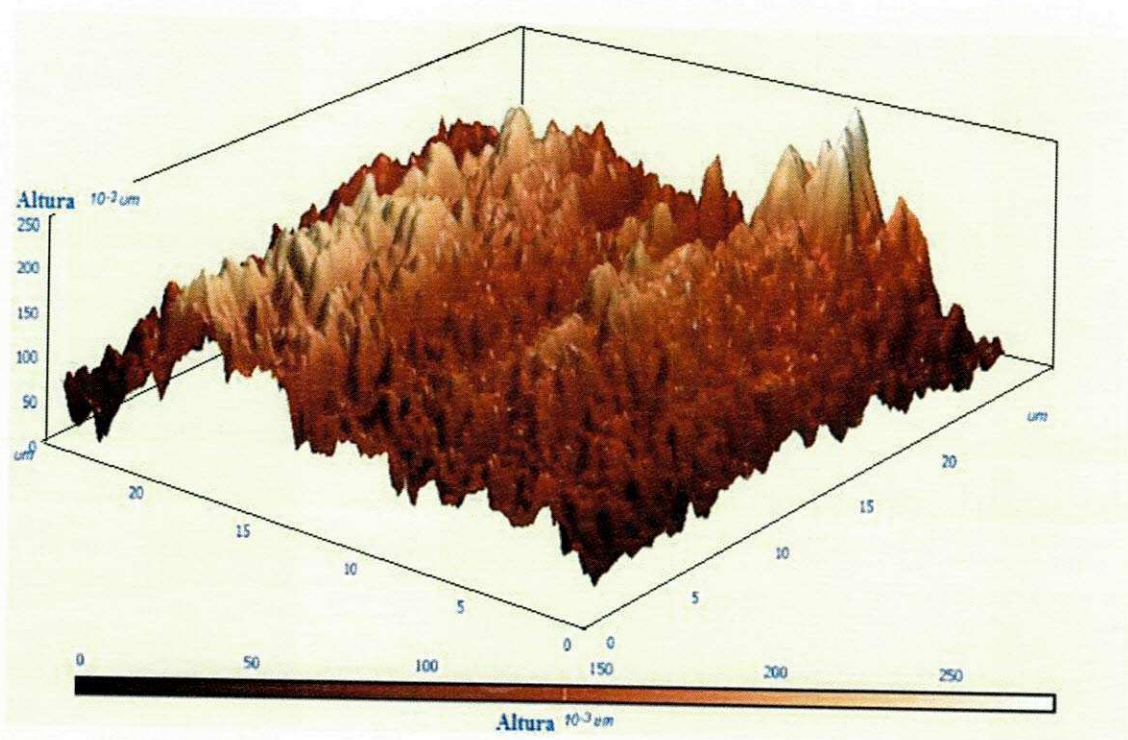
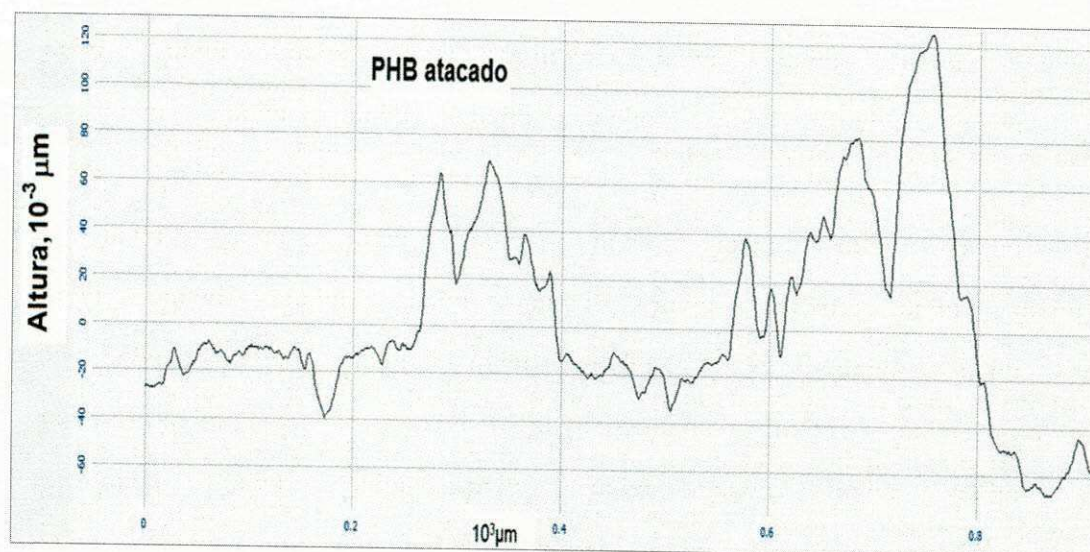


Figura 43: Varredura topográfica da amostra PHB atacado.



Analisando a Figura 44 confirma-se, assim como já visto na MEV, que nas amostras de PHB que foram expostas à solução de 1.0M de SBF, a camada do recobrimento obtido foi heterogênea, pois se verifica na Figura 45 que, mesmo com uma tendência a regularizar a superfície, manteve várias elevações características do próprio polímero estudado. Infere-se ainda que na maior parte da superfície desta amostra, a espessura obtida neste recobrimento foi em torno de  $0,095\mu\text{m}$ .

Analisando a Figura 46, confirma-se a relativa homogeneidade da camada do recobrimento obtido nas amostras de PHB que foram expostas à solução de 1,5M de SBF, pelo fato de que, nesta imagem da MFA, é possível verificar duas topografias distintas: uma com tendência à planificação, onde supostamente houve uma deposição do fosfato de cálcio, e a outra mais irregular, com algumas elevações, entretanto, com altura e quantidade bem mais reduzidas que às observadas na imagem de MFA da Figura 44 (PHB exposto à solução de SBF 1.0M).

Figura 44: Microscopia de força atômica da amostra PHB atacado e exposto à solução de SBF 1,0M

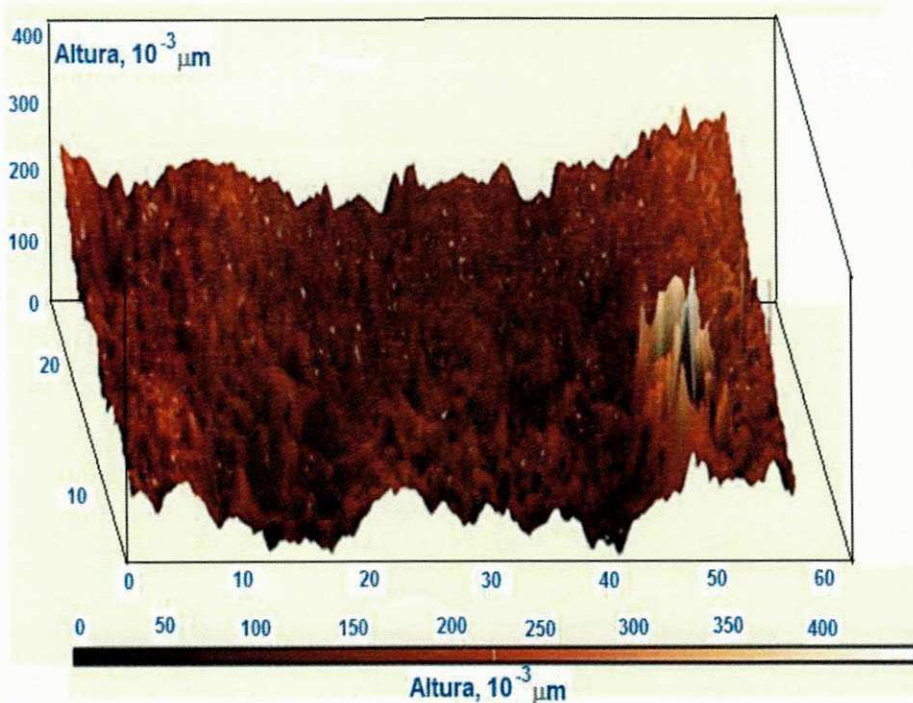




Figura 45: Varredura topográfica da amostra PHB atacado e exposto à solução de SBF 1,0M.

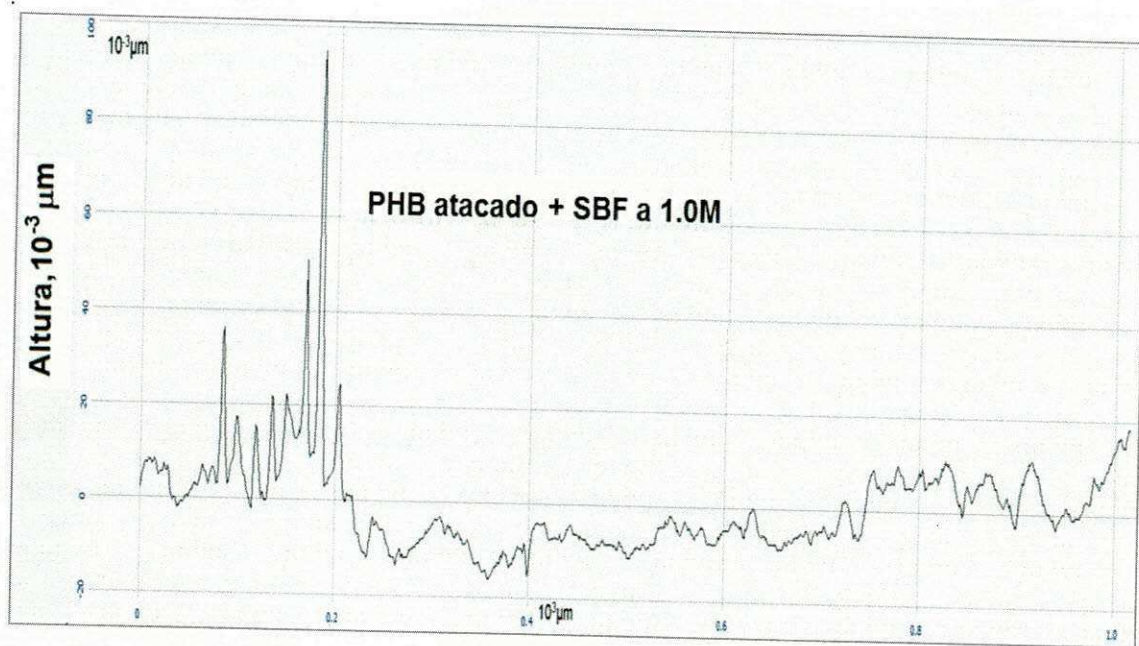


Figura 46: Microscopia de força atômica da amostra PHB atacado e exposto à solução de SBF 1,5M.

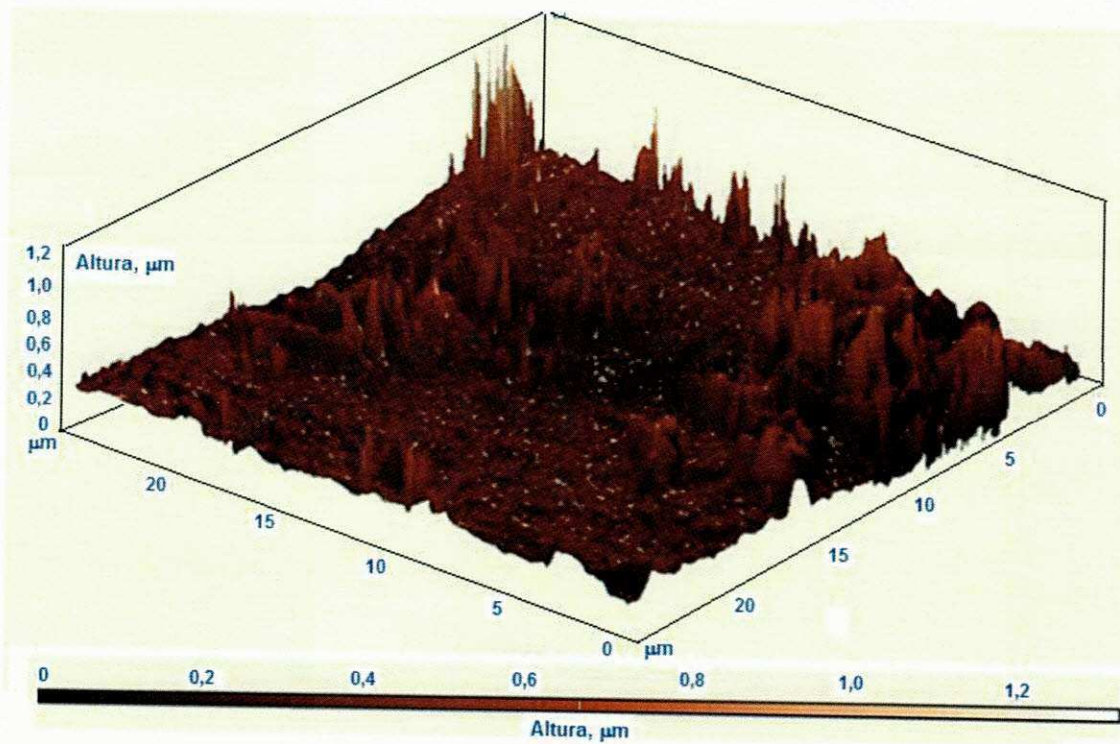
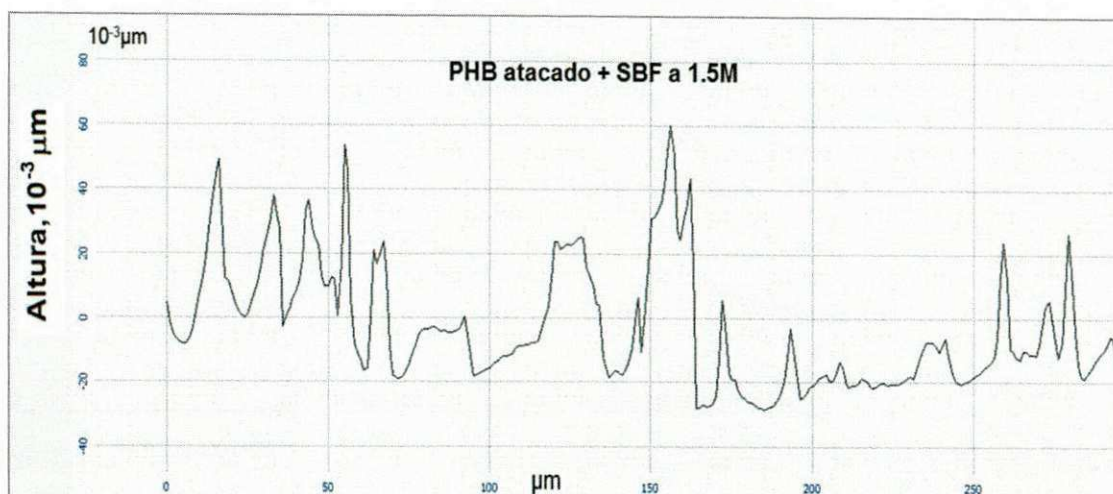


Figura 47: Varredura topográfica da amostra PHB atacado e exposto à solução de SBF 1,5M



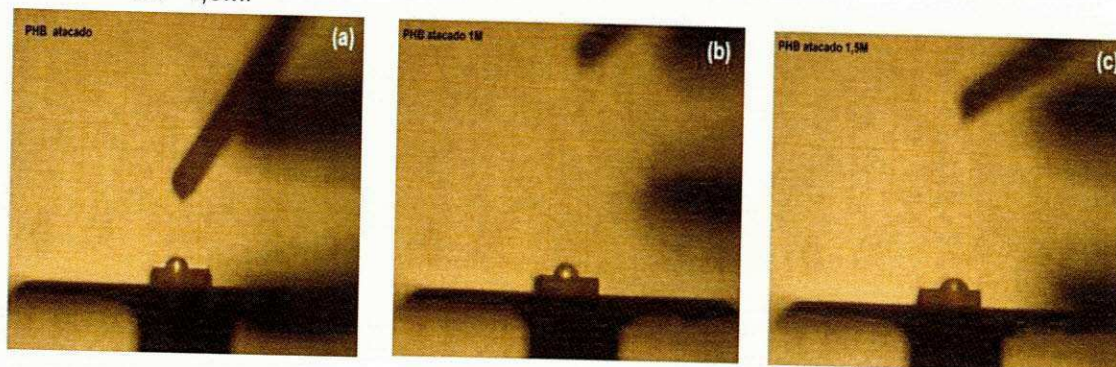
Corroborando com esta colocação, podemos ver no gráfico da Figura 47, onde a altura dos picos são menores, devido à base do substrato (amostras do PHB) ter sido recoberto com a camada da SBF a 1.5M, houve diminuição na quantidade destes picos em relação ao gráfico da Figura 45 (SBF 1,0M), isto é, uma regularidade no traço horizontal. Com isto, verifica-se então que a espessura obtida pelo recobrimento foi em torno de 0,4 a 0,6μm, presentes em quase toda extensão desta superfície.

