

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Tese de Doutorado

**"Síntese, Caracterização e Avaliação do
Comportamento Degradativo de Híbridos Porosos de
Poli (Álcool Vinílico)/Vidro Bioativo"**

Autor: Hermes de Souza Costa

Orientador: Prof. Herman Sander Mansur

Dezembro / 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Hermes de Souza Costa

**"Síntese, Caracterização e Avaliação do
Comportamento Degradativo de Híbridos Poli (Álcool
Vinílico)/Vidro Bioativo Imersos em Meio Aquoso"**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Engenharia Metalúrgica.

Área de concentração: Ciência e Eng. de Materiais
Orientador: Prof. Dr. Herman Sander Mansur

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG

2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir chegar e concluir mais esta etapa.

Aos meus pais, Ezequiel de Souza Costa e Maria José Monteiro de Souza Costa, e aos meus irmãos, Ezequiel, Eugênio, Maria Clara, Fernando, Maria Ângela, Maria Celeste e Maria Cristina, que sempre me estimularam durante essa jornada.

À Gláucia por me acompanhar lado a lado e servir de estímulo para o meu empenho.

Ao professor Herman Sander Mansur, por ter me dado o suporte necessário durante todos esses anos de pesquisa e participar de maneira vibrante em cada etapa do projeto.

À Professora Marivalda de Magalhães Pereira pelo inestimável auxílio nas discussões e redação dos trabalhos.

À Alexandra Mansur, pela participação no dia a dia do trabalho no laboratório.

Ao Professor Rodrigo Lambert Oréfice, pela realização dos ensaios mecânicos.

À Professora Edel Figueiredo Barbosa-Stancioli, pela execução de toda a parte biológica envolvida neste trabalho.

Ao Dr. Julian R. Jones do Departamento de Materiais do Imperial College, pela realização da microtomografia computadorizada.

Ao Professor Ricardo José Alves, pela realização dos ensaios FTIR.

Aos laboratoristas, Andréa Bicalho, Denise Souza, Ilda Batista, Patrícia Azevedo e Mateus Laguardia que tiveram sempre a disponibilidade para atender às solicitações.

Aos meus colegas, Agda Oliveira, Eliane Ayres, Joyce Cristina, Lívio Jacques, Magda Rocha, Marco Elísio pela companhia e colaboração na execução dos ensaios.

Ao Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da UFMG, aos professores pela disponibilidade de infraestrutura dos laboratórios e materiais para realização dos ensaios, e em especial aos funcionários Maria Aparecida Pacheco, Efigênia Araújo, Nelson Azevedo e Vicente Alves pela amizade.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

À JHS Laboratório Químico Ltda, especialmente na pessoa da Professora Sheyla Máximo, pelo fornecimento de hidroxiapatita utilizada nos experimentos biológicos *in vitro*.

Aos amigos e colegas professores do Departamento de Engenharia de Materiais do CEFET-MG.

Ao CEFET-MG que permitiu a flexibilidade de horário das atividades acadêmicas durante o período de doutoramento.

RESUMO

A engenharia de tecidos se utiliza de uma série de estratégias para reparar partes danificadas do corpo. Um dos elementos de grande importância no processo é representado pelas matrizes que mimetizam a estrutura extracelular e atuam como molde temporário para proliferação e diferenciação de células. Essas matrizes devem apresentar porosidade e interconectividade de poros que permita o crescimento celular, biocompatibilidade adequada e biodegradabilidade com cinética de degradação aceitável para promover suporte durante o período necessário para o crescimento do novo tecido. Compósitos microporosos contendo uma fase bioativa e uma fase polimérica reabsorvível são promissores na engenharia de tecido, onde a fase cerâmica pode ser adicionada para melhorar ou introduzir propriedades osteogênicas, além disso as taxas de degradação podem ser ajustadas pela mudança da massa molar ou densidade de ligações cruzadas de polímeros. Outro critério que deve ser considerado no desenvolvimento de biomateriais inclui a provisão de resistência mecânica adequada. As extraordinárias propriedades mecânicas dos nanotubos de carbono (NTC) fazem deles particularmente atrativos como reforço em materiais compósitos. Entretanto a utilização efetiva dos NTC em compósitos depende da habilidade deles serem dispersos individual e homogênea na matriz. Nesse trabalho foram preparados híbridos através do processo sol-gel, onde poli(álcool vinílico) (PVA) foi dissolvido em água e a solução de vidro bioativo (BaG) foi obtida através da mistura de água deionizada, TEOS, TEP e CaCl_2 . Em seguida vários teores de BaG com concentração de 58% de SiO_2 , 33% de CaO e 9% (p/p) de P_2O_5 foram adicionado em PVA. A essa solução resultante foram adicionados tensoativos, catalisador da geleificação e glutaraldeído, como agente de ligações cruzadas. Foram realizados teste de degradação através de imersão em água deionizada na temperatura de 37°C , por períodos de até 21 dias. A caracterização dos materiais obtidos foi conduzida por MEV, perda de massa, análise química das soluções de degradação e ensaio de viabilidade celular. Além disso foram produzidos híbridos macroporosos PVA-BaG reforçados com NTC de paredes múltiplas funcionalizados com grupos COOH . Os resultados indicam redução gradual na perda de massa com o aumento da fração de reticulante utilizado e viabilidade celular obtida para períodos maiores de imersão no meio ensaiado. A boa dispersão dos NTC funcionalizados e a sua ligação com a matriz polímero/cerâmica melhorou a resistência mecânica dos híbridos.

ABSTRACT

Tissue engineering combines the principles of engineering and biology to repair damaged tissue. One of the challenges in the tissue engineering is associated with the development of suitable scaffold materials that can act as templates for cell adhesion, growth and proliferation. The scaffolds may present adequate pore size and interconnectivity to promote cell in-growth, good biocompatibility and kinetic of degradation where is possible to control scaffold degradation to match the ratio of replacement by new tissue. Microporous composite of biodegradable polymers with inorganic bioactive glasses are of particular interest in tissue engineering, where the ceramic phase can improve or fulfill the osteogenic features, moreover the ratio of degradation is able to be tailored by polymer molecular weight or crosslink density. Other criteria which must be considered in the design of biomaterials include the provision of adequate mechanical strength. The extraordinary mechanical properties of carbon nanotubes (CNT) make them particularly attractive as reinforcements in composite materials. However the effective utilization of CNT in composite applications depends strongly on their ability to be dispersed individually and homogeneously within a matrix. In this work were produced hybrids by the sol-gel process. To prepare the hybrids, PVA was dissolved in water and the BaG solution was obtained by mixing deionized water, TEOS, TEP and CaCl_2 in order. Both solutions were prepared with amounts of BaG with 58wt.% of SiO_2 , 33wt.% of CaO and 9wt.% of P_2O_5 in solution of PVA, respectively. Then, surfactant, catalyst for gelation and glutaraldehyde, as crosslinker agent were added to the previously prepared solution. Samples were submitted for degradation study by soaking into deionized water at 37 °C for periods of time up to 21 days. In order to investigate the structure, PVA-derived hybrids were characterized by SEM, weight loss and cell biocompatibility assay. In addition, were produced macroporous hybrids PVA-BaG reinforced with COOH functionalized multi wall CNT's. The results indicated gradual decrease in the weight loss with the increase in the ratio of glutaraldehyde agent used and cell viability obtained for large soaking time at the tested medium. The good dispersion of the functionalized CNT's and bonding to the polymeric/ceramic matrix strongly improved the mechanical strength of the hybrids.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVO	03
2.1. Objetivos Específicos	03
3. REVISÃO DE LITERATURA	04
3.1. Tecido Ósseo	04
3.2. Análise e Dimensionamento do Mercado de Materiais para Substituição Óssea.....	05
3.3. Engenharia de Tecido Ósseo	07
3.3.1. Matrizes na Engenharia de Tecidos	08
3.3.2. Adesão de Osteoblastos em Materiais Sintéticos	11
3.3.3. Materiais Sintéticos	11
3.3.3.1. Vidro Bioativo	12
3.3.3.2. Poli(álcool vinílico) (PVA)	14
3.4. Caracterização Físico-Química de Materiais	16
3.5. Ensaio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de Materiais de Implante	17
3.6. Nanotubos de Carbono	19
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	24
4.1. Síntese de Híbridos PVA/vidro bioativo	25
4.1.1. Preparo da Solução de PVA	26
4.1.2. Preparo da Solução Inicial para Obtenção de Vidro Bioativo	26

4.1.3. Preparo de Espumas Híbridas de PVA-BaG	27
4.2. Síntese de Híbridos PVA/vidro bioativo/glutaraldeído	28
4.2.1. Preparo da Solução de PVA	28
4.2.2. Preparo da Solução Inicial para Obtenção de Vidro Bioativo	29
4.2.3. Preparo de Espumas Híbridas de PVA-BaG-GA	29
4.2.4. Tratamento de Estabilização dos Híbridos Obtidos PVA-BaG-GA	30
4.3. Caracterização dos híbridos sintetizados	31
4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura	31
4.3.2. Análise 3D da estrutura dos híbridos PVA-BaG-GA por microtomografia computadorizada (μ CT)	32
4.3.3 Método Brunauer-Emmett-Teller (B.E.T.)	32
4.3.4 Caracterização por espectroscopia FTIR	32
4.3.5 Difração de Raios-X (DRX)	32
4.3.6 Ensaio de Compressão	33
4.3.7 Teste de citotoxicidade dos híbridos PVA-BaG	33
4.3.7.1 Preparo de Amostras para Ensaio de Citotoxicidade	33
4.3.7.2 Cultura de Células VERO nos Materiais	33
4.3.7.3 Viabilidade e Atividade Celular Realizada com Células VERO por Ensaio de MTT	34
4.3.7.4 Análise Estatística	34
4.4 Degradação de Híbridos PVA-BaG e PVA-BaG-GA	35
4.4.1 Preparo de amostras dos Híbridos para Degradação	35
4.4.2 Protocolo de Degradação em água DI	35
4.4.3 Degradação térmica dos híbridos PVA-BaG-GA	37
4.4.4. Caracterização dos híbridos PVA-BaG-GA após ensaio de degradação	37

4.5 Híbridos PVA-BaG Reforçados com Nanotubos de Carbono Quimicamente Modificados	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Síntese dos Híbridos PVA-BaG	40
5.1.1. Comportamento na síntese em função da Razão PVA/BaG e Grau de Hidrólise do PVA	40
5.2 Avaliação Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura	43
5.3 Caracterização química por espectroscopia FTIR de Híbridos PVA/BaG	46
5.4 Caracterização da cristalinidade por DRX	50
5.5 Caracterização de híbridos PVA-BaG-GA	51
5.5.1 Caracterização morfológica dos híbridos PVA-BaG-GA	51
5.5.2 Caracterização da estrutura dos híbridos PVA-BaG-GA através de μ CT	55
5.5.3 Caracterização por espectroscopia FTIR de Híbridos PVA-BaG-GA	58
5.5.4 Caracterização cristalográfica por DRX de Híbridos PVA-BaG-GA	61
5.5.5 Ensaio de Resistência Mecânica à Compressão de Híbridos PVA-BaG-GA	62
6. DEGRADAÇÃO DE HÍBRIDOS PVA-BAG-GA	68
6.1 Medidas de pH	68
6.2 Ensaio <i>in vitro</i> de Degradação em Meio Aquoso	69
6.3 Caracterização Termogravimétrica do Sistema PVA-BaG-GA	75
6.4 Análise química elementar por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Elétrons .	82
6.5 Morfologia dos Híbridos PVA-BaG-GA Após Degradação em Meio Aquoso	85
6.6 Caracterização por FTIR de Híbridos PVA-BaG-GA Após Degradação	95
6.7 Ensaio de Resistência Mecânica à Compressão	99
6.8 Caracterização da Liberação de Íons por Espectroscopia de Absorção Atômica	105
6.9. Análise da Citotoxicidade e Viabilidade Celular Avaliada por Ensaio de MTT	106

7. REFORÇO MECÂNICO DE HÍBRIDOS PVA/BAG COM NANOTUBOS DE CARBONO	111
7.1 Caracterização de Híbridos PVA-BaG Preparados com Nanotubos de Carbono	111
7.1.1 Avaliação Morfológica dos Híbridos PVA-BaG-NTC	111
7.1.2 Ensaio de Resistência Mecânica à Compressão de Híbridos PVA-BaG-NTC	113
7.2 Degradação de Híbridos PVA-BaG-NTC	119
7.2.1 Morfologia dos Híbridos PVA-BaG-NTC após Degradação	120
7.2.2 Resistência Mecânica de Híbridos PVA-BaG-NTC após Degradação	122
8. CONCLUSÕES	124
9. TRABALHOS FUTUROS	125
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
11. PUBLICAÇÕES DO AUTOR	144

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1	– Esquema da remodelação de ossos esponjosos	04
FIGURA 3.2	– Representação esquemática da engenharia de tecidos	07
FIGURA 3.3	– Fotografia ótica e imagem de MEV de híbrido PVA/BaG	10
FIGURA 3.4	– Esquema mostrando o princípio do processo sol-gel	13
FIGURA 3.5	– Fórmula química do poli (álcool vinílico-co-acetato de vinila)	15
FIGURA 3.6	– Estruturas de NTC de parede simple e parede múltipla	20
FIGURA 3.7	– Esquema do acoplamento de um ácido a amina usando EDC	23
FIGURA 4.1	– Fluxograma das etapas previstas para o trabalho	24
FIGURA 4.2	– Etapas para o preparo de híbridos de PVA/BaG/GA	25
FIGURA 4.3	– Etapas de estabilização e bloqueio dos híbridos PVA/BaG/GA	30
FIGURA 5.1	– Efeito da concentração de polímero no tempo de geleificação para compósitos preparados com (PVA99)	40
FIGURA 5.2	– MEV de híbridos 80PVA-20BaG, 70PVA-30BaG, 60PVA-40BaG	44
FIGURA 5.3	– Efeito do GH do PVA na área superficial estimada por BET para híbridos 70PVA-30BaG	46
FIGURA 5.4	– FTIR de amostras PVA99; BaG e; híbrido 70PVA/30BaG	47
FIGURA 5.5	– FTIR de amostras PVA80; BaG e; híbrido 70PVA/30BaG	49
FIGURA 5.6	– Difractograma de vidro bioativo, híbrido PVA/BaG nas razões 70/30; 80/20 e PVA80	50
FIGURA 5.7	– MEV de híbridos PVA/BaG preparados com as concentrações de (a) 0% p/p; (b) 1% p/p e (c) 5% p/p de GA	52
FIGURA 5.8	– MEV da parede de híbridos PVA/BaG preparados com as concentrações de (a) 0% p/p; (b) 1% p/p e (c) 5% p/p de GA	54
FIGURA 5.9	– Imagem de microtomografia computadorizada de híbrida PVA/BaG reticulada com 5% p/p de GA	55

FIGURA 5.10	– Distribuição de tamanho de poro de matriz híbrida PVA/BaG reticulada com 5% p/p de glutaraldeído. Resultados obtidos a partir de análise de imagem 3D de microtomografia computadorizada por transmissão de raios X	56
FIGURA 5.11	– Distribuição de tamanho das interconectividades entre poros de matriz híbrida PVA/BaG reticulada com 5% p/p de glutaraldeído. Resultados obtidos a partir de análise de imagem 3D de microtomografia computadorizada por transmissão de raios X	57
FIGURA 5.12	– Espectros FTIR de híbridos PVA/BaG preparados com as concentrações de (a) 0% p/p; (b) 1% p/p e (c) 5% p/p de GA	59
FIGURA 5.13	– Razão entre os picos dos espectros FTIR em função da concentração de glutaraldeído dos híbridos PVA-BaG	60
FIGURA 5.14	– Difratoograma de Híbridos PVA/BaG com 0,5%; 1,0 e 5% de GA ..	61
FIGURA 5.15	– Curvas tensão-deformação de híbridos PVA/BaG preparados nas concentrações de 0%; 1% e 5% p/p de GA	63
FIGURA 5.16	– Gráfico do limite de escoamento em função da concentração de glutaraldeído utilizada no preparo dos híbridos PVA/BaG/GA	64
FIGURA 5.17	– Gráfico da deformação no escoamento em função da concentração de glutaraldeído utilizada no preparo dos híbridos PVA/BaG/GA ..	65
FIGURA 5.18	– Gráfico do módulo de elasticidade em função da concentração de glutaraldeído utilizada no preparo dos híbridos PVA/BaG/GA	66
FIGURA 6.1	– Gráfico de pH obtidas através de ensaio de degradação de híbridos PVA/BaG reticulados com GA, nas concentrações de (a) 0%; 0,5%; 1,0% e 5% p/p de GA	69
FIGURA 6.2	– Gráfico mostrando perda de massa obtido em ensaio de degradação realizado com híbridos PVA/BaG reticulados com GA, nas concentrações de 0% a 5% p/p.....	70
FIGURA 6.3	– Esquema da estrutura de híbridos PVA/BaG reticulados com GA ..	72
FIGURA 6.4	– Variação da taxa de perda de massa K1 de híbridos PVA/BaG em função da concentração de GA utilizada	73
FIGURA 6.5	– Variação da taxa de perda de massa K2 de híbridos PVA/BaG em função da concentração de GA utilizada	73
FIGURA 6.6	– Fração de massa presente após 21 de imersão em água DI em função da concentração de GA utilizada	74

FIGURA 6.7	– Gráfico com porcentagens de material orgânico/inorgânico dos híbridos PVA/BaG reticulados com GA em frações de até 5% p/p.	76
FIGURA 6.8	– Análise térmica mostrando a massa em função da temperatura, para híbridos PVA/BaG preparados nas concentrações de 0% p/p a 5% de GA	77
FIGURA 6.9	– Gráfico mostrando perda de massa em porcentagem de orgânico/inorgânico dos híbridos PVA/BaG reticulados com GA em até 5% p/p, após 7 dias de degradação em água DI	80
FIGURA 6.10	– Gráfico mostrando a perda de massa em porcentagem de orgânico/inorgânico dos híbridos PVA/BaG reticulados com GA em até 5% p/p, após 21 dias de degradação em água DI	80
FIGURA 6.11	– Gráfico mostrando a perda de massa ocorrida após 7 dias de degradação em meio aquoso e a fração de inorgânico presente nos híbridos em função da concentração de GA	81
FIGURA 6.12	– Gráfico mostrando a perda de massa ocorrida após 21 dias de degradação em meio aquoso e a fração de inorgânico presente nesses híbridos em função da concentração de GA	81
FIGURA 6.13	– Fração de material orgânico e inorgânico presente nos híbridos PVA/BaG reticulados com GA em concentrações de até 5% (p/p), após ensaio de degradação em água DI por período de até 21 dias .	82
FIGURA 6.14	– Espectro EDS de híbridos PVA/BaG antes, após 2 dias e após 21 dias de degradação em H ₂ O DI	83
FIGURA 6.15	– MEV de híbrido PVA/BaG antes e após processo de degradação em água DI por período de até 21 dias	86
FIGURA 6.16	MEV e EDS de híbrido PVA/BaG submetida a processo de degradação em água DI por período de 21 dias	88
FIGURA 6.17	– MEV de híbrido PVA/BaG reticulados com 1% p/p de glutaraldeído, antes e após 2 dias de degradação em água DI	89
FIGURA 6.18	– MEV de híbrido PVA/BaG preparado na concentração 1% p/p de glutaraldeído submetidas a processo de degradação em água DI por período de 21 dias	90
FIGURA 6.19	– MEV de híbrido PVA/BaG preparado na concentração 5% p/p de glutaraldeído submetidas a processo de degradação em água DI por período de até 21 dias	92

FIGURA 6.20	– MEV de híbridos PVA/BaG preparados nas concentrações de 0%; 1% e 5% p/p de GA antes e após serem submetidas a processo de degradação pelo período de 21 dias	93
FIGURA 6.21	– MEV de híbrido PVA/BaG com 5% p/p de GA submetidos à estabilização com solução de NH_4OH 0,3M por 1 minuto	94
FIGURA 6.22	– Espectro FTIR de amostras PVA/BaG preparados sem glutaraldeído antes e após ensaio de degradação por 21 dias	95
FIGURA 6.23	– Espectro FTIR de amostras PVA/BaG reticuladas com 5% p/p de glutaraldeído antes e após ensaio de degradação por 21 dias	96
FIGURA 6.24	– Razão entre os picos dos espectros FTIR em função da concentração de glutaraldeído dos híbridos PVA-BaG para amostras submetidas à degradação por 21 dias	97
FIGURA 6.25	– Espectro FTIR de amostras PVA/BaG reticuladas com 5% p/p de glutaraldeído e submetidas a tratamento estabilizador com solução 0,3M de NH_4OH antes e após ensaio de degradação por 21 dias	98
FIGURA 6.26	– Curvas tensão-deformação típicas para híbridos PVA/BaG preparados nas concentrações de 0%; 1%; 5% p/p de GA e amostras preparadas com 5% p/p de GA tratadas com solução de NH_4OH , após serem submetidas a degradação por 21 dias	100
FIGURA 6.27	– Gráfico do limite de escoamento em função da concentração de GA utilizada em híbridos PVA/BaG/GA, após 21 dias de degradação em água DI	101
FIGURA 6.28	– Gráfico dos valores da deformação no escoamento em função da concentração de GA utilizada em híbridos PVA/BaG/GA, após 21 dias de degradação em água DI	102
FIGURA 6.29	– Gráfico do módulo de elasticidade em função da concentração de GA utilizada em híbridos PVA/BaG/GA, após 21 dias de degradação em água DI	103
FIGURA 6.30	– Gráfico com valores obtidos por análise química da solução de imersão dos híbridos, para os elementos Si e Ca, após imersão por período de até 21 dias	105
FIGURA 6.31	– Gráfico de viabilidade celular através de MTT, para amostras de híbridos de PVA/BaG reticuladas com 5% de GA estabilizadas com NH_4OH em concentrações que variaram de 0,075 à 0,750M .	107
FIGURA 6.32	– Micrografia de híbridos de PVA-BaG-GA estabilizadas com NH_4OH 0,3M por 10 horas após ensaio em meio de cultura celular	108

FIGURA 6.33	– Gráfico de viabilidade celular por contato direto através de MTT, conduzidos após 21 dias de imersão em água DI, para híbridos PVA/BaG reticulados com GA, em concentrações até 5% p/p	109
FIGURA 7.1	– Fotografia de híbridos PVA/BaG preparado com e sem adição de nanotubos de carbono	111
FIGURA 7.2	– MEV de híbridos PVA/BaG e PVA/BaG reforçados com nanotubos de carbono	112
FIGURA 7.3	– Curvas típicas tensão-deformação obtidas por teste de compressão de híbridos PVA/BaG preparados com as concentrações de 0% e 1% p/p de GA e de amostras preparadas sem GA e reforçadas com nanotubos de carbono	114
FIGURA 7.4	– Gráfico mostrando efeito da adição de nanotubos de carbono no limite de escoamento, na deformação no escoamento e no módulo de elasticidade de híbridos PVA/BaG	115
FIGURA 7.5	– Nanotubos de carbono funcionalizados e fórmula química do poli (álcool vinílico-co-acetato de vinila)	117
FIGURA 7.6	– Mecanismo de formação da rede de PVA com a incorporação dos nanotubos de carbono	118
FIGURA 7.7	– Esquema da estrutura dos híbridos PVA/BaG reticulados com GA formando as pontes entre as redes poliméricos com a matriz inorgânica dispersa na matriz polimérica	118
FIGURA 7.8	– Gráfico obtido através de ensaio de degradação realizado em amostras PVA/BaG preparadas com e sem nanotubos de carbono, conduzidos em período de 7 dias de imersão em água DI	119
FIGURA 7.9	– MEV de híbridos PVA/BaG e PVA/BaG reforçados com nanotubos de carbono após serem submetidas a degradação por 7 dias em água DI	120
FIGURA 7.10	– Gráfico mostrando efeito da adição de nanotubos de carbono no limite de escoamento, na deformação no escoamento e no módulo de elasticidade de híbridos PVA/BaG após imersão por 7 dias em água deionizada	122

LISTA DE TABELA

TABELA 3.1	– Concentração iônica do plasma sanguíneo e do SBF (mmol/l)	17
TABELA 4.1	– Concentrações das soluções de PVA	26
TABELA 4.2	– Concentrações dos Reagentes dos Híbridos PVA/BaG	27
TABELA 4.3	– Concentrações dos Reagentes dos Híbridos PVA/BaG/GA	29
TABELA 4.4	– Identificação, proporções, tratamento de estabilização e período de imersão utilizados nos ensaios de degradação, para os Híbridos PVA-BaG-GA	36
TABELA 5.1	– Porosidade Aparente em dos Híbridos PVA/BaG	45
TABELA 5.2	– Principais Modos Vibracionais Associados com PVA e BaG	48
TABELA 5.3	– Tamanho de Poro de Híbridos PVA/BaG	52
TABELA 5.4	– Interconectividade entre Poros de Híbridos PVA/BaG	53
TABELA 5.5	– Análise Dimensional do Tamanho de Poro de Híbridos PVA/BaG ..	57
TABELA 5.6	– Dados do módulo de compressão axial, limite de escoamento e deformação no escoamento para híbridos PVA/BaG/GA	66
TABELA 6.1	– Resumo dos Índices de Degradação de Híbridos PVA/BaG	71
TABELA 6.2	– Fração de material orgânico/inorgânico dos híbridos após períodos de até 21 dias de degradação em água DI	79
TABELA 6.3	– Razão dos elementos Ca, P e Cl em função do silício (% atômica) ..	84
TABELA 6.4	– Dados do módulo de compressão axial, limite de escoamento e deformação no escoamento para híbridos PVA/BaG/GA antes e após 21 dias de imersão em água DI	104
TABELA 6.5	– Taxas de liberação de Si e Ca dos Híbridos PVA/BaG para meio de imersão	106
TABELA 7.1	– Propriedades mecânicas obtidas por ensaio de compressão axial para híbridos PVA/BaG e PVA/BaG/(NTC-COOH)	113
TABELA 7.2	– Propriedades mecânicas obtidas por ensaio de compressão axial para híbridos PVA/BaG e PVA/BaG/(NTC-COOH) após imersão por 7 dias em água deionizada	121

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Å	angstrom
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
ATR	reflexão transmitida atenuada
BaG	Vidro bioativo
BET	Método Brunauer-Emmett-Teller
BMP	proteínas ósseas morfogenéticas
BSA	albumina de soro bovino
cm ⁻¹	unidade de número de onda
CVD	<i>chemical vapor deposition</i>
DI	deionizada
DRX	Difração de raio-X
DSC	calorimetria exploratória diferencial
EDC	hidrocloro 1-etil-(3-3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
EMC	matriz extracelular
FBS	soro fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
FTIR	<i>Fourier transform infrared</i>
GA	glutaraldeído
GH	grau de hidrólise
HAC	hidroxiapatita carbonatada
IEP	ponto isoelétrico
IGF	fator de crescimento à base de insulina
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IV	infra vermelho
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
KBr	brometo de potássio
kDa	quilodalton

kN	quilonewton
kV	quilovolt
M	molar
mA	miliampere
μCT	microtomografia computadorizada
MEM	meio mínimo essencial Eagle
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	miligrama
MM	massa molar
mm/min	milímetro por minuto
MPA	Mega Pascal
MTT	brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazolium
MWNT	<i>multiple wall carbon nanotubes</i>
nm	nanômetro
NHS	N-hidroxisuccinimida
NTC	nanotubos de carbono
NTC(COOH)	nanotubos de carbono carboxílicos
PBS	solução salina de tampão fosfato
PGDF	fatores de crescimento derivados de plaqueta
PVA	Poli (álcool vinílico)
PVA80	Poli (álcool vinílico) 80% hidrolisado
PVA99	Poli (álcool vinílico) 99% hidrolisado
rhBMP-2	BMP-2 humana recombinante
rpm	rotações por minuto
SBF	fluido de simulação corporal
SDS	dodecil sulfato de sódio
SUS	Sistema Único de Saúde
SWNT	<i>single wall carbon nanotubes</i>
TEOS	tetraetilortosilicato
TEP	trietilfosfato
Tg	tempo de geleificação
TGA	análise termogravimétrica

TPa	Tera Pascal
λ	comprimento de onda
μm	micrometro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

1. INTRODUÇÃO

Engenharia de tecidos é desenvolvida para reparar partes danificadas do corpo e restaurar sua função através do uso de tecidos crescidos em laboratório. Para regeneração dos tecidos, a engenharia de tecidos utiliza três ferramentas fundamentais: células, moléculas sinalizadoras e matrizes porosas. Dentre as características importantes para as matrizes porosas podemos destacar a biocompatibilidade com os tecidos do hospedeiro, propriedades mecânicas adequadas, porosidade e morfologia compatíveis para o transporte de células, gases, metabólitos, nutrientes e moléculas entre a matriz e o ambiente local (KIM et al., 2008).

Matrizes porosas obtidas à base de cerâmicas bioativas têm sido estudadas largamente como estrutura para crescimento de tecido ósseo. As cerâmicas bioativas apresentam propriedades osteocondutoras, que permitem a colonização de células ósseas e promovem a formação de uma interface contínua entre osso-cerâmica. Entretanto, os vidros bioativos têm baixa resistência mecânica à compressão, especialmente na forma porosa, se comparados com osso cortical ou medular (VALLET-REGÍ & GONZÁLEZ-CALBET, 2004; JONES et al., 2005; PEREIRA et al., 2005; PADILLA et al., 2007; GUPTA & KUMAR, 2008).

Híbridos que incluem polímeros sintéticos e biológicos, com uma fase de vidro bioativo, têm a capacidade potencial de combinar o comportamento bioativo com propriedades mecânicas adequadas (YAMAOKA et al., 1995; CHIELLINI et al., 2003). Materiais híbridos orgânico-inorgânico podem ser definidos como materiais sintéticos com componentes orgânicos e inorgânicos intimamente misturados, onde pelo menos um dos domínios tem dimensões variando de poucos angstroms a vários nanômetros. As condições de síntese promovidas pelo processo sol-gel tais como, precursores organometálicos, baixa temperatura de processamento e versatilidade do estado coloidal permitem a mistura de componentes orgânicos e inorgânicos na escala nanométrica em praticamente qualquer proporção de mistura (SANCHEZ et al., 2010).

Especificamente, materiais híbridos a base de polímeros biodegradáveis, associados com vidros bioativos, são de particular interesse para a engenharia de tecido, porque oferecem um excelente balanço entre resistência mecânica e rigidez, além da melhora nas propriedades mecânicas, quando comparados com seus componentes individuais (YAMAOKA et al., 1995; CHIELLINI et al., 2003; KOTOKY & DOLUI, 2004; 2003; JONES et al., 2005; PAUL & SHARMA, 2006, MANSUR &

COSTA, 2008; COSTA et al., 2008a; COSTA et al., 2008b; COSTA et al., 2008c; COSTA et al., 2008d).

Dentre os vários polímeros, o poli(álcool vinílico) (PVA), caracterizado por ser um polímero solúvel em água, tem sido frequentemente explorado como material de implante em aplicações biomédicas para sistemas de liberação de drogas, membranas utilizadas em diálise, cobertura para feridas, pele artificial, dispositivos cardiovasculares e reparos cirúrgicos, aproveitando de sua excelente resistência mecânica, biocompatibilidade e baixa toxicidade (YAMAOKA et al., 1995; PEREIRA et al., 2000; CHIellini et al., 2003; TANG et al., 2007).

O objetivo desse trabalho foi a obtenção de matrizes híbridas porosas tridimensionais com estrutura a base de vidro bioativo, reforçadas com uma fase orgânica nanoestrutura de PVA, para suportar solicitações mecânicas compatíveis àquelas presentes em defeitos ósseos medulares. Essas matrizes receberam tratamento químico para viabilizar sua introdução em meio de cultura para crescimento celular. Os materiais produzidos foram caracterizados morfológica e quimicamente durante as várias etapas do preparo, bem como foram avaliadas as características de viabilidade celular e degradação em meios aquosos.

2. OBJETIVO

Produzir material com morfologia e composição, que permitam sua utilização na engenharia de tecido ósseo ou como material de implante, fornecendo estrutura temporária para a colonização e crescimento celular, no processo de reparação de ossos medulares.

2.1. Objetivos Específicos

- Fabricar matrizes porosas tridimensionais com estrutura à base de poli (álcool vinílico)/vidro bioativo.
- Promover a reticulação da estrutura do híbrido com glutaraldeído e avaliar as modificações físico-químicas ocorridas.
- Determinar as características microestruturais das matrizes híbridas através de análise da distribuição do tamanho dos poros e do formato e interconectividade entre os poros.
- Avaliar a resistência mecânica das matrizes híbridas tridimensionais, através de ensaio de compressão.
- Verificar por meio de ensaio *in vitro* a taxa cinética de degradação que as matrizes sofrem em meio aquoso, através de ensaios de perda de massa.
- Conduzir ensaios *in vitro* de adesão e viabilidade celular, através de contato direto dos híbridos, utilizando a técnica de redução do MTT em cultura de células VERO.
- Avaliar a influência da utilização de nanotubos de carbono como agente de reforço mecânico nas matrizes porosas tridimensionais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Tecido Ósseo

O osso e a cartilagem são os dois tecidos que formam o esqueleto nos vertebrados. Esses dois tecidos contêm tipos específicos de células dispersas na matriz extracelular. Osteoblastos ou células produtoras de osso e osteoclastos ou células que reabsorvem osso, presentes nas matrizes ósseas (Fig.3.1) e os condrócitos na cartilagem. Os osteoblastos são derivados de células mesenquimais e se localizam na superfície do osso. Elas são responsáveis pela síntese das proteínas da matriz, que subsequentemente se torna mineralizada, o processo chamado de formação de novo osso. Os osteoclastos são células de origem hematopoiética que são responsáveis pela reabsorção da matriz extracelular (EMC), processo chamado de reabsorção óssea (MACDONALD & GOWEN, 1993; SIMS & GOOI, 2008).

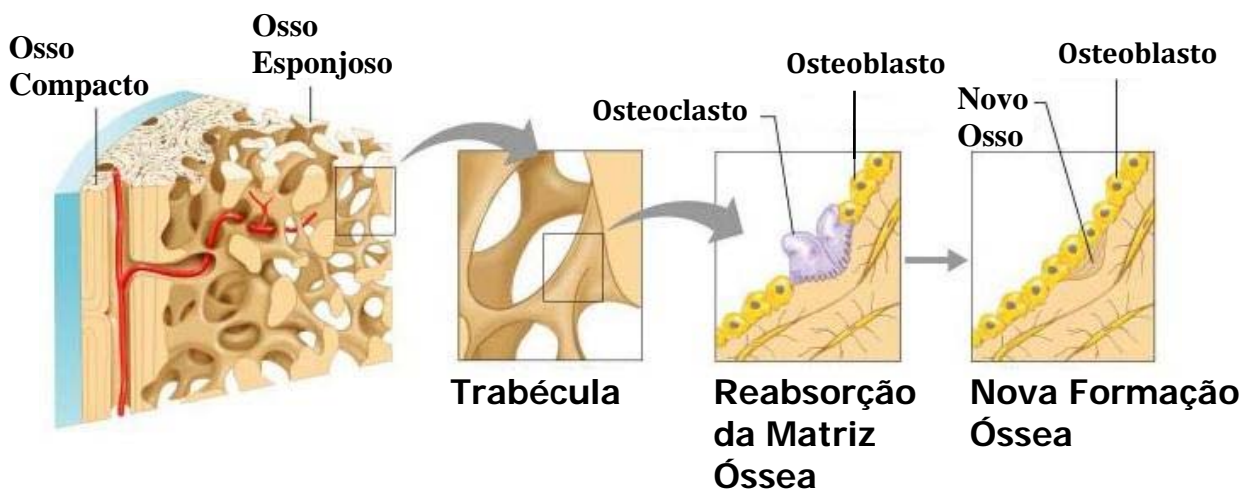


Figura 3.1 – Esquema da remodelação de ossos esponjosos (MARIEB et al., 2008).

As primeiras formas do esqueleto são condensações mesenquimais primitivas que são formadas quando células mesenquimais indiferenciadas migram para áreas destinadas a se tornarem osso. Em ratos, as condensações mesenquimais começam a se formar com 9,5 dias de gestação. Essas condensações mesenquimais podem eventualmente se tornarem osso através de dois processos distintos. Durante a ossificação intramembranosa, células das condensações mesenquimais se

diferenciam diretamente em osteoblastos, sem nenhum estágio intermediário. Os ossos formados através desse processo incluem os ossos frontal, parietal, parte dos ossos temporal e occipital, a maioria dos ossos faciais e as clavículas.

Todos os outros ossos são formados através de ossificação endocondral, que é um processo composto de dois estágios. Após 11,5 dias de gestação, no desenvolvimento embrionário de ratos, células da condensação mesenquimal se diferenciam, primeiro em condrócitos para criar uma matriz cartilaginosa do futuro osso. Esse processo, também chamado condrogênese, dará origem essencialmente a um esqueleto consistindo de elementos cartilagosos. No centro de cada matriz cartilaginosa, células param de se dividir e se tornam condrócitos hipertróficos, ou seja, uma subpopulação de condrócitos margeadas por uma ECM calcificada. A invasão vascular dessa ECM trará osteoblastos progenitores que iram formar o centro de ossificação (MACKIE et al, 2008).

A composição do osso apresenta colágeno, minerais e água arranjados em uma distribuição espacial específica (BURG et al., 2000). O osso compacto contém na média, em peso, cerca de 30% de matriz orgânica e 70% de sais. A matriz orgânica do osso é constituída por 90 a 95% de fibras colágenas, e o restante correspondente a um meio gelatinoso homogêneo chamado de substância fundamental, composta por líquido extracelular mais proteoglicanos, especialmente condroitino sulfato e ácido hialurônico. Os sais cristalinos depositados na matriz orgânica do osso são compostos principalmente por cálcio e fosfato (GUYTON, 1997).

3.2. Análise e Dimensionamento do Mercado de Materiais para Substituição Óssea

Com o aumento da expectativa de vida, as pessoas passaram a ter sua estrutura física sobrecarregada. Embora muitos dos fatores responsáveis pelo envelhecimento não são entendidos, as consequências são muito claras. Os dentes se tornam doloridos e às vezes precisam ser removidos. As articulações passam a apresentar artrose, os ossos se tornam frágeis e quebram. A capacidade da visão e da audição diminuem e podem ser perdidas. O sistema circulatório mostra sinais de aterosclerose e o coração perde o controle do seu ritmo de batimento vital ou suas válvulas se tornam danificadas. Tumores aparecem em ossos, mamas, pele e órgãos vitais. Além disso, há ainda a possibilidade de mutilação, esmagamento, quebra e desfiguração do corpo humano com veículos motorizados, armas e ferramentas potentes ou mesmo como resultado da prática de esportes. Como consequência dessas causas, naturais ou não, de deterioração do corpo humano, é

que entre dois e três milhões de dispositivos artificiais e próteses são implantadas em indivíduos nos Estados Unidos a cada ano.

Dados recentes colocam os gastos com saúde nos Estados Unidos acima de 2,5 trilhão de dólares (HCUP, 2010). Danos e doenças relacionadas ao sistema esquelético representam uma parcela significativa desse custo. De acordo com dados de 2004 o custo com saúde e utilização de planos nos Estados Unidos foi de aproximadamente um milhão e duzentos mil acessos para os três procedimentos mais prevalentes (reconstrução de joelho, de quadril e fraturas vertebrais), com um custo efetivo de mais de 17 bilhões de dólares (HCUP, 2007). O custo para fraturas de crânio e faciais contribuíram com 1,3 bilhão de dólares adicionais. De todas fraturas aproximadamente 10% são complicações com cicatrização defeituosa (LOGEART-AVRAMOGLOU et al., 2005)

Na área da ortopedia, traumatismo de juntas ósseas consiste em um dos maiores problemas, abrangendo mais de 500.000 procedimentos de reparo realizados anualmente nos Estados Unidos, a um custo de centenas de milhões de dólares (HOOTMAN & HELMICK, 2006). Além disso, estima-se que o mercado para produtos e serviços envolvendo terapias celulares e/ou engenharia de tecidos foi de cerca de US\$ 24,6 bilhões em 2005 e que possa chegar a US\$ 68,9 bilhões em 2010. (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2001).

As estatísticas no Brasil mostram que em 2004, os gastos do Sistema Único de Saúde (SUS) com ortopedia totalizaram cerca de 60 milhões de reais, sendo que somente o procedimento de artroplastia total de quadril gerou um gasto de quase R\$ 30 milhões na compra de próteses. Somado a isso, houve ainda cerca de 1500 cirurgias de revisão, somente em 2004, responsáveis por um gasto adicional de quase R\$ 7 milhões em próteses (SOARES, 2005).

Dentre as áreas que podem ser beneficiadas com a engenharia de tecidos, podemos citar a de transplante de tecidos e órgãos. Os recursos públicos empregados no Brasil para a realização de transplantes são muito expressivos e crescentes. A título de exemplificação, pode-se tomar por base o valor gasto com as cirurgias de transplantes em 2004, que chegou a aproximadamente 155 milhões de reais. Se forem considerados, além dos gastos com transplantes, procedimentos associados e medicamentos, esse valor aumenta para 400 milhões de reais (VILAÇA, 2006), indicando a importância dessa área no setor da saúde.

3.3. Engenharia de Tecido Ósseo

Nas últimas duas décadas procedimentos aplicando engenharia de tecidos e medicina regenerativa têm sido alvo estratégico no desenvolvimento de protocolos que possam suprir o potencial regenerativo do próprio corpo suficientemente para restaurar por longos períodos, tanto a integridade estrutural como a funcionalidade de tecidos ósseos danificados.

A engenharia de tecidos combina os princípios da seleção de biomateriais e manipulação de células para desenvolver tecidos substitutos e/ou promover a regeneração endógena. A forma inicial foi concebida para suprir a necessidade gerada pelo enorme crescimento do número de pacientes na lista de espera para transplante de órgãos e o número limitado de doadores de órgãos disponíveis para cada procedimento (LAVIK & LANGER, 2004; NEREM, 2000).

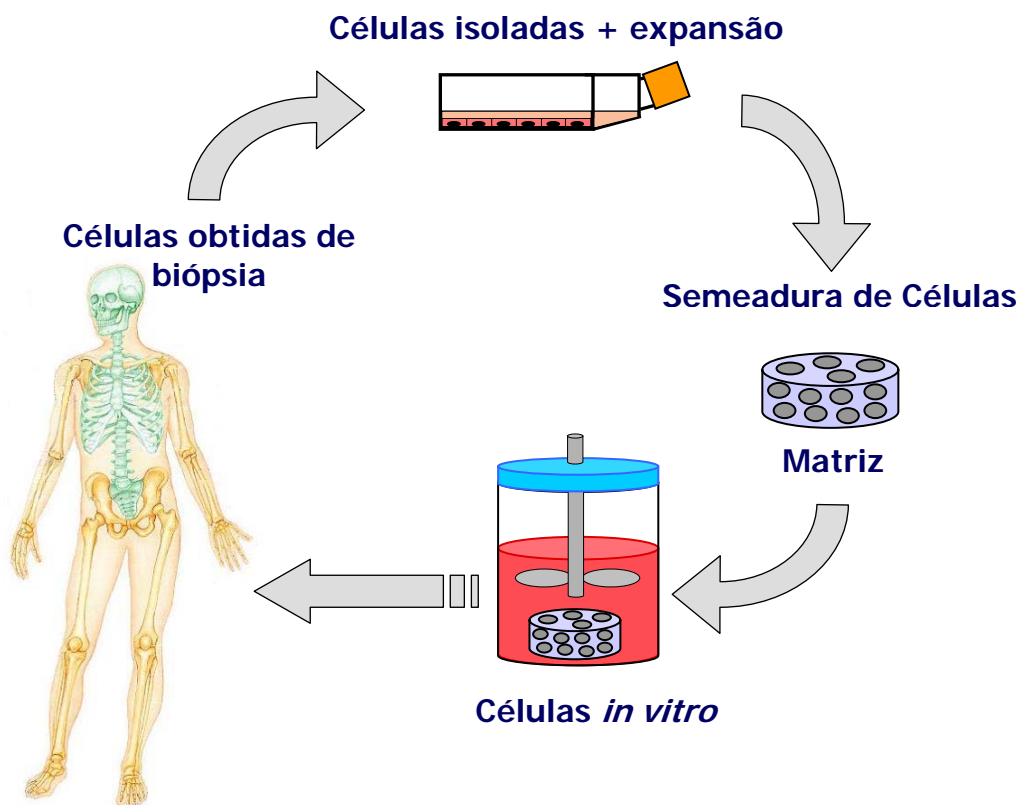


Figura 3.2 – Representação esquemática da engenharia de tecidos.

O conceito básico da engenharia de tecido inclui uma matriz capaz de promover determinada arquitetura na qual células semeadas possam se organizar e desenvolver o órgão ou tecido desejado antes da sua implantação, conforme esquema da figura 3.2. A matriz deve promover um perfil

biomecânico inicial para reposição tissular até que as células produzam uma matriz extracelular adequada. Durante a formação, deposição e organização da nova matriz gerada, a matriz inicial é degradada ou metabolizada, levando eventualmente a um órgão ou tecido vital que restaura, mantém ou melhora as funções teciduais (ULRICH & VACANTI, 2001).

A engenharia de tecidos *in vitro* consiste no desenvolvimento de estruturas na forma de tecidos, onde células crescem e se organizam em matrizes tridimensionais.

De outra forma, engenharia de tecidos *in vivo* tem por objetivo recriar um ambiente biológico favorável para a regeneração de tecidos, promovido por aqueles elementos biológicos que são fornecidos pelo corpo. Os elementos básicos de um tecido, ou seja matriz extracelular, células e moléculas sinalizadoras, devem ser guiados através da engenharia de tecidos para reparar defeitos. Nesse contexto, numerosas estratégias da engenharia de tecidos são baseadas no uso de matrizes que mimetizam a matriz extracelular e atuam como molde temporário para proliferação e diferenciação de células. As matrizes devem promover não somente suporte mecânico para as células, mas também oferecer um microambiente de moléculas sinalizadoras capazes de conduzir as células para regeneração de um tecido funcional.

3.3.1. Matrizes na Engenharia de Tecidos

A matriz ideal para a engenharia de tecidos deve promover (i) uma arquitetura com forma bem definida e resistência mecânica satisfatória, (ii) porosidade altamente interconectada com estrutura de poros abertos para permitir semeadura de um elevado número de células bem como o transporte eficiente de nutriente e metabólitos necessários para a sobrevivência das células, (iii) condução para uma resposta biológica capaz de promover interações dinâmicas com os tecidos vizinhos, (iv) biocompatibilidade adequada, tanto em termos de resposta tecidual como resposta sistêmica e biodegradabilidade, com cinética de degradação aceitável para promover suporte durante o período necessário para o total crescimento do novo tecido.

De uma forma geral a matriz ideal para crescimento celular na engenharia de tecidos deve também favorecer a adesão, crescimento e diferenciação celular, revascularização, integração e remodelação gradual da matriz por novo tecido. Ela deve ser esterilizável sem perda das suas propriedades e não desencadear efeito deletério ao tecido do hospedeiro (BURG et al, 2000).

Tais características se refletem em uma matriz que deve promover um ambiente para o desenvolvimento dos tecidos. Dentre as questões referentes às características das matrizes, os materiais utilizados devem apresentar-se como não mutagênicos, não antigênicos, não carcinogênicos, não tóxicos, não teratogênicos e possuem alta biocompatibilidade com células/tecidos (WILLIAMS, 2008). Além disso, importância deve ser dada às propriedades macro e microestruturais. Tais propriedades afetam não somente a sobrevivência, sinalização, crescimento, propagação e reorganização das células, mas também desempenham funções importantes, influenciando a modelagem da forma da célula e a expressão gênica para o crescimento celular e preservação do fenótipo nativo (CHUNG & PARK, 2007).

Essas características macro e microestruturais essenciais das matrizes para o rápido crescimento celular referem-se a uma macroestrutura temporária tridimensional que mimetize as funções fisiológicas naturais (Fig. 3.3), porosidade e interconectividade de poros que permita o crescimento celular e apresente espaço suficiente para neovascularização, tamanho de poro suficiente para penetração e colonização das células na matriz, área superficial e química de superfície que permitam acomodar um grande número de células para restaurar a função e finalmente propriedades mecânicas suficientes para manter o espaço requerido para o crescimento celular durante os estágios iniciais de regeneração (LEONG et. al., 2003).

Além disso, aplicações promissoras na engenharia de tecidos dependem de materiais que sejam reabsorvidos ou degradem nos fluidos corporais, de modo que os dispositivos ao final tenham desaparecido sem causar efeitos deletérios (GRIFFITH, 2000; ORLOFF et. al., 1997). Esse processo de degradação deve ocorrer de forma que os materiais sejam eliminados ou metabolizados sob condições fisiológicas, através de mecanismos controlados, em produtos facilmente excretados através de caminhos metabólicos do corpo (VERT, 2007; AZEVEDO & REIS, 2009).

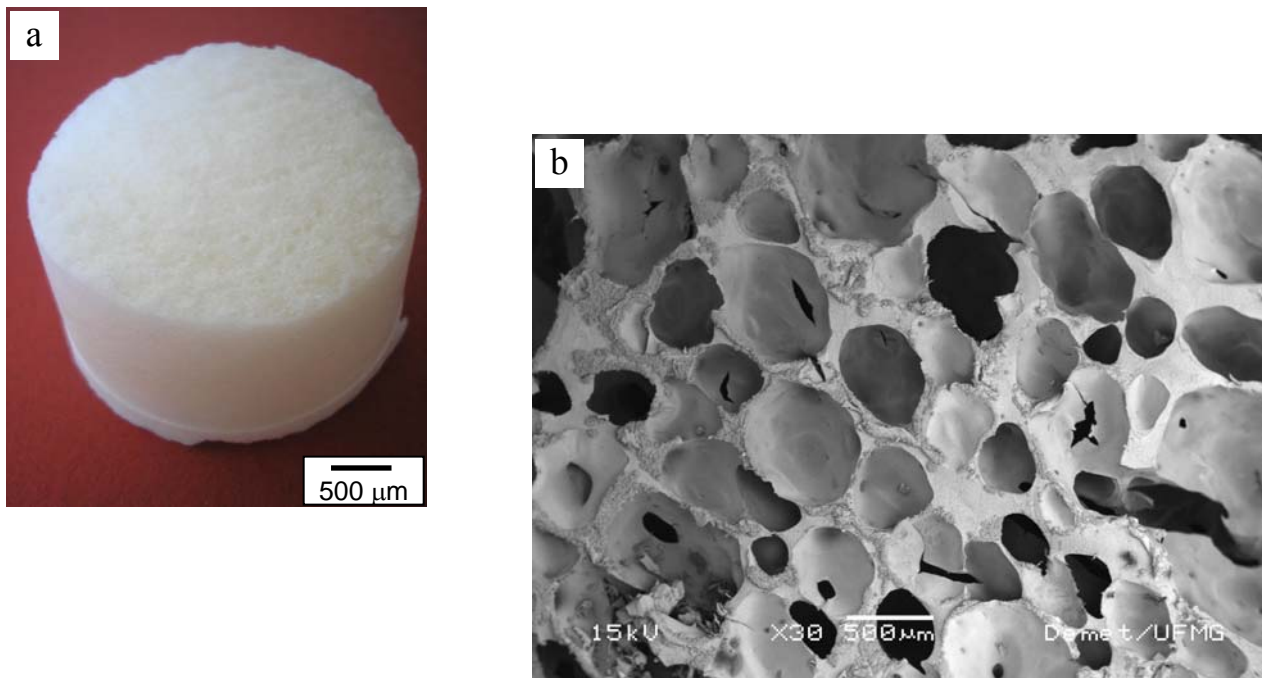


Figura 3.3 – (a) Fotografia ótica de matriz tridimensional e (b) imagem de MEV obtido através de elétrons retroespalhados de híbrido 70% PVA/ 30% BaG (MANSUR & COSTA, 2008).

O termo degradável pode ser atribuído a materiais que degradam durante sua aplicação, apresentado como mecanismos principais a degradação química via hidrólise ou hidrólise catalisada por enzimas (GOPFERICH, 1996).

O processo de degradação envolve a erosão do polímero, onde a água entra na estrutura volumétrica do material e promove seu inchamento. A intrusão de água dispara a degradação química do polímero, levando a formação de oligômeros e monômeros. A degradação progressiva altera a microestrutura do material, resultando na formação de poros, na medida em que oligômeros e monômeros são liberados. Esse processo é capaz de alterar o pH do microambiente e levar à perda de massa do dispositivo. (GOPFERICH, 1996; SACKETT & NARASIMHAN, 2011).

O tempo de eliminação do material in vivo é determinado pela natureza das ligações químicas dos polímeros, da solubilidade dos produtos de degradação, do tamanho, forma e densidade dos dispositivos, do peso molecular do polímero e do local da implantação (ORLOFF et. al., 1997, SINGH & SHARMA, 2008). Polímeros reabsorvíveis gradualmente se dissolvem em meios

apropriados e são eliminados pelos rins ou através de outros mecanismos de excreção (GRIFFITH, 2000).

3.3.2. Adesão de Osteoblastos em Materiais Sintéticos

Adesão celular está envolvida em vários fenômenos naturais como a embriogênese, manutenção da estrutura tissular, cicatrização de feridas, resposta imunológica, metástase, bem como na integração tecidual com o biomaterial. Para a adesão celular e particularmente a adesão de osteoblastos no material é essencial otimizar a interface osso/biomaterial nos materiais híbridos (MEYER et al., 2004).

Na determinação das proteínas envolvidas no processo de adesão de células ósseas, são utilizados experimentos com cultura de células ósseas realizados em placas cobertas com proteínas da matriz extracelular. A partir disso os resultados indicam que osteoblastos humanos aderem preferencialmente à fibronectina se comparado com colágenos do tipo I e do tipo IV, e vitronectina, mas fracamente à laminina e colágeno do tipo V. Ao contrário, eles não aderem ao colágeno do tipo III.

Depois de aderidas as células buscam se projetar para colonização das superfícies. Os eventos para a migração celular requerem uma interação dinâmica entre as células e o substrato, com participação do citoesqueleto. Primeiramente, as células desenvolvem uma protrusão da sua borda para formar um prolongamento citoplasmático. Em seguida após a formação e fixação do prolongamento citoplasmático, a célula usa interações adesivas para gerar tração com necessidade de gasto de energia para o movimento celular. O último passo do ciclo migratório é a liberação das adesões formadas na retaguarda da célula, seguido pelo descolamento e retração. Portanto várias etapas importantes referentes as interações das células com a estrutura do material desempenham papel fundamental para o sucesso do processo de reparo através da engenharia de tecidos (ANSELME, 2000).

3.3.3. Materiais Sintéticos

Cerâmicas e metais são as maiores categorias de substitutos para osso, disponíveis para reparar defeitos esqueléticos, cada um com seus problemas associados. Metais promovem suporte mecânico imediato, mas por vezes falham na integração com os tecidos adjacentes (SALGADO et al., 2004). Metais têm também alto risco para infecções e esforços de fadiga. Cerâmicas, mimetizam a composição inorgânica do osso, tendem a integrar bem, mas possuem baixa resistência a tração e são muito frágeis (TEMENOFF & MIKOS, 2000). Numerosos outros materiais sintéticos têm sido desenvolvidos para ajudar na reconstrução óssea, incluindo o uso de substitutos a base de polímeros e vidros bioativos.

A formulação de compósitos polímero/cerâmica pode compensar a fragilidade e melhorar a biodegradabilidade e liberação de drogas das cerâmicas, entretanto a resistência a compressão e a atividade biológica do polímero adicionado são freqüentemente inferiores. Biopolímeros como quitosana, gelatina e colágeno são freqüentemente introduzidos em formulações de cimentos de fosfato de cálcio para melhorar a coesão *in vivo*. Partículas cerâmicas podem também ser adicionadas a carreadores poliméricos para melhorar ou introduzir propriedades osteogênicas. Além disso, as taxas de degradação podem ser ajustadas pela mudança da massa molecular ou densidade de ligações cruzadas de polímeros (HABRAKEN et al., 2007; YUNOS et al., 2008).

3.3.3.1. Vidro Bioativo

Tecidos naturais exibem a capacidade de se reparar e são gradualmente restabelecidos durante toda a vida através de uma contínua renovação das populações celulares. Quando algum material é utilizado como implante o organismo apresenta uma resposta, sendo que nenhum material implantado nos tecidos vivos é inerte, todos exibem uma resposta por parte dos tecidos vivos. Um material bioativo é um material que exibe uma resposta biológica específica na interface do material, que resulta na formação de uma ligação entre os tecidos e o material (HENCH, 1991).

A sequência de eventos relacionados com a reatividade *in vitro* e *in vivo* de vidros bioativos, e que é responsável pela capacidade desses materiais se ligarem com o osso envolve a liberação de cátions do vidro com a conseqüente elevação do pH do microambiente, seguida pela formação de camada

rica em sílica e precipitação de camada rica em Ca-P, que futuramente se cristaliza como hidroxiapatita (HAC) (CERRUTIA et. al., 2005; ZEITLER & CORMACK, 2006).

A camada ativa da fase HAC que se forma na superfície de implantes bioativos é química e estruturalmente equivalente à fase mineral no osso e é essa equivalência a responsável pela ligação interfacial entre o material e os tecidos (HENCH, 1991).

Na obtenção dos vidros bioativos uma técnica utilizada é o processo sol-gel (Fig. 3.4). A evolução da síntese através do processo sol-gel requer uma combinação de precursores de alcóxidos metálicos $[M(OR)_n]$ e água, onde M é o elemento inorgânico formador de rede e R é tipicamente um grupo alquila. As propriedades dos compósitos de híbridos orgânico-inorgânicos são resultado da rica interação entre os componentes e são fortemente influenciadas pela escala de tamanho das fases constituintes (tamanho e forma) e também pelas interações interfaciais. Os parâmetros de reação que influenciam a química do processo sol-gel são o pH da solução, a razão entre os moles de silício e água, os catalisadores, os solventes e a temperatura da reação (BANDYOPADHYAY et al., 2006).

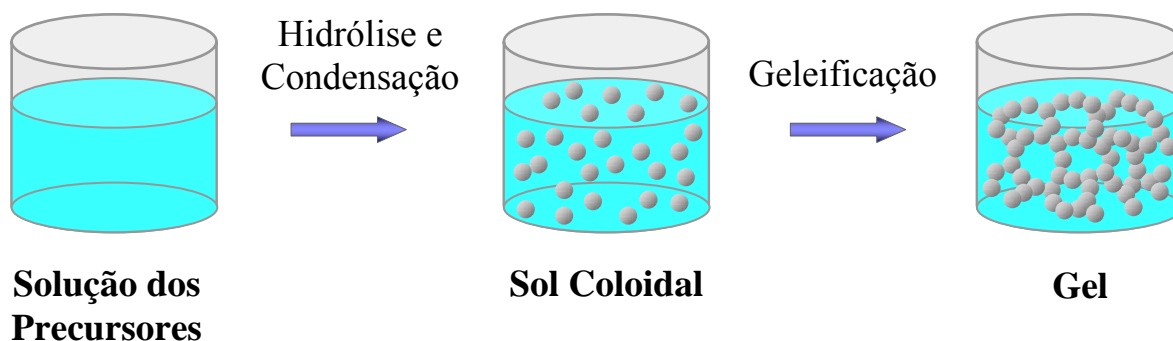


Figura 3.4 – Esquema mostrando o princípio do processo sol-gel (GUPTA & KUMAR, 2008).

A ligação com o osso foi primeiro demonstrada para certa faixa composicional dos vidros bioativos que continham SiO_2 , Na_2O , CaO e P_2O_5 em proporções específicas: (1) menos que 60% em mol de SiO_2 ; (2) altos teores de CaO e de Na_2O e (3) alta razão entre CaO/P_2O_5 . Essas características composicionais tornam a superfície reativa quando expostas em meio aquoso (PEITL et al., 2001).

Além das composições de silício, fósforo e cálcio alguns elementos podem incorporar características favoráveis para os vidros bioativos. O zinco foi introduzido em vidros e vidros cerâmicos obtidos via processo sol-gel, sendo que a adição de zinco influenciou na deposição de hidroxiapatita e na proliferação de osteoblastos. O ZnO nos vidros cerâmicos mostrou um efeito estimulador na proliferação de osteoblastos, sendo que os íons zinco foram o fator chave para esse efeito estimulatório (DU et al., 2006). Vidros cerâmicos contendo microcristais de fluorapatita também possuem biocompatibilidade e bioatividade. Esses biomateriais podem ser facilmente processados em dispositivos protéticos com diferentes formas para aplicação clínica (CHEN et al., 1998).

3.3.3.2. Poli(álcool vinílico) (PVA)

Uma grande variedade de materiais naturais e sintéticos, ou uma combinação de ambos têm sido investigadas no desenvolvimento de matrizes para utilização na engenharia de tecido (LIU et al., 1999; HUTMACHER, 2000; HERATH et al., 2005; DRURY & MOONEY, 2003). Dentre os vários materiais, polímeros sintéticos degradáveis têm atraído atenção, onde o poli(álcool vinílico) (PVA) se destaca por suas características favoráveis para aplicações médicas como elevada hidrofília, formação de filmes e processabilidade (KANEKO et al., 2005; KARAGEORGIU & KAPLAN, 2005; PEREIRA, 2005; MANSUR & COSTA, 2008; COSTA et. al., 2008a; COSTA et. al., 2008b; COSTA et. al., 2008c; COSTA et. al., 2008d).

Poli(álcool vinílico) (PVA) é a resina sintética, solúvel em água, produzida em maior volume no mundo. Foi obtido pela primeira vez em 1924, por Herrman e Haehnel, pela hidrólise do poli acetato de vinila, que é a forma de obtenção comercial utilizada até hoje (Fig. 3.5) (ARANHA & LUCAS, 2001). O PVA tem uma cadeia de carbono vinílico e um grupo lateral hidroxila, que se liga facilmente às partículas de óxido (SAY et. al., 2002).

O PVA comercial é frequentemente um copolímero de poli (álcool vinílico) e poli acetato de vinila, do qual o álcool está na forma hidrolisada. Geralmente o grau de hidrólise está na faixa de 87-89% e o PVA é então chamado parcialmente hidrolisado. A outra forma, totalmente hidrolisada, tem um grau de hidrólise de 98-99%.

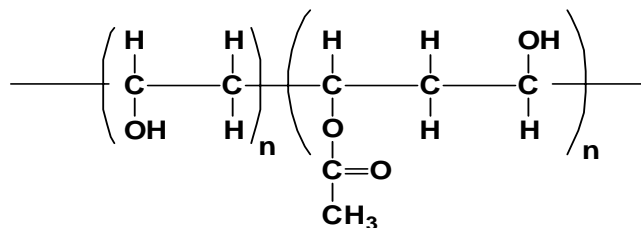


Figura 3.5 – Fórmula química do poli (álcool vinílico-co-acetato de vinila).

Tanto as propriedades físicas do PVA quanto as químicas dependem largamente do grau de hidrólise e do peso molecular (MANSUR et al., 2008). A solubilidade em água aumenta com o número de grupos acetato (FINCH, 1973), como resultado do caráter fraco das ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares. A temperatura de transição vítrea e a resistência à tração são diminuídas com a diminuição do grau de hidrólise. Outras propriedades influenciadas pelo grau de hidrólise e também importantes para o processamento são a viscosidade e a tensão superficial.

A viscosidade e a tensão superficial são diminuídas em PVA's parcialmente hidrolisados. Dentre os plastificantes comuns para o PVA temos glicerol, polietileno glicol e poli propileno glicol. A água é também um plastificante do PVA, sendo importante ter controle total do conteúdo de água das misturas (KRISTOFFERSSON et al., 1998).

O mecanismo de dissolução de polímeros semicristalinos, dentre eles o PVA, ocorre de forma que na presença de solventes termodinamicamente compatíveis, os cristais do polímero desdobram camada por camada e se juntam à região amorfa adjacente. Esse processo é seguido pela distensão da cadeia na região amorfa, que leva à dissolução do polímero (MALLAPRAGADA & PEPPAS, 1996).

O PVA, como outros polímeros não aniônicos solúveis em água, é caracterizado pela baixa toxicidade (KARAGEORGIU & KAPLAN, 2005). Ele também apresenta propriedades elásticas favoráveis e disponibilidade de sítios para adesão de moléculas bioativas (THAMARASELVI & RAJESWARI, 2004; ANDRADE et al., 2008; MANSUR & COSTA, 2008; COSTA et al., 2008d). Dentre as várias aplicações, o PVA tem sido proposto como biomaterial promissor para ser empregado como cartilagem (HENCH, 1991; JONES et al., 2005), córneas oculares (MANSUR et

al., 2004), cicatrização de feridas (BANDYOPADHYAY et al., 2006) e na engenharia de tecido (THAMARAISELVI & RAJESWARI, 2004).

3.4. Caracterização Físico-Química de Materiais

A realização da caracterização de materiais se fundamenta na necessidade de identificar padrões de comparação que possam ser estabelecidos para os materiais e que permitam identificar as estruturas encontradas nos diversos níveis de organização e relacioná-las com fatores que possam ser importantes na seleção para proporcionar um melhor desempenho. Inúmeras são as técnicas utilizadas na caracterização dos materiais, dentre as quais podemos citar: a análise química por espectroscopia de absorção na região do infravermelho; análise microestrutural por microscopia ótica e eletrônica de varredura, complementada através de análise química pontual utilizando detector de energia dispersiva, além da análise cristalina realizada por difração de raios X (DRX).

A espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) representa uma técnica importante na determinação dos grupos funcionais de um dado material. A região espectral do infravermelho compreende radiação com número de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a 10cm^{-1} ou comprimento de onda de 0,78 a $1000\mu\text{m}$. Sendo assim, a radiação IV tem baixa energia e é absorvida somente por moléculas com ligações covalentes em que as vibrações e as rotações podem mudar o momento dipolo. Cada grupo absorve em frequência característica de radiação na região do IV. Assim, um gráfico de intensidade de radiação versus frequência, o espectrograma de IV, permite caracterizar os grupos funcionais de um padrão ou de um material desconhecido (SKOOG et al, 2002). Desta forma a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é útil para detectar componentes que contêm átomos de hidrogênio ligados a heteroátomos (C-H de ligações alifáticas e aromáticas, ligações N-H de proteínas e ligações O-H presentes em álcool e água) (PONS et al, 2004).

Considerando a composição dos híbridos a serem estudados, cuja formulação contém vidro bioativo e o PVA com sua estrutura orgânica e presença de grupos álcool, o FTIR é uma ferramenta com indicação para analisar características relacionadas a esses híbridos.

Dentre as várias técnicas de caracterização de materiais, a técnica de DRX é a mais indicada na determinação das fases cristalinas presentes em uma amostra. Isto é possível porque na maior parte

dos sólidos (cristais), os átomos se ordenam em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X. Ao incidir um feixe de raios X em um cristal, o mesmo interage com os átomos presentes, originando o fenômeno de difração (PICCOLI et al., 2006).

A difração de raio X é um método de grande importância na elucidação de estruturas de produtos naturais com estrutura complexa, tais como os esteróides, as vitaminas e os antibióticos. Ela fornece também um meio conveniente e prático para a identificação qualitativa de compostos cristalinos. Além disso, o método de difração de raios X usando amostras policristalinas é capaz de fornecer informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos presentes em uma amostra sólida (SKOOG et al, 2002). Dentre outras aplicações tem-se a determinação e acompanhamento de diagramas de fases e o efeito da deformação nas redes cristalinas (AFONSO, 2003).

3.5. Ensaio *in vitro* e *in vivo* de Materiais de Implante

Estudos *in vitro* em soluções sintéticas são correntemente praticados como o primeiro estágio para estimar o comportamento superficial *in vivo* de materiais de implante. Provavelmente, a solução mais popular de estudo *in vitro* na bioatividade de materiais é a *simulated body fluid* – SBF (fluido de simulação corporal). Essa solução aquosa tem o valor de pH igual a 7,4 e contém em sua composição as concentrações conforme a tabela 3.1, sendo a concentração de íons inorgânicos aproximadamente igual ao plasma humano. MARQUES et al. (2004) relatam que essa solução constitui um método rápido, fácil e conveniente para avaliação de novos materiais de implantes bioativos.

Tabela 3.1 – Concentração iônica do plasma sanguíneo e do SBF (mmol/l)

	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma Sanguíneo	142,0	3,6 – 5,5	1,0	2,1 – 2,6	95,0 – 107,0	27,0	0,65 – 1,45	1,0
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	148,8	4,2	1,0	0,5

Fonte: KOKUBO et al., 1990.

Outro estudo usado é o ensaio de biocompatibilidade *in vitro*, que tem como objetivo simular reações biológicas para materiais que são usados sobre ou dentro dos tecidos do corpo. Esses métodos oferecem formas mais baratas de inspeção de novos materiais desenvolvidos, reduzindo a

probabilidade de condições inesperadas quando ensaios usando animais ou ensaios clínicos são realizados. Sem estudos laboratoriais, os ensaios *in vivo* usando animais poderão consumir muito tempo e dinheiro (HANKS, 1996).

Há inúmeros problemas envolvidos com o desenvolvimento de modelos *in vitro* de biocompatibilidade. Os maiores problemas são discernir reações biológicas significativas *in vivo* para o qual os ensaios de simulação possam ser delineados e desenvolver ensaios *in vitro* que sejam relativamente simples de realizar e que produzam resultados consistentes (HANKS, 1996).

Um exemplo de ensaio de biocompatibilidade consiste em avaliações, nas quais materiais em estado natural ou polimerizados são colocados diretamente em cultura de células ou sobre uma membrana colocada sobre cultura de células, que reajam aos efeitos dos produtos ou componentes capazes de escapar através das barreiras. Muitos produtos que são inicialmente considerados citotóxicos podem ser modificados ou então o seu uso pode ser controlado pelo fabricante para evitar a citotoxicidade. Nestes ensaios podem ser usadas células de mamíferos ou de não-mamíferos, bactérias, levedos ou fungos, para determinar se há mutação gênica. Esses ensaios avaliam também mudanças na estrutura cromossômica ou mudanças genéticas que são causadas pelo material ensaiado, dispositivos ou extratos dos materiais (ANUSAVICE, 1998).

A biocompatibilidade de um material *in vivo* pode ser avaliada através da análise da população celular presente, pela medição de mediadores e metabólitos excretados pelas células ou analisando as características morfológicas dos tecidos ao redor do implante (HUNT; WILLIAMS, 1995; HARADA et al., 1996).

Como ensaio *in vivo*, pode-se lançar mão da utilização de implantes. O uso da técnica de implantação *in vivo* também leva em consideração as características físicas do produto, como forma, densidade, dureza e acabamento superficial, que podem influenciar na caracterização da reação do tecido. A espécie animal é selecionada de acordo com o tamanho da amostra do ensaio de implante e conforme a duração prevista do ensaio em relação ao período de vida do animal. Para ensaios de curta duração (de mais ou menos 12 semanas) em tecido subcutâneo ou músculo, são comumente usados camundongos, ratos, hamster, porquinho-da-índia e coelho. Para testes de longa duração (12 semanas ou mais) em músculo ou osso, são usados coelhos, cachorros, carneiros, cabras e primatas com expectativa de vida relativamente longa (ANUSAVICE, 1998).

Além desses ensaios, são usados ensaios em humanos. Nessa fase, ensaios pré-clínicos empregando um produto podem ser aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) após passar com sucesso pelos ensaios primários e secundários, considerando-se então que o produto não é prejudicial aos seres humanos. Em relação aos medicamentos, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a FDA exigem que ensaios de eficácia e de uso sejam completamente verificados e conduzidos (ANUSAVICE, 1998).

Defeitos ósseos de tamanho crítico são defeitos que falham na cicatrização quando nenhum tipo de intervenção é realizada. Alguns ensaios buscam reproduzir os defeitos críticos, procurando compreender os eventos relacionados e as alternativas que podem resolver essa injúria. Os tipos comuns de defeitos incluem defeitos de calvária e defeitos segmentais de ossos longos ou mandibulares (SALGADO et al., 2004). O modelo da calvária é particularmente útil na avaliação de dispositivos para defeitos craniofaciais, dada à manipulação relativamente fácil das placas da calvária e ao suporte promovido pelo osso intacto adjacente, minimizando a necessidade da fixação. Ele é também um modelo relativamente sem carga mecânica, minimizando a influência de forças exógenas, na investigação de elementos celulares específicos. Defeitos segmentais de ossos longos podem ser criados no rádio e em situações onde o carregamento dos dispositivos é desejável, também podem ser usados os defeitos de fêmur. Todos esses modelos permitem exame radiográfico serial através do uso de modalidades como a tomografia computadorizada. Entretanto a histologia permanece a ferramenta padrão ouro na avaliação da eficácia dos dispositivos biomédicos.

3.6. Nanotubos de Carbono

A descoberta de nanotubos de carbono (NTC) ocorreu em 1991, por Sumio Iijima, ao avaliar a fuligem resultante da obtenção do fulereno (IJIMA, 1991). O nome nanotubos de carbono é derivado do seu tamanho que é de apenas alguns nanômetros de largura, ou seja, 10.000 vezes mais fino que um cabelo humano. Nos nanotubos os átomos de carbono são arranjados de maneira tubular e representam um tipo de fibra de carbono que compreende cilindros coaxiais formados por unidades de carbono sp^2 ligadas covalentemente numa rede hexagonal (MELISSA et al., 2007); (HONGJIE, 2002)

Há dois tipos principais de nanotubos de carbono classificados de acordo com o número de camadas. Os nanotubos de parede simples (SWNT) consistem de uma camada simples de grafite

enrolada sem costura com um diâmetro típico em torno de 1,4nm (MELISSA et al., 2007). Nanotubos de parede múltipla (MWNT) consistem de um arranjo de tais cilindros formados concentricamente e separados por 0,35nm, de maneira similar à separação do plano basal no grafite. MWNT's podem ter diâmetros de 2 a 100 nm e comprimento de dezenas de micrometros (JONATHAN et al., 2006). A figura 3.6 ilustra a estrutura dos SWNT e MWNT:

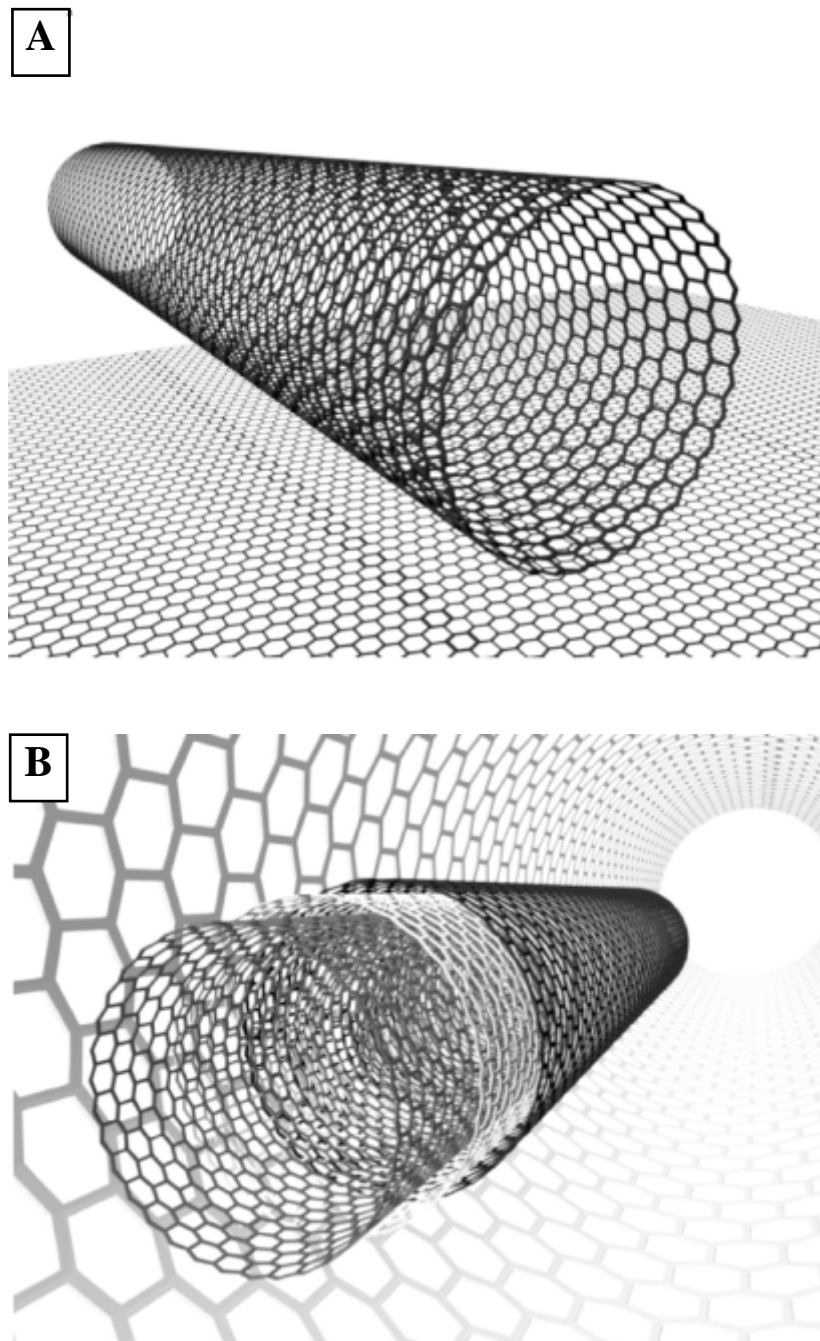


Figura 3.6 – Estruturas dos SWNT (A) e MWNT (B) (FERREIRA & RANGEL, 2009)

As três principais técnicas para a produção de NC são (THOSTENSON et. al., 2001)

- a) descarga por arco elétrico;
- b) ablação por laser (THESS et. al., 1996);
- c) deposição química de vapor (CVD) .

Os processos de descarga por arco elétrico e ablação por laser promovem a deposição de átomos de carbono sublimados gerados pela evaporação de fonte de grafite sólido. O mecanismo básico do processo CVD é a dissociação de moléculas de hidrocarbonetos cataliticamente fazendo com que os nanotubos sejam depositados em um substrato e cresçam a partir desse substrato em poucos milisegundos (SEN et. al., 2001).

Dentre as propriedades apresentadas pelos NTC se destacam a elevada flexibilidade, baixa densidade e elevada razão de aspecto (tipicamente >1000). Alguns dados experimentais publicados indicam módulo de elasticidade e resistência a tração extremamente elevados (ZDENKO et. al., 2010). Um nanotubo de carbono tem um módulo de Young de 1,2 TPa e resistência a tração aproximadamente 100 vezes maior que o aço e pode apresentar elevada deformação antes da falha mecânica (YAKOBSON et. al., 1997). Nanotubos de carbono de parede simples podem ser metálicos ou semicondutores e podem transportar elétrons por grandes comprimentos o que fazem deles agente de reforço ideal em várias aplicações de engenharia.

O enorme interesse da comunidade científica na utilização de NTC's está relacionado à capacidade potencial desses materiais servirem como reforço em compósitos. Entretanto alguns fatores podem interferir na sua performance como: (1) dificuldade de dispersão do NTC's em matriz polimérica, devido ao fato desses tenderem a se aglomerarem, (2) somente pequenas quantidades de NTC's foram utilizadas até o momento, entre 0,1 e 5 % em peso, e (3) baixa adesão, ou seja, ligação insuficiente na interface nanotubos/matriz (AMAL et. al., 2007).

Os NTC's usualmente aglomeram devido às forças de Van der Waals, portanto, como foi dito, um dos desafios no desenvolvimento de compósitos polímero/NTC's é introduzir NTC's na matriz polimérica de maneira a obter dispersão com interação interfacial capaz de transferir carga através da interface NTC/polímero.

A funcionalização química de NTC é uma forma efetiva de prevenir a agregação e ajuda a dispersar e estabilizar os NTC com a matriz polimérica. Dentre as várias técnicas de dispersão podemos destacar a chamada funcionalização covalente que consiste em romper a simetria translacional dos

NTC's pela mudança de átomos de carbono sp^2 para átomos de carbono sp^3 (PARK et. al., 2006). A funcionalização covalente pode ser acompanhada por modificações na superfície. Geralmente grupos funcionais como COOH ou OH são criados nos NTC's durante oxidação por oxigênio, ar, ácido sulfúrico concentrado, ácido nítrico ou misturas ácidas (LIU et. al., 1998; ZHANG et. al., 2004).

Na medida em que os NTC passaram a apresentar solubilidade tanto em solventes orgânicos, como em soluções aquosas, suas aplicações no campo da biologia ganharam mais atenção e passaram a ser estudados em matrizes para aplicações em nanobiotecnologia (ZHANG et. al., 2010; KLUMPP et. al., 2006; ABARRATEGI et. al., 2008). Destaque pode ser dado para materiais preparados com peptídeos conjugados à parede externa dos NTC (KUM et. al., 2007) e sistemas de liberação de drogas (ZHANG et. al., 2009), além da característica já conhecida, onde a adição de NTC se mostra uma forma efetiva de modificar as propriedades mecânicas em hidrogéis (TONG et. al., 2007).

A recente expansão nos métodos para modificação química e funcionalização de nanotubos de carbono tem possibilitado a solubilização e dispersão desses nanotubos em água e facilitado a manipulação e processamento em ambientes fisiológicos (PETROV et. al., 2010; SONG et. al., 2007). De igual importância tem sido também a demonstração que espécies biológicas e bioativas como proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos podem ser conjugados com nanotubos de carbono (MENDES et. al., 2010).

A presença de grupos ácido carboxílico na superfície de nanotubos de carbono após o processo de funcionalização é conveniente, pois uma variedade de reações podem ser conduzidas com esse grupo (NANDA et. al., 2010).

EDC (hidroclorato de 1-etil-(3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) é um agente de ligação cruzada chamada de "zero-length" usado para acoplar grupos carboxil a amins primárias. Tipicamente, EDC é uma carbodiimida altamente solúvel em água empregada na faixa de pH entre 4,0 - 6,0 para ativar grupos carboxílicos para o seu acoplamento com amins primárias (PANA et. al., 2009; YADAV et al., 2010).