#### 4.1.2.7 Ângulo de contato/ molhamento

Um parâmetro útil para prever a interação de um biomaterial (no caso, as placas de PHB) com o meio biológico (a solução de SBF) é a sua molhabilidade, que está diretamente relacionada com a energia superficial do material. Para caracterizar a molhabilidade da superfície das placas de PHB estudadas foi utilizada a medida do ângulo de contato da gota de um líquido (água) na superfície das amostras, conforme ilustrado na Figura 48.

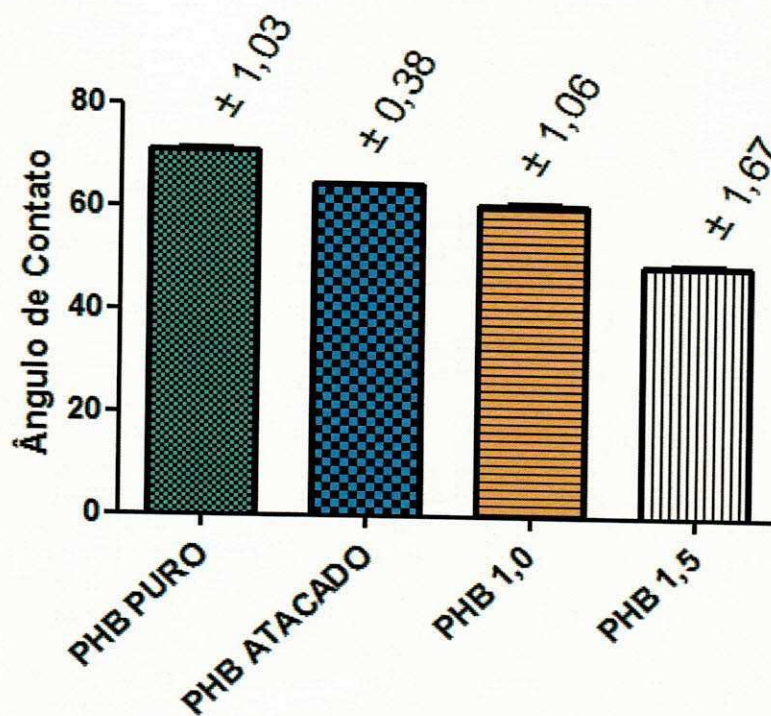


Figura 48: Fotografias ilustrativas da determinação do ângulo de contato das amostras de PHB: atacado (a), atacado e em contato com SBF 1,0M (b) e atacado e em contato com SBF 1,5M.



A Figura 49 mostra os resultados obtidos para o ângulo de contato/molhamento das amostras de PHB.

Figura 49: Resultados da determinação do ângulo de contato das amostras de PHB estudadas.



Por meio da análise dos resultados apresentados na Figura 49 pode-se verificar que a amostra PHB puro apresentou o maior ângulo de contato ( $\approx 71,00^\circ$ ), dentre as quatro amostras estudadas, corroborando com os resultados de Wang et al. (2005).

A amostra do PHB atacada com o peróxido de hidrogênio apresentou menor ângulo de contato em relação ao PHB puro, pois o peróxido de hidrogênio provavelmente diminuiu a tensão superficial do polímero, pelo aumento da polaridade, diminuindo assim o ângulo de contato com a água, indicando uma maior molhabilidade da superfície, o que se encontra de acordo com o relatado por Zhang et al. (2008).

As amostras que foram submetidas ao contato com as soluções de SBF apresentaram medidas de ângulo de contato decrescentes, onde se pode observar que o aumento da concentração da solução de 1,0M para 1,5M ocasionou uma diminuição do ângulo de contato, o que indica um provável recobrimento cerâmico (hidrofílico) obtido na superfície das placas. Observa-se ainda que a amostra PHB/1,5M de SBF foi a que apresentou a maior molhabilidade, ou seja, o menor ângulo de contato ( $\approx 50,00^\circ$ ).

Os resultados obtidos para o molhamento da superfície do polímero, a partir das medidas de ângulo de contato (quanto menor o ângulo de contato, maior o molhamento), apresentaram valores decrescentes com o aumento da concentração da solução de SBF. Isso indica que a exposição da superfície do PHB com a solução de SBF foi benéfica, evidenciando que as placas do polímero atuaram como substratos eficientes para o crescimento da fase cerâmica (fosfato de cálcio) semelhante à encontrada nos tecidos ósseos, sendo este um indicativo de que o PHB após o ataque, evidenciou uma superfície mais receptiva e hidrofílica em relação com este meio.

Desta forma, após todos os resultados desta avaliação, pode-se afirmar que o PHB comportou-se como um polímero receptível com o meio biológico, principalmente após ter sido atacado com peróxido de hidrogênio, sendo, portanto um substrato eficiente para o crescimento ósseo, uma vez que a solução de SBF representa um fluido corporal sintético composto pelos

elementos químicos presentes na cerâmica do tecido ósseo (fosfatos de cálcio), sendo este um indicativo de que o PHB interagiu com o meio biológico.

## 4.2 Avaliação da biodegradabilidade

### 4.2.1 Procedimento (A)

Neste primeiro procedimento (A) - (Figura 19), foram caracterizadas as amostras do PHB Puro com recobrimento (que tiveram contato com a solução de SBF a 1.5M) e sem recobrimento. Todas foram submersas no meio de degradação (PBS + Lisozima), com intervalos de exposições de 30 dias (renovando-se o meio) até completar os 180 dias.

#### 4.2.1.1 Determinação da perda de massa (Peso)

Na Tabela 15, têm-se os resultados do primeiro ensaio de biodegradação, segundo as variações de massa observadas para os intervalos de exposição (de 30 a 180 dias) e as denominações dos corpos de prova utilizados neste ensaio: tipo 1 (PHB + PBS), tipo 2 (PHB + PBS + Lisozima), tipo 3 (PHB e SBF a 1.5M + PBS) e tipo 4 (PHB e SBF a 1.5M + PBS + Lisozima).

Tabela 15: Variação percentual de massa no ensaio de biodegradação

<b>Retirada</b>	<b>Tipo 1</b>	<b>Tipo 2</b>	<b>Tipo 3</b>	<b>Tipo 4</b>
<b>30 dias</b>	0,19%	-0,14%	-0,22%	-0,11%
<b>60 dias</b>	0,17%	-0,09%	-0,10%	-0,13%
<b>90 dias</b>	0,55%	-0,15%	-0,29%	-0,37%
<b>120 dias</b>	0,08%	0,04%	-0,13%	-0,15%
<b>150 dias</b>	0,15%	-0,24%	-0,46%	-0,09%
<b>180 dias</b>	0,38%	-0,08%	-0,44%	-0,01%



A princípio, não foi observada uma variação consistente dos valores obtidos. Isto se deve basicamente a dois efeitos que ocorrem simultaneamente: ganho de massa resultante da absorção de fluido pelo corpo da amostra, devido à afinidade físico-química entre os componentes, e perda de massa devido à biodegradação. Como esses dois fenômenos ocorrem em proporções não sistemáticas, os resultados se mostram aleatórios. Nos corpos de prova do tipo 1, por exemplo, ocorreu apenas ganho de massa, nos do tipo 3 e 4 apenas perda e, nos do tipo 2, ganho e perda.

#### 4.2.1.2 Termogravimetria (TG/DTG)

Nas Figuras 50 a 54 encontram-se as curvas termogravimétricas obtidas das amostras de PHB Puro (sem contado com PBS e Lisozima) e as submetidas ao ambiente de biodegradação *in vitro*. Estas amostras estão especificadas em: tipo 1, 2, 3 e 4 (Tabela 12) para os intervalos de exposição de 60 (a) e 180 (b) dias. As curvas referentes ao intervalo de 120 dias encontra-se no Anexo 1.

Figura 50: Termogravimetria do PHB Puro, que não foi submetido ao ambiente de biodegradação *in vitro*.

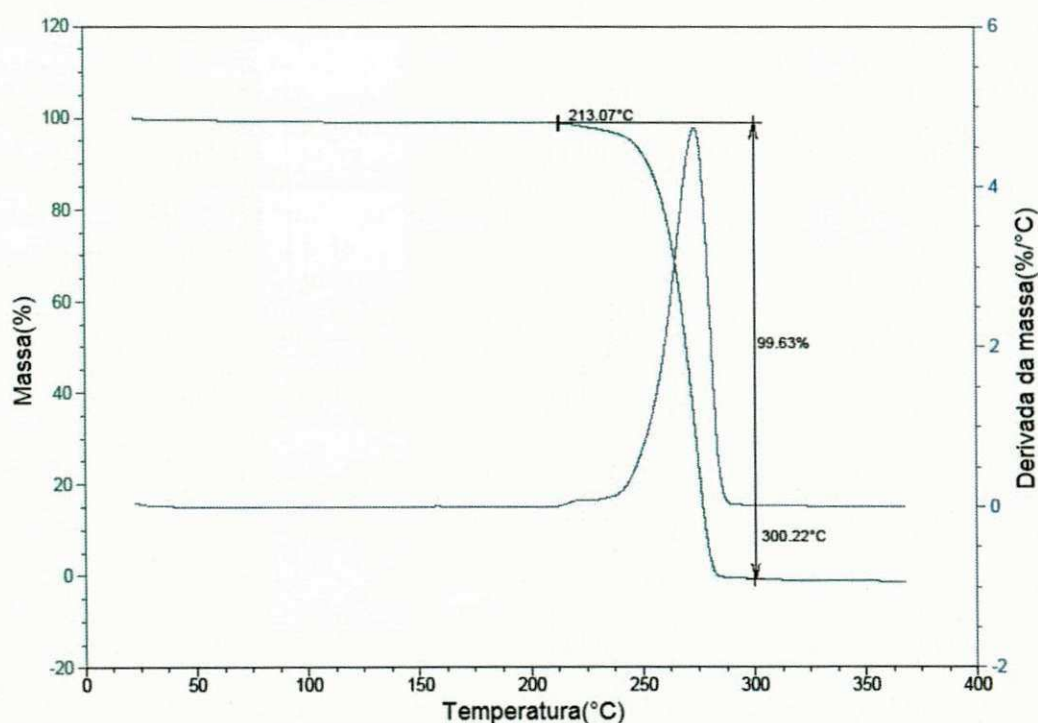


Figura 51: Termogravimetria das amostras tipo 1 (PHB+PBS) submetidas ao ambiente de biodegradação *in vitro*: (a) 2 meses e (b) 6 meses.

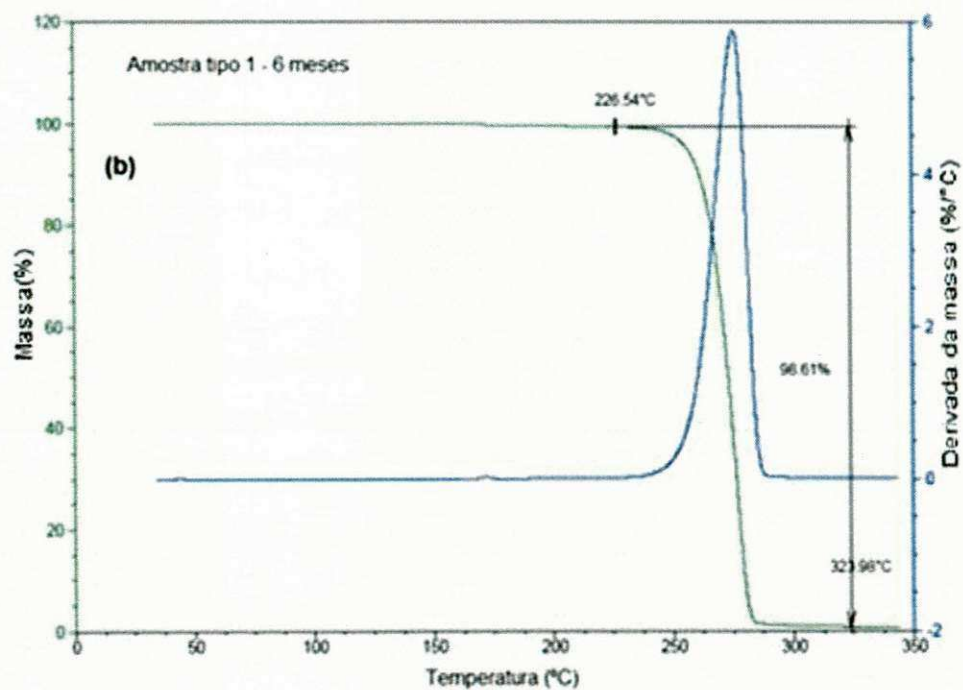
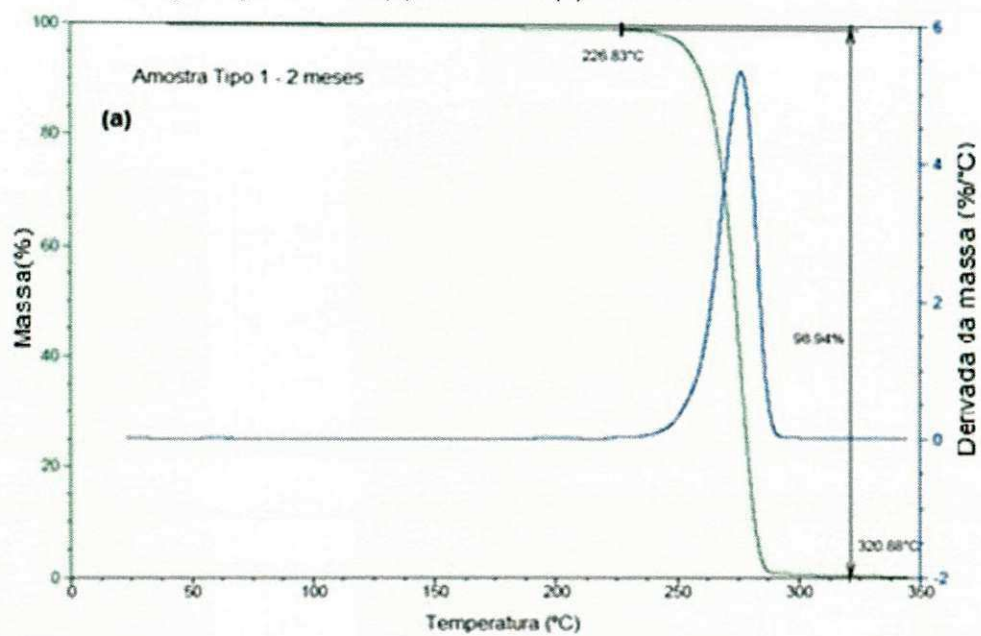




Figura 52: Termogravimetria das amostras tipo 2 (PHB+PBS+Lisozima) submetidas ao ambiente de biodegradação *in vitro*: (a) 2 meses e (b) 6 meses.