A carbodiimida liga-se ao $-COOH$ formando um intermediário O-acilisouréia muito reativo (eletrofílico) que pode sofrer ataque de uma espécie nucleofílica contendo grupo amina, formando assim o conjugado.

A EDC, apesar de muito eficiente na ativação de carboxilas de proteínas, apresenta grande labilidade na presença de meios ácidos (LEI et al., 2002); WROBEL et al., 2002) e de átomos de oxigênio por longos períodos, como os encontrados na água (HERMANSON, 1996). Esses últimos podem agir como nucleófilo e levar a hidrólise do EDC antes da ativação da proteína (HERMANSON, 1996).

Para aumentar a eficiência do acoplamento e diminuir os inconvenientes da hidrólise a EDC é usada frequentemente em combinação com N-hidroxisuccinimida (NHS) ou sulfo-NHS. Esses compostos tornam o intermediário O-acilisouréia mais estável e podem elevar a eficiência da reação de condensação (SEHGAL & VIJAY, 1994; GRABAREK & GERGELY, 1990). As reações envolvidas na conjugação de nanotubos funcionalizados com proteínas são mostradas na figura 3.7.

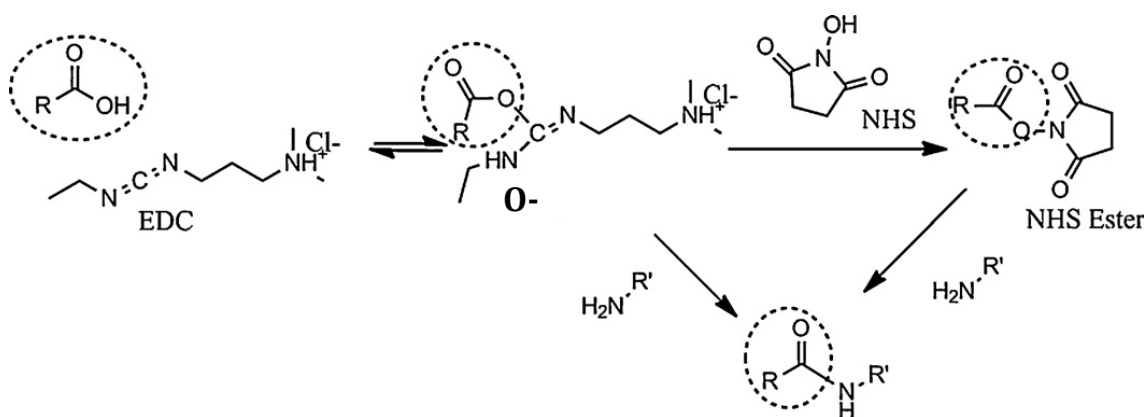


Figura 3.7 – Esquema do acoplamento de um ácido a amina usando EDC como agente de acoplamento. O éster intermediário N-hidroxisuccinimida (NHS) deve ser formado para aumentar a eficiência da reação (NGUYEN et. al., 2010).

EDC pode também ser usado para ativar grupos fosfato e encontra extensa aplicação no preparo de imunogonjugados, síntese de soluções e peptídeos na fase sólida, ligação cruzada de proteínas em ácidos nucleicos, além de outras (PANA et. al., 2009).

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A figura 4.1 apresenta um fluxograma das etapas realizadas na execução do projeto de acordo com os tópicos enumeradas a seguir:

- 1- Análise da Razão PVA/BaG na Obtenção de Híbridos Tridimensionais
- 2- Influência do Grau de Hidrólise do PVA nos Híbridos Obtidos
- 3- Reticulação Química da Estrutura dos Híbridos Buscando Modulação da Degradação
- 4- Tratamento de Estabilização e Bloqueio para Ensaio *in vitro*
- 5- Ensaio Físico/Químicos após Imersão em Água DI

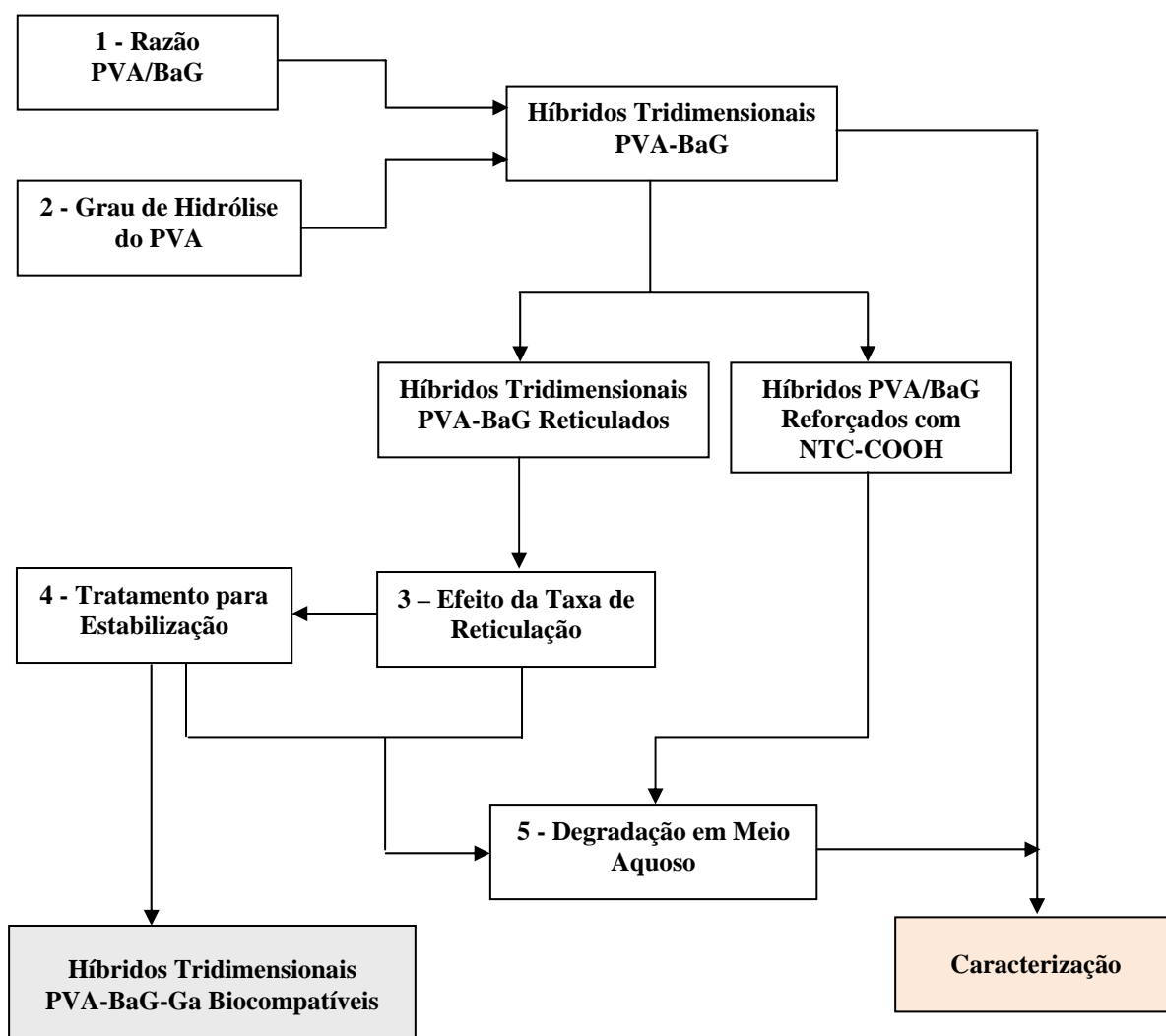


Figura 4.1 – Fluxograma do projeto desenvolvido.

4.1. Síntese de Híbridos PVA/vidro bioativo (PVA-BaG)

A figura 4.2 ilustra o procedimento experimental de síntese e descreve todos os passos realizados no preparo dos híbridos PVA-BaG.

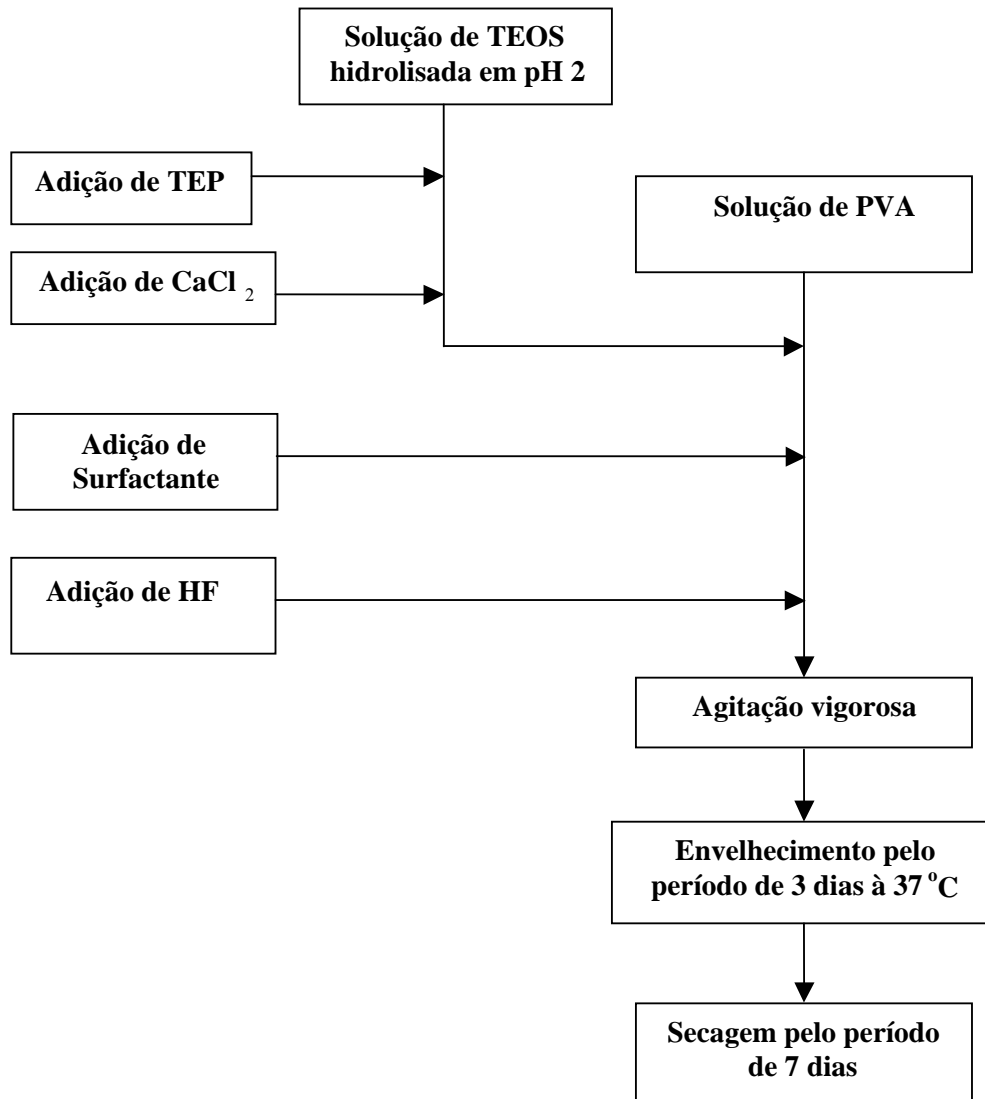


Figura 4.2 – Etapas para o preparo de híbridos de PVA-BaG.

4.1.1. Preparo da Solução de PVA (Sol. PVA)

Foram utilizados dois PVA's de diferentes graus de hidrólise (GH) no preparo das soluções, um da marca Celanese Chemicals, Celvol 103, com grau de hidrólise 98,0-98,8% e massa molar entre 13.000-23.000 g/mol (PVA99) e outro da marca Sigma –Aldrich, com grau de hidrólise 80% e massa molar entre 9.000-10.000g/mol (PVA80). As soluções aquosas de PVA foram preparadas nas frações de 28 e 35% (p/v) conforme mostra a tabela 4.1. O preparo seguiu o procedimento descrito a seguir:

Tabela 4.1 – Concentrações das soluções de PVA

Matéria Prima	Concentração de PVA (% p/v)
PVA80	28
PVA99	35

- Colocar água deionizada em béquer e resfriar em geladeira. Pesar o PVA de acordo com as frações a serem utilizadas como mostrado na tabela 4.1.

- Adicionar lentamente o PVA no béquer com água deionizada na temperatura de 10 °C, sob agitação magnética branda por 5 minutos para homogeneização. Com agitação branda aquecer a solução até a temperatura na faixa de 90 ± 5 °C e manter pelo período de 30 minutos para promover a dissolução do PVA na solução.

- Depois de passados 30 minutos desligar o aquecimento, aguardar o resfriamento até a temperatura ambiente. Ajustar o pH da suspensão para $2,0 \pm 0,1$, usando solução de HCl 2N e completar a suspensão com água até alcançar o peso inicial da suspensão, para compensar o volume de água perdido por evaporação durante o aquecimento.

4.1.2. Preparo da Solução Inicial para Obtenção de Vidro Bioativo (BaG)

A solução inicial para obtenção de BaG via rota sol-gel, apresentando composição de 58% p/p de SiO₂, 33% p/p de CaO e 9% p/p de P₂O₅ foi sintetizada através da mistura de TEOS, água DI, TEP e cloreto de cálcio na presença da solução de ácido clorídrico 2N. O HCl foi utilizado porque o alcóxido de silício apresenta reação de hidrólise lenta, tornando-se necessária a presença de um

catalisador para tornar mais rápida e completa a hidrólise do alcóxido. Foi adotada a razão molar H₂O/TEOS de 12 : 1 e o protocolo contemplou as etapas descritas a seguir:

- Adicionar a água em béquer iniciando agitação branda, ajustar o pH com solução de HCl 2N para o valor $2,0 \pm 0,1$.
- Adicionar o TEOS (tetraetilortosilicato, 98% Aldrich Chemical Company Inc.), na solução e manter agitação por mais 45 minutos.
- Adicionar o TEP (trietilfosfato, Sigma Aldrich) e agitar por 30 minutos.
- Adicionar o cloreto de cálcio, Sigma-Aldrich, na solução e manter agitação por 1 hora.

4.1.3. Preparo de Espumas Híbridas de PVA-BaG

Os materiais sintetizados foram preparados na composição de 60, 70 e 80% (p/p) de polímero para 40, 30 e 20% (p/p) de vidro bioativo, respectivamente. Os híbridos foram obtidos utilizando as razões molares apresentadas na tabela 4.2 e seguindo o procedimento esquematizado na figura 4.2, descrito a seguir:

- Uma quantidade apropriada da solução inicial para obtenção de vidro bioativo (sol. BaG) foi adicionada à solução de PVA (sol. PVA), sob agitação e mantida por 5 minutos para homogeneizar.

Tabela 4.2 – Concentrações dos Reagentes dos Híbridos PVA-BaG

Proporção de Fases %(p/p) PVA / Inorgânica	Grau de Hidrólise (%)	Razão Molar					
		PVA	TEOS	TEP	CaCl ₂	H ₂ O	HF
60 / 40	PVA80	3,5316	1,0000	0,1317	0,6094	34,1989	0,215373
	PVA99	2,9999	1,0000	0,1317	0,6094	28,0325	0,215373
70 / 30	PVA80	5,4937	1,0000	0,1317	0,6094	46,5316	0,215373
	PVA99	4,6664	1,0000	0,1317	0,6094	36,9395	0,215373
80 / 20	PVA80	9,4177	1,0000	0,1317	0,6094	71,1970	0,215373
	PVA99	7,9996	1,0000	0,1317	0,6094	54,7534	0,215373

- A partir disso a mistura obtida recebeu a adição do surfactante sulfato laureato de sódio e em seguida a adição do ácido fluorídrico (Cromato Produtos Químicos Ltda) introduzido através de solução diluída na concentração de 10% v/v, momento no qual iniciou a contagem do tempo gasto para atingir a geleificação da suspensão. O HF foi utilizado como catalisador da reação de condensação, pois ele promove a protonação de grupos silanol de maneira a tornar o silício mais

electrófilo e, por conseguinte, mais susceptível aos ataques nucleófilos (BRINKER & SCHERER, 1990).

- Uma amostra da suspensão foi colhida em recipiente plástico, aproximadamente 90 segundos após a adição do ácido fluorídico para realizar o controle da geleificação e do tempo gasto na geleificação.

- Por meio de observação da solução amostrada foi aguardado o momento de alteração brusca da resistência ao fluxo. Nesse instante se iniciou a agitação vigorosa da suspensão, com o objetivo introduzir bolhas no material. Em seguida foi vertida a espuma em recipiente plástico, mantendo-o aberto em estufa por 5 minutos na temperatura de 37 °C. Passado esse período o recipiente foi tampado, vedado com fita de teflon e mantido na temperatura de 37 °C por 3 dias.

- Finalmente o recipiente foi aberto e mantido mais 7 dias em estufa a 37 °C, para secagem.

4.2. Síntese de Híbridos PVA/vidro bioativo/glutaraldeído (PVA-BaG-GA)

4.2.1. Preparo da Solução de PVA (Sol. PVA)

Foi utilizado o PVA com grau de hidrólise 80% e massa molar entre 9.000-10.000g/mol (PVA80). A solução aquosa de PVA foi preparada na fração de 28% (p/v). O preparo seguiu o procedimento descrito a seguir:

- Adicionar água deionizada em béquer, resfriar a água até a temperatura de 10 °C e pesar 28% (p/v) de PVA.

- Adicionar lentamente o PVA no béquer com água deionizada na temperatura de 10 °C, sob agitação magnética branda por 5 minutos para homogeneizar. Com agitação branda aquecer a solução até a temperatura na faixa de 90 ± 5 °C e manter pelo período de 30 minutos.

- Passados 30 minutos retirar o aquecimento e aguardar o resfriamento até a temperatura ambiente. Ajustar o pH da suspensão para $2,0 \pm 0,1$ usando solução de HCl 2N e completar a suspensão com

água até alcançar o peso inicial da suspensão, para compensar o volume de água perdido por evaporação durante o aquecimento.

4.2.2. Preparo da Solução Inicial para Obtenção de Vidro Bioativo (BaG)

A solução de BaG utilizada no preparo de híbridos PVA-BaG-GA foi obtida seguindo o procedimento conforme descrito no item 4.1.2.

4.2.3. Preparo de Espumas Híbridas de PVA-BaG-GA

Os materiais sintetizados foram preparados na composição de 70% (p/p) de polímero para 30% (p/p) de vidro bioativo, respectivamente. Os híbridos foram obtidos utilizando as razões molares apresentadas na tabela 4.3 e seguindo o procedimento descrito a seguir:

- A solução inicial de vidro bioativo (sol. BaG) foi adicionada à solução de PVA (sol. PVA), sob agitação e mantida por 5 minutos para homogeneizar.
- A partir disso a mistura obtida recebeu a adição do surfactante sulfato laureato de sódio e em seguida a adição do ácido fluorídrico (Cromato Produtos Químicos Ltda) introduzido através de solução diluída na concentração de 10% v/v, momento no qual iniciou a contagem do tempo gasto para atingir a geleificação da suspensão.
- Passados 90 segundos da adição do HF foi adicionado o glutaraldeído (25% em solução aquosa) na mistura, de acordo com a tabela 4.3

Tabela 4.3 – Concentrações dos Reagentes dos Híbridos PVA-BaG-GA

Proporção de Fases %(p/p) PVA / Inorgânica	Grau de Hidrólise (%)	Razão Molar							
		PVA	TEOS	TEP	CaCl ₂	H ₂ O	HF	Glutaraldeído (mol)	[GA] %(p/p)
70 / 30	PVA80	5,4937	1,0000	0,1317	0,6094	46,5316	0,215373	0,000000	0,0
								0,012086	0,5
								0,024172	1,0
								0,120860	5,0

- Uma amostra da suspensão foi colhida em recipiente plástico, aproximadamente 20 segundos após a adição do glutaraldeído, para realizar o controle da geleificação e do tempo gasto na geleificação.
- Por meio de observação da modificação da resistência ao fluxo das soluções, foi avaliado o estágio da reação sol-gel, para realizar agitação vigorosa na suspensão com o objetivo introduzir bolhas no material. A espuma obtida foi vertida em recipiente plástico, que foi mantido aberto em estufa por 5 minutos na temperatura de 37 °C, quando o recipiente foi tampado, vedado com fita de teflon e mantido na temperatura de 37°C por 3 dias.
- Após esse período o recipiente foi aberto e mantido mais 7 dias em estufa a 37 °C.

4.2.4. Tratamento de Estabilização dos Híbridos Obtidos PVA-BaG-GA

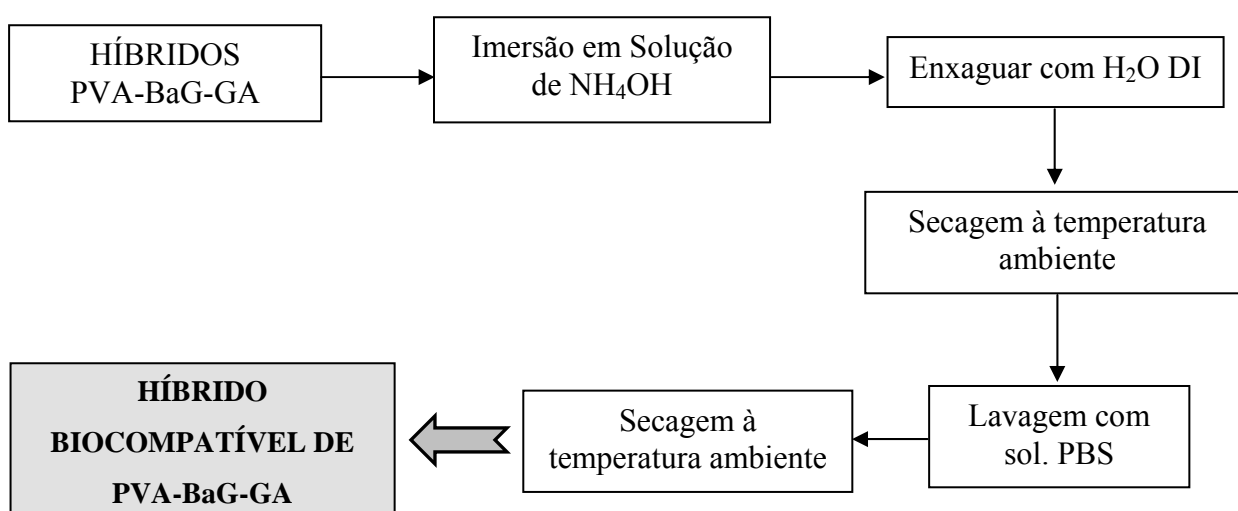


Figura 4.3 – Etapas de estabilização e bloqueio dos híbridos PVA-BaG-GA para ensaios *in vitro*.

Os híbridos reticulados com glutaraldeído na concentração de 5% por peso de PVA foram submetidos a processo de estabilização, conforme esquema mostrado na figura 4.3. Esse procedimento foi introduzido para reduzir a acidez dos híbridos, buscando alcançar uma faixa de pH compatível com o meio celular. Para tal, amostras (n=3) foram cortadas em seções circulares e imersas em soluções de NH₄OH cujas concentrações variaram de 0,075 à 0,75M. Durante o

processo de estabilização foi realizada agitação da solução estabilizadora e as amostras foram submetidas a esse condicionamento por períodos de tempo de 60, 150 e 600 minutos.

Decorrido o período de tempo previsto para o tratamento de estabilização, as amostras foram lavadas três vezes com água deionizada, para remoção do excesso de solução de NH_4OH , e secas na temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram lavadas com solução tampão fosfato salino (PBS).

Foi utilizado um volume de 20 ml de solução PBS por grama de massa do híbrido. As amostras foram mantidas sob agitação por 5 minutos para em seguida permanecerem em repouso por 3 horas. Finalmente as amostras foram secas à temperatura ambiente e encaminhadas para serem submetidas ao processo de esterilização com vapor de óxido de etileno.

4.3. Caracterização dos híbridos sintetizados

Os híbridos a base de PVA e vidro bioativo tiveram sua morfologia caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A estrutura cristalina foi avaliada por difração de raios X (DRX) e sua composição química avaliada por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e espectroscopia de energia dispersiva de elétrons (EDS). Além disso, foi medida a resistência mecânica através de ensaio de compressão.

4.3.1. Microscopia eletrônica de varredura

Para avaliação da morfologia dos poros e da distribuição de tamanho dos macroporos dos híbridos, antes e após imersão em água deionizada, foram realizados ensaios através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) por meio do equipamento JSM 6360LV (JEOL/NORAN) acoplado ao espectrômetro de energia dispersiva de elétrons (EDS), utilizado para análise da composição química da superfície das amostras. Para a realização do MEV, as amostras foram recobertas com ouro para tornar suas superfícies condutoras para o feixe de elétrons.

As medidas do tamanho de poro das amostras dos híbridos PVA-BaG foram obtidas pelo tratamento das imagens de MEV, utilizando o programa Quantikov (PINTO, 1996).

4.3.2. Análise 3D da estrutura dos híbridos PVA-BaG-GA por microtomografia computadorizada (μ CT)

Foi realizada varredura em amostras do híbrido PVA-BaG reticulados com glutaraldeído na concentração de 5% por peso de PVA, através de uma unidade comercial de microtomógrafo de raios X (μ CT) (Sistemas e Serviços GmbH – Phoenix) com resolução de aproximadamente 10 μ m. A análise das imagens 3D envolveu a conversão dos dados obtidos com o μ CT a partir de imagens em escala cinza para conversores das estruturas, quantificados através do desenvolvimento e uso de operadores matemáticos morfológicos apropriados.

4.3.3. Método Brunauer-Emmett-Teller (B.E.T.)

O método BET foi utilizado para calcular as áreas superficiais específicas. O volume de poro e a distribuição do tamanho de poro foram derivados das isotermas de adsorção. Antes das medições, os híbridos PVA-BaG foram secos a 40 °C por 48 horas sob fluxo de N₂ para degaseificação apropriada (Micromeritics). É importante apontar que somente a faixa de macroporos foi avaliada por este método envolvendo isotermas de adsorção-desorção.

4.3.4. Caracterização por espectroscopia FTIR

Na obtenção dos espectros de FTIR foi adotada a técnica de reflexão transmitida atenuada (ATR). Os ensaios foram realizados no equipamento FT-IR Spectrometer Spectrum 1000, Perkin Elmer, repetindo 32 vezes na faixa de número de onda compreendida entre 600-4000cm⁻¹, com resolução de 4cm⁻¹ e em intervalos de 2cm⁻¹.

4.3.5. Difração de Raio X (DRX)

Os estudos de DRX foram conduzidos usando radiação CuK α ($\lambda=1,54056$ Å), operando com 40kV, 20mA e 2 θ variando de 3,03 a 89,91° com passo igual a 0,06°. Os picos identificados na varredura foram identificados utilizando-se os arquivos do “*Joint Committee on Powder Diffraction*

Standards” (JCPDS). No preparo das amostras os híbridos foram cortados com 1mm de espessura e prensados de modo a obter uma lâmina em torno de 100 μ m.

4.3.6. Ensaio de Compressão

Os ensaios de compressão foram realizados em corpos de prova cúbicos, com dimensões de 10 X 10 X 10mm. Os ensaios foram conduzidos sem uso de lubrificantes a uma velocidade de 0,5mm/min, na Máquina Universal de Ensaios, modelo DL-3000, marca EMIC, com capacidade máxima de carga de 30kN e adaptada com a célula de carga, modelo SV, com capacidade de carga de 2kN e utilização recomendada na faixa de 40 a 1800N.

4.3.7. Teste de citotoxicidade dos híbridos PVA-BaG

4.3.7.1. Preparo de Amostras para Ensaios de Citotoxicidade

Amostras das matrizes porosas dos híbridos PVA-BaG-GA foram cortadas na forma cilíndrica com 5mm de diâmetro por 2mm de espessura para os estudos com células, sendo as amostras submetidas ao processo de esterilização pela exposição a vapor saturado de óxido de etileno. Os ensaios de viabilidade celular foram conduzidos em 4 replicatas para cada material. As amostras foram colocadas em placas de 96 poços, imersas em 250 μ l/poço de meio mínimo essencial Eagle (MEM) e mantidas em incubadora à 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas.

4.3.7.2. Cultura de Células VERO nos Materiais

Células VERO (ATCC-CCL-81 - cultura de células epiteliais extraídas de rim de macacos verdes africanos) foram semeadas na concentração de 5×10^5 células/ml em 96 poços de placas de poliestireno e também em poços de uma microplaca, usados como referência (controle). A solução MEM suplementada com 2mM de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino (FBS) foi então adicionada nos poços. Esse sistema foi incubado à 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas.

4.3.7.3. Viabilidade e Atividade Celular Realizada com Células VERO por Ensaio de MTT

Após 24 horas de cultivo, os sobrenadantes dos poços foram retirados e repostos com 100µl de MEM (meio mínimo essencial Eagle) fresco suplementado com L-glutamina e 10% de SFB. Em seguida foram adicionados 30µl/poço da solução de MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazolium) Sigma Aldrich na concentração de 5mg/ml. A placa foi então re-incubada em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 4 horas, ao abrigo da luz. Após 2 horas de incubação, foram feitos registros fotográficos usando o Microscópio Olympus IX70 para avaliação da formação dos cristais intracitoplasmáticos de cor púrpura característicos do ensaio de viabilidade celular pelo MTT.

Após o tempo de incubação com o MTT, foram adicionados 35 µl/poço da solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) com solução de 10%/HCl. A placa foi levemente homogeneizada e reincubada por 14 – 16 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, ao abrigo da luz. Em seguida, os cristais intracitoplasmáticos foram solubilizados por pipetagem exaustiva (50 vezes), cuidadosamente, sem fazer espuma. Os sobrenadantes foram transferidos para nova placa (100µl de cada poço) quando procedeu-se a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 595nm no aparelho Asys Hitech GmbH, modelo Expert Plus Microplate Reader. A referência (obtida a partir do controle sem células) foi subtraída das medidas de todas as amostras.

Como parâmetro de comparação para os ensaios de citotoxicidade foi adotado o controle negativo utilizando o meio celular, sem adição de nenhuma parcela dos híbridos e como controle positivo o meio celular com adição de Triton X-100 na concentração de 0,1%(v/v).

4.3.7.4. Análise Estatística

Os dados relativos ao ensaio de MTT serão apresentados como valor mais provável ± desvio padrão. Para testar a significância das diferenças observadas entre os grupos de estudo, uma avaliação estatística foi realizada utilizando-se a análise de variância simples. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.4. Degradação de Híbridos PVA-BaG e PVA-BaG-GA

4.4.1. Preparo de amostras dos Híbridos para Degradação

As amostras foram preparadas na forma de discos, com diâmetro de 40 mm e 2 mm de espessura, seguindo a relação da medida do diâmetro 20 vezes o valor da espessura. A forma adotada buscou garantir uma área uniforme. O volume de solução utilizado seguiu a relação (Área da seção circular da amostra/Volume de solução) de $0,1\text{cm}^{-1}$. O número de replicatas para cada ensaio foi igual a três.

4.4.2. Protocolo de Degradação em água DI

Os ensaios de degradação foram conduzidos em amostras PVA-BaG reticuladas com glutaraldeído em frações que variaram até 5% p/p, com e sem tratamento estabilizador a base de NH_4OH . As amostras após cortadas foram pesadas, sendo realizadas seis medidas e adotando o valor das médias como a massa com úmida de equilíbrio.

Após esse procedimento as amostras foram mantidas por 24 horas em dessecador com sílica gel, sob vácuo, à temperatura de 25 ± 5 °C e pesadas. O valor medido após a estabilidade do peso das amostras foi definido como massa seca antes da imersão.

Em seguida as amostras foram imersas em água deionizada na temperatura de 25 ± 2 °C e mantidas pelos períodos de 2, 7, 14 e 21 dias. Decorrido o tempo de imersão as amostras foram novamente secas em dessecador com sílica gel, sob vácuo à temperatura de 25 ± 5 °C. A partir disso foram feitas medidas das massas, sendo esse procedimento repetido até que fosse atingida a condição de massa constante, valor definido como sendo a massa seca após a imersão.

A perda de massa, ΔM , foi calculada usando a Eq. (1)

$$\Delta M = \frac{M_{Si} - M_{Sf}}{M_{Si}} \times 100\% \quad (1)$$

onde M_{Si} é a massa seca antes da imersão na solução de degradação e M_{Sf} é a massa seca após o período de imersão no meio de degradação. As várias composições dos híbridos porosos obtidos, que foram submetidas ao ensaio de degradação, nos vários períodos de imersão, resultaram em uma

série de amostras cujas denominações e suas respectivas características composicionais são apresentadas detalhadamente conforme mostrado na tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Identificação, proporções, tratamento de estabilização e período de imersão utilizados nos ensaios de degradação, para os Híbridos PVA-BaG-GA com razão molar dos reagentes TEOS:TEP:CaCl₂:HF / 1,00:0,13:0,61:0,2.

Identificação das Amostras	Razão GA/PVA % (p/p)	Tratamento com NH₄OH	Tempo de imersão em H₂O DI (dias)
HB - 0G- 0D	0,0	-	0
HB - 0G- 2D	0,0	-	2
HB - 0G- 7D	0,0	-	7
HB - 0G-14D	0,0	-	14
HB - 0G-21D	0,0	-	21
HB-0,5G- 0D	0,5	-	0
HB-0,5G- 2D	0,5	-	2
HB-0,5G- 7D	0,5	-	7
HB-0,5G-14D	0,5	-	14
HB-0,5G-21D	0,5	-	21
HB - 1G- 0D	1,0	-	0
HB - 1G- 2D	1,0	-	2
HB - 1G- 7D	1,0	-	7
HB - 1G-14D	1,0	-	14
HB - 1G-21D	1,0	-	21
HB - 5G- 0D	5,0	-	0
HB - 5G- 2D	5,0	-	2
HB - 5G- 7D	5,0	-	7
HB - 5G-14D	5,0	-	14
HB - 5G-21D	5,0	-	21
HB - 5G- 0D-E	5,0	Sim	0
HB - 5G- 2D-E	5,0	Sim	2
HB - 5G- 7D-E	5,0	Sim	7
HB - 5G-14D-E	5,0	Sim	14
HB - 5G-21D-E	5,0	Sim	21

Para a identificação das amostras foi seguido o padrão HB – G – D – E, onde HB destaca que os ensaios foram realizados em híbridos PVA-BaG, G descreve a concentração de reticulante utilizada em porcentagem de glutaraldeído por peso de PVA, D indica o período em dias o qual a amostra ficou imersa no meio de degradação e E refere-se às amostras que receberam tratamento de estabilização dos sítios ácidos com solução de hidróxido de amônio 0,3M.

4.4.3. Degradação térmica dos híbridos PVA-BaG-GA

Amostras dos híbridos foram cortadas e pesadas. Após esse procedimento as amostras foram mantidas em estufa na temperatura de 110 °C por 24 horas. Passado esse período foram pesadas novamente as massas de cada amostra, para averiguar a hidratação das mesmas e definir os valores da massa seca inicial. Em seguida as amostras foram levadas ao forno Quimis, aquecidas com taxa de 10 °C.min⁻¹ até a temperatura de 450 °C e mantidas nessa temperatura por 1 hora, quando foram retiradas e mantidas em dessecador, sob vácuo até seu resfriamento a temperatura de 25°C. Feito isso foram realizadas medidas das massas finais correspondentes à fração de material inorgânico presente.

4.4.4. Caracterização dos híbridos PVA-BaG-GA após ensaio de degradação

Os híbridos de PVA-BaG-GA após realização dos ensaios de degradação em água deionizada tiveram sua morfologia caracterizada por microscopia eletrônica de varredura. A composição química foi avaliada por espectroscopia na região do infravermelho e espectroscopia de energia dispersiva de elétrons. Além disso, foi verificada a resistência mecânica através de ensaio de compressão.

4.5. Híbridos PVA-BaG Reforçados com Nanotubos de Carbono Quimicamente Modificados

Foram preparados híbridos PVA-BaG com nanotubos de carbono (NTC's) utilizando nanotubos purificados de paredes múltiplas, com diâmetro externo entre 10 e 30 nm e comprimento entre 1 e 2µm, da marca SES Research. Inicialmente os NTC's foram submetidos a tratamento para funcionalização da superfície. Para tal, 1g de nanotubos de carbono foi imerso em 50 ml de solução HNO_3 14 mol.L⁻¹ à 120 °C por 15h sob refluxo (SILVA, 2007).

Decorrido o período da reação em meio ácido a solução foi filtrada a vácuo utilizando filtro AP4004700 (Millipore), com abertura de 0,7 µm e membrana em microfibras de vidro, sem resina. Em seguida os nanotubos foram lavados com água DI até o filtrado atingir o pH no valor de 5,5±0,1 e secos em estufa por 48 horas a 60±5°C.

As soluções aquosas de PVA foram preparadas na fração de 28 (p/v). O preparo seguiu o procedimento descrito a seguir:

- Adicionar água deionizada em béquer, pesar a fração de nanotubos de carbono funcionalizados na proporção de 0,25% (p/p) em relação ao PVA e manter a mistura em banho ultrassônico por 30 minutos.
- Pesar o PVA de acordo com as frações a serem utilizadas, adicionar lentamente no béquer com a solução aquosa de nanotubos de carbono na temperatura de 10 °C, sob agitação magnética branda por 5 minutos para homogeneizar. Com agitação branda aquecer a solução até a temperatura na faixa de 90 ± 5 °C e manter pelo período de 1 hora.
- Depois de passado o período de dissolução do PVA, desligar o aquecimento e aguardar o resfriamento até a temperatura ambiente. Ajustar o pH da suspensão para 2,0±0,1, usando solução de HCl 2N e completar a suspensão com água DI até alcançar o peso inicial da suspensão, para compensar o volume de água perdido por evaporação durante o aquecimento.

As espumas sintetizadas com nanotubos de carbono foram preparadas na composição de 70% (p/p) de polímero para 30% (p/p) de vidro bioativo. Os híbridos foram obtidos utilizando o procedimento descrito a seguir:

- Uma quantidade apropriada da solução inicial para obtenção de vidro bioativo (sol. BaG) foi adicionada à solução de PVA com nanotubos (sol. PVA-NTC), sob agitação e mantida por 5 minutos para homogeneizar.
- A partir disso a mistura obtida recebeu a adição do surfactante sulfato laureato de sódio e em seguida a adição do ácido fluorídrico (Cromato Produtos Químicos Ltda) introduzido através de solução diluída na concentração de 10% v/v, momento no qual iniciou a contagem do tempo gasto para atingir a geleificação da suspensão.
- Uma amostra da suspensão foi colhida em recipiente plástico, aproximadamente 90 segundos após a adição do ácido fluorídrico, para realizar controle da geleificação e do tempo gasto na geleificação.
- Por meio de observação avaliar o estágio da reação, para realizar agitação vigorosa na suspensão, com o objetivo introduzir bolhas no material. Verter a espuma obtida em recipiente plástico, mantendo-o aberto em estufa por 5 minutos na temperatura de 37 °C, quando o recipiente deve ser tampado, vedado com fita de teflon e mantido na temperatura de 37°C por 3 dias. Após esse período o recipiente foi aberto e mantido mais 7 dias em estufa a 37 °C.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese dos Híbridos PVA-BaG

5.1.1. Comportamento na síntese em função da Razão PVA/BaG e Grau de Hidrólise do PVA

A figura 5.1 mostra o gráfico do tempo de geleificação de soluções de PVA/BaG em função da concentração de PVA utilizada.

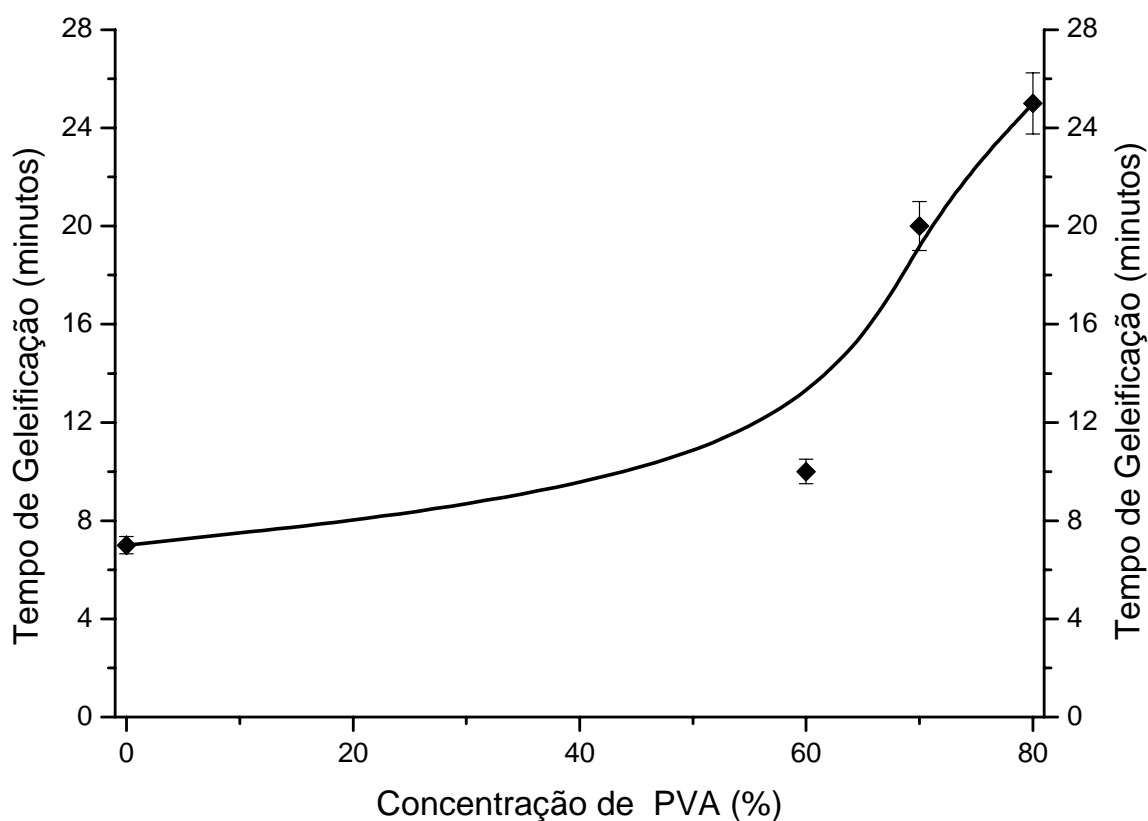


Figura 5.1 – Efeito da concentração de polímero no tempo de geleificação para compósitos preparados com PVA de alto grau de hidrólise (PVA99).