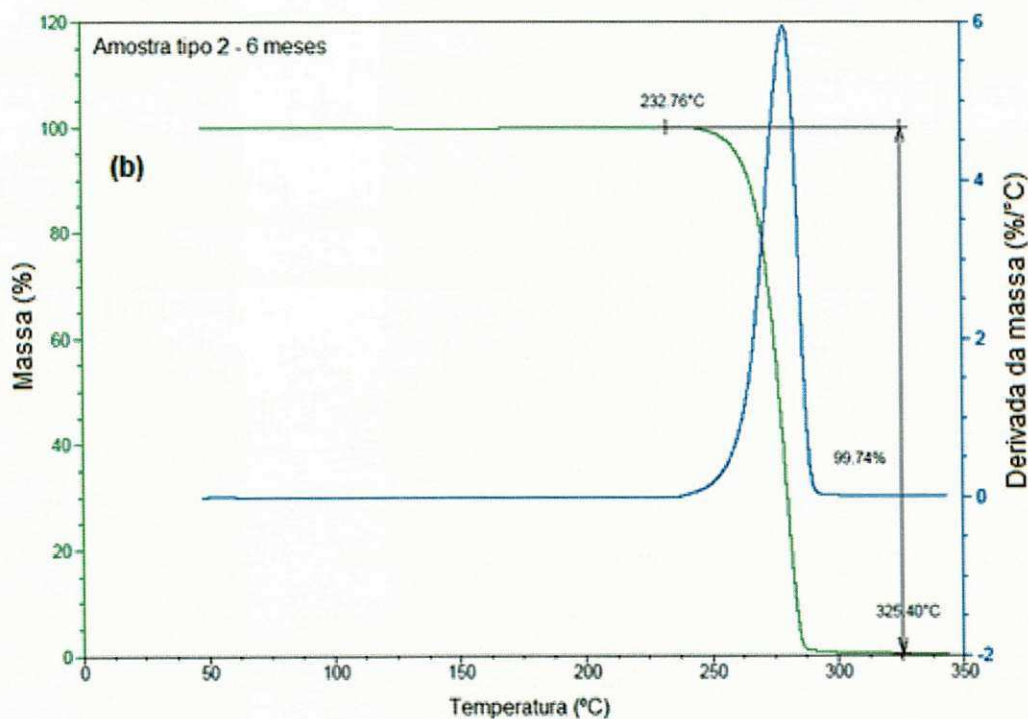
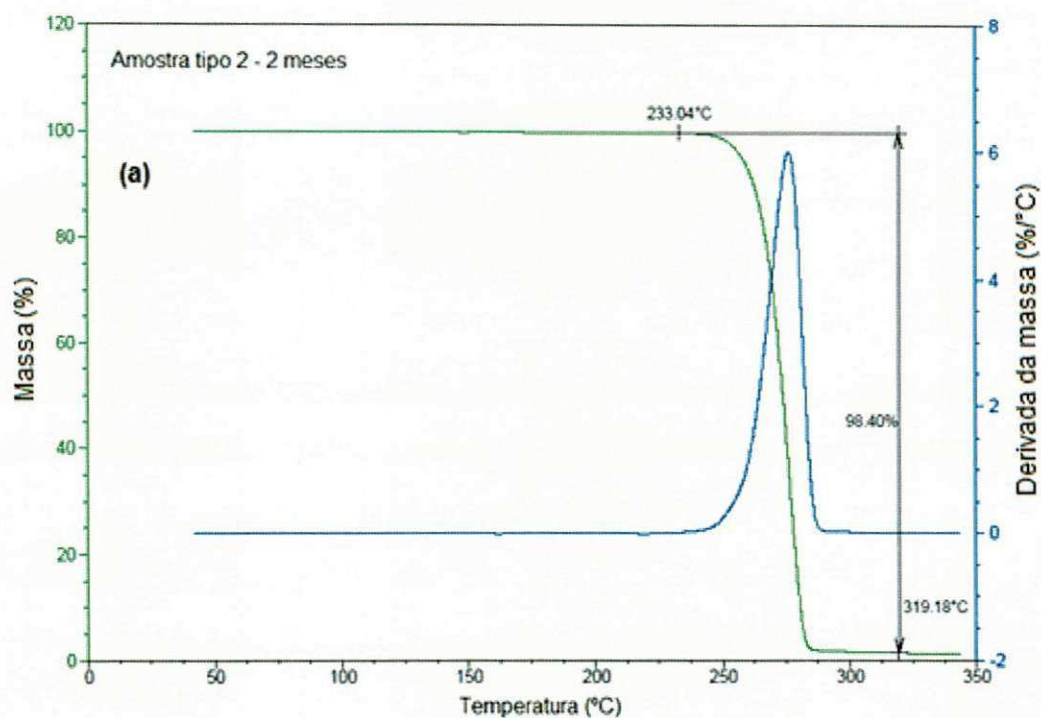


Figura 53: Termogravimetria das amostras tipo 3 (PHB+PBS+SBF 1,5M) submetidas ao ambiente de biodegradação *in vitro*: (a) 2 meses e (b) 6 meses.

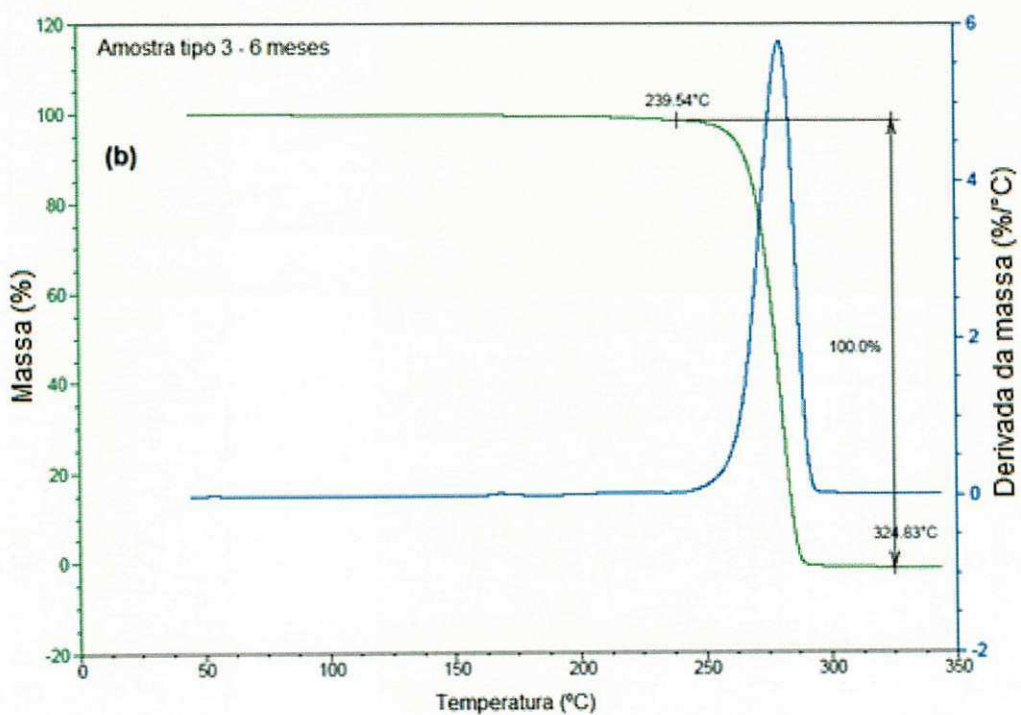
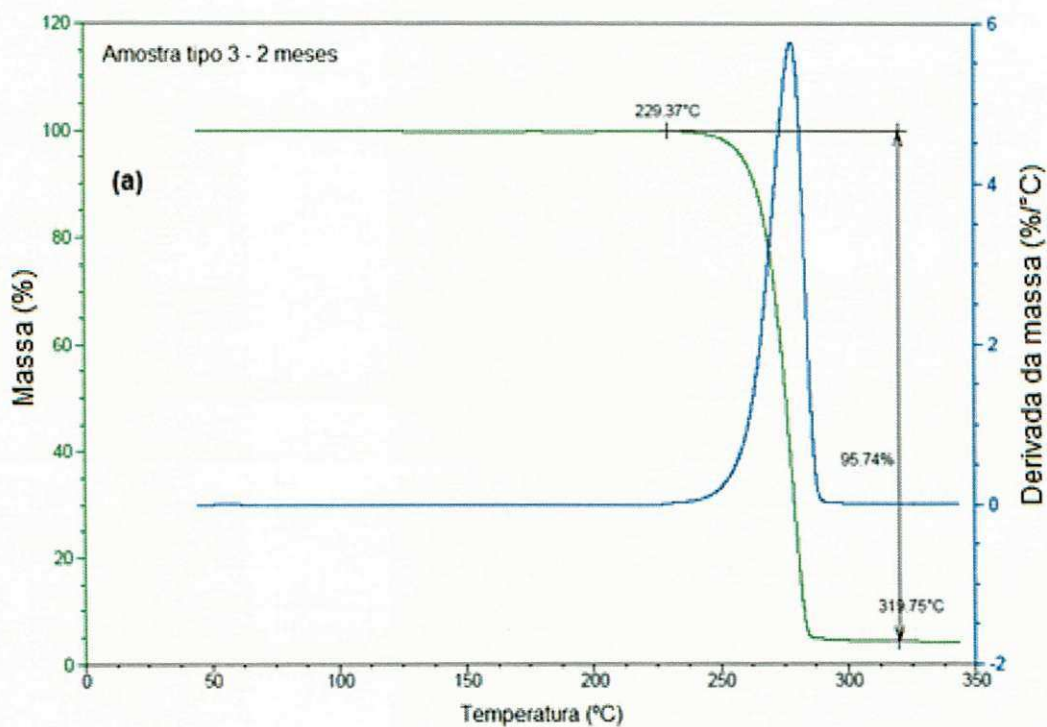
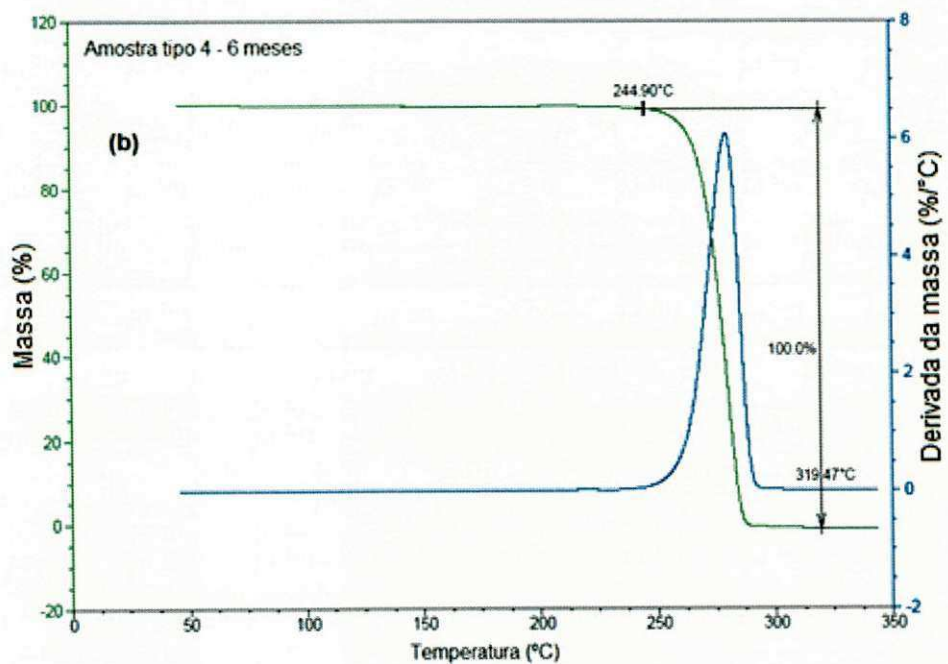


Figura 54: Termogravimetria das amostras de PHB tipo 4 submetidas ao ambiente de biodegradação *in vitro*: (a) 2 meses e (b) 6 meses.



Analisando estas termogravimetrias, observou-se nos 4 tipos de amostras que, à uma temperatura média de aproximadamente 228°C, inicia-se a decomposição térmica do polímero, concluindo próximo de 321°C com uma redução de massa em torno de 98%.

A biodegradação das peças não ocasionou deslocamento significativo das curvas desta TG e DTG, de modo que quanto maior o tempo de exposição da amostra, mais baixa a temperatura de início da decomposição. Isto ocorre, portanto, devido a biodegradação resultar na quebra das cadeias poliméricas e diminuição das cadeias atadoras, diminuindo a resistência térmica do material e facilitando a decomposição sob efeito da temperatura.

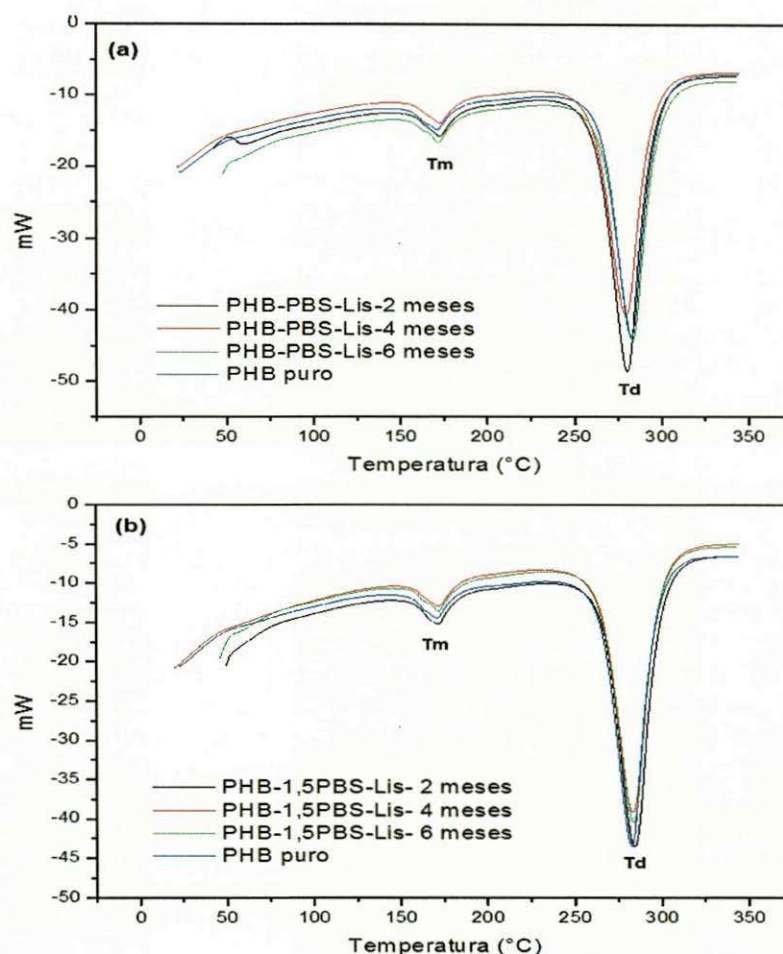
Estes resultados corroboram com os observados por Weng et al. (2011) e Barud et al. (2011) que também não observaram mudança nos perfis de curvas de TG para amostras de PHB expostas à biodegradação *in vitro*.

#### 4.2.1.3 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

Na Figura 55, encontram-se as curvas de DSC obtidas para as amostras de PHB submetidas ao ambiente de biodegradação *in vitro*: Figura 55a (PHB + PBS + Lisozima) e Figura 55b (PHB e SBF a 1.5M + PBS + Lisozima), para os intervalos de exposição de zero a 180 dias.

Por meio das curvas de DSC obtidas para o PHB puro, verifica-se um evento endotérmico, em torno de 170°C referente à fusão ( $T_m$ ) do PHB. Perfis de DSC para o PHB puro já foram descritos por Barud et. al. (2011). Ressalta-se que apenas polímeros semicristalinos como o PHB, exibem  $T_m$ .

Figura 55: DSC das amostras de PHB Puro e as submetidas ao ambiente de biodegradação *in vitro*: (a) PHB+PBS+Lisozima e (b) PHB+SBF 1.5 M+PBS+Lisozima.



Analisando conjuntamente todas as curvas de DSC apresentadas na Figura 55, verifica-se que a biodegradação *in vitro*, de zero a 180 dias, não modificou notadamente a estrutura do PHB, tanto para as amostras recobertas com a solução de SBF a 1.5M, Figura 55b, como as sem recobrimento. Apenas as que tiveram contato com a PBS com Lisozima, Figura 55a, uma vez que se observa exatamente os mesmos eventos térmicos que os apresentados pelo PHB puro, em que estes ocorrem praticamente nas mesmas temperaturas.

#### 3.2.2.1.4 Análise termomecânica (TMA)

O coeficiente de expansão térmica obtido nas amostras desta análise foi constituídos por três materiais: o aço inoxidável 316 L, o osso bovino e o PHB,



medidos na faixa de 30 a 50°C. Os resultados estão apresentados na Figura 56 e na Tabela 16.

Figura 56: Gráfico dos resultados dos coeficientes de expansão térmica.

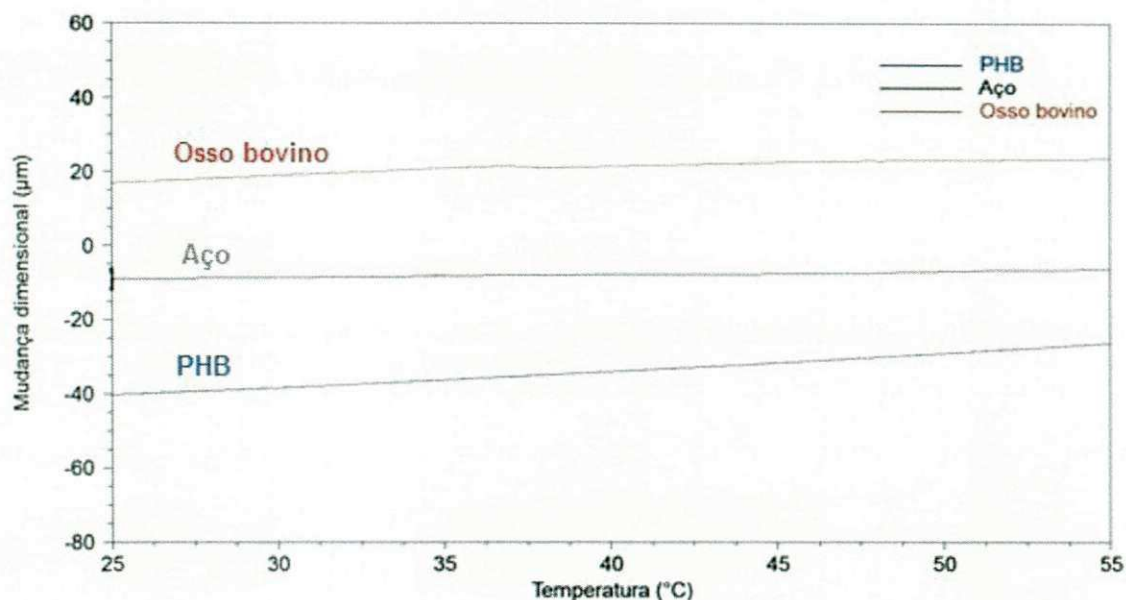


Tabela 16. Coeficiente de expansão térmica.

<b>Materias</b>	<b>Coeficientes de expansão térmica (µm/°C)</b>
PHB	0,474
Osso bovino	0,394
Aço inoxidável 316 L	0,064

Estes dados mostram que, do ponto de vista de variação dimensional no organismo, o PHB é muito mais adequado, pois expande aproximadamente igual ao osso e isto gera menos tensionamento entre o osso e o implante.

#### 4.2.1.5 Viscosimetria

Na Figura 57 e na Tabela 16, encontram-se as massas molares viscosimétricas médias obtidas para as amostras de PHB submetidas ao ambiente de biodegradação *in vitro* (solução tampão de PBS + lisozima). Esses resultados apresentados são para as amostras: PHB puro e para as amostras submetidas à biodegradação durante os tempos de 60, 120 e 180 dias.

As amostras utilizadas neste ensaio, como já descritas em outros ensaios, são de quatro tipos: Tipo 1 (PHB imerso em solução tampão de PBS), Tipo 2 (PHB imerso em solução tampão de PBS + lisozima), Tipo 3 (PHB, submetido à solução de 1,5M de SBF e imerso em solução tampão de PBS) e Tipo 4 (PHB, submetido à solução de 1,5M de SBF e imerso em solução tampão de PBS + lisozima).

Tabela 17. Massa molar viscosimétrica das amostras submetidas à biodegradação.

<b>Amostra</b>	<b>Tempo</b>	<b>Massa Molar Viscosimétrica</b>
<b>Tipo 1</b>	60 dias	37112 ± 208
	120 dias	35397 ± 234
	180 dias	33725 ± 318
<b>Tipo 2</b>	60 dias	42327 ± 364
	120 dias	27094 ± 615
	180 dias	26099 ± 217
<b>Tipo 3</b>	60 dias	37635 ± 851
	120 dias	27094 ± 55
	180 dias	23363 ± 615
<b>Tipo 4</b>	60 dias	41512 ± 220
	120 dias	38232 ± 339
	180 dias	21666 ± 449
<b>PHB Puro</b>		44095 ± 113

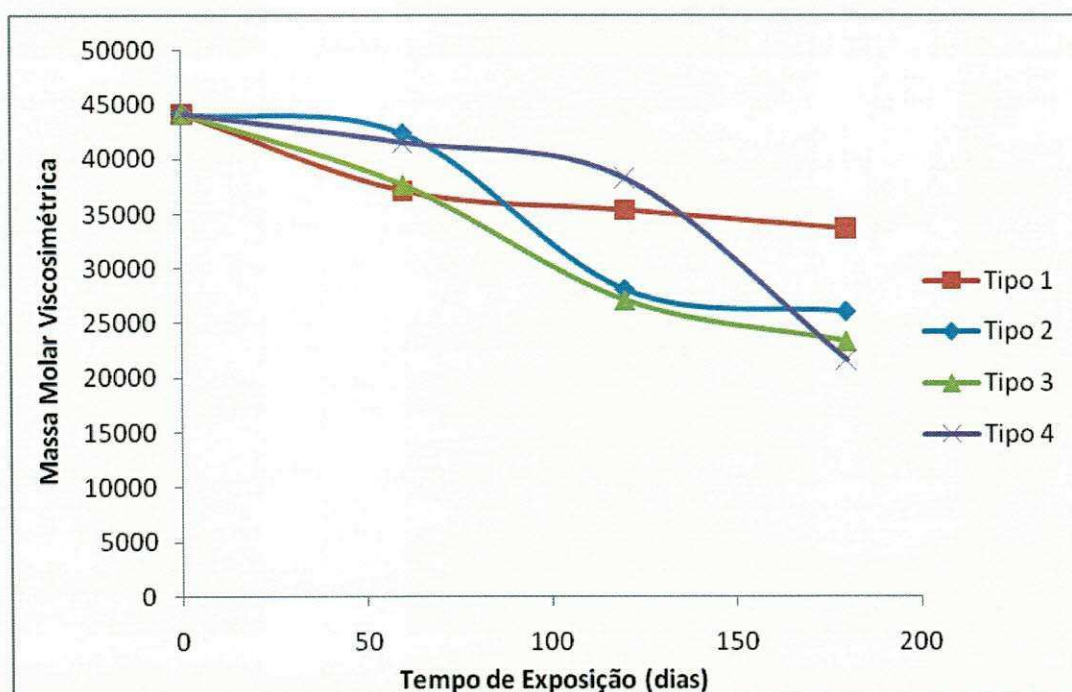
Para todas as amostras, observou-se uma diminuição crescente na massa molar, chegando, em alguns casos, à metade do valor inicial (polímero puro), comprovando a ocorrência do fenômeno da biodegradação.

Comparando os resultados das amostras do tipo 1 e 2, observamos uma maior redução de massa molar no tipo 2, uma vez que a presença da lisozima intensifica a biodegradação. Os resultados para as amostras do tipo 3 e 4 não

são totalmente confiáveis, uma vez que a camada cerâmica observada nelas pode ter sido dissolvida juntamente com o polímero durante a preparação da solução polimérica, mascarando as massas molares obtidas.

Por meio dos resultados da massa molecular do PHB exposto à biodegradação *in vitro* (PBS + lisozima) verifica-se que ocorreu, ao final de 180 dias, uma queda em média de 38% em relação à massa molecular viscosimétrica média do polímero puro.

Figura 57: Massas molares viscosimétricas médias das amostras de PHB submetidas ao ambiente de biodegradação *in vitro*.

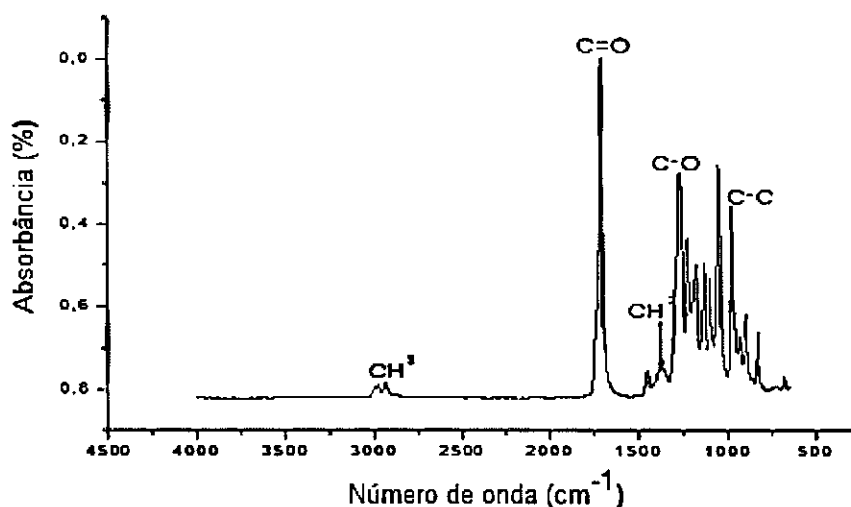


Analisando isoladamente tal resultado, este seria um indicativo de que o PHB sofreu biodegradação nas condições estudadas nesta tese. No entanto, como observado anteriormente no resultado de TG, não ocorreram alterações consideráveis que indicassem ter havido dano substancial durante os testes de avaliação da biodegradabilidade.

#### 4.2.1.6 Espectroscopia da região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 58, observamos os espectros FTIR de uma amostra de PHB Puro, não biodegradado. Podemos observar a presença de bandas intensas referentes aos estiramentos C-C, C-O e C=O, em aproximadamente 980, 1280 e 1720  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Além dessas, temos também algumas bandas mais fracas, próximas a 2870 e 1380  $\text{cm}^{-1}$ , referentes aos grupos metila e metileno.

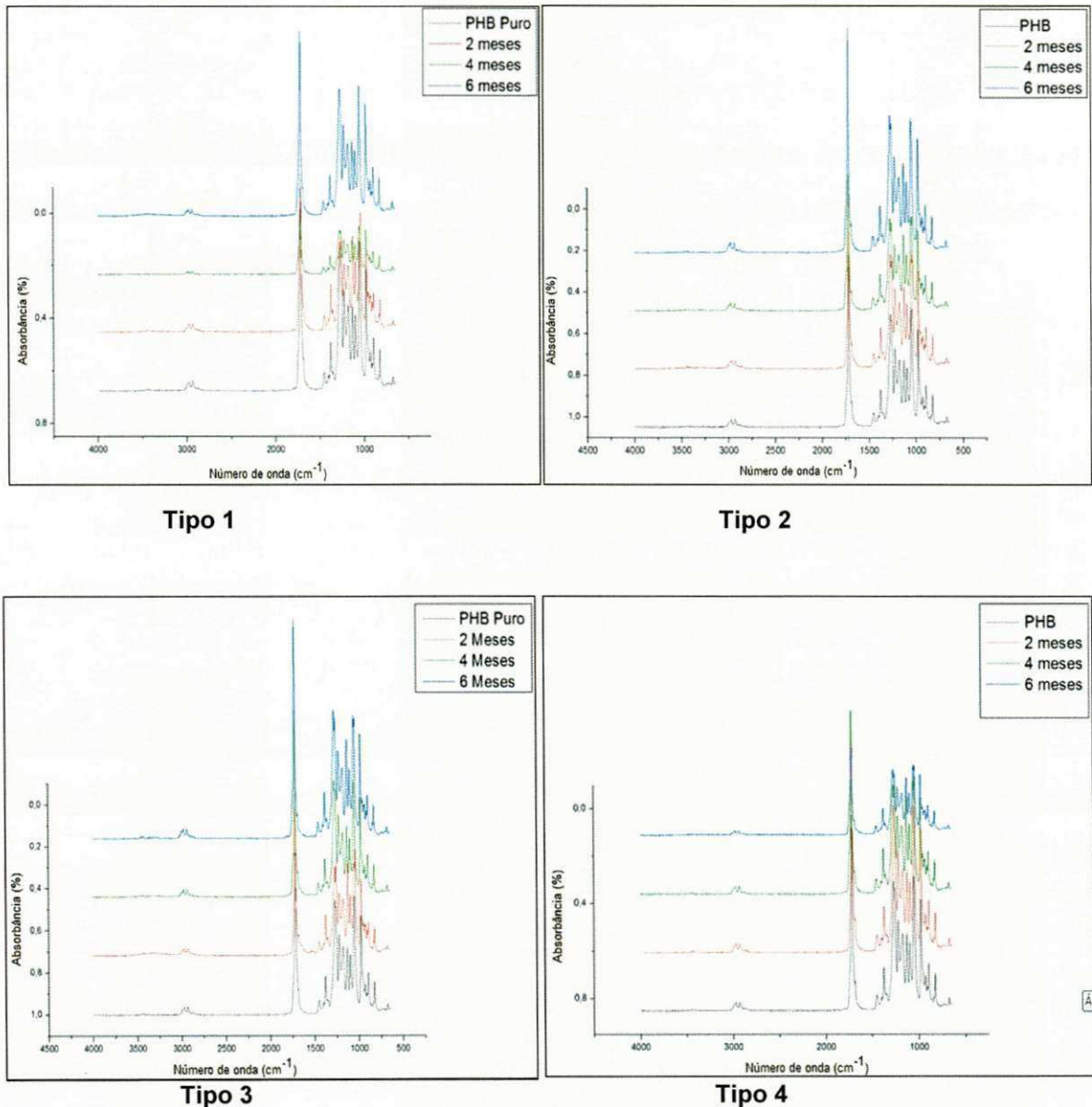
Figura 58: Espectro FTIR de uma amostra de PHB não biodegradadas.



Na Figura 59, encontram-se os espectros FTIR das amostras expostas ao meio biodegradável durante 60, 120 e 180 dias em comparação com o espectro do polímero puro, não biodegradado. A princípio, não é possível observar em nenhum dos quatro tipos de amostras, Tipo 1 (PHB imerso em solução tampão de PBS), Tipo 2 (PHB imerso em solução tampão de PBS + lisozima), Tipo 3 (PHB, submetido à solução de 1,5M de SBF e imerso em solução tampão de PBS) e Tipo 4 (PHB, submetido à solução de 1,5M de SBF e imerso em solução tampão de PBS + lisozima), diferenças marcantes entre o polímero puro e o polímero degradado, pois os picos apresentados são praticamente os mesmos. Isso se dá, provavelmente, pelo fato das bandas

características dos grupos gerados pela biodegradação se sobrepõem às bandas já existentes, ou a biodegradação não ter gerado novos grupos químicos.

Figura 59: Espectros FTIR das amostras biodegradadas durante 60, 120 e 180 dias.



Destaca-se mais uma vez as bandas de absorção de infravermelho observadas: estiramento da ligação C-O (1100 cm<sup>-1</sup>) e C=O (1730 cm<sup>-1</sup>) do éster, deformação assimétrica das ligações C-H (1450 cm<sup>-1</sup>), radicais CH<sub>2</sub> (2900



cm<sup>-1</sup>) e radicais CH<sub>3</sub> (1300 cm<sup>-1</sup>), estiramento das ligações =C-H (955 cm<sup>-1</sup>) e =C-O (800 cm<sup>-1</sup>).

Desta forma, mesmo nestes resultados de FTIR, não apresentando indicativos de biodegradabilidade do PHB nas condições estudadas neste período de tempo, outros resultados, como foi o caso das massas molares viscosimétricas médias, tiveram redução com a exposição deste polímero no ambiente de degradação.

Os resultados destas análises estão de acordo com o trabalho feito por Freier et. al. (2002), onde afirmam que a degradação do PHB *in vitro* a 37°C em uma solução tampão apresenta perda de massa após 180 dias, mas o decréscimo de massa molar se inicia após 80 dias. Neste período há uma permeabilização da água na estrutura do polímero. A hidrólise ocorre em duas etapas: quebra das cadeias amorfas e cristalinas da matriz polimérica, o que leva ao decréscimo da massa molar, e perda de massa, o que ocorre quando a massa molar atinge o valor de 13.000. Neste trabalho os autores concluíram que o PHB tem uma meia vida de 1 ano a 37°C, porém é acelerado quando o PHB é adicionado de poli(L-lactato) (PLLA). Este longo período é viável quando o material é utilizado para regeneração tecidual e deve ser mantido por muito tempo em uma função, auxiliando mais eficazmente esta.

#### 4.2.1.7 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas deste polímero foram avaliadas por meio de ensaios destrutivos e com baixa velocidade de aplicação de carga. Foram eles: tração e flexão.

Para o ensaio de tração, um exemplo de curva tensão-deformação do PHB Puro encontra-se na Figura 60 e os valores obtidos estão na Tabela 18. Os resultados estão de acordo com os esperados para este polímero, onde se apresenta como um material frágil.

Figura 60: Exemplo de curva Tensão x Deformação do PHB.