Os resultados mostram que o aumento no teor de PVA de 0% para 80% (biovidro puro e PVA/BaG com 80% de polímero e 20% de vidro bioativo, respectivamente) causou um aumento simultâneo no tempo de geleificação (Tg), que passou de aproximadamente 7 minutos para valores acima de 25 minutos. Tal efeito representou aproximadamente 400% de aumento no tempo requerido para ocorrer alteração significativa na viscosidade da suspensão.

O Tg e a viscosidade são frequentemente utilizados no processo sol-gel como indicativo da contribuição global dos parâmetros de processo sobre as reações envolvidas nessa rota. Em relação às matrizes híbridas PVA-BaG desse trabalho, uma característica fundamental é a necessidade da mudança brusca de sol para gel através do aumento da viscosidade.

A alteração na viscosidade dos híbridos PVA-BaG deve ocorrer em período de tempo capaz de permitir estabilizar as bolhas inseridas durante a agitação vigorosa, pois caso contrário o material irá escoar, liberando o ar das bolhas e promovendo a densificação da estrutura, que deixará de ser porosa (PEREIRA, 2000; PEREIRA, 2005; STUART et. al., 2006).

A síntese e o controle do processo de obtenção de híbridos orgânico-inorgânicos produzidos via rota sol-gel são certamente sistemas complexos, devido ao grande número de variáveis que estão normalmente envolvidas. Como exemplo temos concentração e miscibilidade dos reagentes (água, TEOS, TEP e CaCl₂), alterações do pH durante as reações no meio aquoso, as razões entre o precursor do alcóxido e a água, temperatura, catalisador (BRINKER & SCHERER, 1990; XENOPOULOS et. al., 1998; OKI et. al., 2006).

Dentre os vários sistemas dos híbridos PVA-BaG estudados, alguns se apresentaram com maior dificuldade para formar estrutura porosa tridimensional, em geral os híbridos com elevada concentração de PVA.

Pela análise da tabela 4.2 do capítulo anterior, podemos observar alterações significativas na razão molar entre TEOS/PVA, com valores três vezes menores para amostras com 80% (p/p) de PVA, se comparado aos híbridos com 60% (p/p) de polímero. Mudanças nessa razão podem refletir de forma significativa no tempo de geleificação.

Nos híbridos PVA-BaG obtidos com teores de polímeros de 60, 70 e 80% (p/p), utilizando PVA's com dois graus de hidrólise diferentes, ocorreram alterações marcantes no comportamento das soluções. Quanto menor a concentração de PVA utilizada menos viscosa deve ser a solução, além das viscosidades serem menores para PVA's com menores graus de hidrólise (BRISCOE et. al., 2000). Para o PVA99, as concentrações iniciais de diluição do polímero, que se apresentaram adequadas para permitir a geleificação de espumas, foram as soluções com 23 e 28% (p/p) de PVA. As espumas resultantes a partir dessas concentrações tiveram menos água residual e o procedimento de secagem foi mais eficiente, se comparado com soluções de menor concentração de PVA.

A obtenção de híbridos PVA-BaG porosos com resistência mínima a manipulação foi influenciada pela quantidade de água utilizada na síntese e, por conseguinte, pelas concentrações de polímero e grau de hidrólise do PVA utilizado. Quanto maior a quantidade de PVA utilizado maior a quantidade de água na síntese das espumas, conforme mostra a tabela 4.2 do capítulo anterior.

As variações nas quantidades de água referem-se às especificações dos fabricantes para as diluições máximas nos diferentes graus de hidrólise, sendo que para o PVA99 a diluição máxima obtida foi de 28% (p/p) e para o PVA80 a diluição máxima foi de 35% (p/p). A diferença na diluição máxima do PVA reside no maior número de grupos acetato presentes no PVA80, capaz de promover diminuição na viscosidade e aumento na solubilidade do polímero (CELANESE CHEMICALS, 2010).

Esse comportamento é determinado pelas configurações de equilíbrio das ligações de hidrogênio entre as cadeias do polímero e entre as cadeias do polímero e as moléculas de água. Dessa forma utilização de soluções com menores concentrações de polímero e graus de hidrólise menores observa-se menor viscosidade. A adição de teores elevados de água também refletiu interferindo no tempo de geleificação. Esse fato pode explicar a dificuldade de preparar híbridos com PVA80 na relação PVA/BaG 80/20.

Para o PVA80, a concentração inicial de PVA com 23% (p/p) não foi trabalhada porque as soluções não foram estabilizadas, dado que a transição de sol para gel não ocorreu em período que permitisse a manutenção da estrutura porosa. Na concentração de 28%, dependendo da razão PVA/BaG utilizada foi possível obter espumas híbridas, sendo que frações maiores que 70% de PVA também apresentaram reação de transição de sol para gel muito lenta, com períodos superiores a 30 minutos.

Considerando um aumento na concentração de PVA, é razoável imaginar que durante a reação sol-gel as cadeias poliméricas devem limitar e/ou impedir a interação entre os grupos silanol dos núcleos de silicato e polisiloxanos produzidos pela hidrólise. Essa limitação pode causar um aumento no tempo de formação do gel (T_g). Portanto, através do controle da razão entre as concentrações de vidro bioativo e PVA, além do grau de hidrólise dos polímeros, é possível alterar a porosidade, a distribuição do tamanho de poro e a interconectividade das espumas resultantes, como será visto a seguir.

Para as relações PVA/BaG de 80:20, notamos uma redução expressiva na relação TEOS/PVA, observada para ambos os graus de hidrólise estudados, o que pode sugerir a dificuldade da obtenção de híbridos nessa composição. Esses resultados indicam que as propriedades dos compósitos finais podem ser muito dependentes da concentração de polímero.

A síntese dos híbridos PVA-BaG obtidos reflete o controle de parâmetros importantes do processo sol-gel no sistema estudado. Compósitos a base polímeros sintéticos e degradáveis com fase inorgânica bioativa atraem particular interesse na engenharia de tecidos pela possibilidade de ajustar o comportamento bioativo e cinética de degradação em estrutura de poliméricos porosos (REZWAN ET AL., 2006).

Vários sistemas preparados utilizando silicatos com polímeros como PVA (PEREIRA et. al., 2005; COSTA et. al., 2006); Poli(ϵ -caprolactona) (ALLO et. al., 2010), Poli(etileno glicol e poli(ácido L-lático) (WU, ET AL., 2010) tem sido foco de pesquisas. A inclusão de nanopartículas em matrizes poliméricas tem o objetivo de incorporar características que mimetizem a nanoestrutura de tecidos naturais (CHEN et. al., 2008). Dessa forma os híbridos no presente trabalho, a base de PVA com incorporação de silicatos obtidos pelo processo sol-gel apresentam potencial para atuarem como suporte em engenharia de tecidos.

5.2 Avaliação Morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura

A partir das matrizes obtidas, a morfologia e a distribuição dos poros das espumas de PVA-BaG podem ser vistas nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura apresentadas na figura 5.2. É possível observar que matrizes híbridas 3D com macroporos interconectados variando de 10 μm à 600 μm foram produzidas por meio do processo sol-gel através da incorporação de bolhas às misturas das soluções aquosas de PVA com precursores do vidro bioativo e adição do surfactante LESS.

Para cada composição dos híbridos é possível notar que a morfologia das espumas pode ser alterada pelos parâmetros de síntese como concentração da solução de polímero, concentração do surfactante e tempo de geleificação. Para as mesmas condições e parâmetros de processo, não houve variação detectável para o diâmetro modal dos macroporos (aproximadamente 600 μm) referente à faixa de tamanho de poro para teores da fase vidro bioativo variando de 20 a 30% (p/p), como

mostrado nas figuras 5.2A e 5.2B, respectivamente. Entretanto, um aumento significativo no número de poros, variando de 20 μm a 100 μm foi encontrado nos híbridos com 40% (p/p) de BaG, como pode ser observado na figura 5.2C, quando comparado com amostras preparadas com teores menores da fase inorgânica. Ambos os resultados descrevem características morfológicas compatíveis com as necessárias aos materiais utilizados como matrizes para crescimento celular (IGNJATOVIC et. al., 1999).

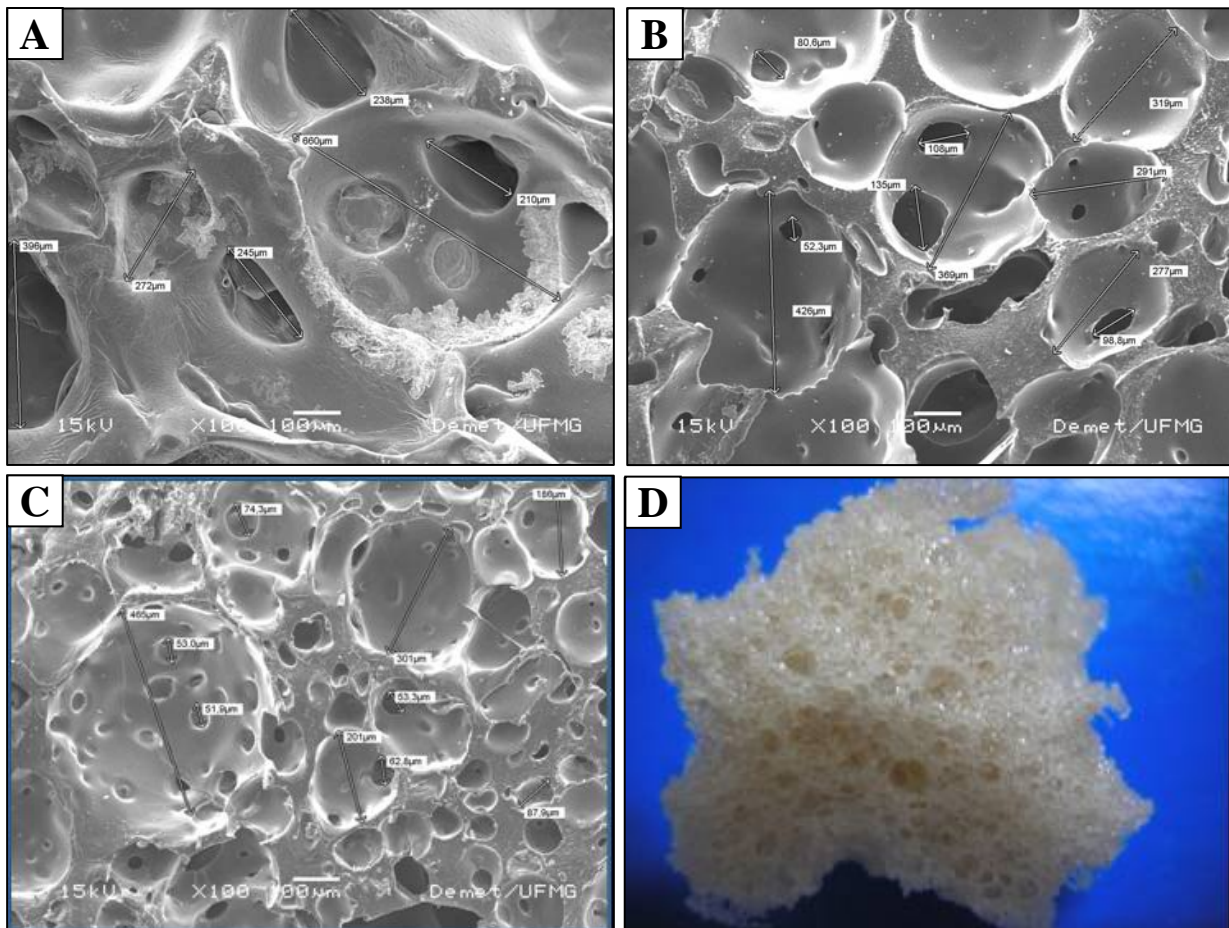


Figura 5.2 – Microscopia eletrônica de varredura de híbridos de (a) 80PVA-20BaG, (b) 70PVA-30BaG, (c) 60PVA-40BaG e (d) fotografia ótica (sem magnificação) de amostra da matriz 3D.

Um fato importante a ser mencionado é que matrizes tridimensionais altamente macroporosas sem trincas superficiais foram desenvolvidas através dessas novas proporções estequiométricas de PVA/BaG por meio da rota sol-gel. Isso é um diferencial, quando comparado com alguns artigos reportados na literatura (OKI ET ALL, 2006), onde um comportamento frágil de cerâmicas

bioativas e compósitos derivados de vidros têm restringido sua utilização nas aplicações em engenharia de tecido ósseo, devido às propriedades mecânicas.

Através de variação na razão das fases orgânica e inorgânica, foi possível alterar as propriedades de textura, morfologia e porosidade. A porosidade aparente que representa uma das características estruturais apresentadas pelas amostras dos híbridos PVA-BaG é descrita na tabela 5.1 e os resultados mostram que após secagem em atmosfera de nitrogênio os valores de porosidade medidos através do método de Arquimedes, para todas as concentrações polímero/vidro, descrevem uma média em torno de 55%, com certa tendência para maiores porosidades em híbridos com maiores frações de vidro bioativo.

A faixa de porosidade em torno de 55% pode ser resultante da presença de poros fechados, refletindo valores subestimados de porosidade. Além disso, o próprio processo de secagem adotado, que por sua vez, com a remoção de água, promove contração das amostras e afeta diretamente na porosidade. De acordo ainda com a tabela 5.1, amostras produzidas com PVA's de graus de hidrólise diferentes e mesma razão polímero/vidro apresentaram porosidades com valores muito similares.

Tabela 5.1 - Porosidade Aparente em dos Híbridos PVA-BaG

	[] PVA/ BaG (p/p)		
	60/40	70/30	80/20
PVA80	57 ± 3	57 ± 1	53 ± 2
PVA99	59 ± 2	55 ± 1	54 ± 1

A área superficial específica das matrizes foi estimada pelo método BET através de isotermas de adsorção-desorção de nitrogênio. Para as amostras de híbridos na composição de 70%PVA-30%BaG os resultados mostraram que o aumento no grau de hidrólise do PVA80 para o PVA99, ocasionou alteração na área superficial média das matrizes com diminuição em torno de 50%, cujos valores passaram de 3,0 m².g⁻¹ para 1,6 m².g⁻¹, conforme mostra a figura 5.3.

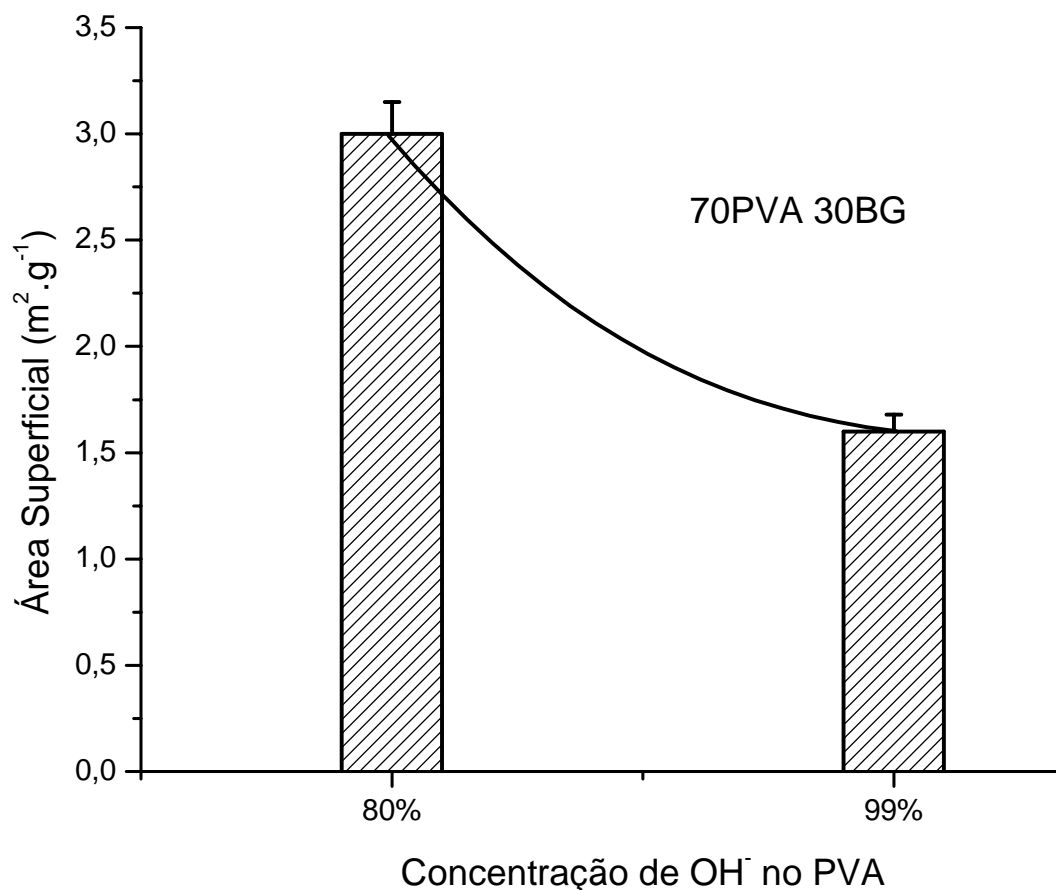


Figura 5.3 – Efeito do grau de hidrólise do PVA no resultado da área superficial estimada por BET para híbridos 70PVA-30BaG.

5.3 Caracterização química por espectroscopia FTIR de Híbridos PVA-BaG

Espectros FTIR representativos de filmes de PVA puro, vidro bioativo e híbridos (PVA-BaG 70/30%) são mostrados na figura 5.4, para amostras do grupo preparado com PVA99, e a figura 5.5 para amostras do grupo preparado com PVA80. A tabela 5.2 apresenta um resumo dos principais grupos químicos relacionados com os materiais utilizados e os respectivos números de onda associados.

Embora não mostrados, espectros de híbridos obtidos nas razões 60PVA-40BaG e 80PVA-20BaG são muito similares aos espectros apresentados nas figuras 5.4c e 5.5c.

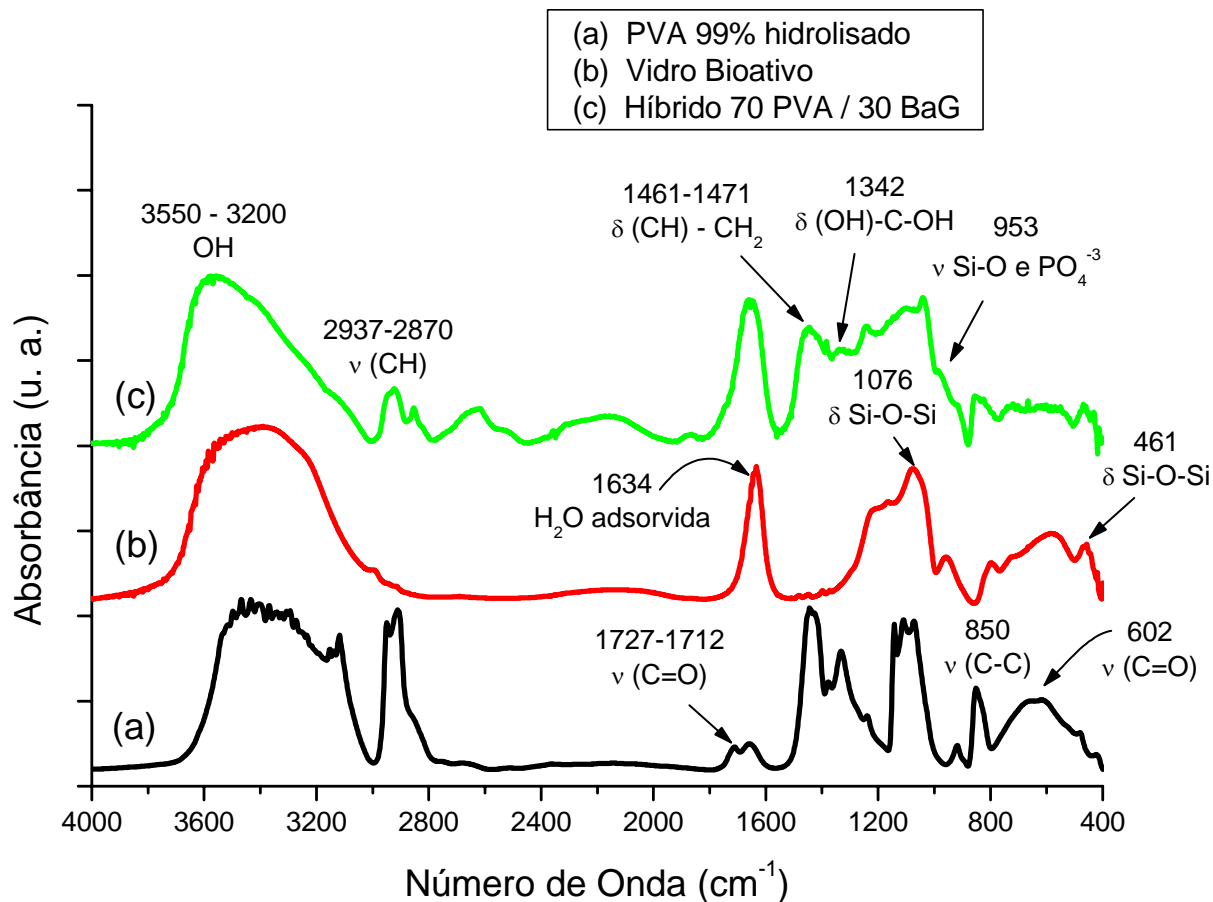


Figura 5.4 – Espectro FTIR de amostras (a) PVA 99% hidrolisado; (b) BaG; (c) híbrido 70%PVA-30% BG.

Como fica claro pela observação das figuras 5.4a e 5.5a, o grau de hidrólise de ambos os PVA's usados no processo indicaram diferenças no espectro FTIR. Para ambos os espectros, a banda larga observada entre $3100-3600\text{cm}^{-1}$ pode ser atribuída à ligação OH devido às fortes ligações de hidrogênio do tipo intramolecular e intermolecular. A presença do alto teor de hidroxilas no PVA99 comparado com o PVA80 pode ser vista pela banda larga em torno de 3300cm^{-1} .

O estiramento da banda C-H alquil pode ser observado em $2850-2950\text{cm}^{-1}$. O pico de absorção em aproximadamente 1710cm^{-1} (para PVA99) ou 1740cm^{-1} (para PVA80) e $1090-1150\text{cm}^{-1}$ devem ser atribuídos respectivamente aos estiramentos $\nu\text{C=O}$ e C-O dos grupos acetato não hidrolisados do polímero PVA. A banda de absorção em torno de 1700cm^{-1} aumenta devido à presença da carbonila (C=O) dos grupos acetato, encontrados no polímero PVA parcialmente hidrolisado, e tem

intensidade relativa maior para o PVA80, pela presença de concentrações maiores dos grupos acetato remanescentes.

Tabela 5.2 – Principais Modos Vibracionais Associados com PVA e BaG

Material	Frequência (cm ⁻¹)	Grupos Químicos Característicos	Referências
BaG	461	Estiramento Si-O-Si	(MANSUR et. al., 2004)
BaG	822	Estiramento Simétrico Si-O-Si	(ALMEIDA & PANTANO, 1990)
PVA	850	Estiramento C-C	(PARIDA et. al., 2006)
PVA	916	Dobramento (CH) – CH ₂	(PARIDA et. al., 2006)
BaG	953	Estiramento ligação Si-OH	(MANSUR et. al., 2004, PARIDA et. al., 2006)
BaG	1080	Estiramento Assimétrico Si-O-Si no SiO ₄ tetraédrico	(MANSUR et. al., 2004, COATS, 2000)
PVA	1093	Dobramento (C-O) – C-OH	(a)
PVA	1141	Estiramento C-O	(a)
PVA	1329	Dobramento (OH) – C-OH	(a)
PVA	1461-1471	Dobramento (CH) – CH ₂	(a)
BaG, PVA	1634	Dobramento O-H (molécula de água)	(a)
PVA	2937-2870	Estiramento CH	(a)
BaG, PVA	3550-3200	Estiramento O-H água adsorvida	(a)

(a) - Referências (PEREIRA et. al., 2005; MANSUR & COSTA, 2008; COSTA et. al., 2008a)

A cristalinidade relativa das duas amostras de PVA com diferentes graus de hidrólise foi verificada pela presença da banda de vibração em ν_{1141} cm⁻¹. Foi notado claramente que o PVA com alto grau de hidrólise (PVA99), da figura 5.4a mostrou maior intensidade nessa banda quando comparado com o PVA de baixo grau de hidrólise (PVA80) da figura 5.5a. Isso significa, que à medida que o número de grupos hidroxila aumenta o número de ligações de hidrogênio estabilizadas aumentou simultaneamente, resultando em estrutura global do polímero mais cristalina.

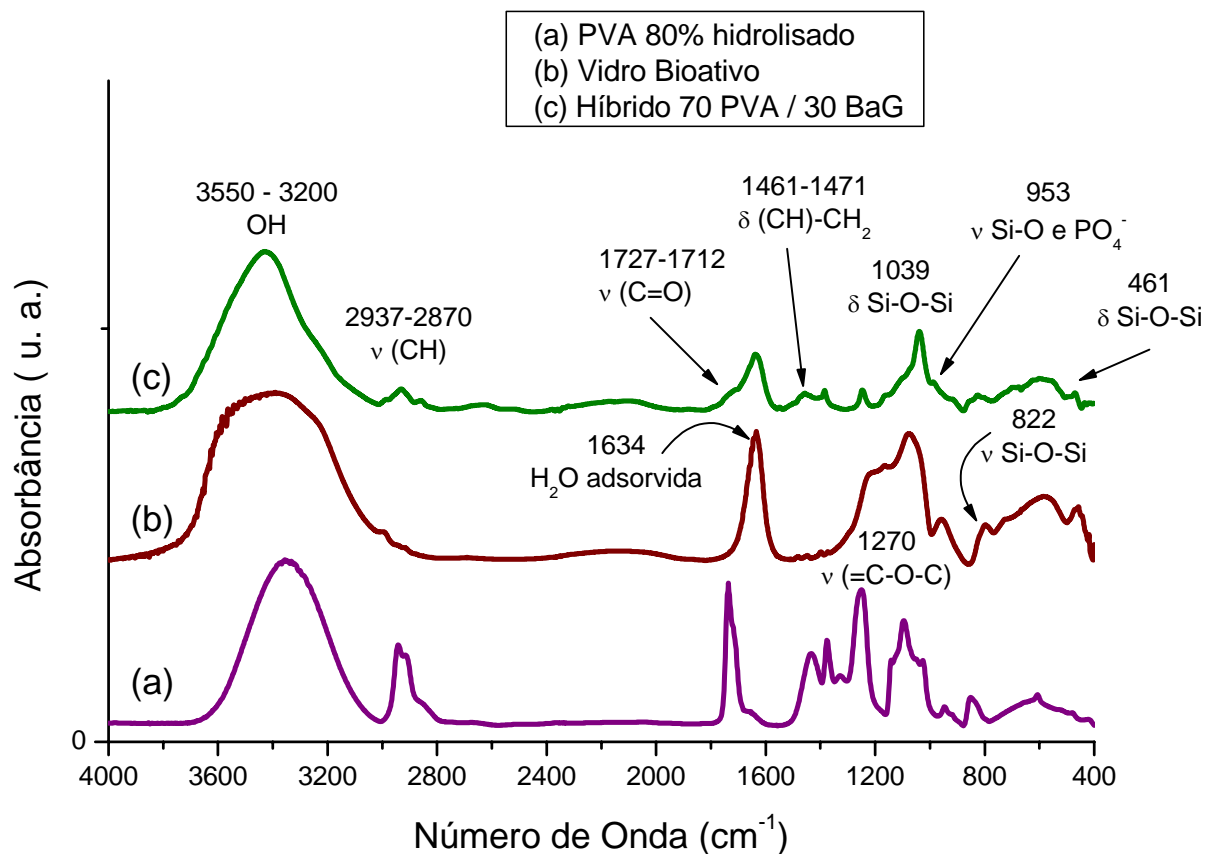


Figura 5.5 – Espectro FTIR de amostras (a) PVA 80% hidrolisado; (b) BaG; (c) híbrido 70%PVA-30% BaG.

O composto BaG é identificado pela banda com vibração (Si-OH) do silanol em 953 cm^{-1} . A banda localizada a 1640 cm^{-1} relacionada com a água adsorvida no material, provavelmente permanece nos híbridos, pois em baixas temperaturas não há condições suficientes para remover a água dos poros. O grupo vinil terminal do PVA em 1740 cm^{-1} (MANSUR et al., 2004; COATES, 2000) e que aparece em menor intensidade para o híbrido 70/30% (p/p) sugere que essa ligação deve estar envolvida na ligação cruzada com a sílica. São apresentadas também as bandas típicas para o grupo fosfato em $1000\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$ (PO_2^- e PO_3^{2-}) e 960 cm^{-1} (PO_4^{3-}). A análise FTIR mostra-se uma ferramenta útil para a investigação da formação de híbridos PVA-BaG e como a estrutura orgânico-inorgânica se correlaciona.

5.4 Caracterização da Cristalinidade por DRX

O resultado de difração de raios X para o vidro bioativo puro é mostrado na figura 5.6a. Como esperado, ele não mostrou a presença de nenhuma fase cristalina, sendo constituído por uma fase totalmente amorfa. O padrão DRX das amostras de PVA parcialmente hidrolisado é apresentado na figura 5.6d. Ele foi identificado como uma estrutura semicristalina. As curvas DRX para os híbridos de PVA-BaG sintetizados nas concentrações 70/30 e 80/20%(p/p) são mostrados nas figuras 5.6b e 5.6c, respectivamente.

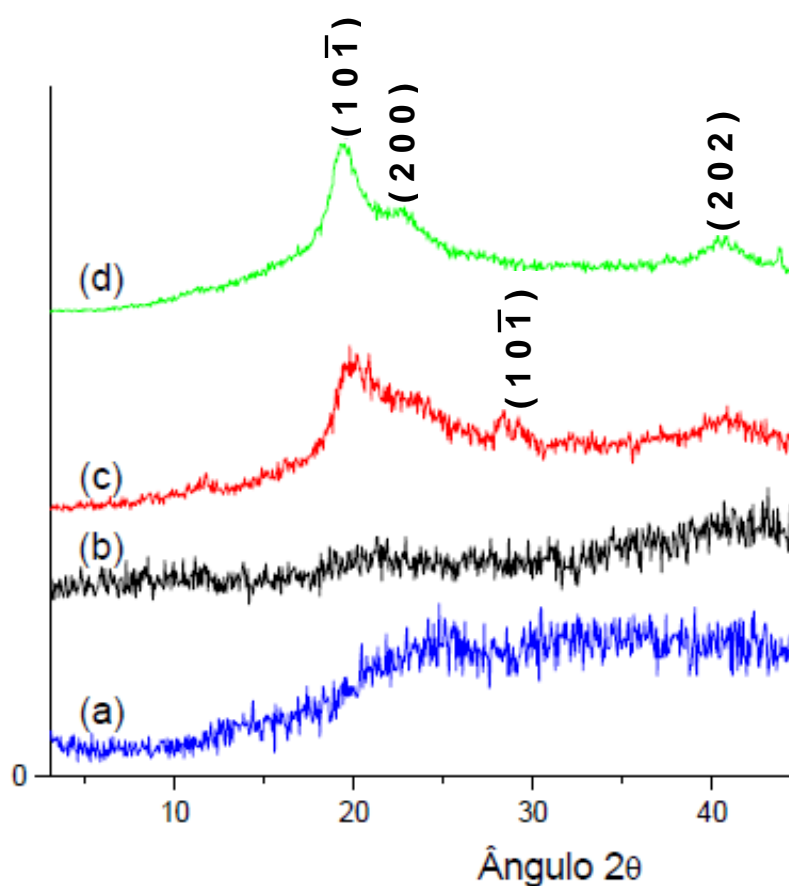


Figura 5.6 - Padrão DRX de (a) vidro bioativo, (b) Híbrido PVA-BaG na concentração 70/30% (p/p), (c) Híbrido PVA-BaG na concentração 80/20% (p/p) e (d) PVA80.

Pode ser verificada a contribuição tanto do PVA80, com a estrutura semicristalina como da fase amorfa do vidro bioativo. Para os híbridos na concentração de 80/20% (p/p), é observada uma diminuição na cristalinidade em relação à amostra de PVA puro, exceto para o surgimento de um pico mais destacado na região de 2θ igual a 29 graus, compatível com o plano (1,0,-1) do PVA, que sugere um arranjo de cristalinidade entre a estrutura do PVA e do BaG nessa concentração.

Com a adição de mais BaG a estrutura passa a apresentar um caráter mais amorfo, tendendo mais para a característica do vidro. Esses resultados sugerem a ocorrência de uma reação da estrutura do BaG com o PVA formando arranjo regular, que é limitado em função da quantidade de BaG adicionado

5.5 Caracterização de híbridos PVA-BaG-GA

5.5.1 Caracterização morfológica dos híbridos PVA-BaG-GA

As figuras 5.7A, 5.7B e 5.7C mostram imagens de MEV, dos híbridos PVA-BaG preparados utilizando as concentrações de 0,0% p/p, 1,0%p/p e 5%p/p de glutaraldeído, respectivamente. A estrutura do material é caracterizada por uma matriz microporosa sólida delimitando macroporos. De acordo com a IUPAC são adotadas as definições para microporos como sendo poros com largura menor que 2 nm, mesoporos com larguras de poro entre 2 e 50 nm e macroporos tendo largura maior que 50nm (ROUQUEROL et. al., 1994). Os macroporos dos híbridos PVA-BaG foram formados intencionalmente através da agitação vigorosa aliada ao emprego do agente tensoativo sulfato laureato de sódio, de forma a criar uma estrutura que sirva de suporte para a migração e colonização de células ósseas.

Conforme mostram as imagens (figura 5.7) podem ser também vistas duas tipologias de poros: poros fechados e abertos. Os poros fechados são isolados da superfície externa e os poros abertos são conectados à superfície externa e dessa forma acessíveis a líquidos e gases. A análise dimensional dos poros dos híbridos PVA-BaG foi realizada a partir das imagens de microscopia eletrônica de varredura. Os valores dos diâmetros dos macroporos variaram para as diferentes amostras, com tamanho médio dos poros em torno de 450µm para os híbridos PVA-BaG, sem utilização de agente reticulante e discreto aumento para valores em torno de 490µm para híbridos reticulados com 1% p/p de glutaraldeído.

Amostras preparadas com 5% p/p de glutaraldeído sofreram redução significativa no tamanho médio de poro para valores em torno de 150µm, indicando a influência das concentrações de reticulante utilizada na síntese sobre a porosidade dos híbridos. As tabela 5.3 e 5.4 mostram um resumo dos resultados obtidos através da análise das imagens de MEV utilizando o programa Quantikov (PINTO, 1996) para medição dos diâmetros de poro das amostras.

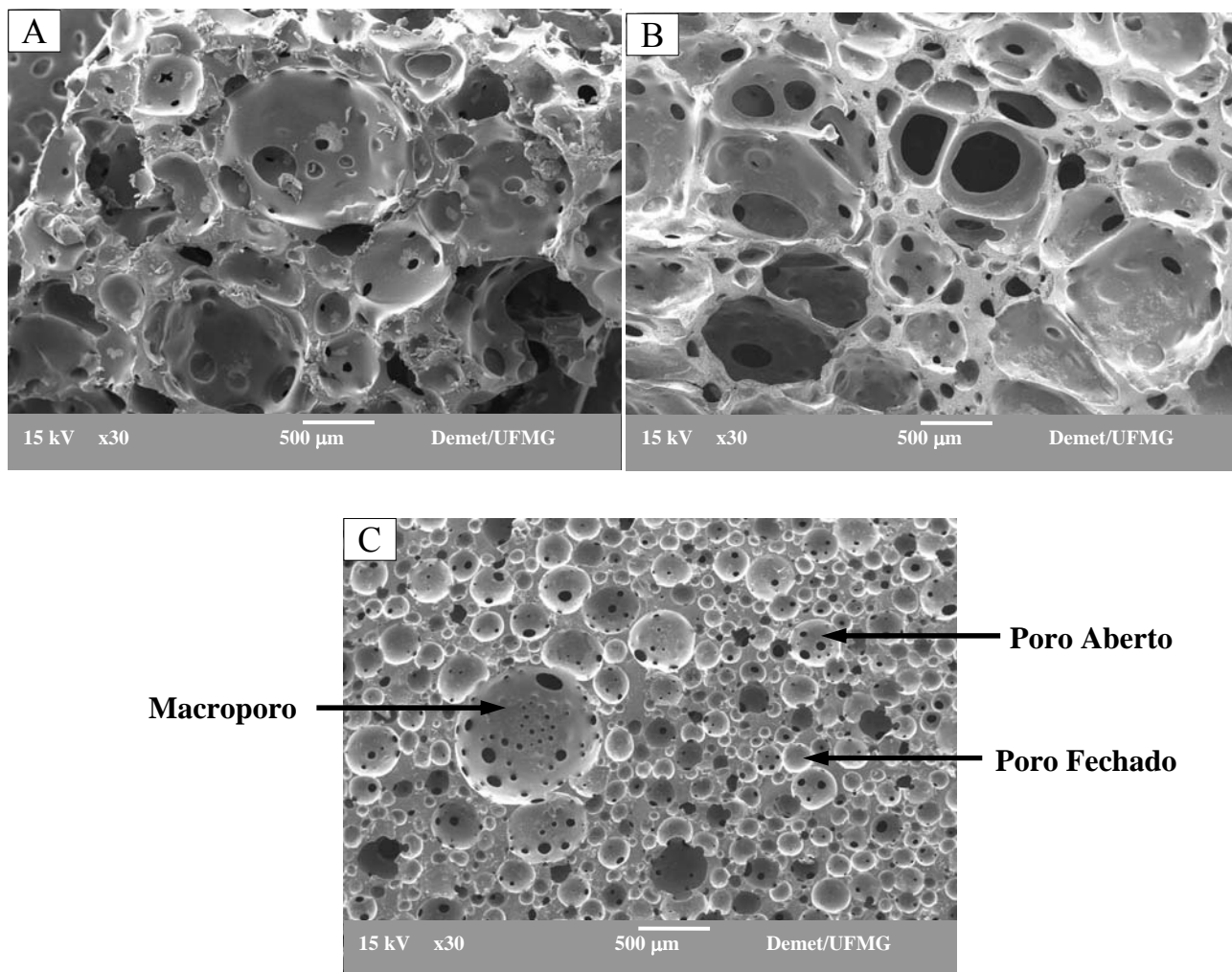


Figura 5.7 – MEV de híbridos PVA-BaG preparados com as concentrações de (a) 0% p/p; (b) 1% p/p e (c) 5% p/p de glutaraldeído (aumento 30x).

Tabela 5.3 – Tamanho de Macroporo de Híbridos PVA-BaG

	[] de Glutaraldeído (% p/p)		
	0,0	1,0	5,0
Tamanho Médio de Poro (μm)	450	490	150
Medida Máxima de Poro (μm)	1100	1000	450
Medida Mínima de Poro (μm)	220	180	50

Tabela 5.4 – Interconectividade entre Macroporos de Híbridos PVA-BaG

	[] de Glutaraldeído (% p/p)		
	0,0	1,0	5,0
Tamanho Médio (μm)	75	145	35
Medida Máxima (μm)	285	475	100
Medida Mínima (μm)	25	35	10

Os valores obtidos indicam o efeito de redução do tamanho de poro para híbridos preparados com concentrações maiores de glutaraldeído. Esse efeito é compatível com a capacidade dos grupos aldeído inseridos, reagirem com as hidroxilas presentes no PVA formando pontes entre as cadeias poliméricas e contribuindo na geleificação da solução. Com o aumento na velocidade de reticulação da mistura é possível congelar a estrutura dos híbridos, antes mesmo das bolhas inseridas durante o processo de agitação vigorosa tenham tempo de coalescer.