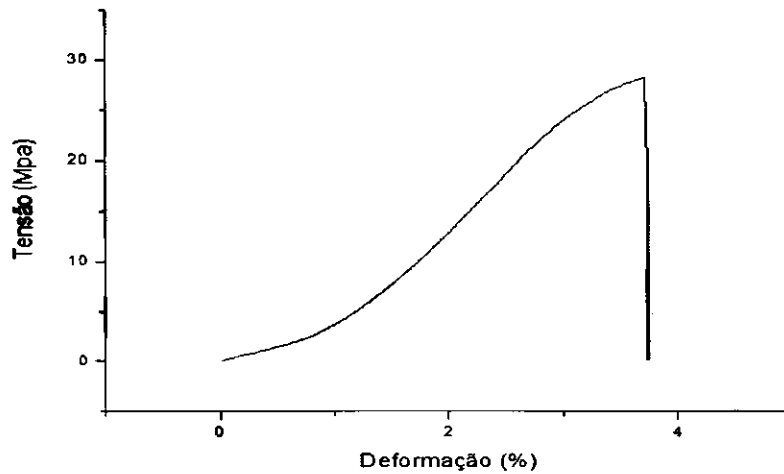


Tabela 18. Propriedades mecânicas em tração do PHB

<b>Tensão Máxima (MPa)</b>	29,4 ± 0,9
<b>Tensão de Ruptura (MPa)</b>	29,4 ± 0,9
<b>Deformação de Ruptura (%)</b>	5.1 ± 0,7

Na Tabela 19, temos a evolução das propriedades mecânicas das amostras de PHB expostas à biodegradação. Podemos observar que a tensão de ruptura e o alongamento máximo mantiveram-se praticamente constantes durante os 180 dias de exposição, ou seja, a resistência mecânica das peças é mantida. Esse fato é extremamente interessante, uma vez que em aplicações ortopédicas as peças estão constantemente submetidas a esforços mecânicos, logo essa manutenção de propriedades mecânicas é desejável. Principalmente até os 90 dias, quando neste período já tem ocorrido a consolidação óssea.

Tabela 19. Propriedades mecânicas em tração das amostras de PHB submetidas à biodegradação.

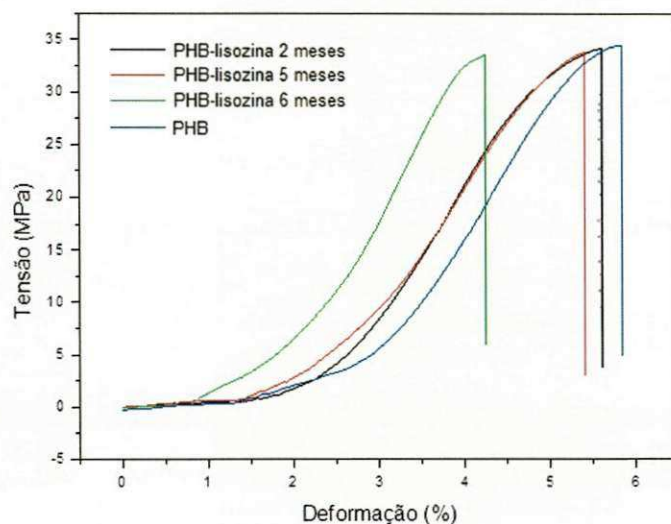
PHB	Tensão Máxima (MPa)	Deformação de Ruptura (%)
0 dias	29,4±0,9	5,1±0,7
30 dias	31,9±0,3	4,7±0,5
60 dias	34,5±1,3	4,1±0,3
90 dias	28,9±0,8	4,9±0,2
150 dias	30,1±0,4	4,1±0,1
180 dias	26,8±0,7	3,4±0,1

Na Figura 61 encontram-se as curvas tensão x deformação para as amostras de PHB submetidas ao ambiente de biodegradação *in vitro* (solução tampão de PBS + lisozima), para os tempos de 60, 150 e 180 dias.

Avaliando o comportamento das curvas tensão x deformação, tanto para as amostras de PHB expostas à biodegradação *in vitro*, quanto para o PHB puro, verifica-se que houve uma tendência discreta de redução da resistência à tração com o aumento do tempo de biodegradação. No entanto esta redução foi em torno de 8,8%, já que para o PHB puro a resistência à tração encontrada foi de 29,4 MPa e para o PHB exposto ao ambiente de biodegradação por 180 dias foi em torno de 26,8 MPa. Assim, verifica-se que o tempo exposto neste ambiente de biodegradação não comprometeu a resistência deste PHB. Deduzindo-se, portanto, que o mesmo é polar, pois, com massa molar relativamente baixa, ele mantém a integridade.

Vale ressaltar que os resultados de resistência à tração para o PHB Puro obtidos nesta tese foram ligeiramente superiores aos reportados por Graupner e Müssig (2011), que relataram valores de aproximadamente 28 MPa.

Figura 61: Resistência à tração das amostras de PHB submetidas ao ambiente de biodegradação *in vitro*



O ensaio de flexão foi realizado segundo as normas estabelecidas e descritas anteriormente. Este procedimento foi feito apenas para a amostra do PHB Puro, com a finalidade de confirmar os dados obtidos deste biopolímero, aos dados já existentes do mesmo em outras pesquisas. Estes resultados se encontram na Figura 62 e na Tabela 20.

Figura 62: Curva da tensão x deformação do PHB em flexão.

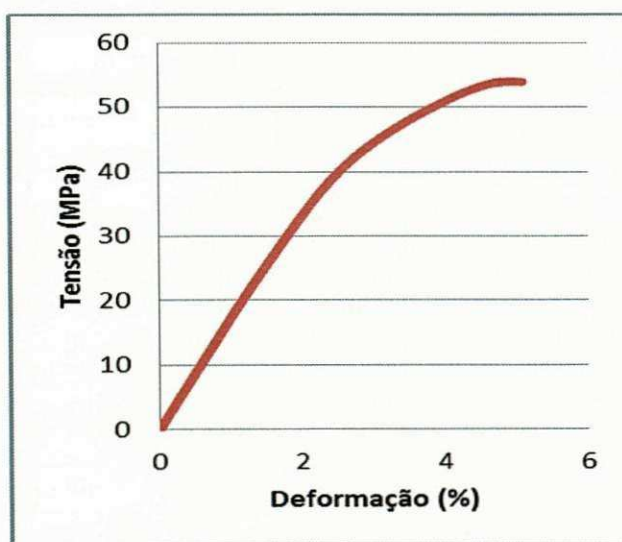


Tabela 20: Resultados do ensaio de flexão do PHB.

Ensaio de flexão	
Deslocamento máximo (%)	4,4
Tensão máxima (MPa)	53,6
Módulo (GPa)	1,87

Todos os resultados obtidos neste ensaio estão de acordo com os já pesquisados, principalmente o módulo de elasticidade que é de 1,87 GPa, enquanto que os resultados estudados ficam em uma faixa de 1.8 a 3.2 GPa.

Confirmadas as características das propriedades mecânicas do PHB, como um material frágil, Withey et. al. (1999), explica a causa e propõe solução para melhorar as propriedades deste biopolímero. O PHB é um material produzido por fermentação bacteriana, estereorregular, com ausência de heterogeneidades que atuariam como eficientes agentes nucleantes para este polímero, exibindo, portanto, uma baixa densidade de nucleação. Em decorrência desta situação, a cristalização, mediante o resfriamento lento em um molde, produz um material com esferulitos grandes e, com o tempo de armazenamento, um processo de cristalização secundária ocorrerá, induzindo à fragilização do polímero. Assim, a adição de um agente nucleante mostra-se de fundamental importância, permitindo que o material se cristalize em uma temperatura maior, com uma estrutura cristalina mais refinada (maior número de esferulitos e muitos menores), apresentando assim propriedades mecânicas melhoradas.

#### 4.2.2 Procedimento (B)

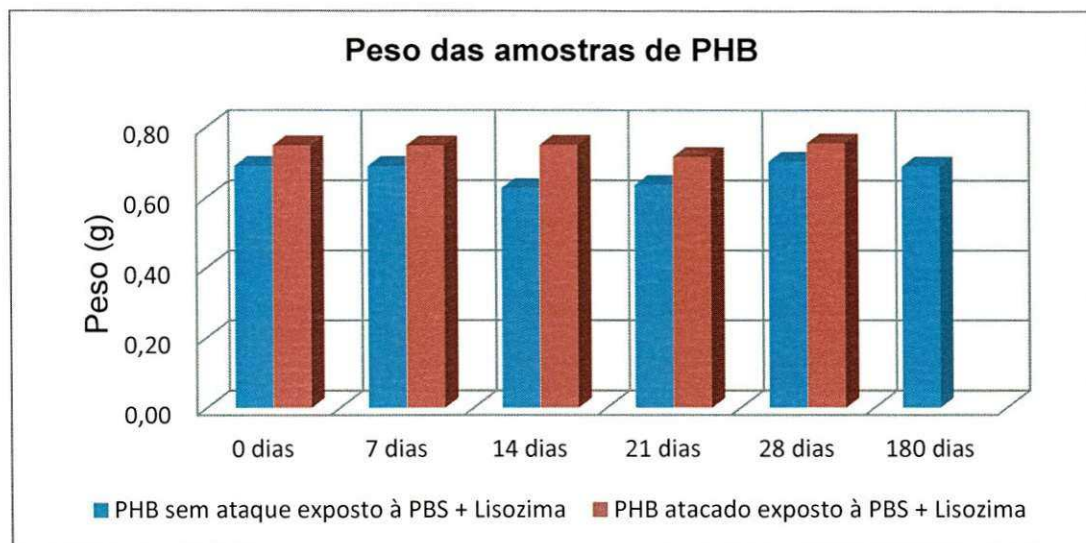
Neste segundo procedimento (B), foram analisadas as amostras do PHB atacado e PHB sem ataque, imersas na solução tampão (PBS) e lisozima, por um período de 28 dias, com troca desta solução de 7 em 7 dias, Tabela 13.



#### 4.2.2.1 Variação de massa (Peso)

Os valores dos pesos das amostras de PHB submetidas a este ambiente de biodegradação estão apresentados na Figura 63. Na última coluna desta figura, está referenciado também o PHB sem ataque com exposição de 180 dias no mesmo ambiente de degradação, tendo, como finalidade, uma análise comparativa em relação ao tempo de exposição e sua eventual biodegradação.

Figura 63: Pesos das amostras de PHB submetidas ao ambiente de biodegradação *in vitro*



Analisando os resultados, verifica-se que não ocorreu variação significativa no peso das amostras expostas à biodegradação, considerando tanto as placas de PHB atacadas previamente com peróxido de hidrogênio, quanto as não atacadas. O efeito mais significativo é que o peso em 180 dias é praticamente o mesmo do tempo de início do ensaio.

#### 4.2.2.2 Calorimetria diferencial exploratória (DSC).

As representações gráficas desta caracterização estão contidas nas Figuras 64 a 66, com as seguintes denominações: Figura 64, PHB Puro. Figura 65, PHB atacado e Figura 66, PHB atacado e imerso ao ambiente de degradação (PBS + Lisozima).

Figura 64: DSC da amostra de PHB Puro.

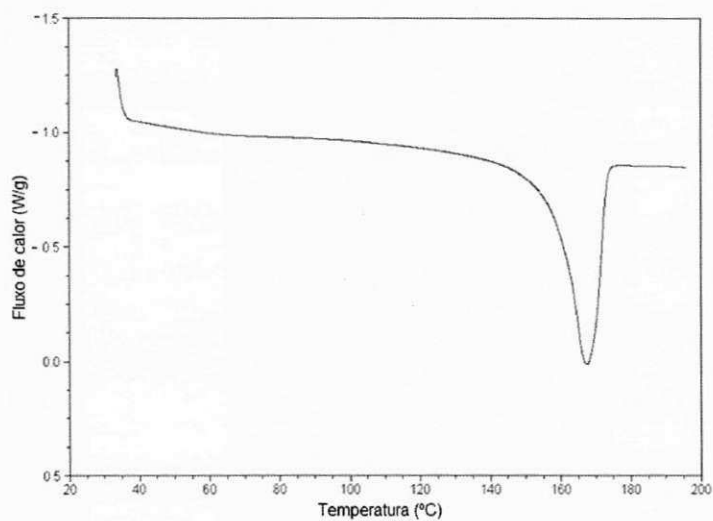


Figura 65: DSC da amostra de PHB atacado com peróxido de hidrogênio.

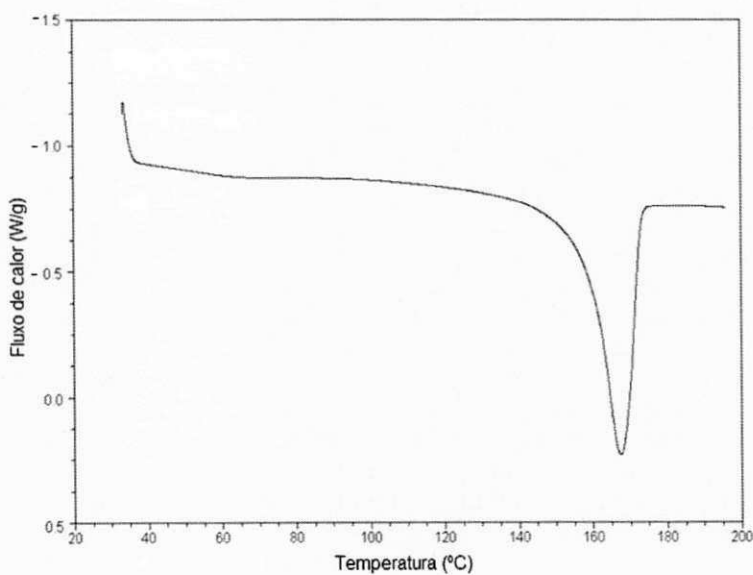
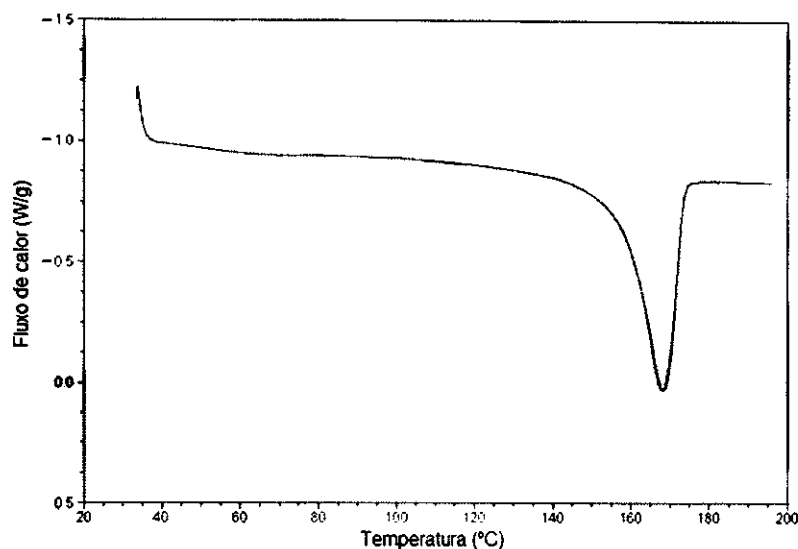


Figura 66: DSC da amostra de PHB atacado + PBS + Lisozima (28 dias).



Observando conjuntamente todas as curvas de DSC apresentadas nestas Figuras, verifica-se que a biodegradação *in vitro*, de zero a 28 dias, não modificou a estrutura do PHB, tanto para a amostra atacada com  $H_2O_2$ , quanto à atacada e imersa no ambiente de biodegradação, uma vez que se observam exatamente os mesmos eventos térmicos que os apresentados pelo PHB puro, onde estes ocorrem praticamente nas mesmas temperaturas.

#### 4.2.2.3 Microscopia de força atômica (AFM)

Nas Figuras 67 a 74, encontram-se as imagens obtidas por AFM para as amostras do PHB Puro, PHB somente atacado, PHB atacado e submetido a biodegradação e o PHB sem ataque submetido também ao ambiente de biodegradação *in vitro* (solução tampão de PBS + lisozima), em um tempo de 28 dias. As amostras do PHB Puro e somente atacadas (Figuras 67 a 70) já estão descritas na primeira parte da avaliação da Bioatividade. Reapresentamos novamente com o objetivo de facilitar a comparação com os resultados seguintes.

Figura 67: Microscopia de força atômica da amostra PHB Puro

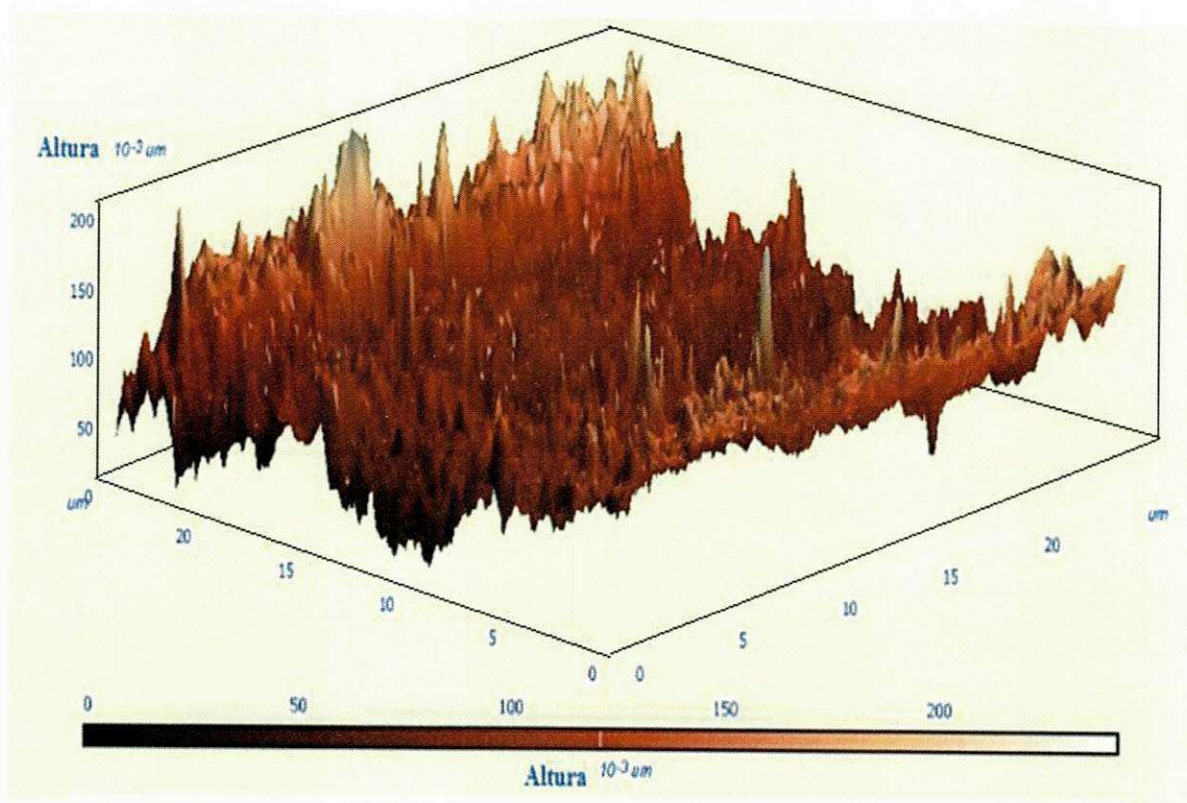


Figura 68: Varredura topográfica da amostra PHB Puro.

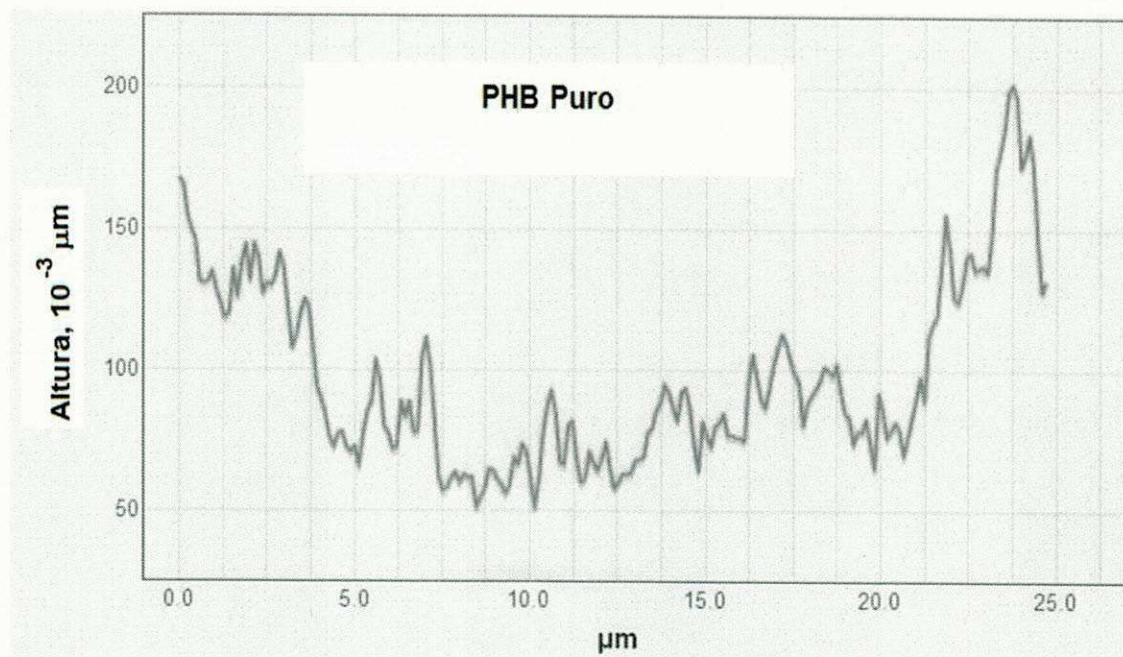




Figura 69: Microscopia de força atômica da amostra PHB somente atacado.

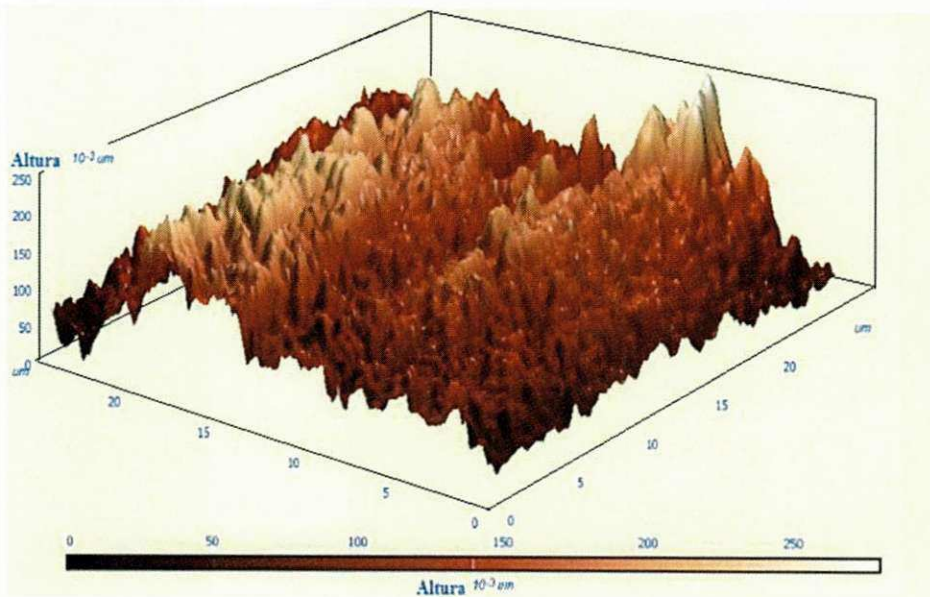
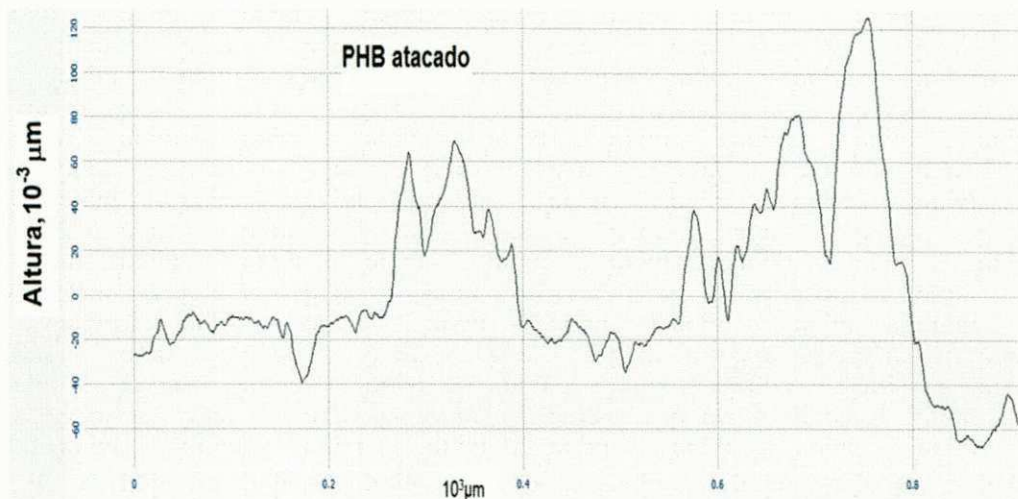


Figura 70: Microscopia de força atômica da amostra PHB somente atacado.



A microscopia das amostras do PHB atacadas e depois imersas na solução de PBS + Lisozima, apresentadas na Figura 71, evidencia duas situações distintas: uma, observam-se espículas maiores, com pontas arredondas, semelhantes às imagens encontradas nas amostras do PHB que foram somente atacadas, mas, em menor proporção. E a outra, com tendência à planificação, característica de uma superfície menos rugosa, predominante, confirmada na Figura 73, quando foi submetida apenas à solução do PBS +



Lisozima. A Figura 72 apresenta o gráfico correspondente à característica da superfície da Figura 71, onde ilustra uma diminuição da rugosidade, mas com alguns picos referentes a primeira situação, correspondendo às elevações arredondadas, descritas anteriormente.

Figura 71: MFA das amostras de PHB atacadas com  $H_2O_2$  e submetidas ao ambiente de biodegradação (PBS + Lisozima) *in vitro*.

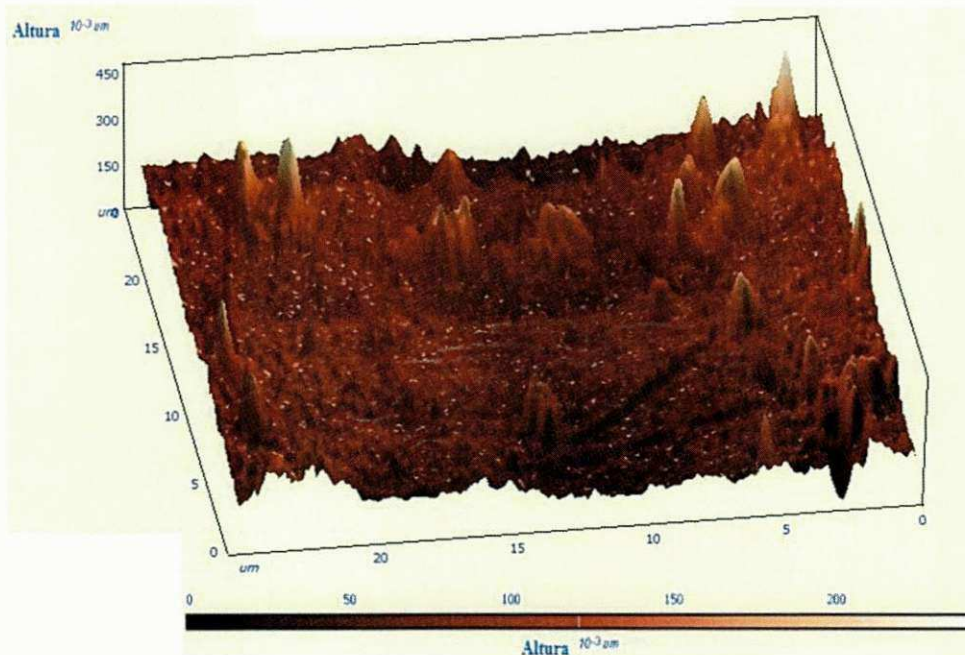
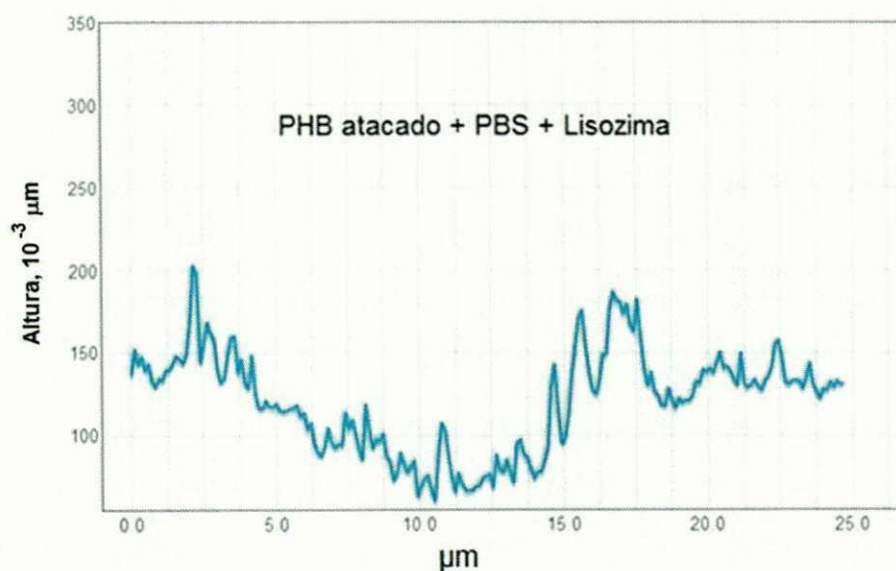


Figura 72: Varredura topográfica das amostras de PHB atacadas com  $H_2O_2$  e submetidas ao ambiente de biodegradação (PBS + Lisozima) *in vitro*.



As Figuras 73 e 74 correspondem às amostras do PHB sem ataque e submetidas à solução de PBS + Lisozima. Elas ilustram uma superfície com

tendência à planificação, isto é, menos rugosa. Resultado de uma ação de biodegradação química que, mesmo não chegando a influenciar significativamente na perda de peso e na estrutura física das amostras, levou à uma diminuição homogênea da rugosidade confirmada pela altura do ponto mais alto desta amostra, que é de  $0,10\ \mu\text{m}$ , comparado com o PHB Puro, que foi de  $0,150\ \mu\text{m}$ . Outro fato que chama atenção na Figura 74 é a ocorrência de registros gráficos de algumas erosões, ao longo da superfície desta amostra, manifestado pela negatividade ( $0,08\ \text{m}\mu$ ) projetada pela margem inferior do gráfico no eixo "y". Fato este percebido apenas na Figura 69, do PHB atacado, onde constata uma profundidade menor, em torno de  $0,06\ \text{m}\mu$ . Corroborando com a função de serem, as duas soluções (peróxido de hidrogênio e a PBS + Lisozima), ambientes de degradação.

Figura 73: Imagem obtida por MFA das amostras de PHB sem ataque superficial com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e submetidas ao ambiente de biodegradação ((PBS + Lisozima) *in vitro*).