No preparo de híbridos PVa-BaG Pereira et. al. (2005) obteve estrutura macroporosa com diâmetro de até 600 μm e poros conectados com diâmetro de até 200 μm . Um dos parâmetro de controle da porosidade foi através da concentração de surfactante. Concentrações maiores de surfactante apresentaram maior tamanho de poro.

Em estudo realizado por Allo et. al. (2010), o preparo de híbridos Poli(e-caprolactona) (PCL) com vidro bioativo, usando concentrações de 60% (p/p) de PLC, promoveu a policondensação do vidro de forma lenta por causa do efeito da diluição do polímero e do solvente. Por outro lado, para teores de 10% (p/p) de PCL a policondensação da fase inorgânica foi rápida.

Por esses resultados vemos que o controle da porosidade pode ser ajustado por vários parâmetros de processo, sendo que a viscosidade desempenha papel importante na morfologia e distribuição do tamanho de poro. A figura 5.8 mostra detalhes da textura das paredes dos híbridos PVA-BaG na região que delimita os poros.

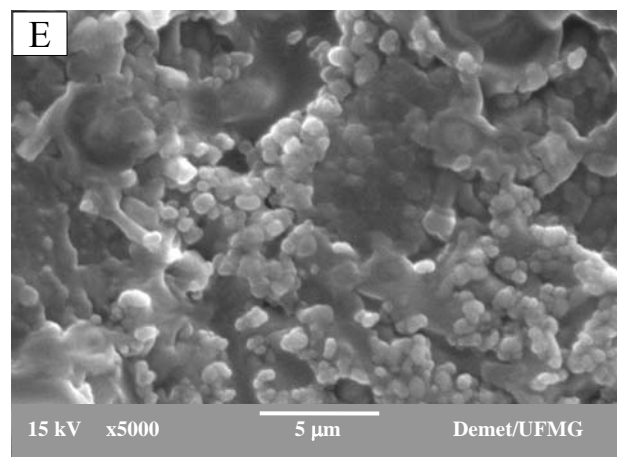
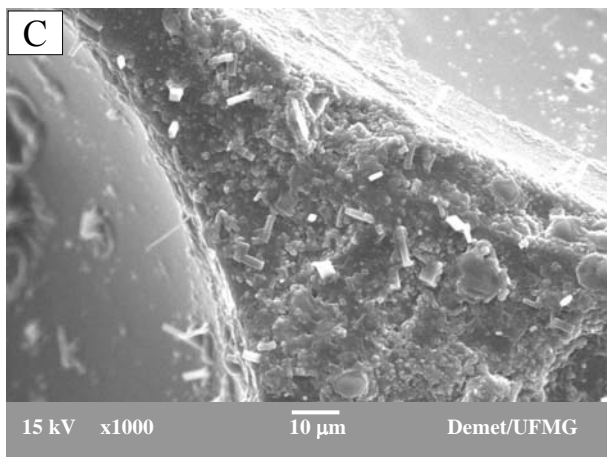
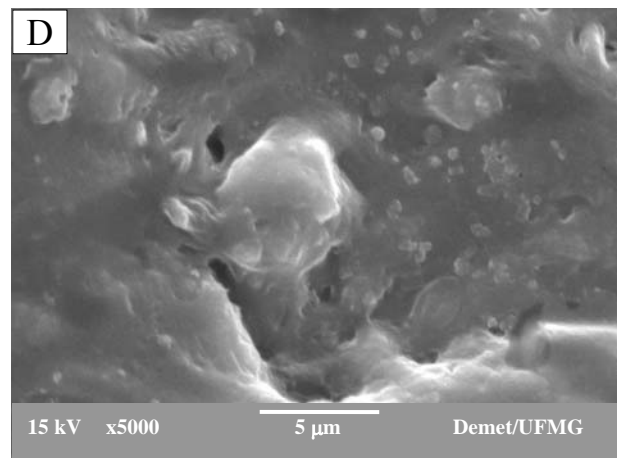
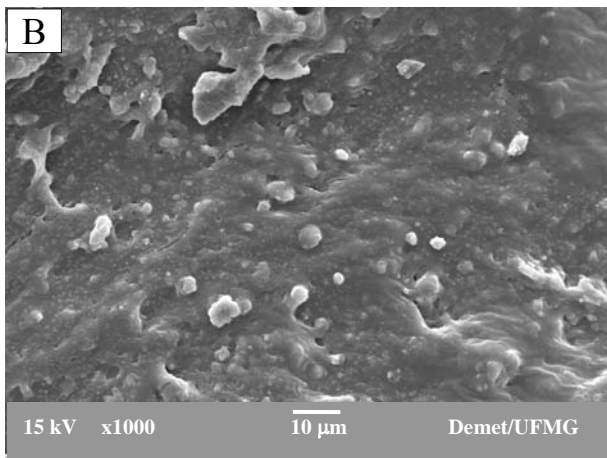
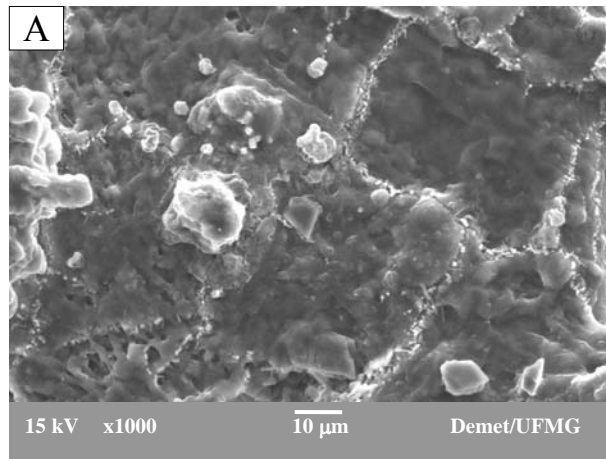


Figura 5.8 – MEV mostrando a estrutura de parede de híbridos PVA-BaG preparados com as concentrações de (A) 0% p/p; (B) 1% p/p e (C) 5% p/p de glutaraldeído (1000x). As imagens (D) e (E) representam ampliações das figuras “B” e “C”, respectivamente (5000x).

Podemos notar ainda pela figura 5.7 que uma parcela expressiva dos poros com diâmetro em torno de 50 μm, para amostras preparadas com 5% (p/p) de glutaraldeído, são poros fechados. Esse

resultado reforça a idéia da dinâmica de formação dos poros, cujos tempos de geleificação desempenham papel decisivo. Ou seja, as bolhas inseridas antes da consolidação da estrutura migram pela solução contribuindo na formação de agrupamentos de bolhas para formação de poros maior até que a viscosidade aumente ao ponto de estabilizar o material.

5.5.2 Caracterização da estrutura dos híbridos PVA-BaG-GA através de μ CT

A figura 5.9 mostra imagem de amostra do híbrido PVA-BaG reticulado com 5% (p/p) de glutaraldeído construída a partir de microtomografia computadorizada e as figuras 5.10 e 5.11 apresentam os gráficos das distribuições de tamanho de poro e das interconectividades obtidas através da microtomografia.

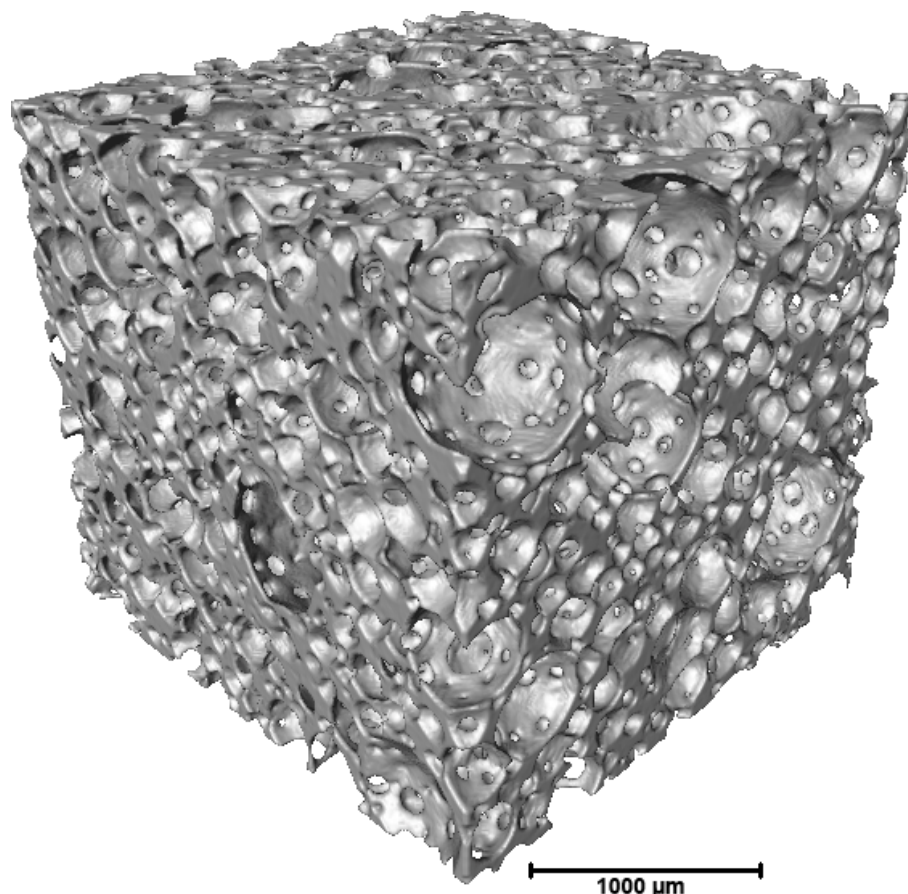


Figura 5.9 – Imagem de microtomografia computadorizada por transmissão de raios X do híbrido de matriz híbrida PVA-BaG reticulada com 5% p/p de glutaraldeído.

Os valores demonstram a existência de uma ampla distribuição de tamanho de poro onde 80% dos poros se apresentam com diâmetro entre 100 a 450 μm e o valor da moda (D_{modal}) correspondente a 227 μm . As interconectividades também apresentaram para as mesmas amostras uma ampla distribuição de tamanho, com 80% das interconectividades variando entre 60 a 200 μm e um I_{modal} igual a 110 μm . Ainda pelas imagens obtidas pela microtomografia computadorizada fica evidente que os híbridos PVA-BaG-GA apresentam uma matriz tridimensional com poros interconectados.

Quando comparados os valores obtido por MEV e pela μCT , pela tabela 5.5 e figuras 5.10 e 5.11, notamos que há uma proximidade para os resultados relacionados ao tamanho máximo de poro, entretanto comparações referentes às medidas mínimas do tamanho de poro demonstram valores discrepantes entre o MEV e a μCT .

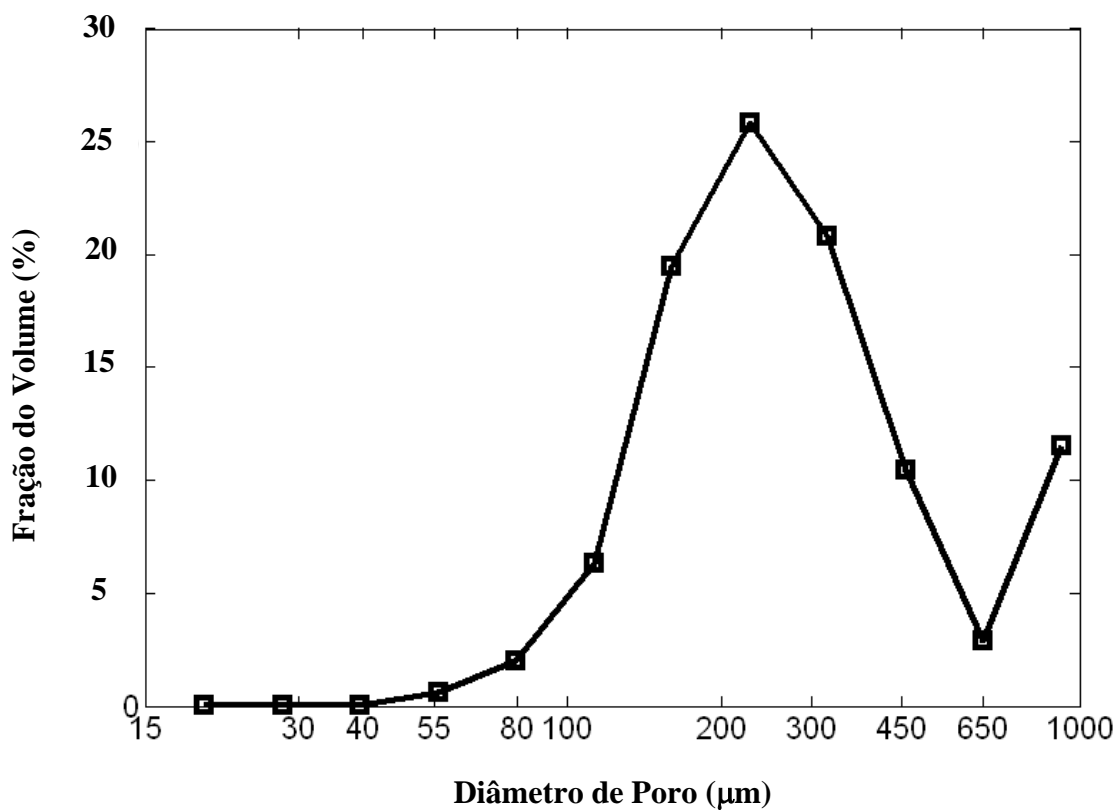


Figura 5.10 – Distribuição de tamanho de poro de matriz híbrida PVA-BaG reticulada com 5% p/p de glutaraldeído. Resultados obtidos a partir de análise de imagem 3D de microtomografia computadorizada por transmissão de raios X.

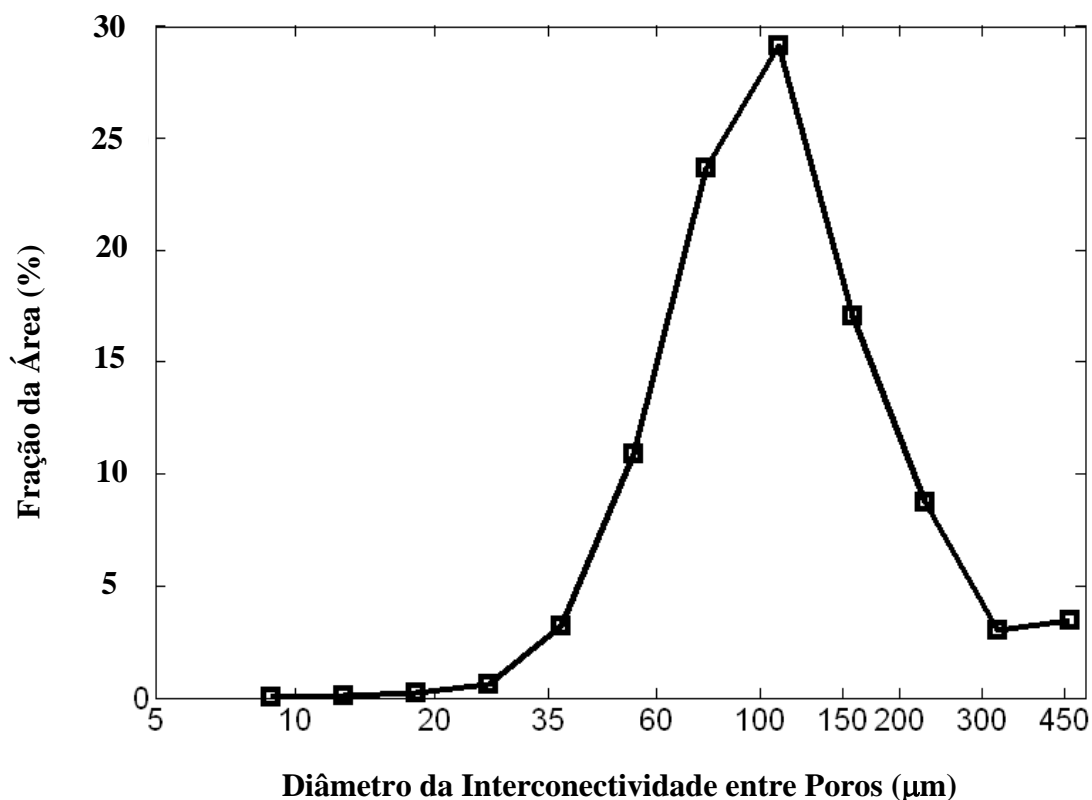


Figura 5.11 – Distribuição de tamanho das interconectividades entre poros de matriz híbrida PVA-BaG reticulada com 5% p/p de glutaraldeído. Resultados obtidos a partir de análise de imagem 3D de microtomografia computadorizada por transmissão de raios X.

Tabela 5.5 – Análise Dimensional do Tamanho de Poro de Híbridos PVA-BaG

	[] de Glutaraldeído (% p/p)	
	5,0	5,0*
Medida Máxima de Poro (µm)	450	450
Medida Mínima de Poro (µm)	50	100
Medida Máxima de Interconectividade (µm)	100	200
Medida Mínima de Interconectividade (µm)	10	60

* Valores obtidos através de microtomografia computadorizada

Se tomarmos por base as medidas obtidas por μ CT tanto para tamanho de poro como para as interconectividade e compararmos com a microscopia eletrônica de varredura, os resultados indicam que há dificuldade para diferenciação nas imagens de MEV entre estruturas que representem poros menores e interconectividades, o que pode justificar a imprecisão nos valores da medida mínima do tamanho de poro. Além disso, é imperativo destacar o benefício obtido através da μ CT, para análise qualitativa e quantitativa de estruturas tridimensionais.

A μ CT tem demonstrado várias vantagens na avaliação de matrizes, como versatilidade, sendo uma técnica capaz de caracterizar matrizes em múltiplos aspectos, como porosidade, área superficial em relação ao volume e interconectividade (HO et. al., 2006). Como exemplo de resultado obtido por μ CT se destaca a capacidade de observar o osso regenerado nos tecidos de hospedeiro, adjacentes ao centro do defeito (SHAO et. al., 2006).

Além disso, matrizes de vidro bioativo apresentaram, através de microtomografia, estrutura porosa similar ao osso trabecular com tamanho modal de poro de 561 μ m (JONES et. al., 2007), similar ao osso trabecular humano que apresentou tamanho aproximado de 600 μ m.

5.5.3 Caracterização por espectroscopia FTIR de Híbridos PVA-BaG-GA

Por meio da análise das regiões de absorção nos espectros FTIR associadas à sílica e ao polímero PVA foram realizadas comparações das intensidades buscando identificar as ligações presentes para os híbridos preparados nas concentrações de até 5% (p/p) de glutaraldeído.

As bandas relativas ao PVA foram as bandas entre 3600-3200 cm^{-1} , usualmente associadas ao grupo OH do álcool e as bandas entre 2900-2800 cm^{-1} e 1250-1100 cm^{-1} associadas aos grupos C-H e C-O, respectivamente (PEREIRA et. al., 2005; MANSUR & COSTA, 2008; COSTA et. al., 2008a). Para a fase inorgânica as bandas estudadas foram as localizadas entre, 1100-1000, 950-900 e 800-700 cm^{-1} associadas respectivamente às ligações Si-O-Si, Si-OH e Si-O-Si (ALMEIDA & PANTANO, 1990), conforme mostrado na tabela 5.2.

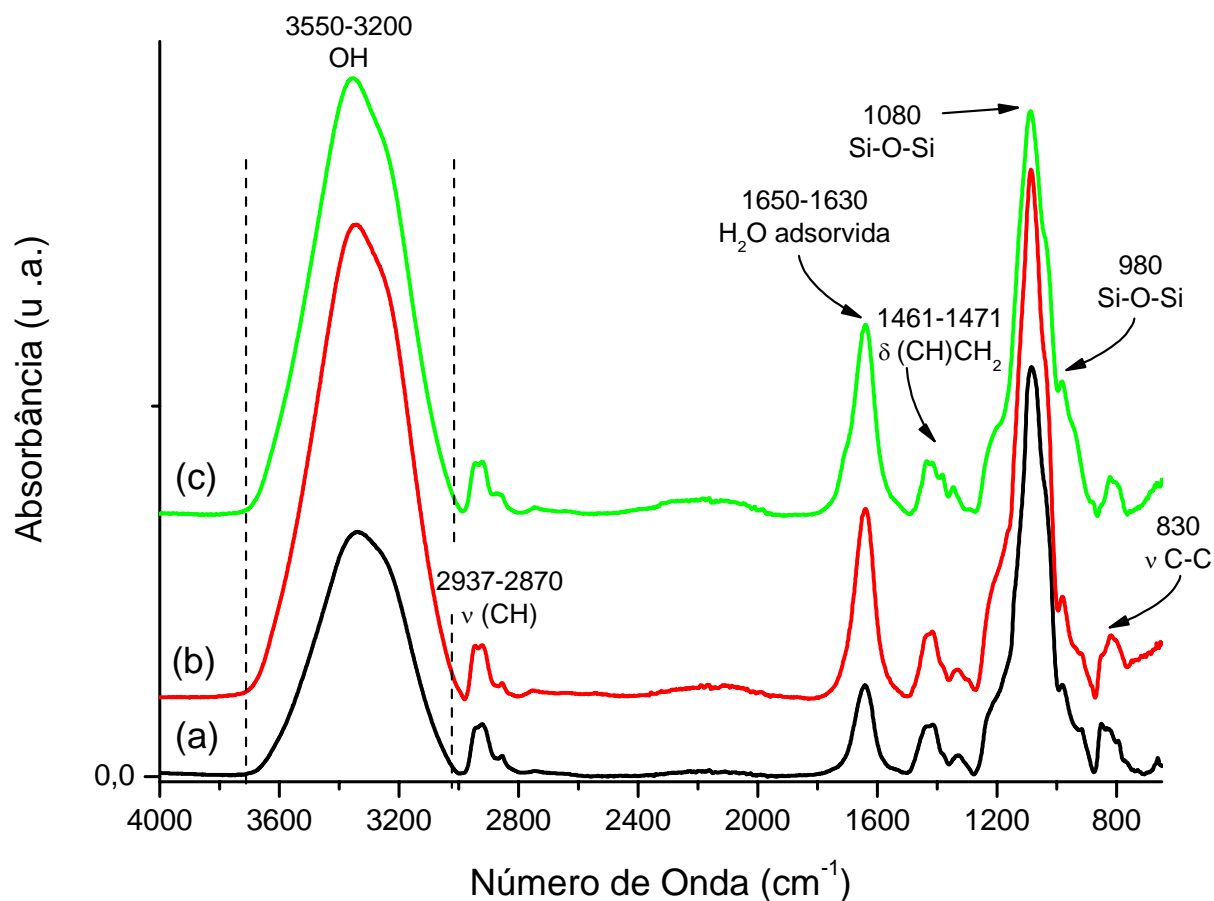


Figura 5.12 – Espectros FTIR de híbridos PVA-BaG preparados com as concentrações de (a) 0% p/p; (b) 1% p/p e (c) 5% p/p de glutaraldeído.

Comparando os valores obtidos para híbridos não reticulados, de acordo com a figura 5.13, as razões entre os picos 1080 e 950 cm^{-1} demonstram aumento dos valores para acréscimos de GA para concentração de 1% (p/p), enquanto que as razões entre os mesmos picos apresentaram diminuição para híbridos reticulados com 5% de GA.

Baseado nesse resultado podemos sugerir que a adição de glutaraldeído na concentração de 1% (p/p) interferiu no número de sítios OH do PVA disponíveis para ligação com os grupos Si-OH, favorecendo a condensação desses grupos para formar ligações Si-O-Si, conforme observado também por Mansur et. al. (2004). Por outro lado a adição de quantidade elevada de glutaraldeído, como a observada na concentração de 5 % (p/p), promoveu a reação de maneira mais intensa, com geleificação mais rápida, cujo tempo gasto chegou a ser menos da metade do tempo dispendido para as reações sem glutaraldeído.

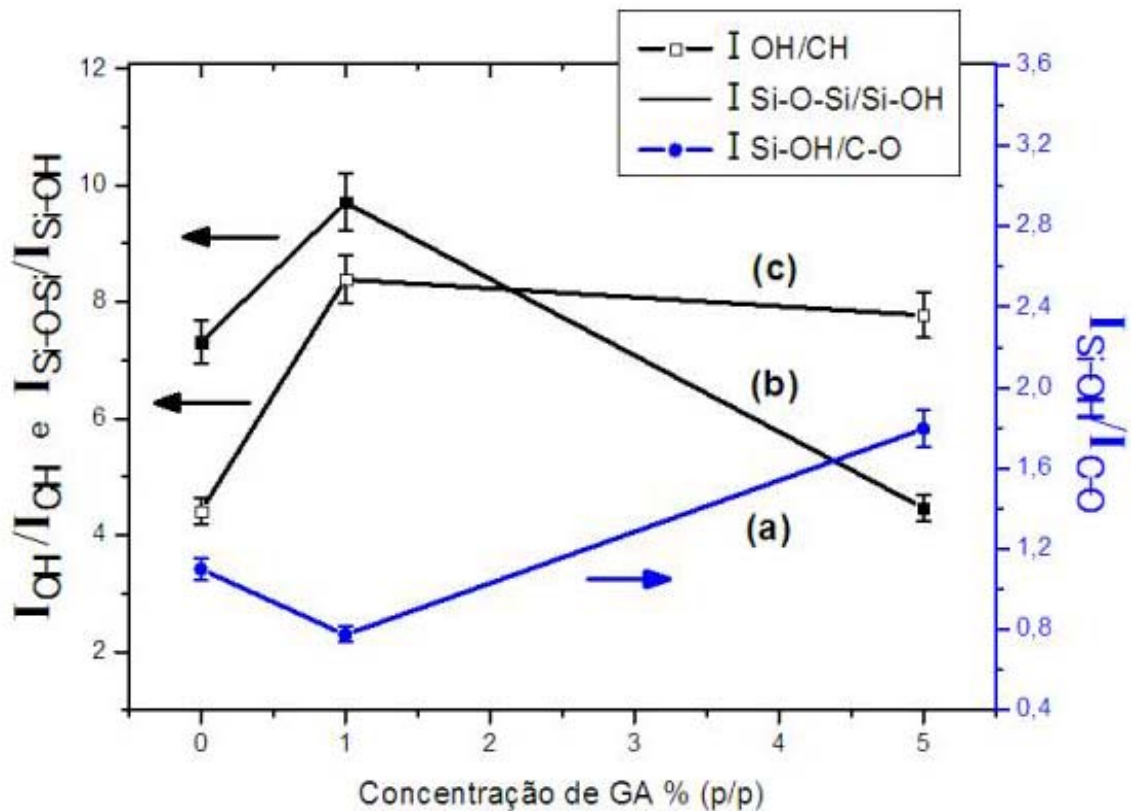


Figura 5.13 – Razão entre os picos dos espectros FTIR em função da concentração de glutaraldeído dos híbridos PVA-BaG. (a) I_{Si-OH}/I_{C-O} ; (b) $I_{Si-O-Si}/I_{Si-OH}$ e (c) I_{OH}/I_{CH} .

Dessa forma os grupos Si-OH podem ter sido impedidos de condensar para formar as ligações Si-O-Si resultando em centros inorgânicos de condensação menores com elevado número de grupos Si-OH disponíveis e razão menor entre as bandas 1080 e 950 cm^{-1} .

A análise dos valores obtidos para híbridos não reticulados, mostrou que as razões entre os picos 950 e 1250 cm^{-1} tiveram diminuição dos valores para acréscimos de GA na concentração de 1% (p/p) enquanto as relações dos picos apresentaram aumento para híbridos reticulados com 5% de GA. Baseado nesse resultado, podemos sugerir que a adição de glutaraldeído diminui a razão entre os valores dos picos, dado o acréscimo de grupos C-O do glutaraldeído, conforme observado para a concentração de 1% (p/p), entretanto para a concentração de 5% (p/p) ocorreu aumento na relação entre os picos, o que indica que, apesar da adição do glutaraldeído o híbrido deve ter apresentado ao final um elevado número de grupos Si-O residuais.

Comparado com os resultados obtidos para híbridos preparados sem agente reticulante, a relação entre as bandas 3300 e 2900 cm^{-1} mostrou um aumento nos valores para híbridos preparados com 1% (p/p) de glutaraldeído e manutenção desses valores para híbridos com 5% (p/p) de GA. Esses dados podem indicar que inicialmente o glutaraldeído atue reagindo com o polímero, competindo com as ligações entre os grupos Si-OH e o PVA. Além disso, a adição de elevadas concentrações de glutaraldeído indicam que a influência do reticulante foi limitada pelas concentrações de polímero e vidro bioativo utilizadas.

5.5.4. Caracterização cristalográfica por DRX de Híbridos PVA-BaG-GA

O resultado de difração de raios X para os híbridos PVA-BaG preparados com adição de até 5%(p/p) de glutaraldeído é mostrado na figura 5.14. Os difratogramas apresentaram um pico na região de 2θ igual a $22,5^\circ$, compatível com o plano (1 0 -1) do PVA, já identificado em amostras de PVA como fornecida pelo fabricante.

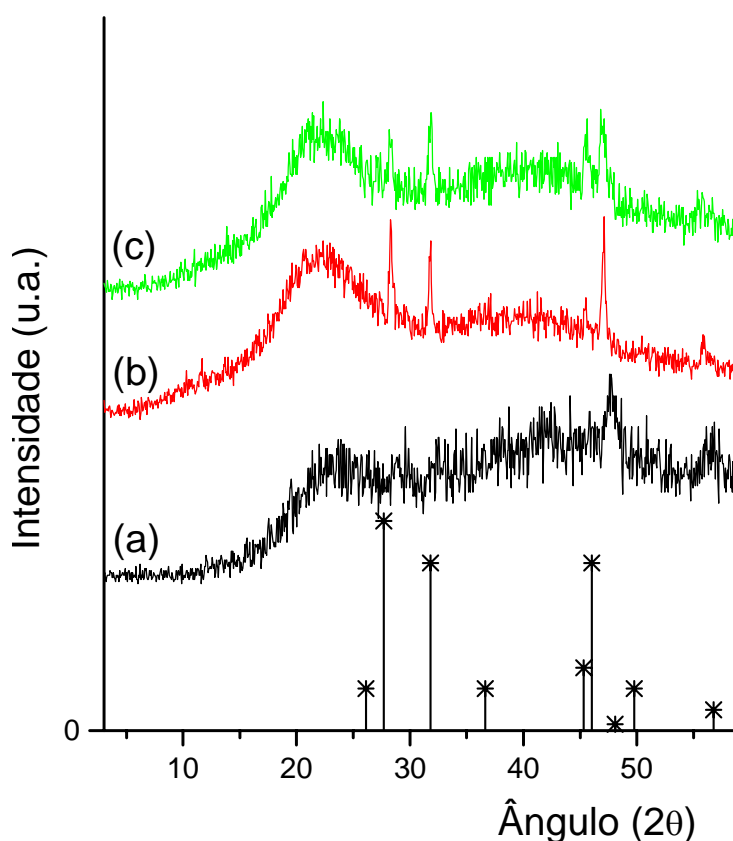


Figura 5.14 - Padrão de DRX para o CaSiO_3 (00-002-0506) indicados por (*) e para amostras de: (a) Híbrido PVA-BaG-0,5%GA, (b) Híbrido PVA-BaG-1,0%GA e (c) Híbrido PVA-BaG-5,0%GA.

Para amostras preparadas com 0,5% de glutaraldeído a intensidade da banda centrada em $22,5^\circ$ foi menor, sugerindo que a cristalinidade dos híbridos diminui com a formação de ligações cruzadas entre o PVA e glutaraldeído (WANG et. al., 2009).

Por outro lado amostras de híbridos PVA-BaG preparados nas concentrações de 1 e 5% (p/p) de GA a intensidade da banda centrada em $22,5^\circ$ foi maior que aquela apresentada para amostras preparadas na concentração de 0,5% de glutaraldeído. Além disso, os difratogramas das amostras preparadas nas concentrações de 1 e 5% de GA apresentaram alguns picos, que comparados com os padrões do “*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*”, foram compatíveis com silicato de cálcio.

5.5.5. Ensaio de Resistência Mecânica à Compressão de Híbridos PVA-BaG-GA

A figura 5.15 mostra a resposta ao esforço de compressão em função da deformação de espumas híbridas de PVA-BaG reticuladas com glutaraldeído em diversas concentrações. As amostras submetidas a esses ensaios foram preparadas a partir da região mais homogênea dos híbridos, definida por inspeção visual, para permitir alcançar resultados mais representativos nas análises mecânicas.

Como pode ser observado a partir da figura 5.15, o comportamento mecânico dos híbridos macroporosos PVA-BaG se apresenta consoante com aquele descrito por Gibson (2005), onde na região inicial há um aumento da tensão proporcional à deformação, que pode ser relacionado à compressão da estrutura dos poros.

Em seguida o gráfico passa para uma região definida por um patamar, que de acordo com as concentrações adicionadas de glutaraldeído se apresentaram mais definidos, como mostrado na concentração de 5% (p/p), com ou sem tratamento estabilizador, ou menos evidentes, como nos híbridos com concentrações de GA de 0 e 1% (p/p) de glutaraldeído. O patamar presente no gráfico é compatível com o colapso plástico e com o empilhamento das estruturas que delimitam os poros.

Por fim, o gráfico mostra a tensão de compressão que aumenta rapidamente em função da deformação, devido à densificação da espuma, com as estruturas dos poros se apresentando colabadas. É conveniente ressaltar que as amostras preparadas na concentração de 5% (p/p), com ou

sem tratamento estabilizador, não sofreram ruptura pela força de compressão, tendo os ensaios sido finalizados através dos limites de segurança da máquina de ensaios.

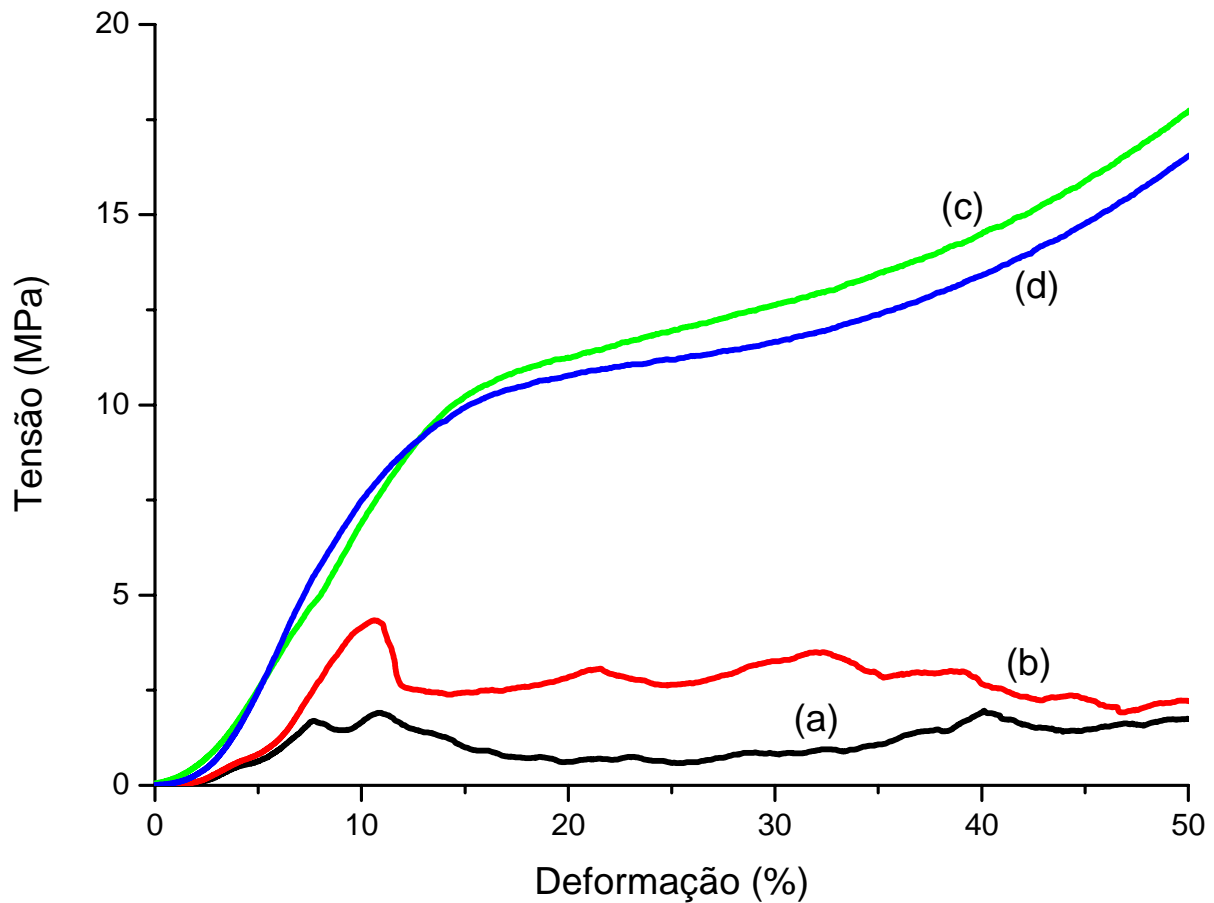


Figura 5.15 – Curvas típicas de Tensão x Deformação obtidas por ensaio de compressão de híbridos PVA-BaG preparados com as concentrações de GA (a) 0%; (b) 1%; (c) 5% e (d) 5% de glutaraldeído submetidas a tratamento com solução de NH_4OH .

A figura 6.16 mostra os valores do limite de escoamento dos híbridos PVA-BaG-GA. Amostras sem glutaraldeído apresentaram limite de escoamento em torno de 2MPa, valor esse na faixa do limite inferior observado para ossos corticais e na média dos valores de biocerâmicas porosas reportadas na literatura, que apresentaram valores entre 0,3 a 5,0MPa (KWON et. al., 2002; LE HUEC et. al.,1995; RAMAY & ZHANG, 2003), dependendo do percentual de porosidade e distribuição de tamanho dos poros.

A adição 1% (p/p) de glutaraldeído promoveu aumento no limite de escoamento para valores até 3 vezes maiores do que os observados para amostras sem o agente reticulante.

Entretanto as amostras com 1% (p/p) de glutaraldeído apresentaram desvio padrão elevado, o que pode ser justificado, pois apesar do glutaraldeído promover a adição de ligações cruzadas nas cadeias poliméricas, híbridos preparados nessa composição apresentaram estrutura tridimensional com tamanho médio de poro muito próximo daquele apresentado pelos híbridos sem reticulante. Dessa forma, apesar do incremento nos valores do limite de escoamento a estrutura macroporosa demonstra instabilidade, ou seja, arquitetura heterogênea ocasionando assim ampla faixa para os valores do limite de escoamento.

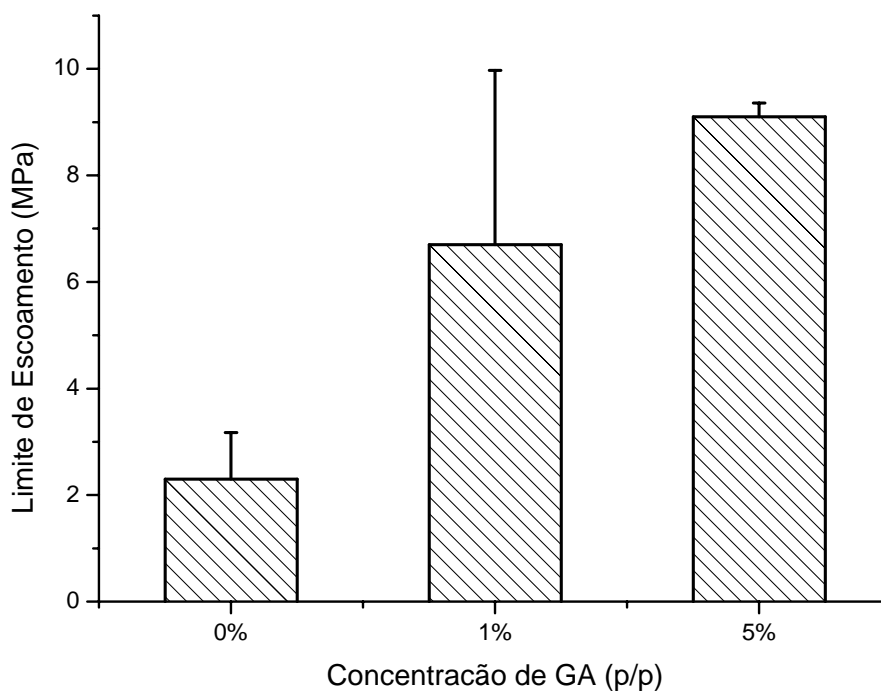


Figura 5.16 – Gráfico mostrando os valores do limite de escoamento em função da concentração de glutaraldeído utilizada no preparo dos híbridos PVA-BaG-GA.

De outra forma as amostras preparadas com 5% (p/p) de glutaraldeído mostraram valores em torno de 9 MPa para o limite de escoamento, que representa um aumento da ordem de 30% em relação às amostras preparadas com 1% (p/p) e cerca de 3,5 vezes os valores observados para as amostras preparadas sem reticulante. O desvio padrão das amostras preparadas com 5% (p/p) de GA foi da ordem de 3%. Esse dado representa a reprodutibilidade dos ensaios e deve ter sido influenciado pela homogeneidade da estrutura dos híbridos, característica essa também demonstrada, conforme pode ser observado pelas imagens de MEV da seção 5.5.1 e pelos resultados descritos pela microtomografia computadorizada de raios X na seção 5.5.2.