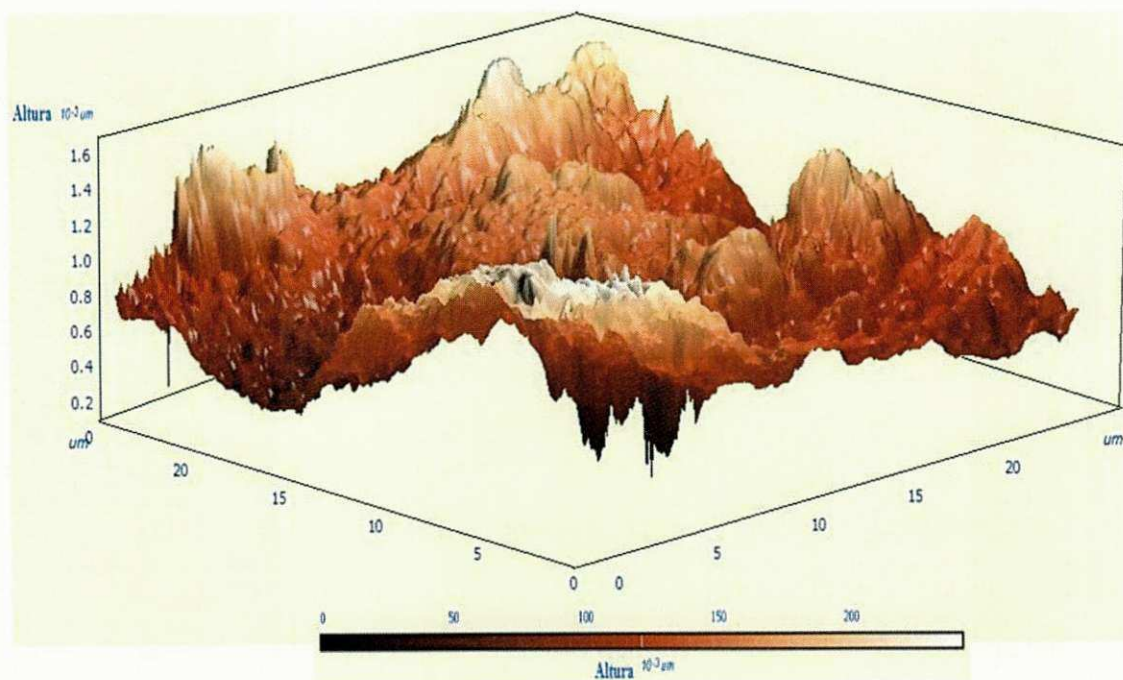
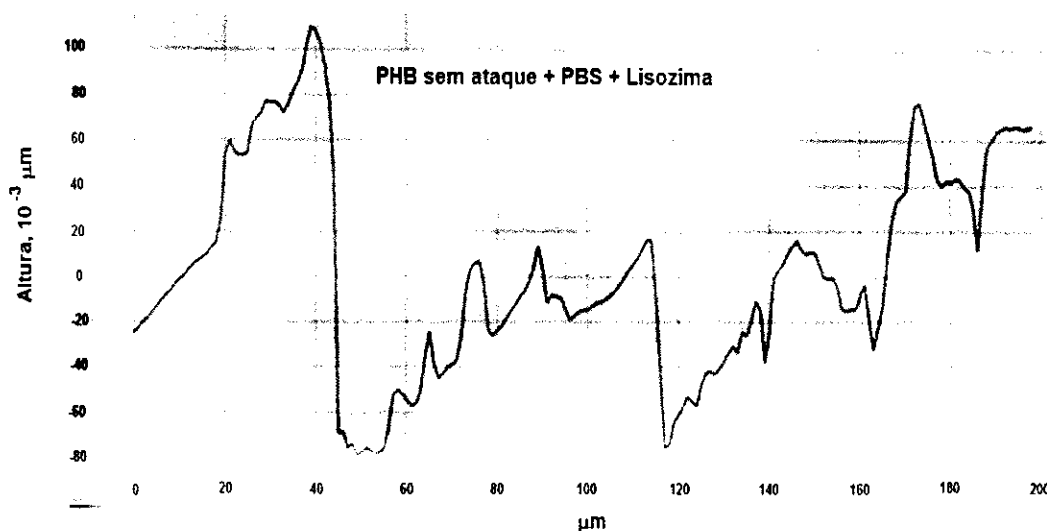


Figura 74: Varredura topográfica das amostras de PHB sem ataque superficial com  $H_2O_2$  e submetidas ao ambiente de biodegradação (PBS + Lisozima) *in vitro*.



Com isso, podemos inferir que, baseado nestes resultados da MFA, estas amostras do PHB sem ataque também evidenciaram uma pequena degradação das suas superfícies, com espessura entre 0,02 e 0,04  $\mu\text{m}$ . Mas, como a degradação ocorrida na superfície deste PHB foi de mínima proporção, deduz-se que não houve danos na estrutura do polímero.

### 4.3 Avaliação da biocompatibilidade

Para a avaliação da biocompatibilidade das amostras do biopolímero PHB Puro, foram realizados os ensaios de análise da citotoxicidade através da determinação da porcentagem da viabilidade celular, utilizando o método do MTT, Figura 75 e Tabela 21 e a determinação da produção de óxido nítrico (NO), apresentado na Figura 76 e na Tabela 22.



Figura 75: Determinação da porcentagem da viabilidade celular, utilizando o método do MTT, quando em contato com o PHB.

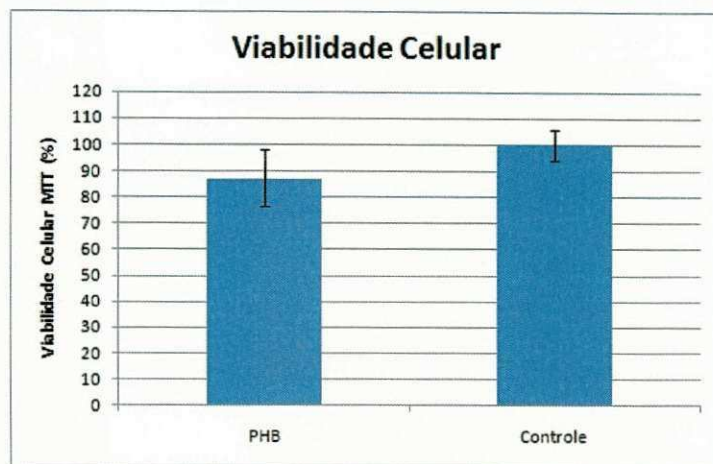


Tabela 21: Viabilidade celular quando em contato com o PHB em relação ao grupo controle.

<b>Viabilidade celular</b>		
	Média (%)	Desvio padrão (%)
PHB	87,22	10,60
Controle	100	5,59

Por meio da análise da viabilidade celular do PHB comprova-se que este é um polímero biocompatível com o ambiente biológico, pois foi observada uma viabilidade celular altíssima, muito próxima à do grupo controle, evidenciando que este polímero apresenta citotoxicidade mínima através deste método. Resultados similares para a biocompatibilidade do PHB foram descritos por Ou et al. (2011). Entretanto, o teste colorimétrico de MTT representa uma avaliação inicial, constituindo uma importante etapa na avaliação da biocompatibilidade, pois permite a racionalização da experimentação *in vivo*, com diminuição de custos e de animais nas análises obrigatórias seguintes.

Quanto à análise da produção de óxido nítrico, é importante destacar que o tempo médio de vida do NO é curto, o que significa que a permanência do mesmo no organismo é baixa. Isto torna muito difícil alcançar uma monitorização apurada do NO *in vivo*. Desta forma, a produção de NO em cultura de células pode ser estimada através do acúmulo do nitrito (NO<sub>2</sub>), que é o produto de conversão estável do óxido nítrico. Esta mensuração pode ser realizada através de um ensaio colorimétrico para NO, conhecido como método de Griess (Green et al., 1982). A Figura 77 e a Tabela 22 apresentam os resultados da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos quando em contato com PHB, com controle negativo e com LPS como agente estimulador.

Figura 76: Determinação da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos quando em contato com PHB, controle negativo e LPS.

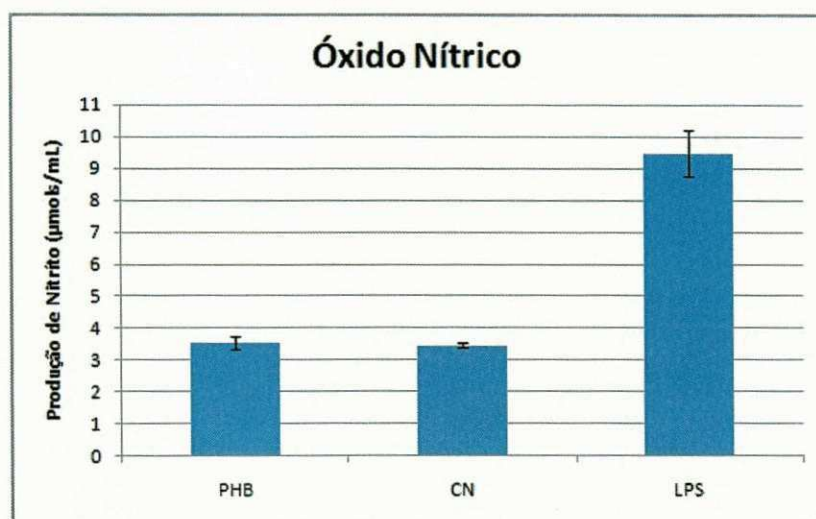


Tabela 22: Produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos quando em contato com PHB e grupo controle.

Produção de óxido nítrico (NO)		
	Média (µmols/mL)	Desvio padrão (µmols/mL)
PHB	3,54	0,19
CN	3,45	0,07
LPS	9,47	0,73

Todos estes resultados da produção de óxido nítrico (NO) estão em consonância com os obtidos no teste calorimétrico do MTT, confirmando mais uma vez o comportamento atóxico do PHB em avaliação *in vitro*.



## 5 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos nesta pesquisa pode-se concluir que:

- O PHB, após o ataque com a solução de peróxido de hidrogênio, modificou quimicamente sua superfície, tornando-se mais reativa e facilitando a obtenção de um recobrimento cerâmico de fosfato de cálcio, fato este, comprovado por meio das técnicas de DRX, FTIR, EDS, MEV, MO e MFA, após as placas de PHB serem submetidas ao contato com um ambiente mimetizando o fluido corpóreo.
- O aumento da hidrofilicidade do PHB foi comprovada pela diminuição do ângulo de contato, confirmada pela molhabilidade, nesta ordem: PHB puro < PHB atacado < PHB atacado recoberto com SBF A 1,5M .
- Apresentou discreta biodegradação superficial, quando posto em contato por 180 dias com a solução tampão (PBS + lisozima), mimetizando também o fluido corpóreo, uma vez que não foram observados danos estruturais nas placas poliméricas como comprovado pelas técnicas de TG/DTG, DSC, FTIR e AFM.
- As propriedades mecânicas das placas de PHB tiveram resultados próximos aos originais, mesmo após terem sido submetidas a 180 dias de biodegradação com PBS + lisozima, onde a redução da resistência à tração foi de apenas 8,8% ao final deste período.
- O PHB é comprovadamente um polímero biocompatível, pois apresentou uma viabilidade celular altíssima, tanto pelo método do MTT, que foi de 87,22% para um grupo controle de 100%, como pela produção de óxido nítrico (NO) que chegou a 3,54  $\mu\text{mols/mL}$ , quando o controle negativo (CN) e o agente estimulador (LPS) chegaram a 3,45 e 9,47  $\mu\text{mols/mL}$  respectivamente, reivindicando assim, uma continuidade desta pesquisa *in vivo* e conseqüentemente, sua aplicabilidade como implantes metálicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULQADER, S. T.; RAHMAN, I. A.; ISMAIL, H.; KANNAN, T. P.; MAHMOOD, Z. "A simple pathway in preparation of controlled porosity of biphasic calcium phosphate scaffold for dentin regeneration". **Ceramics International**, vol. 39, p. 2375–2381, 2013.

ALHANATI, L.S. Tensão Superficial. Alfa Virtual School – Física. Disponível em: < [http://alfaconnection.net/pag\\_avsf/fqm0101.htm](http://alfaconnection.net/pag_avsf/fqm0101.htm) >. Acesso em: 05 de maio 2013.

ALMEIDA, C. M. S. **Análise por XPS e AFM da superfície de blendas de PVC/PHB**. 2005. 92f. Dissertação de Mestrado apresentada à Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Física, Departamento de Física, Rio de Janeiro.

ALMQVIST, N.; THONSON, N.H.; SMITH, B.L. Methods for fabricating and characterizing a new generation of biomimetic materials. **Materials Science & Engineering**. v. 7; p. 34-43, 1999.

ALVES, E. G. L.; REZENDE, C. M. F.; OLIVEIRA, H. P.; BORGES, N. F.; MANTOVANI, P. F.; ROSADO, I. R. Emprego experimental da placa de compósito poli-hidroxibutirado/hidroxiapatita na fixação femoral em gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1128-1134, 2010.

ALVES, E. G. L.; REZENDE, C. M. F.; SERAKIDES, R.; PEREIRA, M. M.; ROSADO, I. R. Orthopedic implant of a polyhydroxybutyrate (PHB) and hydroxyapatite composite in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, p. 546-552, 2011.

AMADEI, S. U.; SILVEIRA, V. A. S.; PEREIRA, A. C.; CARVALHO, Y. R.; ROCHA, R. F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, n.1, p.5-12, 2006.

ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic rate, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol.** v.54, p.450–472, 1990.

APARECIDA, ANAHI H.; FOOK, MARCUS V. L.; GUASTALDI, ANTONIO C. Biomimetic apatite formation on Ultra-High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. **JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE-MATERIALS IN MEDICINE**, v. 20, n. 6, p. 1215-1222, JUN 2009.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4th. ed. Menlo Park: Benjamin/Cummings. 1998, 694p.

AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES S. A.; BEZERRA D. C.; LIA FOOK M. V.; COSTA A. C. F. M.; Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, nº 3, p.27-34, 2007.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, nº 1, p. 13-21, 2005.

BARROS, P. P.; CASSU, S. N.; ZOPPI, R. A.; REIS, N. S.; DOTTO, P. L.; MARÃO, R. E.; CAPARROZ, P. G. Implantes de blendas de poli (caprolactona) e Nafion<sup>®</sup> em tíbia de ratos. **Revista de Ciências Médicas**, volume 15(2), p.123-130, 2006.

BARUD, H. S.; SOUZA, J. L.; SANTOS, D. B.; CRESPI, M. S.; RIBEIRO, C. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial cellulose/poly (3-hydroxybutyrate) composite membranes. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.1279–1284, 2011.

BISPO, V. M. **Estudo do efeito da reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA**. 2009. 140p. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas), Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

BOLSON, J.; SCHOSSLER, J.E.; ORNES, R.C. Análise clínica, radiológica, macroscópica e histológica do úmero de codorna doméstica (*Coturnix japonica*), submetidos a implante de poliuretano a partir de polímero de mamona (*Ricinus communis*). **Cienc. Rural**, v.35, p.1123-1130, 2005.

BORGES, A.P.B.; REZENDE, C.M.F.; RIBEIRO, M.F.B.; MELO, E.G.; NETO, P.I.N. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia de cão: aspectos à microscopia de transmissão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.6, p.616-620, 2000.

BYROM, D. Polyhydroxyalkanoates, In: Mobley DP (Ed) **Plastic from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors**. Hanser Munich. 1994. p.5-33.

CASTNER, D.G., RATNER, B.D., Biomedical surface science: Foundations to frontiers. **Surface Science**, v.500, n.1-3, p. 28-60, 2002.

CAO, W., HENCH, L.L. Bioactive materials. **Ceramics International**, v.22, n.6, p.493-507, 1996.

CRUZ, A. S. **Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entrem em contato com o ser humano**. Revista do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, v.47 p.51-57, 1987.

CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 8<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora, 2012.

CANEVAROLO JÚNIOR, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2004. 448p.

CANGEMI, J. M.; SANTOS, A. M.; NETO, S. C. Biodegradação: uma alternativa para minimizar os impactos decorrentes dos resíduos plásticos. **Química Nova na Escola**. n.22, p.17-21, 2005.

CHIERICE, G. O.; IGNÁCIO, H.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H. Utilização da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em cães. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 37, n.5, p.187-194, 2002.

COUTINHO, B. C.; MIRANDA, G. B.; SAMPAIO, G. R.; DE SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. A importância e as vantagens do poli (hidroxibutirato) (plástico biodegradável). **Holos**, v.20, p.76-81, 2004.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. 212f. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química. Campinas – SP, 2005.

DAREA, E. V.; GRIFFITHA, M.; POITRASB, P.; KAUPPC, J. A.; WALDMANC, S. D.; CARLSSOND, D. J.; DERVINE, G.; MAYOUXD, C.; HINCKEA, M. T. Genipin cross-linked fibrin hydrogels for in vitro human articular cartilage tissue-engineered regeneration. **Cells Tissues Organs**. v.189, p.1-13, 2009.

DEMET (Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais). **Biopolímeros e Polímeros Biodegradáveis**. Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos, Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: Acesso em: 20/06/2011.



DIAS, M. V. F.; GOLDSZTAN, F.; JOÃO, M. G. Epidemiologia das fraturas de acetábulo tratadas no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO). **Revista Bras. Ortopedia**. v.45, p.474-477, 2010.

ESPOSITO, A. R.; DUEK, E. A. R.; CAROLINA LUCCHESI, C.; PRAZERES, L.; ANA PEZZIN, P. T. Citocompatibilidade de blendas de poli (*p*-dioxanona)/ poli (hidroxi butirato) (PPD/PHB) para aplicações em engenharia de tecido cartilaginoso. **Polímeros**. São Carlos, vol.20 n.5 Epub Dec 22, 2010.

ESTRELA, C., **Metodologia Científica-ensino e pesquisa em Odontologia**. São Paulo, ed. Artes Médicas. 2001.

EVANS, F. G. Mechanichanics properties of bone. **J Biomech**. V.8, p.81-86, 1973.