Outro fator relevante para explicar os desvios padrão do limite de escoamento é o efeito da quantidade de ligações cruzadas sobre a resistência desses híbridos, além da modificação das características microestruturais das paredes dos poros. Pode ainda ser citado o efeito envolvido no tempo de geleificação, resultando em diminuição do tamanho de poro e morfologia, que favoreceu o incremento no módulo de elasticidade.

Pela análise do gráfico da figura 5.17, relativo ao percentual de deformação elástica até o limite de escoamento, pode-se observar que amostras preparadas sem reticulante obtiveram valores em torno de 8% do comprimento inicial. A adição de 1% (p/p) de GA promoveu leve incremento nessa característica, com valores em torno de 8,5%.

Híbridos preparados com 5% (p/p) de GA, por outro lado, apresentaram acréscimo da deformação no escoamento para 15%, ou seja, quase o dobro daquele observado para amostras sem reticulante, que foi de 8%, conforme mostrado na tabela 5.6. Esse acréscimo deve estar relacionado à formação de ligações cruzadas, além das modificações na morfologia ocorridas, onde a estrutura com menor tamanho médio de poro deve atuar dissipando a energia envolvida durante a compressão, e dessa forma, apresenta maior capacidade de deformação.

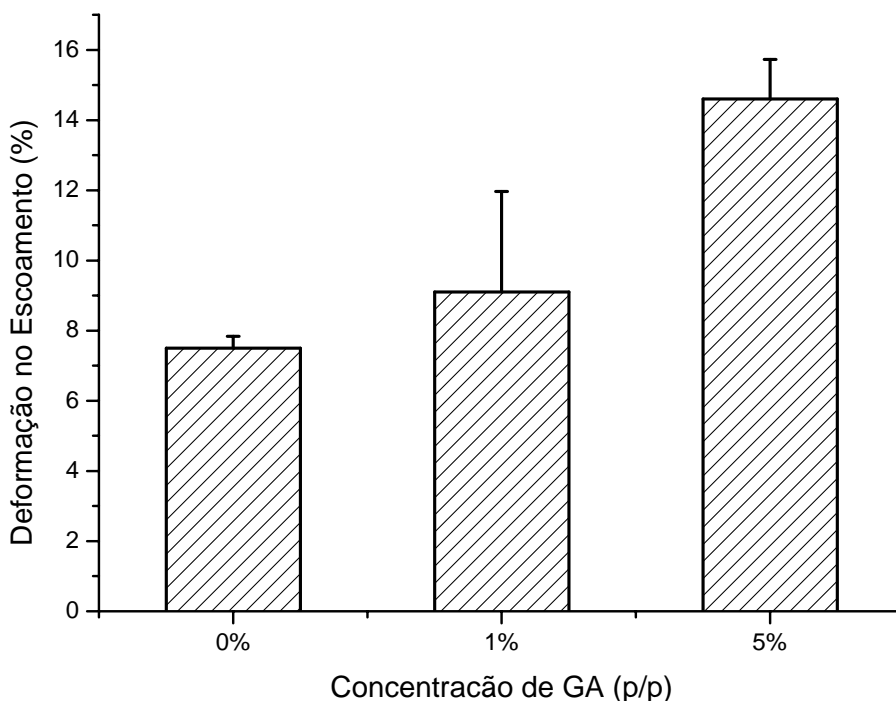


Figura 5.17 – Gráfico mostrando os valores da deformação no escoamento em função da concentração de glutaraldeído utilizada no preparo dos híbridos PVA-BaG-GA.

Outra característica avaliada foi o módulo de elasticidade em função da concentração de glutaraldeído, apresentado no gráfico da figura 5.18. Os valores indicados referem-se à porcentagem relativa aos valores obtidos para amostras preparadas sem agente reticulante, que foram consideradas como 100%. Essa propriedade reflete a relação entre a tensão e a deformação e mostra valores muito similares para amostras preparadas com 1 e 5% (p/p) de glutaraldeído. Ambas as concentrações mostraram acréscimo em torno de 30% em relação aos híbridos preparados sem reticulante.

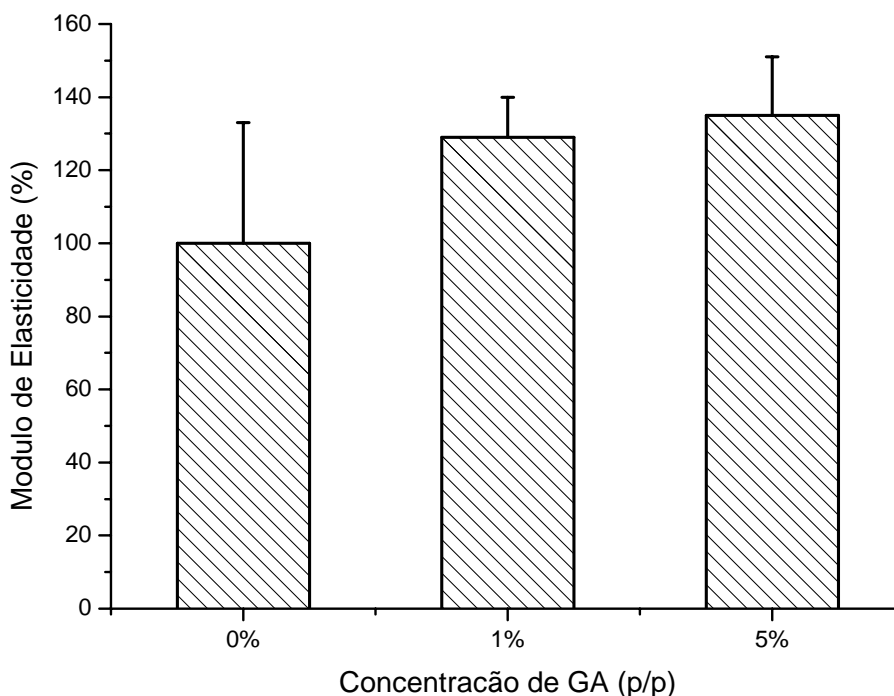


Figura 5.18 – Gráfico mostrando os valores do módulo de elasticidade em função da concentração de glutaraldeído utilizada no preparo dos híbridos PVA-BaG-GA.

O resumo dos valores obtidos nos ensaios mecânicos é apresentado na tabela 5.6, onde pode ser comparado o limite de escoamento com os dados da literatura para a tensão do osso trabecular/esponjoso.

Tabela 5.6 – Dados do módulo de compressão axial, limite de escoamento e deformação no escoamento para híbridos PVA-BaG-GA.

[] GA (%)	Limite de Escoamento (MPa)	Deformação no Escoamento (%)	Módulo de Elasticidade (GPa)
0	2,3±0,87	7,5±0,34	0,6±0,21
1	6,7±3,27	9,1±2,87	0,8±0,07
5	9,1±0,26	14,6±1,13	0,8±0,10
5 - NH ₄ OH	7,5±1,06	9,9±0,94	1,0±0,05
Tensão do osso trabecular/esponjoso (b)	2-12 MPa		

(b) - Referências (SHI & JIANG, 1998; MONTJOVENT et. al., 2005)

6. DEGRADAÇÃO DE HÍBRIDOS PVA-BAG-GA

O estudo do processo de degradação de materiais apresenta uma série de dificuldades em face dos inúmeros eventos envolvidos e dos fatores que interferem para as diferentes respostas observadas. Os híbridos sintetizados nesse trabalho representam enorme desafio por se tratarem de sistemas complexos com estrutura polimérica e fase inorgânica multicomponente composta por silicatos contendo cálcio e fósforo.

O estudo da degradação em ambiente aquoso foi utilizado como modelo experimental por representar uma das maneiras possíveis de avaliar o comportamento de degradação de materiais hidrofílicos (PVA e BaG), como os envolvidos nesse estudo. Além disso, partindo do princípio de que a água atua como solvente universal e está presente na composição dos vários meios fisiológicos, representa portanto o modelo ideal para utilização em ensaios de degradação de biomateriais. Além disso, o ensaio de degradação foi conduzido utilizando o mesmo meio durante todo o período, sem substituição por novo volume de água deionizada, para manter a força iônica em função do ritmo de degradação apresentado pelos híbridos.

O pH (potencial hidrogeniônico) e a temperatura são dois dos principais fatores relacionados às soluções utilizadas como meio de imersão e que merecem especial atenção, sobretudo quando da avaliação do comportamento degradativo de materiais. A influência do pH está relacionada às forças iônicas que atuam sobre as reações químicas e físicas que permeiam o material imerso na solução de degradação. Dessa forma interferem diretamente na maneira como se processam os eventos associados à degradação e os resultados em função da cinética (tempo/temperatura) de dissolução.

6.1 Medidas de pH

O pH após imersão de vidros bioativos em água, normalmente mostra um aumento nos valores, causado pela lixiviação de cátions do vidro, que são em seguida substituídos por íons H^+ vindos da solução (HENCH, 1991). Pelos resultados da figura 6.1 observamos redução nos valores do pH para todas as amostras estudadas, exceto aquelas tratadas com solução de NH_4OH . Esse comportamento pode ser explicado pela presença dos íons cloro, utilizados na síntese do BaG para controlar o

processo de hidrólise do alcóxido de silício, bem como pelo cloro presente na composição do cloreto de cálcio utilizado como fonte de cálcio para o vidro.

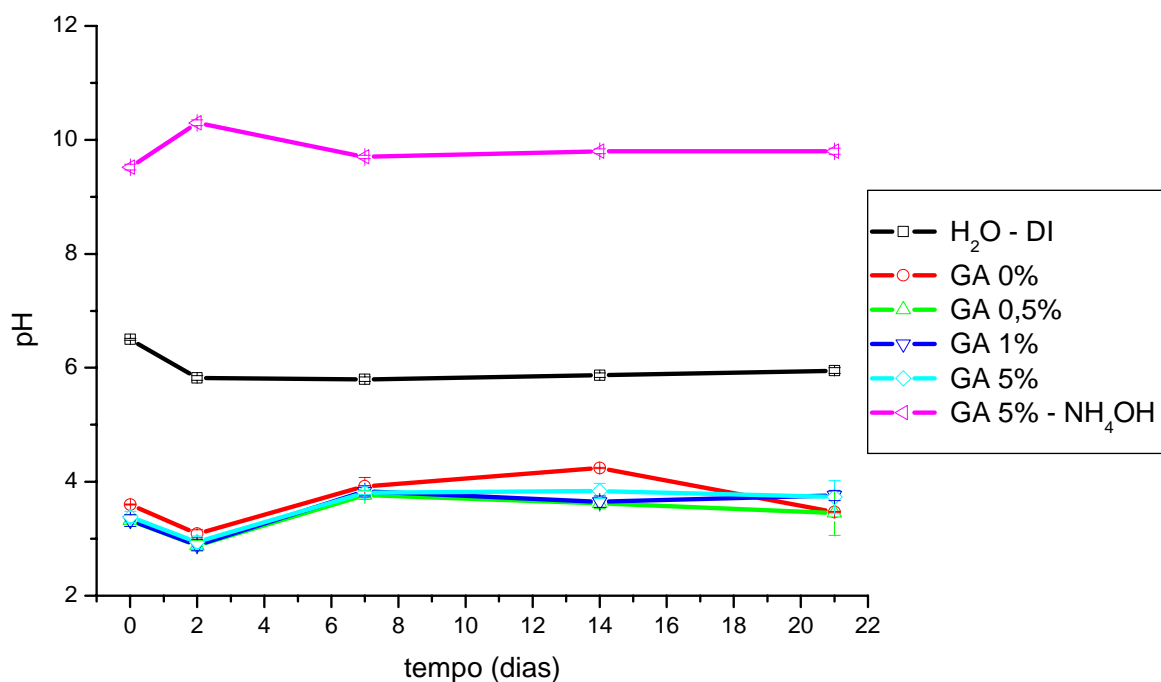


Figura 6.1 – Gráfico mostrando as medidas de pH obtidas através de ensaio de degradação realizado em amostras de PVA-BaG reticulados com GA, nas concentrações de (a) 0% p/p, (b) 0,5% p/p, (c) 1,0% p/p, (d) 5% p/p e (e) 5% p/p estabilizadas com solução de NH₄OH, conduzidos em períodos até 21 dias de imersão em água DI.

Entre o segundo e o sétimo dia de imersão observamos um aumento nos valores do pH, compatíveis com a liberação de silicatos para a solução e protonação da superfície dos híbridos, conforme descrito por Hench (1991). Outro evento que pode ter induzido o aumento do pH é a dissolução de parte do PVA dos híbridos para a solução, com o conseqüente aumento da concentração de cargas OH⁻.

6.2 Ensaio *in vitro* de Degradação em Meio Aquoso

Os resultados obtidos através das medidas da massa nos ensaios de degradação mostraram diminuição progressiva da massa dos híbridos com o aumento do período de imersão em água

deionizada. Pelo gráfico apresentado na figura 6.2 percebemos que para todas as concentrações de glutaraldeído utilizadas ocorreu perda de massa no período estudado, sendo que a parcela mais significativa de perda da massa ocorreu nos quatro primeiros dias de imersão.

A partir disso podemos evidenciar na figura 6.2 duas regiões distintas indicadas como R1 e R2, onde inicialmente ocorre degradação a uma taxa mais elevada (R1), a partir do qual uma segunda região descreve um comportamento onde a taxa da perda de massa passa a ser de menor intensidade (R2). As taxas correspondentes à perda de massa nas regiões R1 e R2 são apresentadas na tabela 6.1, pelos índices K1 e K2

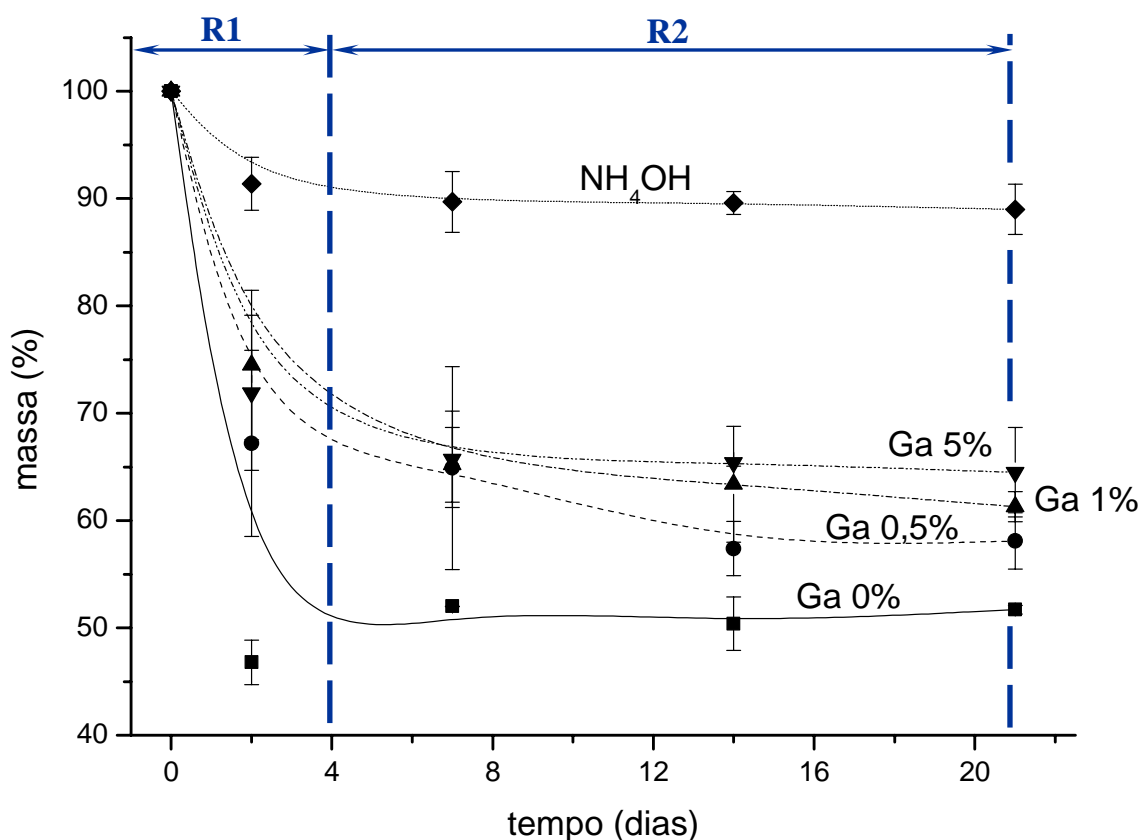


Figura 6.2 – Gráfico obtido através de ensaio de degradação realizado em amostras de PVA-BaG reticuladas com GA, nas concentrações de (a) 0% p/p, (b) 0,5% p/p, (c) 1,0% p/p, (d) 5% p/p e (e) 5% p/p estabilizadas com solução de NH₄OH, conduzidos em períodos de até 21 dias de imersão em água DI. R1 é o período que compreende taxa inicial de perda de massa e R2 é o período onde as taxas de perda de massa mudam para um segundo regime de dissolução com estabilização.

A tabela 6.1 apresenta um resumo dos resultados obtidos para o ensaio de degradação em água DI. As taxas de degradação foram definidas como K_1 e K_2 e correlacionadas aos períodos de imersão R1 e R2, respectivamente, sendo calculadas através da Eq. (2)

$$K = \frac{\Delta M}{\Delta t} \quad (2)$$

onde ΔM é a variação da massa seca durante um período Δt de imersão no meio de degradação.

Tabela 6.1 – Resumo dos Índices de Degradação de Híbridos PVA-BaG

	[] de Glutaraldeído (% p/p)				
	0,0	0,5	1,0	5,0	5,0 Estabilizado c/ NH ₄ OH
K1 (% massa / dia)	-18	-10	-9	-9	-3
K2 (% massa / dia)	0,0	-0,7	-0,4	-0,2	-0,1
Perda de massa no t ∞ (t > 20dd) (%)^a	49	42	39	35	10
m₇₅ (horas)^b	25	49	71	64	-

^a Valor em que a porcentagem da massa dos híbridos permanece constante.

^b Tempo estimado em que a massa dos híbridos atinge o valor de 75% da massa seca inicial.

As amostras sintetizadas sem glutaraldeído apresentaram perda de massa mais acentuada para todos os períodos de imersão estudados, se comparadas com as amostras reticuladas com glutaraldeído. Este resultado sugere que a alta densidade de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas formadas pelo agente de reticulação proporcionou mais estabilidade estrutural e diminuiu a taxa de degradação dos híbridos (BERGER, et al., 2004; WANG, 2004). O esquema mostrado na figura 6.3 representa o agente reticulante formando as ligações entre as cadeias poliméricas e os elementos utilizados no preparo do biovidro dispersos nesse reticulado, formando a estrutura do híbrido.

A adição de glutaraldeído na concentração de 0,5% (p/p) em função da massa de PVA utilizada no preparo dos híbridos foi suficiente para promover uma redução significativa na perda de massa para os quatro primeiros dias de imersão, tendo no decorrer do período estudado uma perda de massa de menor intensidade e estabilização da massa em torno 58% do valor da massa seca inicial, por volta do décimo sexto dia de imersão.

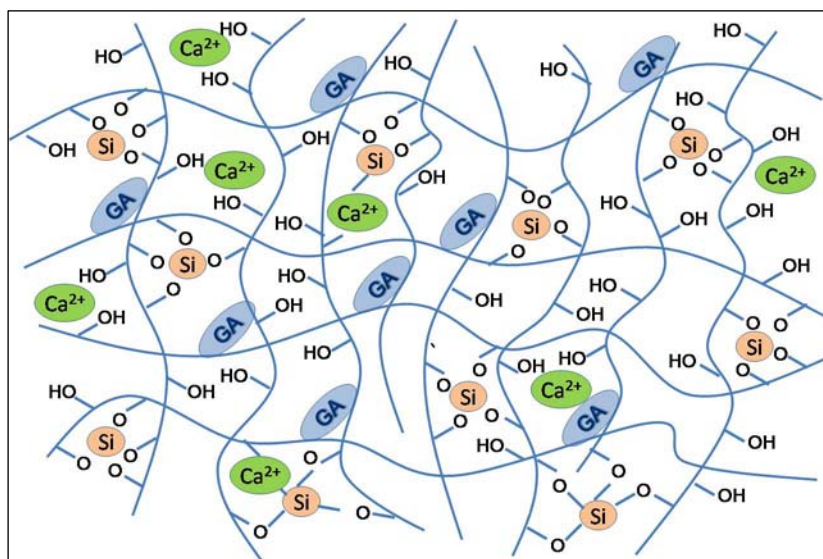


Figura 6.3 – Esquema da estrutura dos híbridos PVA-BaG reticulados com GA formando as pontes entre as redes poliméricas com a matriz inorgânica dispersa na matriz polimérica.

As amostras preparadas com 1% (p/p) de glutaraldeído tiveram perda de massa com valores finais da massa em torno de 61% da massa seca inicial após 21 dias de imersão. Já para as amostras preparadas com 5% (p/p) de glutaraldeído, que representa uma elevada quantidade de reticulante, apresentaram após 21 dias de imersão valores em torno de 64% da massa seca inicial, com estabilização desse valor iniciada próximo ao oitavo dia de imersão.

Amostras preparadas na mesma concentração de 5% (p/p) de glutaraldeído e submetidas a tratamento de estabilização com solução 0,3M de NH_4OH mostraram no ensaio de degradação após 21 dias de imersão, massa final de aproximadamente 90% do valor da massa inicial, reduzindo significativamente a perda de massa para a solução de teste, se comparado com amostras sem tratamento com NH_4OH .

As figuras 6.4, 6.5 e 6.6 mostram a variação das taxas e perdas de massa, para os híbridos avaliados.

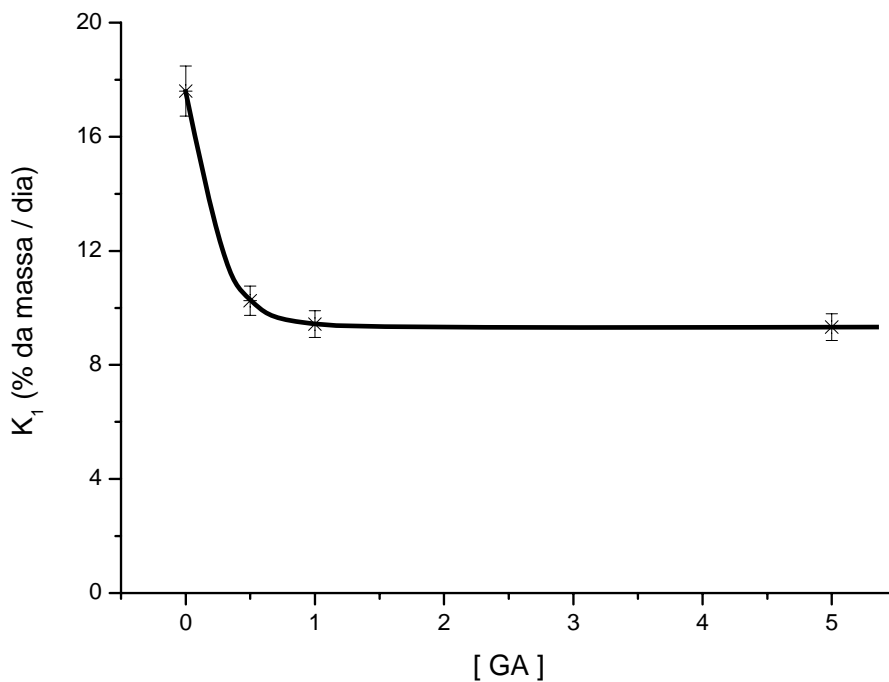


Figura 6.4 – Variação da taxa de perda de massa K_1 de híbridos PVA-BaG em função da concentração de GA utilizado, para amostras preparadas nas concentrações de 0% p/p a 5% e de amostra reticulada com 5% p/p de GA e estabilizada com solução de NH_4OH , apresentada no período inicial R1 de imersão em água DI.

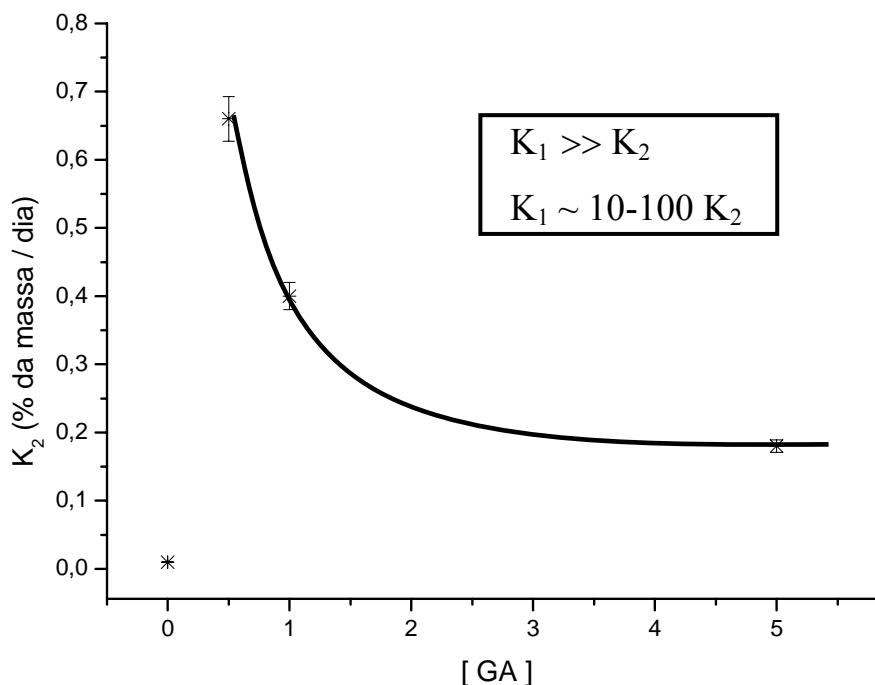


Figura 6.5 – Variação da taxa de perda de massa K_2 de híbridos PVA-BaG em função da concentração de GA utilizado, para amostras preparadas nas concentrações de 0% p/p a 5% e de amostra reticulada com 5% p/p de GA e estabilizada com solução de NH_4OH , apresentada no período inicial R2 de imersão em água DI.

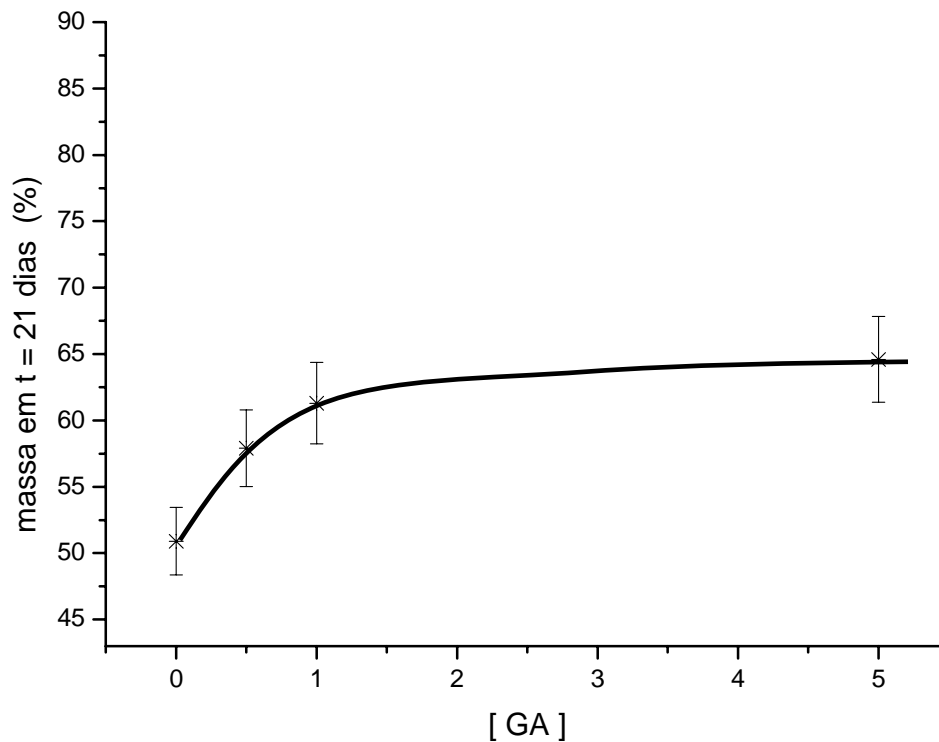


Figura 6.6 – Fração de massa presente após 21 de imersão em água DI em função da concentração de GA utilizado, para amostras preparadas nas concentrações de 0% p/p a 5% de GA e de amostra reticulada com 5% p/p de GA e estabilizada com solução de NH_4OH .

Quando comparado o valor da massa dos híbridos antes e após o tratamento estabilizador, percebemos que as amostras ao final do tratamento apresentaram perda de massa em torno de 30%, indicando que o tratamento estabilizador foi capaz de atuar nos híbridos de maneira a remover parte do material susceptível ao ataque degradativo. Burkersroda et. al. (2002) avaliando a degradação dos polímeros poli (ácido láctico) e poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) em solução com pH alcalino também verificou modificação no perfil de erosão dos polímeros com aumento na taxa de perda de massa. Por outro lado a perda de massa durante os ensaios de imersão em água deionizada, para amostras tratadas com NH_4OH , foi de menor intensidade, ou seja, o material se apresentou mais estável.

Considerando as fases constituintes dos híbridos estudados cada uma apresenta individualmente comportamento de degradação/dissolução distinto.

Segundo Cerruti et. al. (2005) os modelos mais comuns para dissolução do vidro bioativo são os modelos heterogêneo e homogêneo. No modelo heterogêneo, em um primeiro estágio a extração de

sílica e álcalis varia com a raiz quadrada do tempo, e a troca de álcalis com prótons da solução dominam a dissolução. Durante o segundo estágio da dissolução heterogêneo, a extração é linear com o tempo, e a dissolução da rede predomina. No modelo homogêneo, é proposto que o líquido reaja com as partículas durante todo o tempo, atuando por meio de uma reação homogênea de primeira ordem.

Para Mallapragada & Peppas (1996) o PVA como polímero semicristalino solúvel em água apresenta comportamento em meio aquoso onde a parte cristalina do polímero se desdobra e se junta à fase amorfa, que também sofre distensão das cadeias, o que leva à dissolução do polímero.

Por outro lado, compósitos nanoestruturados constituídos de polímeros degradáveis e camadas de silicato, frequentemente exibem alterações em várias propriedades, se comparados com os polímeros puros. Dentre as modificações importantes nas propriedades se destaca o aumento na degradação (RAY & BOUSMINA, 2005). Entretanto polímeros solúveis em água como o PVA podem se tornarem menos solúveis através de introdução de ligações cruzadas hidroliticamente instáveis (MERKLI et. al., 1998).

Tomando por base os resultados de degradação, o presente trabalho mostra que o comportamento dos híbridos durante a imersão em água DI indicou claramente a presença de dois estágios de perda de massa, cuja taxa de perda é influenciada pela concentração de glutaraldeído utilizada. Entretanto a partir de determinada concentração de glutaraldeído esse efeito é suprimido, conforme mostram os gráficos das figuras 6.4 e figura 6.5, que relacionam a taxa de degradação K1 e K2 em função da concentração de glutaraldeído, referente ao período inicial R1 e ao período final R2, respectivamente e o gráfico da figura 6.6 que correlaciona a fração da massa seca presente ao final de 21 dias de imersão em função da concentração de glutaraldeído utilizada.

6.3 Caracterização Termogravimétrica do Sistema PVA-BaG-GA

A obtenção de materiais híbridos preparados a partir do processo sol-gel representa um enorme desafio tecnológico, se tomarmos como base os inúmeros parâmetros envolvidos. A complexidade das etapas envolvidas na síntese do material pode levar a obtenção de materiais com estruturas diversas, sendo imperativo o levantamento das propriedades que permitam estabelecer se as características físicas e químicas foram alcançadas.

Buscando estudar as características relacionadas às composições químicas dos híbridos produzidos nesse trabalho, cuja constituição apresenta parte orgânica e parte inorgânica, foram realizadas análises térmicas. Os resultados apresentados na figura 6.7 referem-se à porcentagem de material orgânico e de material inorgânico calculados pela perda de massa ocorrida com o aumento da temperatura até 550°C.

Os valores obtidos indicam que as frações entre as fases orgânica e inorgânica foram efetivamente alcançadas para híbridos PVA-BaG reticulados com glutaraldeído em concentrações de até 5% (p/p). As únicas amostras que apresentaram divergência referem-se às amostras tratadas com NH_4OH , sugerindo que a neutralização tenha removido maior parcela da fase inorgânica. Entretanto em ambiente alcalino é de se esperar que ocorra hidrólise do PVA, onde uma molécula de éster é rompida resultando em um grupo álcool. Dessa forma pode ser observado que a utilização de glutaraldeído representou papel efetivo na formação de ligações que promoveram diminuição na degradação do PVA.

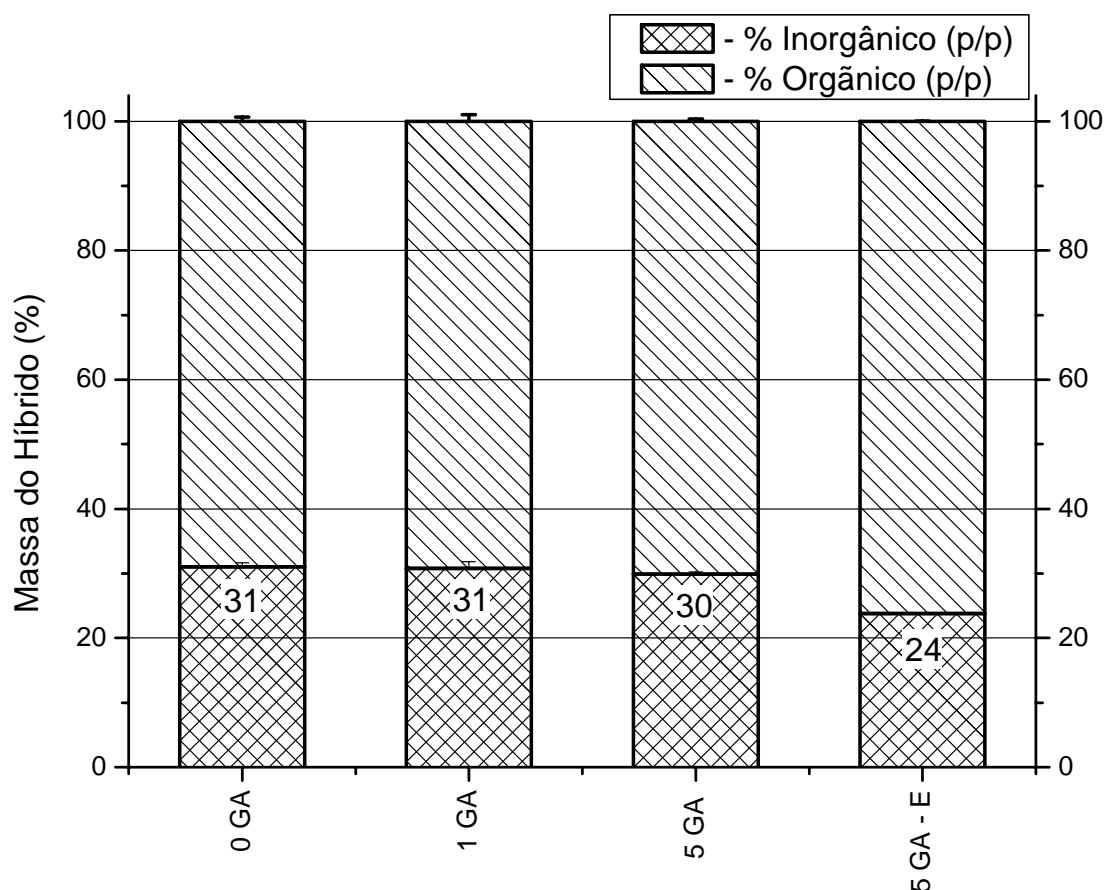


Figura 6.7 – Gráfico mostrando as porcentagens de material orgânico/inorgânico dos híbridos PVA-BaG reticulados com GA em frações de até 5% p/p.

Os híbridos foram também avaliados em função da temperatura através de análise térmica, sendo a perda de massa registrada para amostras na temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e para aquecimento das amostras até as temperaturas de ($110 \pm 5^\circ\text{C}$) e ($550 \pm 5^\circ\text{C}$), conforme o procedimento descrito na seção 4.4.3 do capítulo 4. Para a faixa de temperatura estudada a perda de massa é apresentada na figura 6.8.

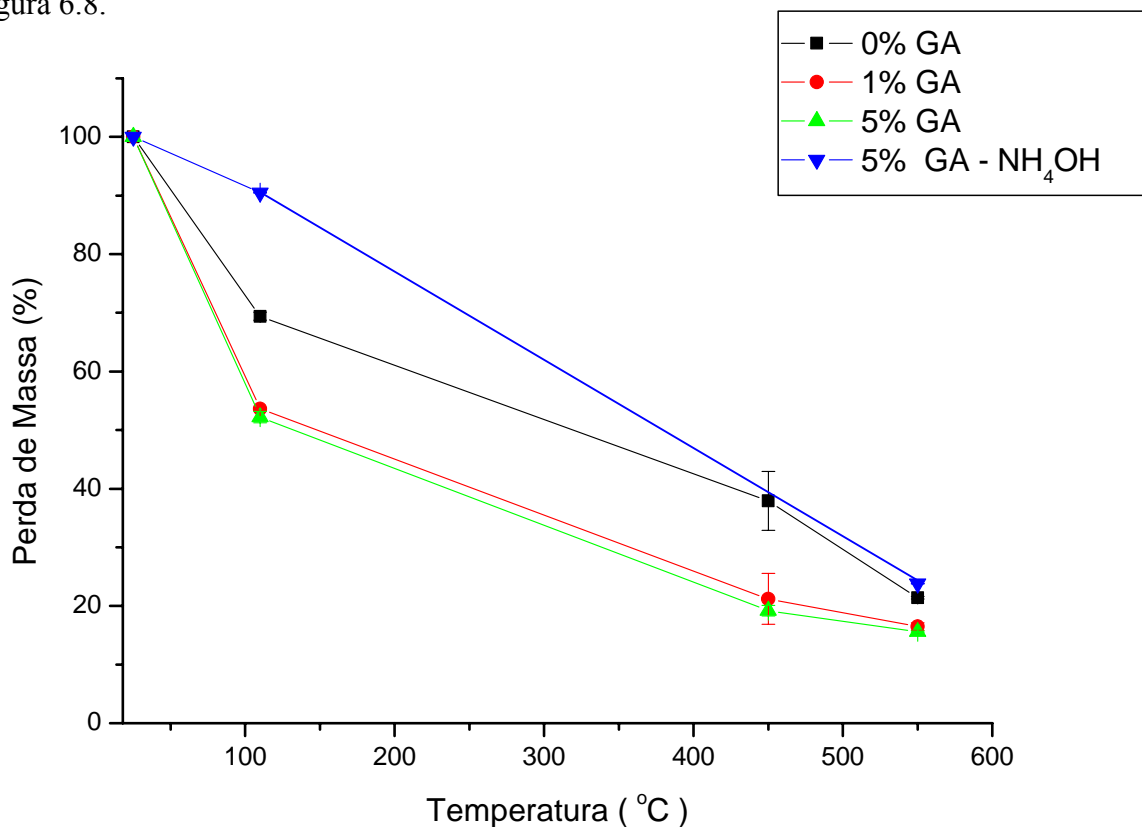


Figura 6.8 –Análise térmica mostrando a massa em função da temperatura, para híbridos com razão PVA-BaG igual a 70/30 preparadas nas concentrações de 0% p/p a 5% de GA e de amostra reticulada com 5% p/p de GA e estabilizada com solução de NH₄OH.

Pela figura 6.8 observamos que as amostras perderam em aquecimentos até a temperatura de 110 °C valores de massa que variaram entre 10 e 40% da massa úmida de equilíbrio. Essa faixa de temperatura normalmente é associada à quantidade de água e álcool residuais do processo de síntese (XU et. al., 2004) cujos valores foram influenciados pela adição de glutaraldeído nos híbridos e pelo tratamento realizado com NH₄OH.

Como é de se esperar a reticulação com glutaraldeído favorece a formação de géis com capacidade de armazenar volumes significativos de água na estrutura polimérica reticulada (DAI & BARBARI, 1999). Além disso, o vidro bioativo também apresenta caráter hidrofílico relacionado à presença da condensação dos átomos de silício, formando redes inorgânicas (ROOHANI-ESFAHANI et. al.,

2011). Essas características justificam os valores elevados de perda de massa até a temperatura de 110 °C.

Por outro lado, amostras tratadas com solução de NH₄OH apresentaram índices menores de perda de massa se comparadas com as demais amostras. Essa redução pode ter sido influenciada pelas reações químicas envolvidas na solução alcalina de NH₄OH que devem ter atuado na estrutura dos híbridos PVA-BaG, no sentido de hidrolisar o polímero e o vidro bioativo, removendo parte da massa para o meio de estabilização.