FERNANDES, E. S.; BORGES, A. P. B.; VILORIA, M. I. V.; POMPERMAYER, L. G.; NETO, C. T.; OLIVEIRA, C. B. Avaliação histológica do polímero derivado do óleo de mamona (*Ricinus communis*) aplicado na diáfise proximal da tíbia de cães. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.14, n. 2, p.63-66, 2007.

FERNANDEZ, E; GIL, F.J.; GINEBRA, M.P. - Calcium phosphate bone cements for clinical applications- part II. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**. v.10, p.177-183,1999.

FERREIRA, B. M. P. **Obtenção, Caracterização, Estudo “In Vitro” e “In Vivo” de Blendas de Poli (L-ácido láctico) /Poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)**. 2012. 125p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FILHO. S. O. **O Potencial da Agroindústria Canavieira do Brasil**. PHB Industrial S/A. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – USP. São Paulo, 2003.

FOOK, M. V. L. **Desenvolvimento de técnica de deposição de hidroxiapatita pelo método biomimético na superfície polietileno de ultra-alto peso molecular para aplicação como biomaterial.** 2005. 128f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química), Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

FONSECA, K. B.; PEREIRA, H. H.; SILVA, S. N. Avaliação de falhas em implantes metálicos coxo-femoral e joelho retirados de pacientes. **Revista Matéria**, v.10, n.3, p.472-480, 2005.

FRANKEL, V. H.; BURSTEIN, A. H. **Orthopedic Biomechanics.** Philadelphia: illus, Lea & Febiger, 1970. 188p.

FREIER, T., KUNZE, C., NISCHAN, C., KRAMER, S., STERNBERG, K., SA, M., HOPT, U.T., SCHMITZ, K., 2002, "In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patchbased on poly(3-hydroxybutyrate)" **Biomaterials**, v. 23, pp. 2649–2657.

FUJIBAYASHI, S., NEO, M., KIM, H.M. A comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub> glasses. **Biomaterials**. v.24, n.8, p. 1349-1356, 2003.

GRAUPNER, N.; MÜSSIG, J. A comparison of the mechanical characteristics of kenaf and lyocell fibre reinforced poly (lactic acid) (PLA) and poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) composites. **Composites: Part A**, v. 42, p. 2010–2019, 2011.

GREEN L. C.; WAGNER D. A.; GLOGOWSK J; SKIPPER P. L; WISHNOK J. S; TANNEMBAUM S. R.. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GOULD, J. A. **Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte.** São Paulo: Manole, 1993. p.3-47.

HAINES, P. J. **Thermal Methods of Analysis Principles, Applications and Problems.** Glasgow: Blackie Academic e Professional , 1995.

HELMUS, M. N., TWEDEN; K. Materials selection in **Encyclopedia Handbook of Biomaterials and Bioengineering.** v.2, Part A, p.1429-1463, 1995.

HENCH, L. L.; PANTANO, C. G.; CLARK, A. E. **J. Am. Ceram. Soc.** v.57, p.412, 1974.

HENCH, L.L., WILSON, J., **An Introduction to Bioceramics.** London: World Scientific Publishing Company. 1993. 389p.

HENCH, L.L., WILSON, J., **An Introduction to Bioceramics.** London: World Scientific Publishing Company. 2012. 500p.

IMAIZUMI, H.; SAKURAI, M.; KASHIMOTO, O.; KIKAWA, T.; SUZUKI, O. Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. **Calcified Tissue International,** v. 78,p. 45-54, 2006.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. **Cerâmicas,** v. 26, p.17, 1980.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. 136 p.

KADOURI, D.; JURKEVITH, E.; OKON, Y. Involvement of the reserve material poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) in azospirillum brasiliense stress endurance and root colonization. **Appl. Environ. Microbiol.** v.6, p.3244-3250, 2003.

KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T.; *J. BIOMED. MATER. RES.,* 24, 721. 1990.

KOKUBO, T., KIM, H.M., KAWASHITA, M., Novel bioactive materials with different mechanical properties, **Biomaterials**. v.24, n.13, p. 2161-2175, 2003.

KOKUBO, T., KIM, H.M., KAWASHITA, M. Bioactive metals: preparation and properties. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**. v.15, n.2, p. 99-107, 2004.

KUMAR, P. T. S.; SRINIVASAN, S.; LAKSHMANAN, V. K.; TAMURA, H.; NAIR, S. V.; JAYAKUMAR, R.  $\beta$ -Chitin hydrogel/nano hydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**. v.85, p.584–591, 2011.

LAMPIN, M.; WAROCQUIER-CLEROUT, R.; LEGRIS, C.; DEGRANGE, M.; SIGOTLUIZARD; M.F. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion and cell migration. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.36, n.1, p.99-108, 1997.

LEONEL, E. C. F.; PORCIÚNCULA, H. F.; SOBRINHO, J. A.; RAMALHO, L. T. O. ; MANGILLI, P. D. ; RAPOPORT, A. A ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 4, p. 123-134, 2004.

LIU, Y; WANG, M. Um material compósito bioactivo e biodegradável consistindo de hidroxiapatite (HA) e PHB. **Current Applied Physics**, v. 7, p. 547–554, 2007

LÚCIO, M. A. M. **Efeito da osteoporose e da osteoartrose nas propriedades mecânicas e estruturais do osso trabecular**. 2008. 89f. Dissertação apresentada à Pós-Graduação de Engenharia Biomédica do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

MASUDA, T., YLIHEIKKILA, P.K., FELTON, D.A. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseo integration. Part I. "In vivo studies",

**International Journal of Oral & Maxillofacial Implants.** v.13, n.1, p.17-29, 1998.

MADISON, L.L.; HUISMAN, G.W. Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. **Microbiol. Mol. Biol.** v.63, n.1, p. 21-53, 1999.

MALISKA, A. M. **Microscopia eletrônica de varredura.** Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia Mecânica. Apostila. Disponível em: < [http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV\\_Apostila.pdf](http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf) >. Acesso em: 04/05/2013.

MEI, L. H. I. **Massa molar viscosimétrica.** Apostila de curso. Disponível em: [http://www.fapi.br/conteudo/conteudo\\_programatico/farmacia/cpspdeterminacao\\_da\\_massa\\_molar\\_viscosimetrica-jucimara.pdf](http://www.fapi.br/conteudo/conteudo_programatico/farmacia/cpspdeterminacao_da_massa_molar_viscosimetrica-jucimara.pdf). Acesso em: 13/02/2013.

MENDONÇA, R. H.; THIRÉ, R. M. S. M; COSTA, M. F.; FILHO, F. C. S. Adsorção de fibronectina a arcabouços de polihidroxibutirato aplicáveis à engenharia óssea. **Polímeros: Ciência e Tecnologia.** v.19, n.2, p.143-148, 2009.

MÜLLER, U. In vitro biocompatibility testing of biomaterials and medical device. **Med Device Technol.** 19(2): 30, 32-4. 2008.

MORA, F. A. R., **Fabricação de implantes ortopédicos a partir da usinagem de osso humano.** 2000. 249f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, vol. 65, p. 55-63, 1983.



MOYEN, B. J.-L.; P.J.;WEINBERG,E.H.; AND HARRIS, W.H. Effects on intact Femora of dogs of the Application and Removal of Metal Plates: A Metabolic and Structural Study Comparing stiffer and More Flexible Plates. **J. Bone Joint Surg.**, v.60A, p.940-947, 1978.

MOYEN, B.; COMTET, J.J.; ROY, J.C.; BASSET, R.; AND DE-MOURGUES, G.: Refracture After Removal of Internal Fixation Devices: Clinical Study of 20 Cases and Physiopathologic Hypothesis. **Lyon Chir.**, v.76, p.153-157, 1980.

MULLER, M.E.; ALLGÖWER,M.; SCHNEIDER, R.; WILLENEGGER, H. **Manual de OSTEOSÍNTESSES**. Barcelona: Editora Científico-Médica,1980. 225p.

NICHOLSON, J. W. **The chemistry of medical and dental materials**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002. 242p.

OJUMU, T.V.; YU, J.; SOLOMON, B.O. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. **Afr. J. Biotechnol.** v.3, p.18-24, 2004.

OLIVEIRA, L. S.A. F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. L.; ROSA, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, vol.9, n.1, p. 37-44, 2010.

OLIVEIRA, P.M. **Desenvolvimento e caracterização de compósitos de matriz polimérica de PHB reforçados com HAP-91®**. 2005.148f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro preto.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 2012. 538p.

ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S. **Biomateriais – fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 2006. p. 239-249.

OU, W.; QIU, H.; CHEN, Z.; XU, K. Biodegradable block poly (ester-urethane) based on poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymers. **Biomaterials**, vol.32, p.3178-3188, 2011.

PARK, J. B.; LAKES, R. S. **Biomaterials an introduction**. 3<sup>o</sup> ed. New York: Plenum Press. 2007. 394p.

PINTO, M. R. **Viscosidade de soluções diluídas de polímeros**. Instituto de Química da Unicamp, departamento de físico-química. Disponível em: < [http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/447/1/PB\\_COQUI\\_2011\\_2\\_19.pdf](http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/447/1/PB_COQUI_2011_2_19.pdf) > Acessado em 19 de maio de 2013.

PINTO, M. R.; MARIANO, E. C.; CARDOSO, T.P.; DUEK, E. A. R. Blendas de PLLA/PCL como prótese de menisco. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 17, 2006, Foz do Iguaçu/PR. **Anais do 17<sup>o</sup> CBECIMat.**, Brasil, 2006. p. 1-11.

PEREIRA, M. M; VASCONCELOS, W. L; ZAVAGLIA, C. A. C. Materiais cerâmicos – Ciência e aplicação como biomateriais. In. ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S. **Biomateriais – fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 2012. p.61- 81.

PERROT, S.; DUTERTRE-CATELLA, H.; MARTIN, C.; RAT, P.; WARNET, J. M. Resazurin metabolism assay is a new sensitive alternative test in isolated pig córnea. **Toxicological Sciences**, v.72, p.122–129, 2003.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2006.

PYLES, M.D. **Avaliação de parafusos bioabsorvíveis na reparação de fraturas experimentais de sesamóides proximais em eqüinos.** 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu/SP.

RAMAKRISHNA, S.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; LEONG, K. W. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. **Composites Science and Technology**, volume 61, p. 118-1224, 2001.

RATNER, B.D. **A History of Biomaterials.** In: Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. (eds), *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2 ed., 2004.

REIS, E. C. C.; BORGES, A.P. B.; VARGAS, M.I. V.; MARTINEZ, M. M.; ELEOTÉRIO, R. B.; DIAS, A. R.; RODRIGUES, M.C.D. Resposta tecidual ao compósito 50% hidroxiapatita: 50% poli (hidroxibutirato) para substituição óssea em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.4, p.844-852, 2009.

RUMPEL, E.; WOLF, E.; KAUSCHKE, E.; BIENENGRBER, V.; BAYERLEIN, T.; GEDRANGE, T.; PROFF, P. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo. **Folia Morphologica**, v.65, n.1, p.43-48, 2006.

SADAT-SHOJAI, M.; KHORASANI, M. T.; JAMSHIDI, A.; IRANI, S. Nano-hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composites: A comprehensive study on the structural and in vitro biological properties. **Materials Science & Engineering C**, doi: 10.1016/j.msec.2013.02.041. 2013.

SALINAS, A. J.; ROMAN, J.; VALLET-REGI, M.; OLIVEIRA, J. M.; CORREIA, R. N.; FERNANDES, M. H. **Biomaterials**. v.21, p.251, 2000.

SANTOS, A. R.; WADA, M. L. F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. V.17, p.308-317, 2007.

SANTOS Jr, A. R. **Cultura de Células Vero sobre polímeros bioabsorvíveis à base de poli-L-ácido láctico**. 2001. 150p. Tese de Doutorado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SARGEANT, A., GOSWAMI, T. Hip implants - Paper VI - Ion concentrations. **Material and Design**. v.28, p.155-171, 2007.

SHIRTLIFF, V.J., HENCH, L.L. Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair. **Journal of Materials Science**. v.38, n. 23, p.4697-4707. 2003.

SHIWAKU, Y.; ANADA, T.; YAMAZAKI, H.; HONDA, Y.; MORIMOTO, S.; SASAKI, K.; SUZUKI, O;. Structural, morphological and surface characteristics of two types of octacalcium phosphate-derived fluoride-containing apatitic calcium phosphates. **Acta Biomaterialia**, v.8, p.4417–4425, 2012.

SILVA, M. H. P. Apostila de biomateriais. Disponível: [http://mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduacao/pdf\\_p3/ApostilaBiomateriaias.pdf](http://mesonpi.cat.cbpf.br/e2006/posgraduacao/pdf_p3/ApostilaBiomateriaias.pdf). Acesso: 11 de abril de 2010.

SOUZA, S. A. **Ensaio Mecânicos de Materiais Metálicos**. São Paulo:Edgard Blücher, 3 ed. 1977.

STEINBÜCHEL, A., FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 419-421, 1998.

STEVENS M P. **Polymer Chemistry: An Introduction**. New York: Oxford University Press, 1999.

SUZUKI, O. Octacalcium phosphate (OCP) - based bone substitute materials. **Japanese Dental Science Review**. doi: org/10.1016/j.jdsr.2013.01.001. 2013.

TADDEI, P.; TINTI, A.; FINI, G. Vibrational spectroscopy of polymeric biomaterials. **Journal of Raman Spectroscopy**, v.32, p.619-629, 2001.

TAVARES, R. **Apostila de práticas – Físico-Química**. Universidade Federal do Ceará. Disponível em: < [http://www.labufc.com.br/arqs/Apostila\\_FQII.pdf](http://www.labufc.com.br/arqs/Apostila_FQII.pdf)> Acessado em 19 de maio de 2013.

TRIPATHI, A. D.; SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, R. P. "Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by *Alcaligenes sp.*" *Biomass and Bioenergy* (2013), doi: org/10.1016/j.biombioe.2013.02.17.

TUREK, S. L. **Ortopedia: Princípios e sua Aplicação 1**. São Paulo: Editora Manole, 1991. P.756.

VERT, M., LI, M.S., SPENLEHAUER, G., GUERIN, P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **Journal of Material Science**, v.3, p.432-46. 1992.

VERT, M. Polymeric biomaterials: Strategies of the past vs. strategies of the future. **Progress in Polymer Science**, v.32, p. 755–761. 2007.

WAKE, M.C.; GERECHT, P. D.; LU, L.; MIKOS, A. G. **Biomaterials**, v.19, p.1255. 1998.

WANG, Y. W.; YANG, F.; WU, Q.; CHENG, Y. C.; YU, P. H. F.; CHEN, J.; CHEN, G. Q. Effect of composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-



hydroxyhexanoate) on growth of fibroblast and osteoblast. **Biomaterials**. v.26, p.755–761, 2005.

WEILER, A.; HOFFMAN, R.F.G.; STÄHELIN, A.C.; HELLING, A.J.; SÜDKAMP, N.S. Biodegradable implants in sports medicine: the biological base. *Arthroscopy. The journal of arthroscopic and related surgery*. v.16, n.3, p.305-321, 2000.

WENDLANDT, W. W., **Thermal Analyses**. New York: Wiley, 1986.

WENG, Y. X.; WANG, X. L.; WANG, Y. Z. Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions. **Polymer Testing**, v.30, p.372–380, 2011.

WESSEL, J. K. **Handbook of advanced Materials Enabling new designs**. Tennessee: Wiley, Wessel & Associates Oak Ridge, 2004.

WILLARD, H. H.; MERRIT, L. L.; DEAN, J. **Análise instrumental**. 2nd ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 986 p. 1979.

WILLIAMS E.C., JANMEY P.A., FERRY J.D., MOSHER D.F. Conformational states of fibronectin: effects of pH, ionic strength and collagen binding. **Journal of Biological Chemistry**, v.257, p.14973-14978. 1982.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v.29, p.2941-2953, 2008.

WITHEY R. E.; HAY, J. N. The effect of seeding on the crystallization of poly (hydroxybutyrate), and co-poly (hydroxybutyrate-co-valerate). **Polymer**, Inglaterra, v.40, n.18, p.5147-5152, 1999.

ZHANG, J.; KANG, J.; ZHANG, X.; ZHOU, H. Change of chemical bond and wettability of polylacticacid implanted with high-flux carbon ion. **Materials Science and Engineering B**, v.151, p.169–173, 2008.

ZHIJIANG, C.; CHENGWEI, H.; GUANG, Y. Poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)/bacterial cellulose composite porous scaffold: Preparation, characterization and biocompatibility evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n.2, p.1073-1080, 2012.