A perda de massa dos híbridos ocorrida na faixa de temperatura entre 110 e 550°C mostra uma tendência para valores da massa final próximos a 20% em relação à massa úmida de equilíbrio. Nessa faixa de temperatura a perda de massa pode ser atribuída à decomposição simultânea do PVA (HOLLAND & HAY, 2001), de resíduos de alcóxidos, precursores de silício e fósforo, e dos resíduos orgânicos do surfactante utilizado. Como todos os híbridos testados apresentavam a mesma razão PVA/BaG é de se esperar valores da massa residual próximos.

A exceção fica a cargo das amostras tratadas com solução estabilizadora, que como já comentado, possivelmente devem ter tido parte de sua estrutura removida durante o processo de neutralização, o que justifica os valores de massa residual em torno de 20% da massa úmida de equilíbrio.

Complementando a análise térmica, foi feita a queima dos híbridos preparados nas concentrações de até 5% de GA em amostras submetida ao ensaio de degradação com água deionizada pelo período de 7, 14 e 21 dias. Os valores obtidos foram comparados com aqueles obtidos antes da degradação e são apresentados na figura 6.9, 6.10 e 6.13 e na tabela 6.2.

Os resultados foram calculados considerando a massa após secagem em estufa por 24 horas na temperatura de 110 °C como sendo a massa inicial M_I e a massa residual M_R como sendo a massa remanescente da queima em forno mufla após uma hora na temperatura de 550 °C.

O cálculo da porcentagem de resíduo inorgânico (%) $R_{inorg.}$ das amostras foi feito através da Eq. (3)

$$(\%) R_{inorg.} = \frac{M_R}{M_I} \times 100 \quad (3)$$

Os valores apresentados na figura 6.9, 6.10 e 6.13 e na tabela 6.2 também levaram em consideração os dados plotados na figuras 6.2, referentes à perda de massa por imersão em água DI, definida como ΔM , que foi calculado usando a Eq. (1) para os vários períodos de tempo estudados. A partir disso foram calculadas as frações de inorgânico $F_{\text{inorg.}}$ e as frações de orgânico $F_{\text{org.}}$ utilizando as equações Eq. (4) e Eq. (5), respectivamente.

$$F_{\text{inorg.}} = (100 - \Delta M) \times (\%)R_{\text{inorg.}} \quad (4)$$

$$F_{\text{org.}} = \Delta M - F_{\text{inorg.}} \quad (5)$$

Os resultados indicam que após 7 dias de imersão em água DI os híbridos apresentaram valores de perda da fase inorgânica em torno de 15% para amostras sem reticulante e para amostras reticuladas com 1% e 5% de glutaraldeído. Por sua vez a fase orgânica apresentou perda maior para amostras não reticuladas e diminuição na perda da fase orgânica similar para amostras reticuladas com 1% e 5% de glutaraldeído. Amostras de híbridos tratadas com NH_4OH apresentaram perda menor da fase orgânica quando comparadas com as amostras anteriores e perdas maiores da fase inorgânica conforme mostra a figura 6.9.

Tabela 6.2 – Fração de material orgânico/inorgânico dos híbridos após períodos de até 21 dias de degradação em água DI

[] de Glutaraldeído (% p/p)	Inorgânico				Orgânico			
	Tempo de Imersão (dias)							
	0	7	21	$-\Delta$ (%)	0	7	21	$-\Delta$ (%)
0	31	16	17	46	69	36	34	50
1	31	17	16	49	69	48	45	35
5	30	15	15	50	70	51	50	29
5 - NH_4OH	24	12	12	49	76	49	50	35

Δ - redução percentual ocorrida no período de 21 dias

Para o período de 21 dias os resultados mostram estabilidade da massa da fase inorgânica para os híbridos estudados. Em relação às massas da fase orgânica foi observada estabilidade para as amostras com exceção para os híbridos preparadas com 1% (p/p) de GA. Esses resultados indicam

que degradação em meio aquoso ocorre em grande parte nos primeiros sete dias de imersão, sendo a fase inorgânica degradada de maneira similar para concentrações até 5% (p/p) de GA. Por outro lado a fase orgânica apresentou perdas que diminuiriam com o aumento da concentração de GA, conforme pode ser observado pelos gráficos das figuras 6.9, 6.10, 6.11 e 6.12.

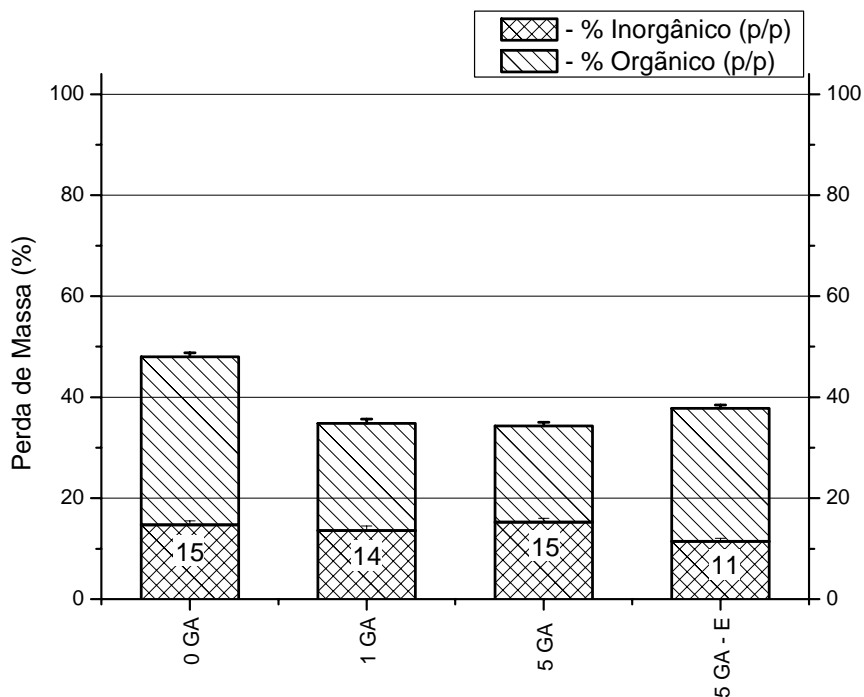


Figura 6.9 – Gráfico mostrando a perda de massa em porcentagem de orgânico/inorgânico dos híbridos PVA-BaG reticulados com GA em até 5% p/p, após 7 dias de degradação em água DI.

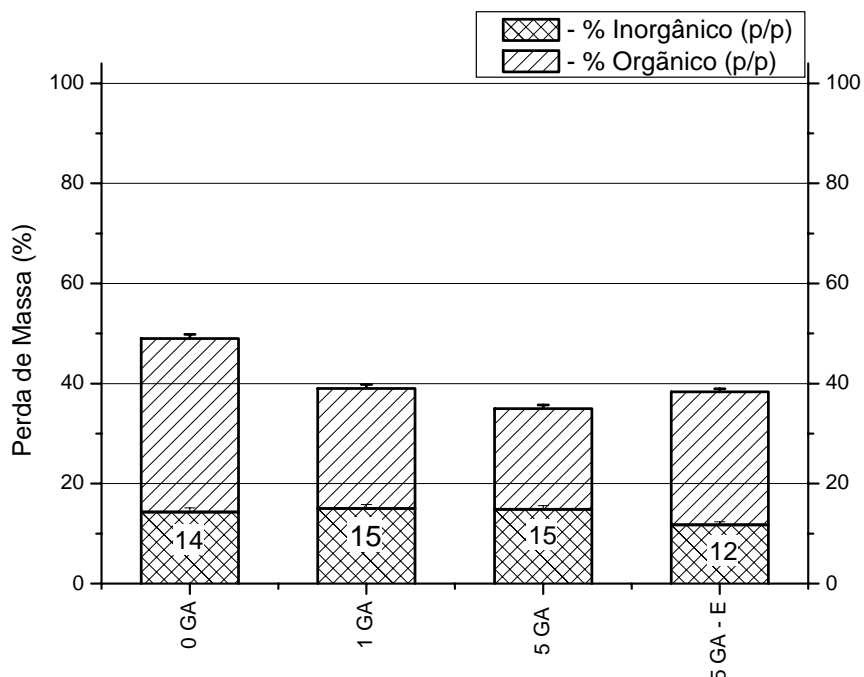


Figura 6.10 – Gráfico mostrando a perda de massa em porcentagem de orgânico/inorgânico dos híbridos PVA-BaG reticulados com GA em até 5% p/p, após 21 dias de degradação em água DI.

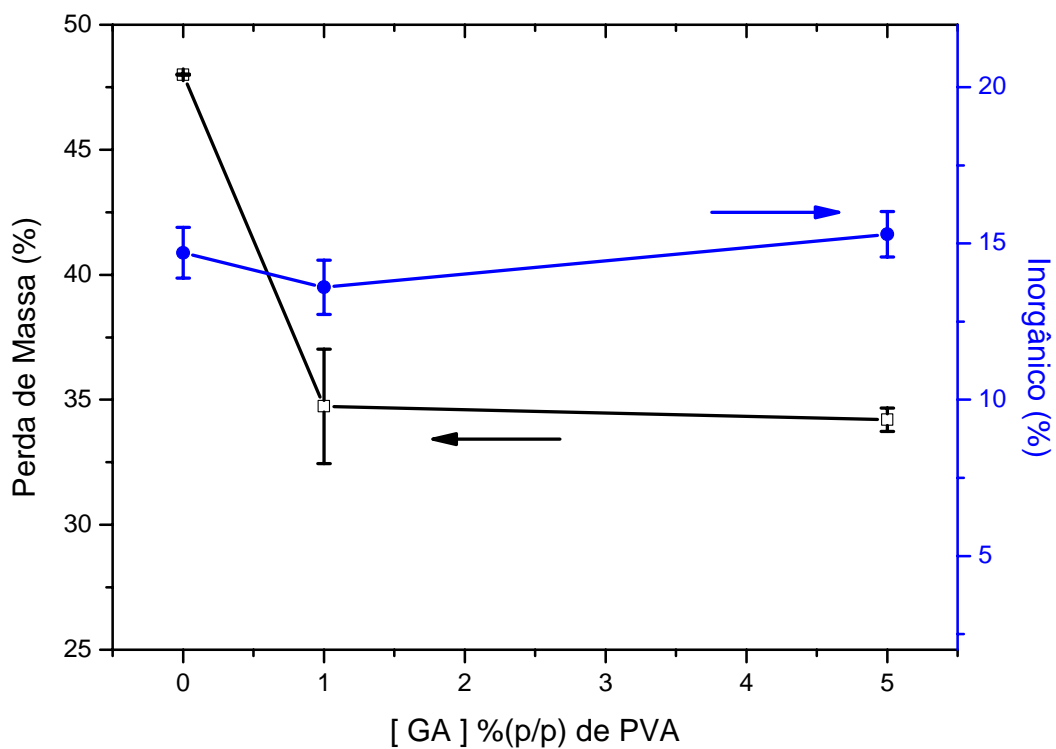


Figura 6.11 – Gráfico mostrando a perda de massa ocorrida após 7 dias de degradação em meio aquoso e a fração de inorgânico presente nesses híbridos em função da concentração de GA.

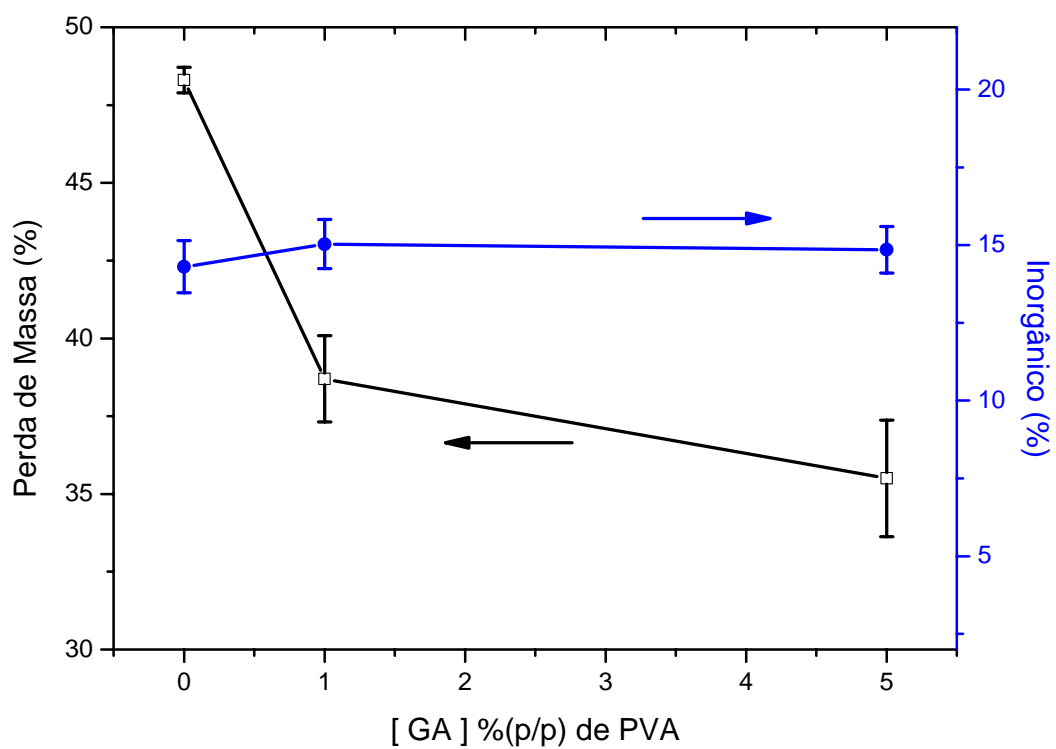


Figura 6.12 – Gráfico mostrando a perda de massa ocorrida após 21 dias de degradação em meio aquoso e a fração de inorgânico presente nesses híbridos em função da concentração de GA.

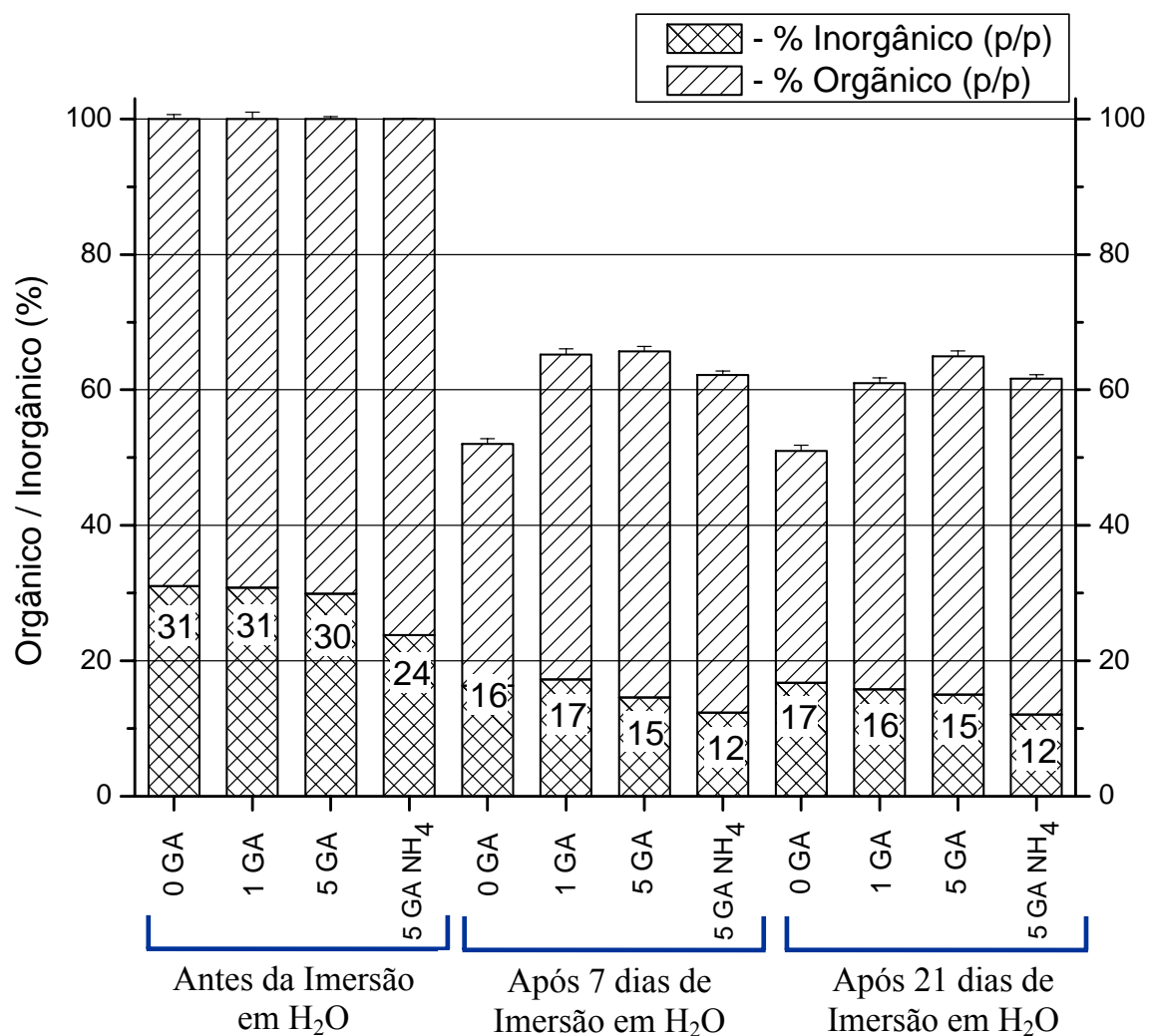


Figura 6.13 – Fração de material orgânico e inorgânico presente nos híbridos PVA-BaG reticulados com GA em concentrações de até 5% (p/p), após ensaio de degradação em água DI por período de até 21 dias.

6.4 Análise química elementar por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Elétrons

Os resultados obtidos por EDS realizado na superfície dos híbridos preparados nas várias concentrações de glutaraldeído e conduzidos após os períodos de imersão estudados detectaram picos referentes aos elementos silício, cálcio e fósforo com resíduos de cloro e sódio, indicados na figura 6.14.

O EDS dos híbridos também indicou que a concentração atômica de Ca para os híbridos submetidos ao ensaio de degradação apresentou redução dos seus valores após 2 e 21 dias de imersão.

No tempo zero, antes da imersão dos híbridos em meio aquoso, os espectros de EDS apresentaram concentração de silício na superfície dos materiais em torno de 25% p/p, ou seja, menor do que a concentração utilizada a partir das frações iniciais dos reagentes durante o processo de síntese, que foi de Si-58%; Ca-33% e P-9%.

Esse resultado pode ser explicado porque no preparo dos híbridos foi utilizado na síntese o cloreto de cálcio como reagente para a incorporação de cálcio. Para a adição de 33 % de cálcio será introduzido nos híbridos a fração correspondente de cloro, ou seja, para 33 gramas de cálcio introduzidas serão introduzidas 58,6 gramas de cloro. Dessa forma, quando consideramos as frações dos elementos silício, fósforo, cálcio e cloro, os valores percentuais passam a ser 36,6%; 5,7%; 20,8% e 36,9%, respectivamente.

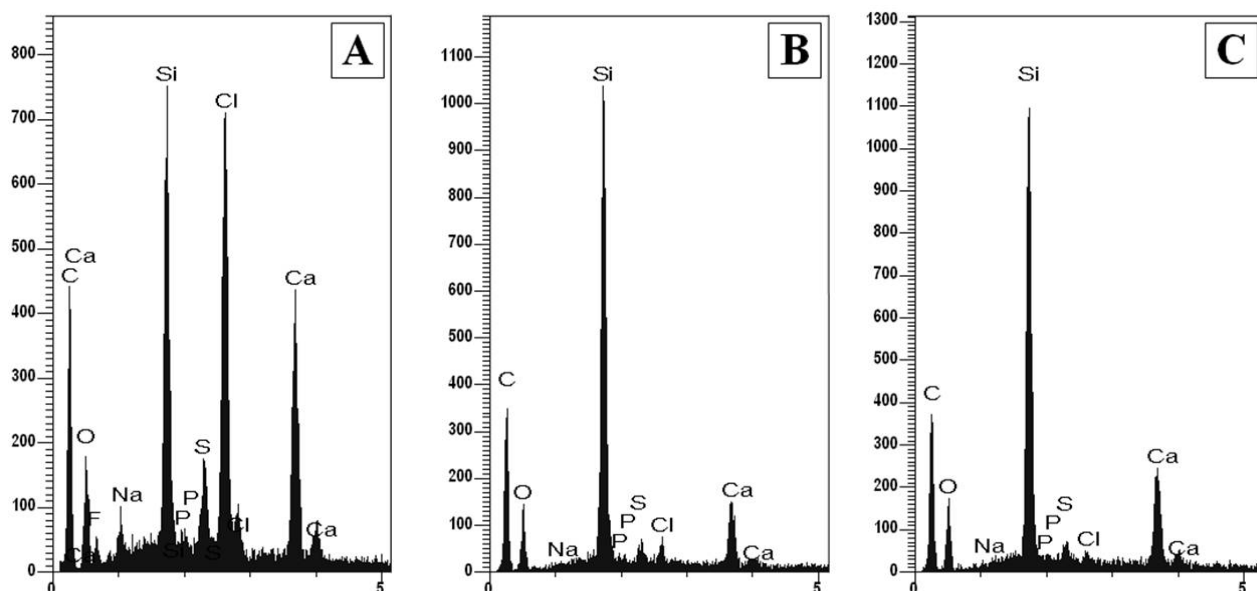


Figura 6.14 – Espectro EDS de amostras de híbridos PVA-BaG (a) antes e após período de (b) 2 dias e (c) 21 dias de degradação em H₂O DI.

As diferenças observadas podem ter também relação com a presença de PVA na superfície da área em análise, além da presença dos elementos cloro, proveniente do ácido clorídrico utilizado no controle do pH e do elemento sódio presente no surfactante adotado. A presença desses elementos pode ter contribuído para essa divergência em relação às concentrações iniciais.

Dessa forma os resultados obtidos por EDS para as amostras de híbridos PVA-BaG-GA antes e após ensaio de degradação são apresentados na tabela 6.3 como a razão dos elementos cálcio, fósforo e cloro em relação à concentração em peso de silício.

Tabela 6.3 – Razão dos elementos Ca, P e Cl em função do silício (% p/p)

[] de Glutaraldeído (% p/p)	0,0			1,0			5,0		
	Tempo de Imersão (dias)								
Razão	0	21	-Δ (%)	0	21	-Δ (%)	0	21	-Δ (%)
Ca / Si	1,30	0,51	60	1,70	0,29	83	1,32	0,22	83
P / Si	0,09	0,05	45	0,09	0,05	40	0,08	0,06	34
Cl / Si	1,62	0,06	96	1,15	0,06	95	1,46	0,09	94

A razão entre as concentrações em peso de Cl e Si, após os períodos de imersão apresentaram valores praticamente constantes, conforme indica a tabela 6.3. A exceção fica a cargo das amostras com 5% de GA, cuja razão cloro/silício ficou maior do que aquela observada para as demais concentrações de GA utilizadas, sugerindo que o cloro possa ter ficado retido na estrutura polimérica com maior grau de reticulação. Como é de se esperar, pois o híbrido deve comporta-se com menor potencial de degradação à medida que aumenta a concentração de GA.

Da mesma forma a tabela 6.3 também mostra redução da razão entre o fósforo e o silício após 21 dias de imersão, sendo a redução menor à medida que aumenta a concentração de glutaraldeído utilizada. A razão entre o cálcio e o silício apresentou valores menores após 21 dias de imersão dos híbridos para todas as amostras estudadas. A redução foi em torno de 80% para amostras preparadas com 1 e 5% de glutaraldeído. Amostras preparadas sem glutaraldeído tiveram 60% menos cálcio após 21 de degradação, o pode sugerir redeposição de cálcio na superfície dos híbridos preparados sem glutaraldeído.

6.5 Morfologia dos Híbridos PVA-BaG-GA Após Degradação em Meio Aquoso

As imagens obtidas por microscopias eletrônica de varredura mostradas das figuras 6.15 à 6.20 apresentam uma sequência com aspectos morfológicos dos híbridos PVA-BaG preparados nas várias concentrações de glutaraldeído antes e após 2 e 21 dias do ensaio de degradação.

A figura 6.15 mostra imagens de MEV de híbridos preparados sem glutaraldeído com aumentos de 5000 e 10000x, antes e após os períodos de 2 e 21 dias de degradação. A figura 6.16 apresenta em destaque região desses híbridos, preparados sem glutaraldeído, evidenciando a presença de partículas aglomeradas depositadas na superfície da parede dos poros.

Nas figuras 6.17 e 6.18 são mostradas imagens de híbridos preparados com 1% p/p de glutaraldeído, que apresentaram regiões com diferentes aspectos morfológicos durante o período de degradação.

A figura 6.19 refere-se à imagem de MEV de híbridos preparados com 5% p/p de glutaraldeído, antes e após os períodos de 2 e 21 dias de degradação. Um resumo das imagens dos híbridos preparados sem glutaraldeído e de híbridos preparados com as concentrações de 1 e 5% p/p, antes e após o ensaio de degradação é mostrado na figura 6.20.

As imagens tomadas antes e após os períodos de imersão permitiram destacar alguns aspectos morfológicos das amostras submetidas aos ensaios de degradação. Em aumentos de 10000X percebemos pelas figuras 6.15 e 6.20A que amostras preparadas sem agente reticulante apresentaram antes do processo de imersão em água deionizada superfície da parede dos poros com presença de estrias descritas na forma de linhas cruzadas, estabelecendo o formato de uma teia.

Há grande similaridade quando comparado o padrão apresentado nas imagens da figura 6.15 com o apresentado para vidros bioativos ou materiais recobertos com vidro bioativo. O aspecto desses materiais é grandemente influenciado pela elevada porosidade característica dos vidros bioativos preparados pelo processo sol-gel, que durante a contração resultante da etapa de secagem leva à formação de trincas.

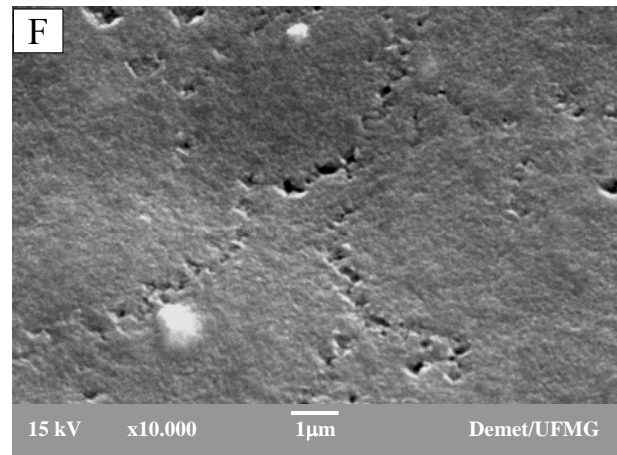
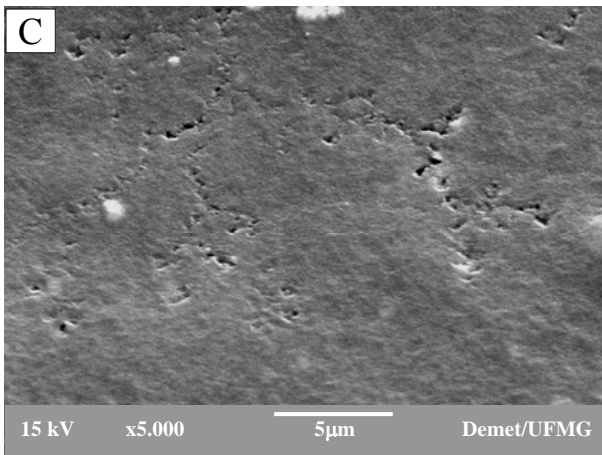
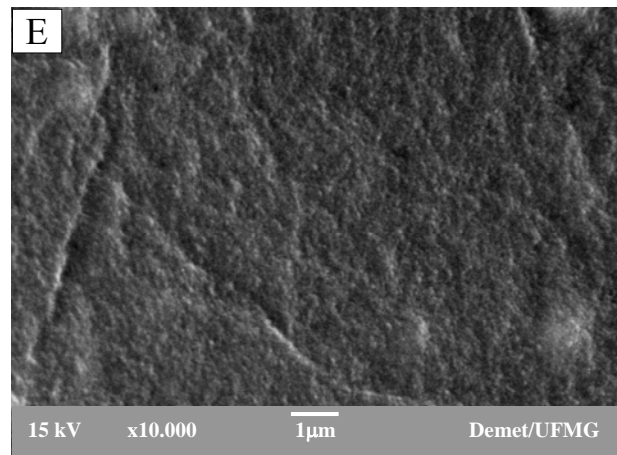
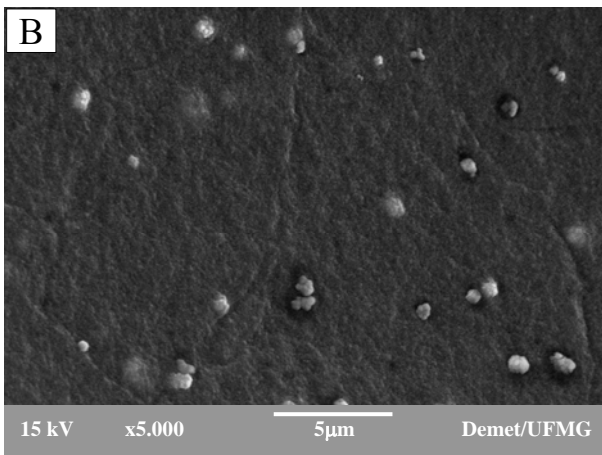
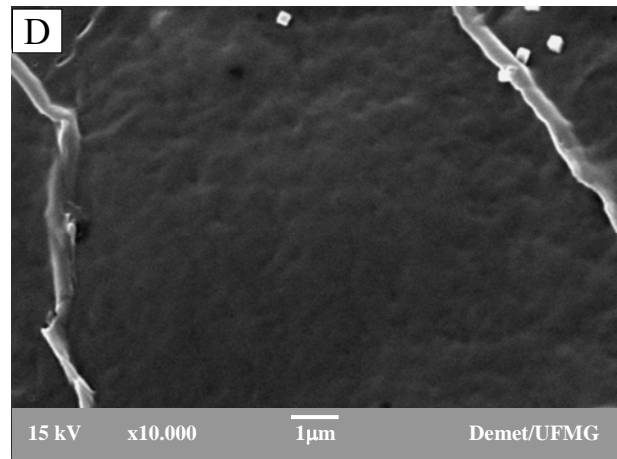
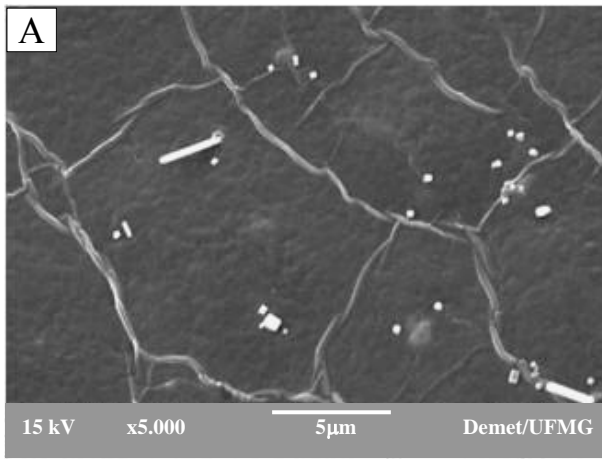


Figura 6.15 – (A) MEV de híbrido PVA-BaG preparado sem reticulação com glutaraldeído; e amostra anterior submetida a processo de degradação em água DI por período de (B) 2 dias e (C) 21 dias. As imagens (D), (E) e (F) representam ampliações das figuras “A”, “B” e “C”, respectivamente.

A partir disso podemos sugerir que durante a secagem dos híbridos PVA-BaG possa ter ocorrido contração, e pelas características elásticas do polímero, aliada à rigidez do vidro bioativo, as forças possam ter sido dissipando através da superfície. Esse processo pode ter criando regiões projetadas na forma de estrias, que após a imersão em água deionizada e a consequente degradação da estrutura, deixou impressões sub-superficiais conforme apresentado nas figuras 6.15 e 6.20D.

Após 21 dias de imersão em água DI notamos em aumentos de 10000x a superfície dos híbridos de aspecto mais regular, dando a impressão de ser mais plana e apresentando partículas depositadas. Esse particulado foi caracterizado como tendo tamanho médio em torno de 800nm, cuja análise por EDS, não mostrado, indica como principal constituinte o elemento cálcio.

Além disso, pode ser notado nas figuras 6.15 e 6.20D a presença de alguns poros na escala nanométrica, formando um percurso compatível com o trajeto apresentado pelas estrias descritas antes da imersão em água deionizada.

Na figura 6.16 a imagem de híbrido PVA-BaG preparado sem agente reticulante evidencia a superfície que delimita um poro apresentando depósito de partículas, que em maior aumento se mostra como aglomerados de partículas com dimensões inferiores a 1 μm . O resultado da análise por EDS na região do particulado indicou se tratar de cálcio.

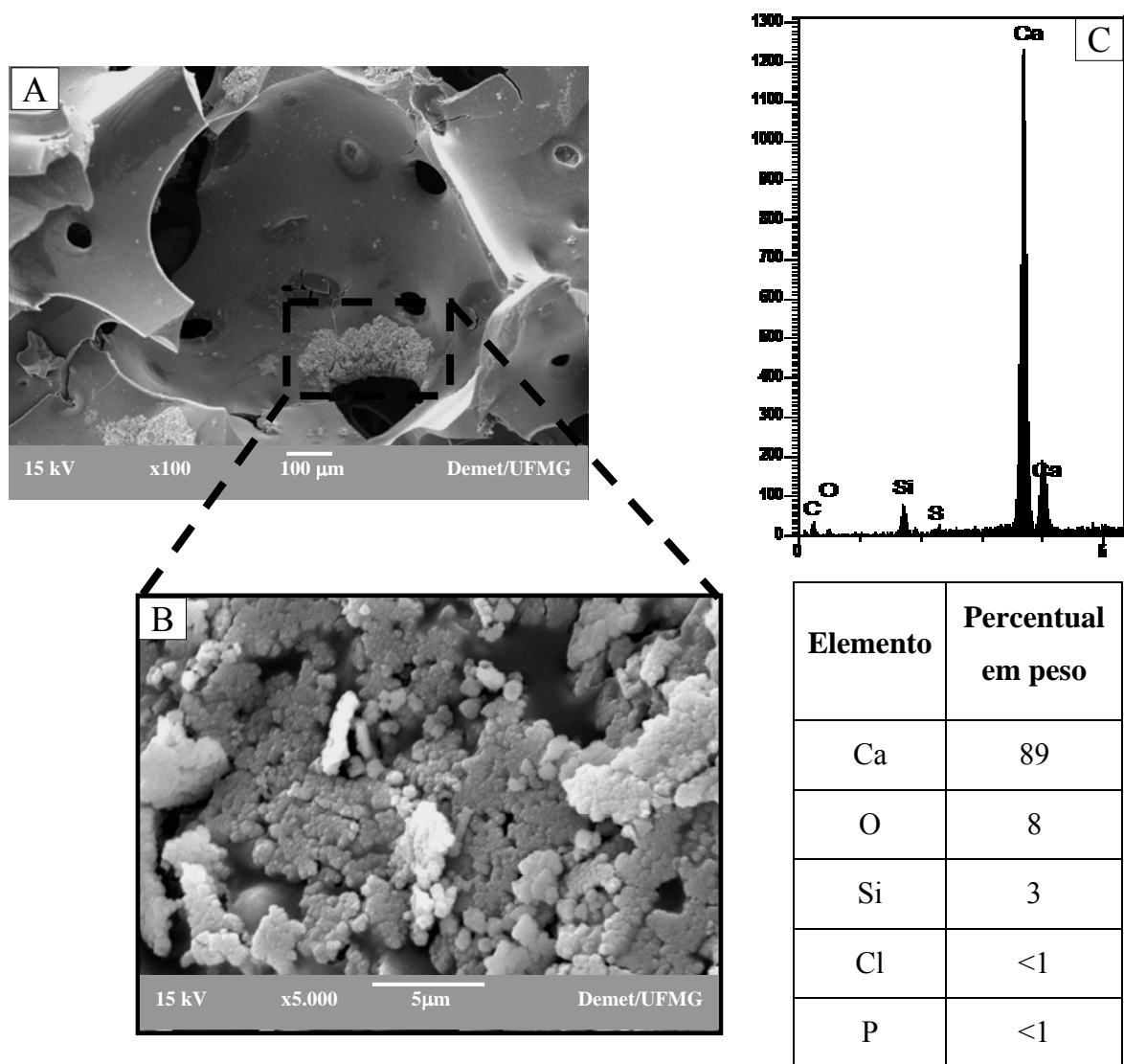


Figura 6.16 – (A) MEV de híbrido PVA-BaG preparado sem reticulação com glutaraldeído submetida a processo de degradação em água DI por período de 21 dias. Em (B) pode ser vista ampliação de “A” e (C) apresenta espectro EDS realizado na região dos aglomerados vistos em “B” com valores indicados na tabela.

Para as amostras dos híbridos PVA-BaG reticulados com 1% de glutaraldeído percebemos nas figuras 6.17 e 6.20B que esses híbridos apresentaram antes do processo de imersão em água deionizada presença de particulado fino com tamanho variando de alguns nanômetros até aproximadamente 2 μm, particulado esse depositado por toda a superfície da parede do poro e também identificado como cálcio, conforme análise por EDS.

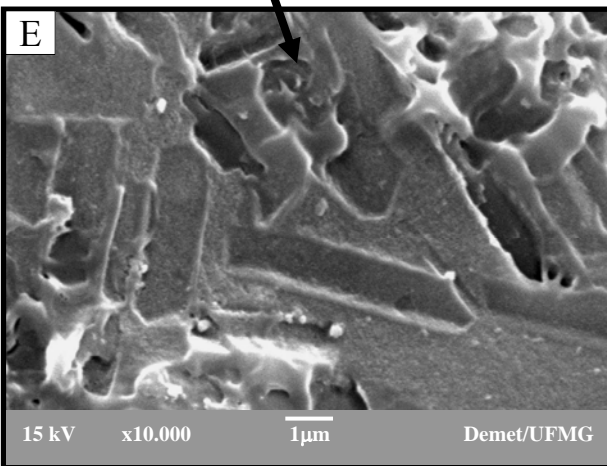
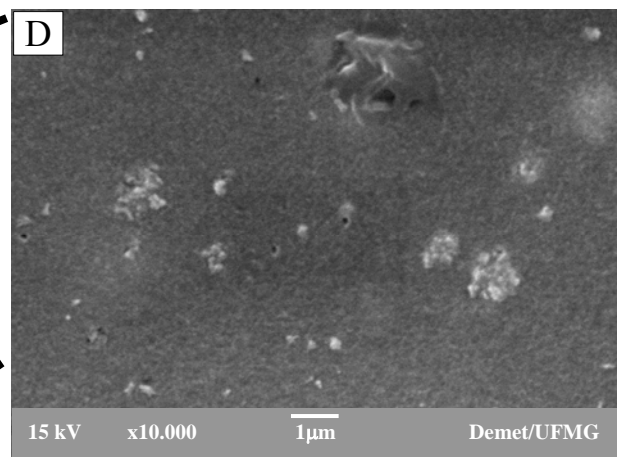
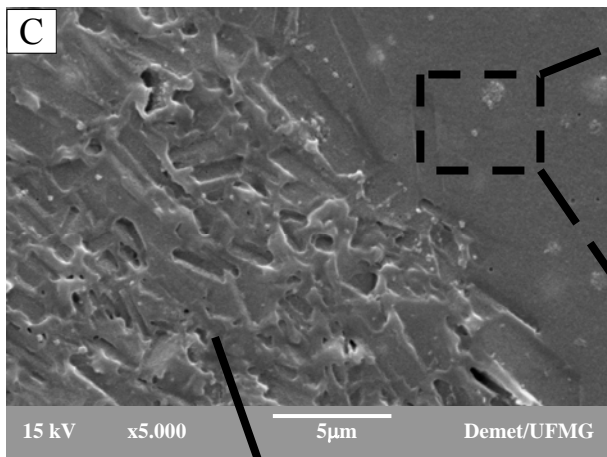
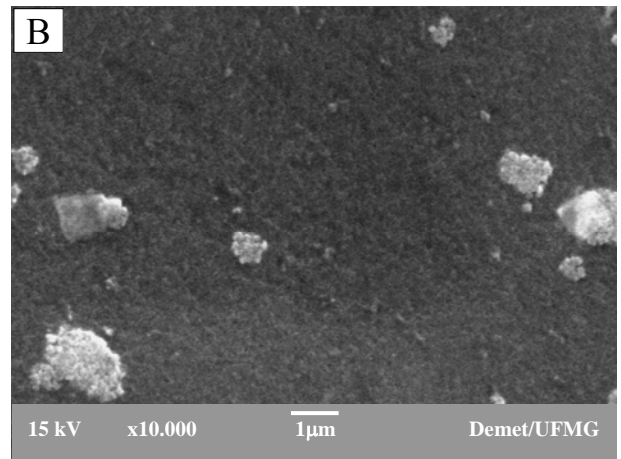
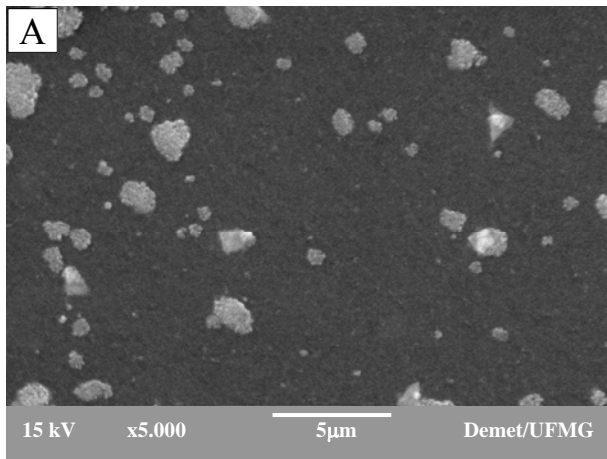


Figura 6.17 – (A) MEV de híbrido PVA-BaG preparado na concentração 1% p/p de glutaraldeído; (B) ampliação da figura “A”. Em (C) as amostra anteriores submetidas a processo de degradação em água DI por período de 2 dias, (D) detalhe ampliado da região indicada pelo quadrado em “C” e (E) ampliação da região indicada pela seta.

Decorridos 21 dias do ensaio de degradação, pela análise da superfície vemos na imagem da figura 6.18A presença de regiões com aspectos distintos. As ampliações indicadas nas figuras 6.18B, 6.18C e 6.18D apresentam três das regiões com características diferentes. A figura 6.18C mostra imagem do híbrido que sugere região com modificações iniciais na superfície. Na figura 6.18D está mostrada região com processo degradativo em estágio intermediário e a figura 6.18B apresenta região com indicativo de modificações na superfície que se projetaram para camadas mais profundas. Essas diferenças apresentadas podem ter relação com a reticulação promovida pela adição do glutaraldeído, que dependendo da concentração utilizada reagiu de maneira heterogênea.

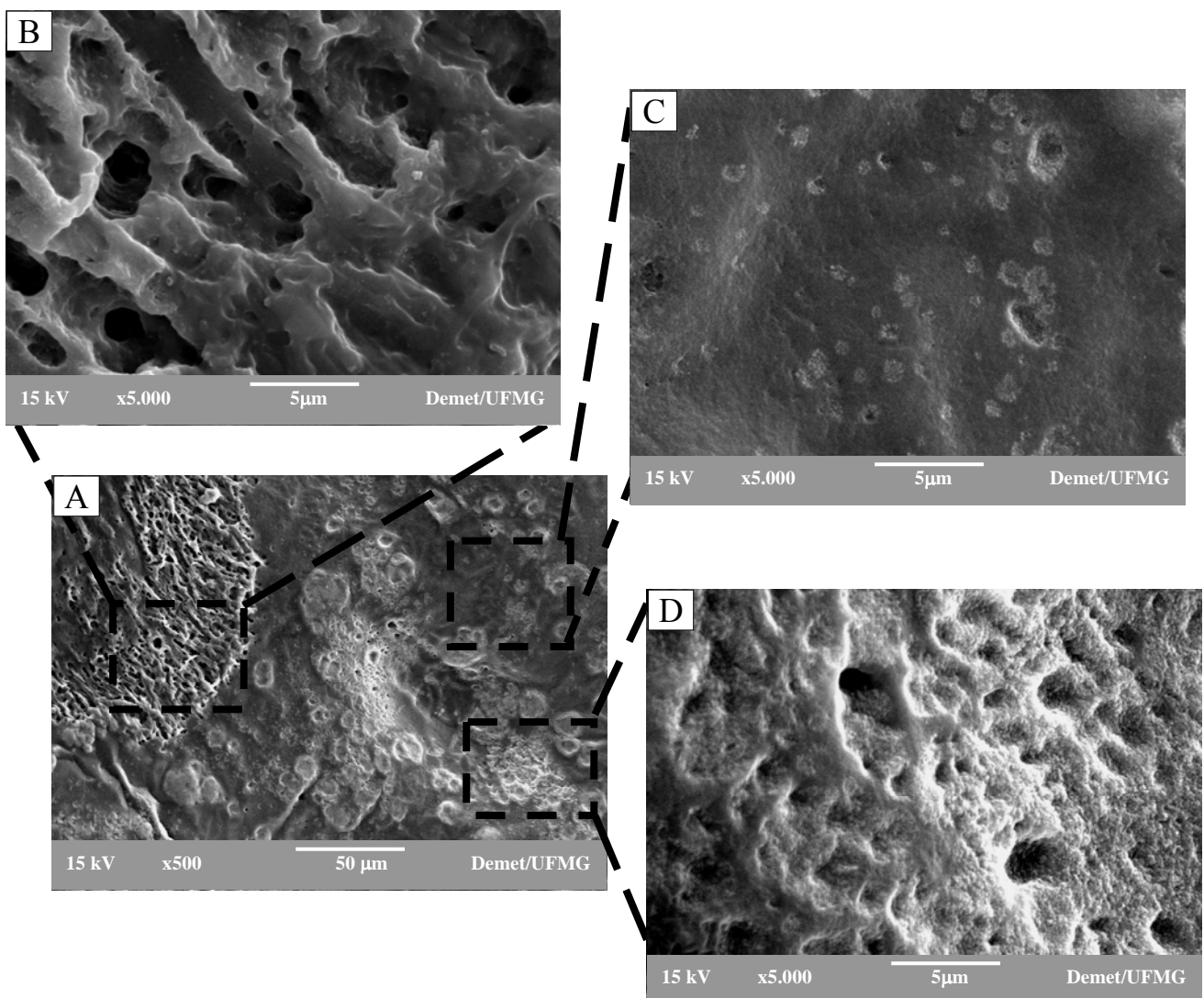


Figura 6.18 – (A) MEV de híbrido PVA-BaG preparado na concentração 1% p/p de glutaraldeído submetidas a processo de degradação em água DI por período de 21 dias; (B), (C) e (D) representam os detalhe ampliados das regiões indicadas em “A”.

Pela análise morfológica das amostras dos híbridos PVA-BaG reticulados com 5% de glutaraldeído fica evidente nas figuras 6.19 e 6.20C a presença de uma superfície com padrão mais regular, homogêneo e textura fina sem presença de depósitos. Após 21 dias de imersão aparecem por toda a superfície dos híbridos poros com tamanho da ordem de 1 μm (figura 6.19C) e regiões com aspecto de ataque degradativo puntual em um padrão poroso interconectado, conforme mostrado nas figuras 6.19 e 6.20F cujas dimensões básicas atingem valores em torno de 15 μm .

Através da análise das figuras 6.16 a 6.20 pode ser sugerido que durante o ensaio de degradação, as amostras preparadas sem utilização de agente reticulante devem ter sido submetidas à degradação caracterizada pela erosão homogênea, ou seja, perda da estrutura volumétrica do híbrido (GOPFERICH, 1996; BREITENBACH et. al., 2000).

Esse fato se fundamenta na medida em que o material é solúvel em água e foi sujeito a degradação em meio aquoso. Além disso, como a reticulação com GA não ocorreu na integralidade do volume do polímero, podemos sugerir que deve ter ocorrido estabilização da fase com menor potencial de ser erodida, representada pelo BaG.

Outro fator a ser observado é que o preparo das amostras para realização do MEV contemplou secagem em dessecador. Esse evento é capaz de promover a contração do material em grande escala e resultar em imagens com aspecto bastante regular além da elevada concentração de sílica na superfície.

Para os híbridos preparados com 5% de GA é razoável imaginar que devem se comportar como hidrogéis de PVA reticulado, tendo a fase biovidro dispersa pela matriz polimérica. Com o decorrer do período de imersão a fase mais propícia ao processo degradativo é atacada pelo meio aquoso e após a secagem o aspecto descrito mostra a presença de vazios. Esses achados sugerem a ocorrência de processo de degradação caracterizado por erosão heterogênea onde a perda de material ocorre a partir da superfície do material (GOPFERICH, 1996; BREITENBACH et. al., 2000).

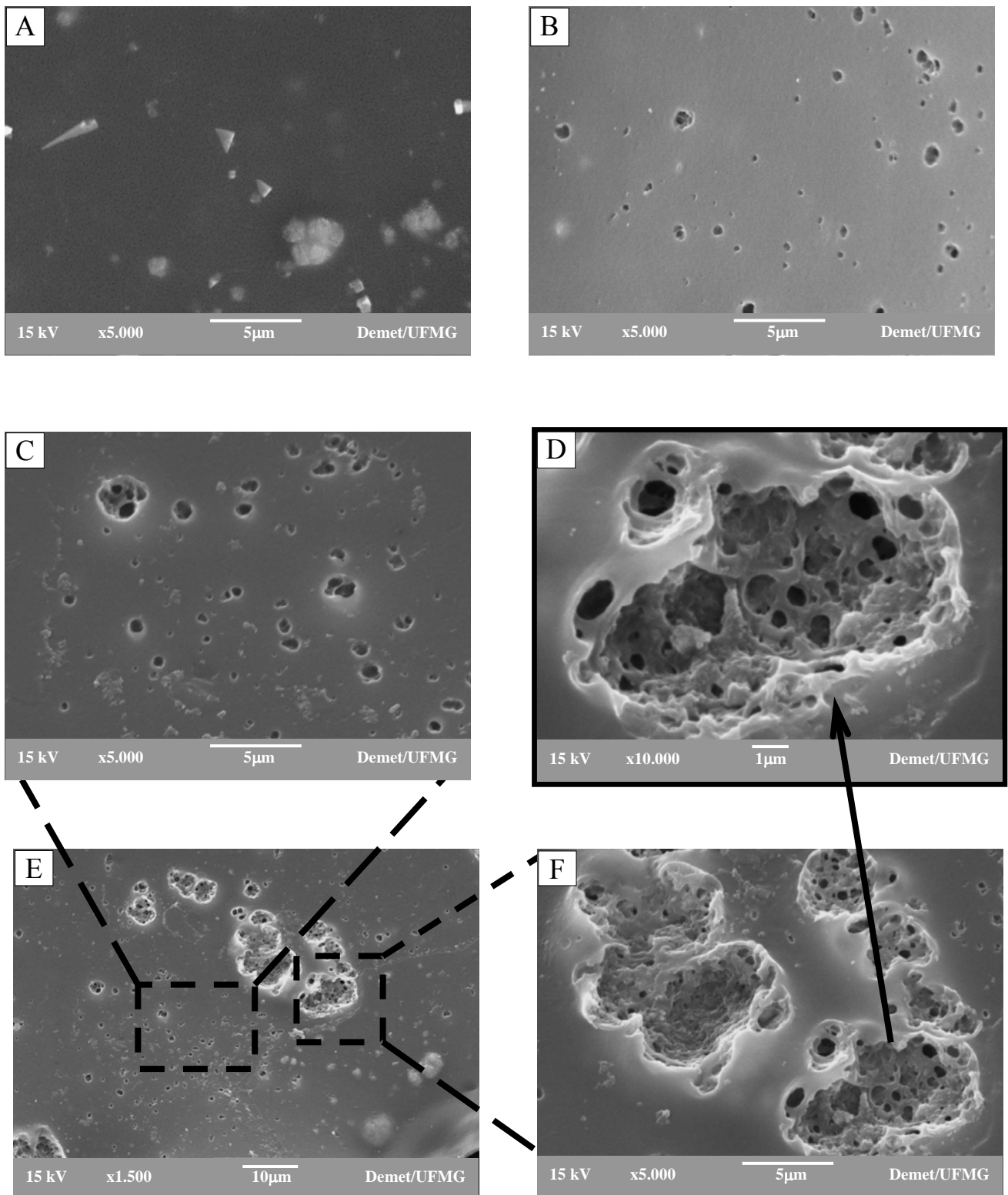


Figura 6.19 – (A) MEV de híbrido PVA-BaG preparado na concentração 5% p/p de glutaraldeído; e amostra anterior submetida a processo de degradação em água DI por período de (B) 2 dias e (e) 21 dias. As imagens (C) e (F) representam detalhe ampliado das regiões indicadas pelos quadrados em “E” e (D) mostra ampliação da figura “F”.

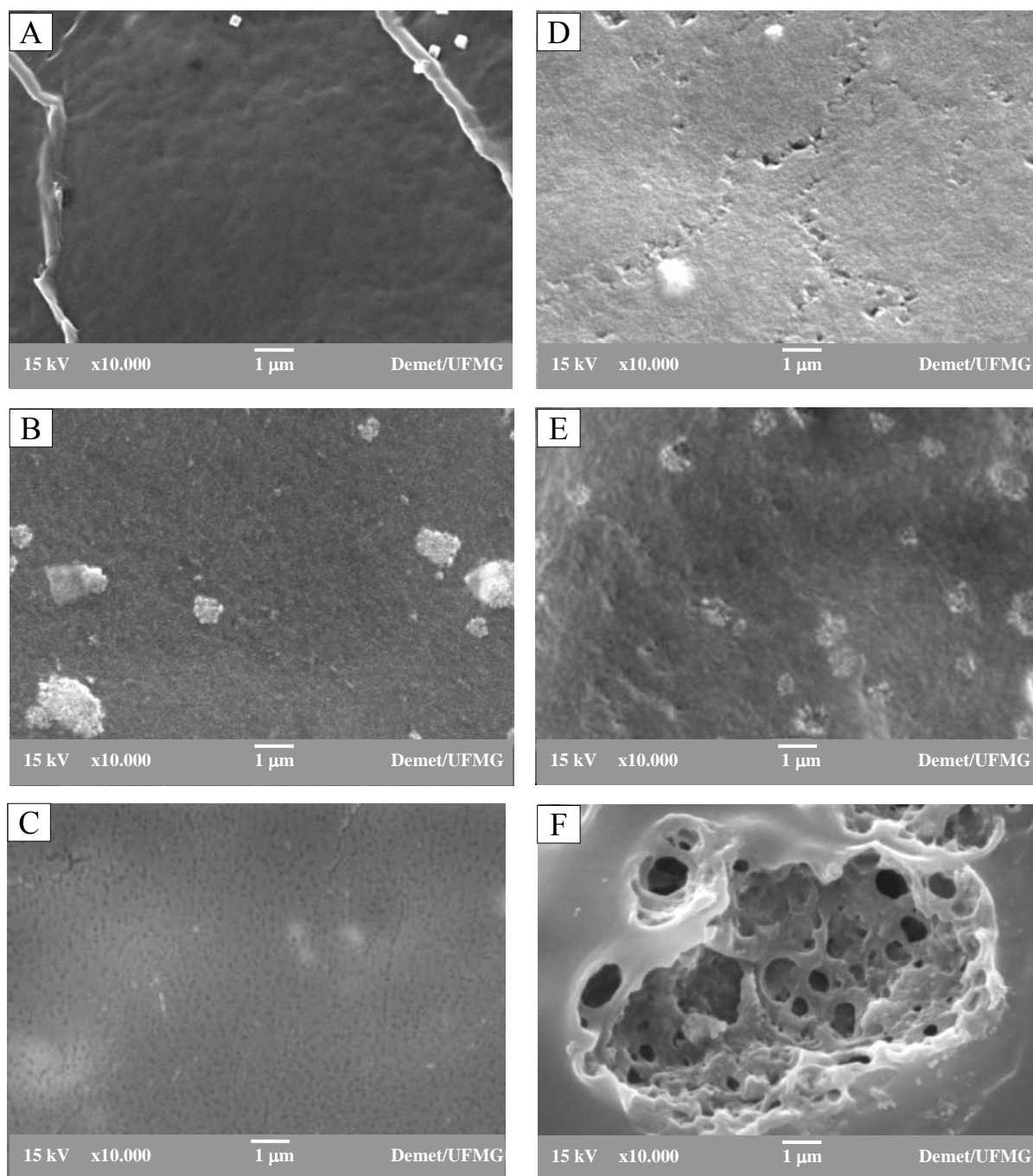


Figura 6.20 – MEV de híbridos PVA-BaG preparados com as concentrações de (A) 0% p/p; (B) 1% p/p e (C) 5% p/p de glutaraldeído e imagens (D), (E) e (F) para amostras dos híbridos (A), (B) e (C) respectivamente, após serem submetidas a processo de degradação pelo período de 21 dias.

À medida que aumenta o tempo de imersão, poros criados pela remoção do BaG, além de poros internos na parede, bem como a fase amorfa do polímero não reticulada pelo GA podem se apresentar através de evidente erosão porosa. Além disso, de acordo com trabalho de Wu & Brazel

(2008), hidrogéis de PVA com elevado número de ligações cruzadas em sua superfície apresentaram uma tendência de ruptura durante o processo de inchamento.

Finalmente as alterações morfológicas observadas nos híbridos após a realização do procedimento de neutralização com solução de NH_4OH 0,3M são mostrados figura 6.21. É possível perceber que em períodos curtos de tempo as paredes dos híbridos apresentaram estrutura com aspecto de bolhas rompidas e a superfície passou a se apresentar com aspecto enrugado. Esses achados sugerem que a solução alcalina foi capaz de promover hidrólise do PVA.

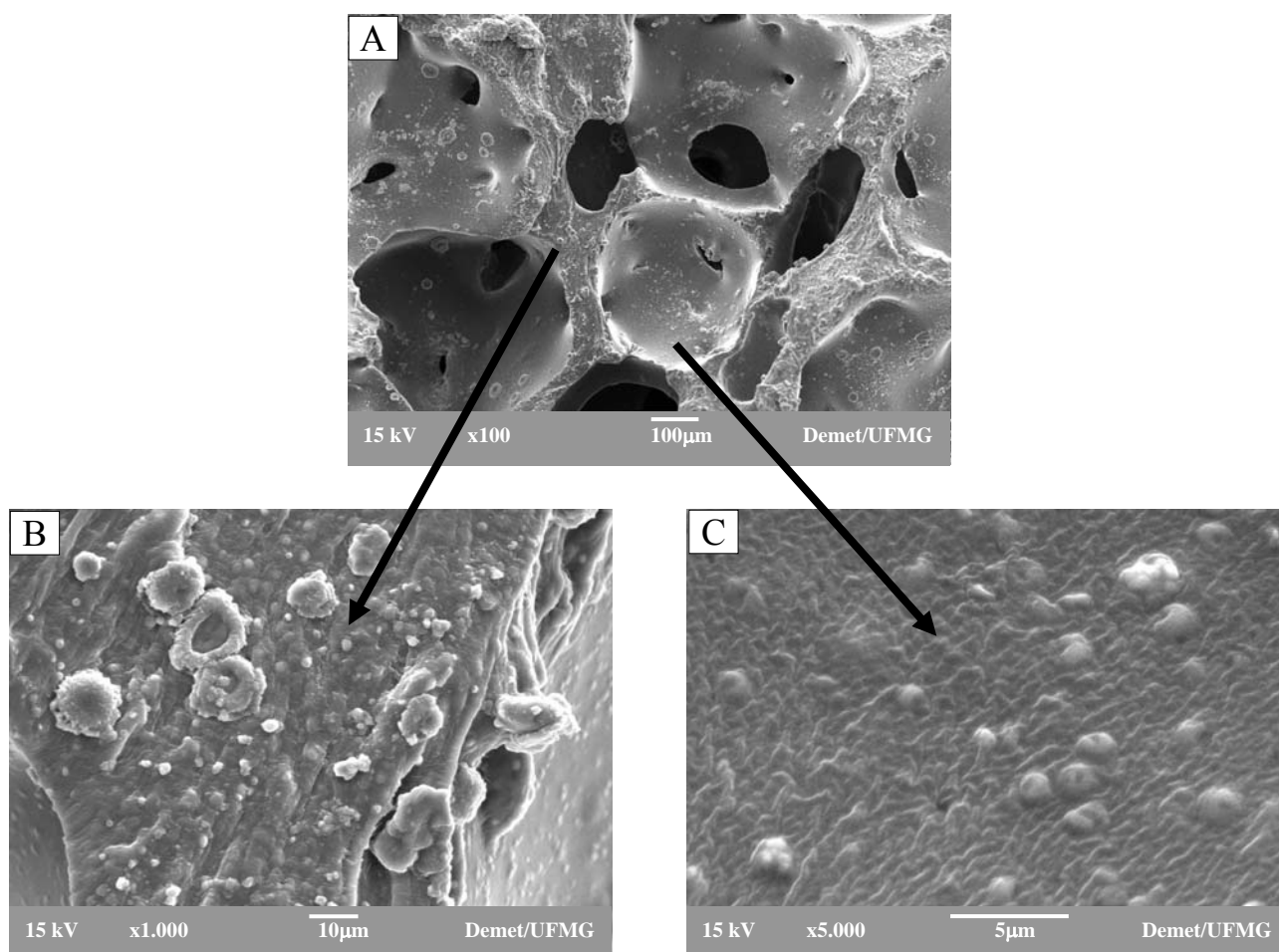


Figura 6.21 – (A) MEV de híbrido PVA-BaG preparado na concentração 5% p/p de glutaraldeído e submetidos à estabilização com solução de NH_4OH 0,3M por 1 minuto. As imagens (B) e (C) mostram ampliações das regiões da parede de poro e da superfície de poro, respectivamente.

6.6 Caracterização por FTIR de Híbridos PVA-BaG-GA Após Degradação

As figuras 6.22, 6.23 e 6.24 mostram espectros FTIR respectivamente para amostras antes e após ensaio de degradação por 21 dias em água DI de híbridos PVA-BaG sem agente reticulantes, reticuladas com 5% de glutaraldeído antes e após serem submetidas ao tratamento de estabilização com NH_4OH .

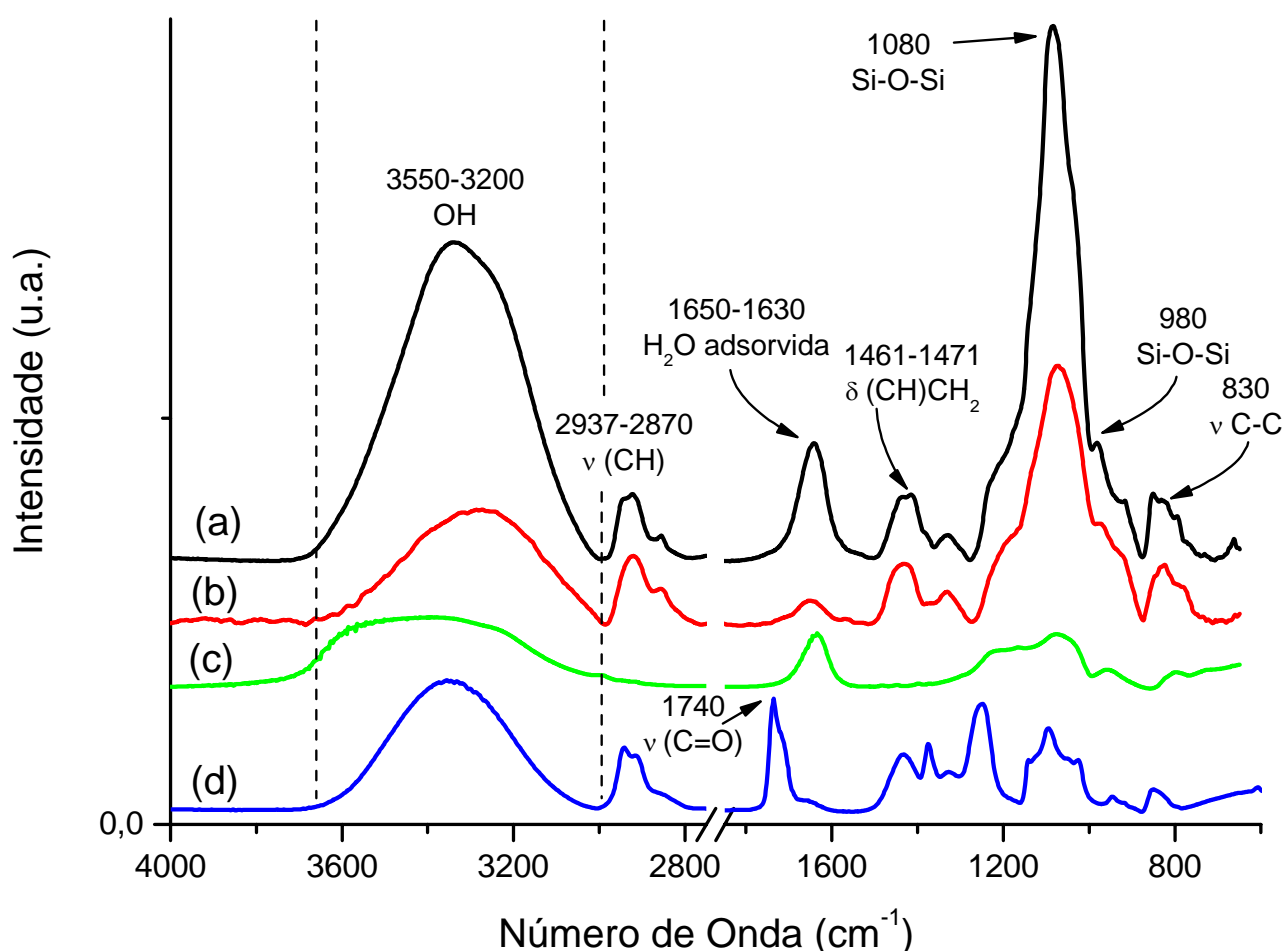


Figura 6.22 – Espectro FTIR de amostras PVA-BaG preparados sem glutaraldeído (a) antes e (b) após ensaio de degradação pelo período de 21 dias, (c) Vidro Bioativo Puro e (d) PVA 80% hidrolisado.

Na análise dos espectros temos que a banda observada entre $3550\text{-}3200\text{cm}^{-1}$ pode ser atribuída à ligação OH e o pico centrado em 1640cm^{-1} compatível com o dobramento do grupo OH e da água adsorvida. Percebemos na região tracejada das figuras 6.22 e 6.23 a nítida redução na intensidade da banda OH ocorrida nas amostras após imersão por 21 dias em água DI, que sugere a remoção de

água, PVA e vidro dos híbridos. Essa evidência fica marcante, inicialmente pelo processo de degradação, que mostrou perda de massa em meio aquoso, de aproximadamente 49% para amostras preparadas sem reticulante e 35% para amostras preparadas com 5% de glutaraldeído (p/p) de PVA, ambos os valores tomando como referência a massa inicial seca até condição de massa constante.

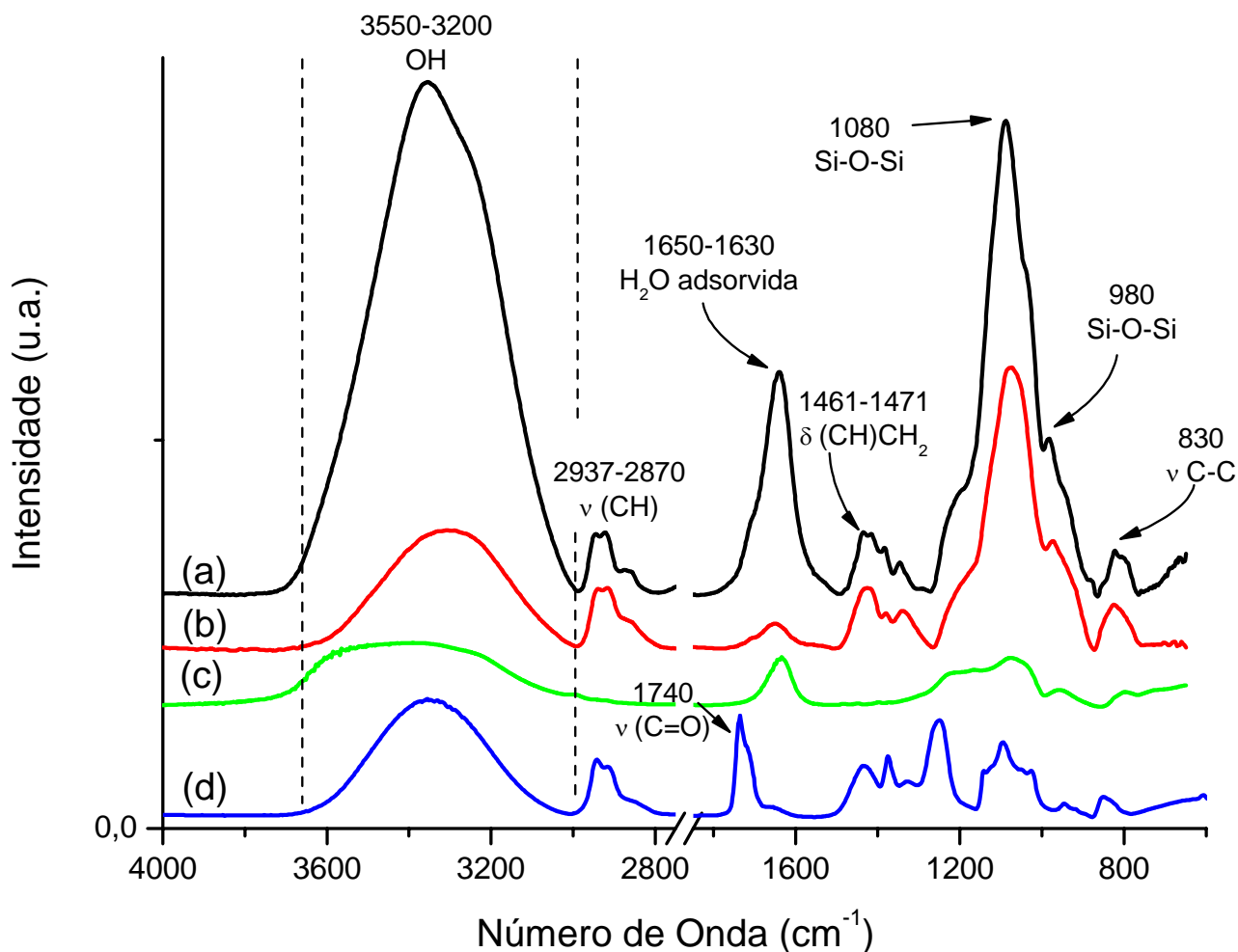


Figura 6.23 – Espectro FTIR de amostras PVA-BaG reticuladas com 5% p/p de glutaraldeído (a) antes e (b) após ensaio de degradação pelo período de 21 dias, (c) Vidro Bioativo Puro e (d) PVA 80% hidrolisado.

Além disso, a análise térmica até a temperatura de 110 °C indicou existência de frações residuais das fases orgânica e inorgânica com clara redução tanto do polímero como do vidro. Se tomarmos por base que tanto o PVA quanto o vidro bioativo apresentam características hidrofílicas. Como mostrado pela elevada quantidade de voláteis presentes para amostras em condição de umidade de equilíbrio, é de se esperar a redução ocorrida nas bandas relacionadas à hidroxila.

Conforme indica a figura 6.8, os voláteis removidos para aquecimento até a temperatura de 110°C atingiram os valores de 30% para amostras não reticuladas e 50% para amostras preparadas com 5% (p/p) de glutaraldeído. Essas reduções devem estar relacionadas aos voláteis presentes nos híbridos associados à água utilizada durante a síntese e ao álcool residual formado pela hidrólise do TEOS utilizado como precursor de silício.

Outros picos característicos para o PVA são os assinalados em 2937 e 2870 cm^{-1} referentes ao grupo νCH e os picos 830 cm^{-1} do $\nu(\text{C}-\text{C})$ e 1461-1417 cm^{-1} do $\delta(\text{CH})\text{CH}_2$ (MANSUR et. al., 2004).

De acordo com as figuras 6.22, 6.23 e 6.25 percebemos também a presença de picos em 980 cm^{-1} e em 1080 cm^{-1} ; referentes às ligações Si-O-Si (COSTA et. al., 2008a; MANSUR & COSTA., 2008), que se apresentam com maior intensidade quando comparados em relação com os picos posicionados em 2937 e 2870 cm^{-1} para os espectros submetidos a 21 dias de imersão em água DI para avaliar a degradação.

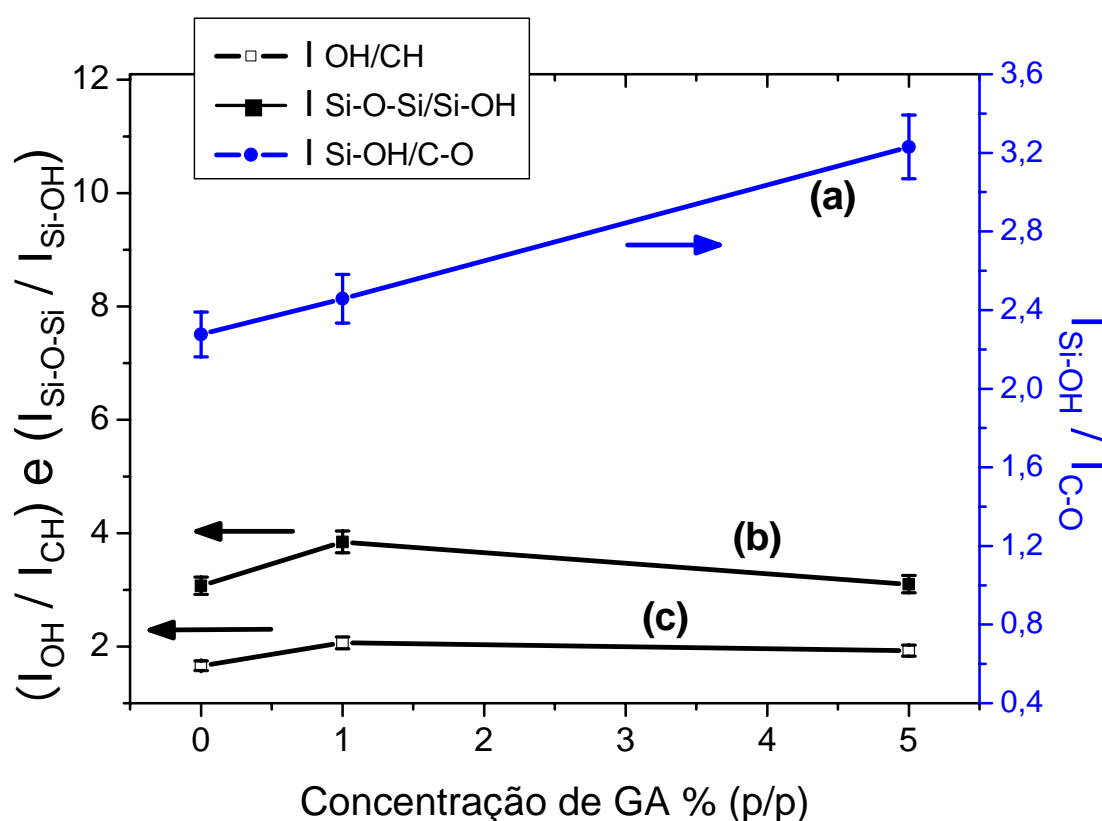


Figura 6.24 – Razão entre os picos dos espectros FTIR em função da concentração de glutaraldeído dos híbridos PVA-BaG para amostras submetidas à degradação por 21 dias. As razões apresentadas referem-se à (a) $I_{\text{Si-OH}}/I_{\text{C-O}}$; (b) $I_{\text{Si-O-Si}}/I_{\text{Si-OH}}$ e (c) $I_{\text{OH}}/I_{\text{CH}}$.

A identificação das regiões de absorção nos espectros FTIR associadas à sílica e ao polímero PVA foram analisadas. Para o PVA foram consideradas as bandas entre $3600-3200\text{ cm}^{-1}$, relacionada ao grupo OH do álcool e as bandas entre $2900-2800\text{ cm}^{-1}$ e $1250-1100\text{ cm}^{-1}$ associadas aos grupos C-H e C-O, respectivamente. Para o vidro bioativo as bandas estudadas foram as posicionadas entre, $1100-1000$, $950-900$ e $800-700$ associadas respectivamente às ligações Si-O-Si, Si-OH e Si-O-Si.

Os dados das razões entre os picos 3300 e 2900 cm^{-1} e os picos 1080 e 950 cm^{-1} apresentam faixa de valores, quando comparados com híbridos sem reticulante, aumento para híbridos com 1% (p/p) de GA e redução para 5% (p/p) de GA. Esses valores estão de acordo com as análises de perda de massa em meio aquoso, onde a perda de polímero foi menor com o aumento na concentração de reticulante utilizada e a perda de massa da fase inorgânica foi constante. Para a relação dos picos 950 e 1250 cm^{-1} os valores se mostraram com aumento gradativo em função da concentração de GA utilizada, sugerindo que o processo degradativo atue de maneira a romper ligações Si-O-Si, removendo parte do silício e resultando em maior número de ligações Si-OH.

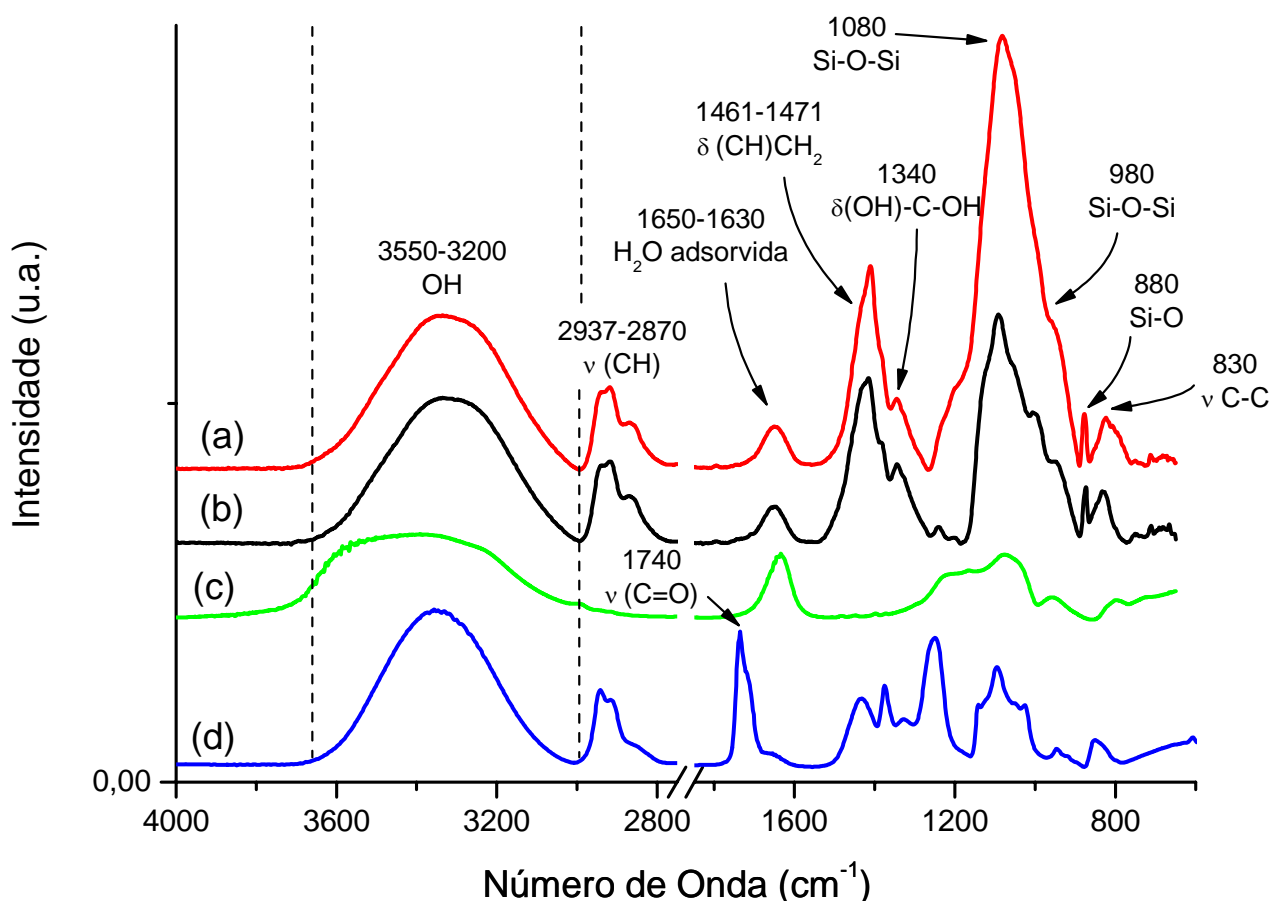


Figura 6.25 – Espectro FTIR de amostras PVA-BaG reticuladas com 5% p/p de glutaraldeído e submetidas a tratamento estabilizador com solução 0,3M de NH_4OH (a) antes e (b) após ensaio de degradação pelo período de 21 dias; (c) Vidro Bioativo Puro e (d) PVA 80% hidrolisado.

Comparando os espectros das três figuras percebemos um comportamento da banda localizada entre 1461-1417 cm^{-1} se apresentando com maior intensidade relativa nos espectros da figura 6.25, que se referem a amostras submetidas a tratamento de estabilização com NH_4OH . Essa maior intensidade indica que a essa amostra apresenta maior relação entre a fase orgânica/inorgânica, resultado também encontrado através da análise térmica. Quando comparados os espectros para amostras tratadas com NH_4OH , levando em consideração que a perda de massa ocorrida para os 21 dias de imersão foi aproximadamente 10% percebemos que a mudança significativa fica pela redução expressiva do pico em 1080cm^{-1} ; referentes às ligações Si-O-Si, confirmando a intensidade da reação de NH_4OH com a estrutura que resultou na redução do vidro bioativo.

Os resultados se apresentam de acordo com os descritos por Pereira et. al., (2000), que embora não tenha sido utilizado o expediente da reticulação com glutaraldeído, permitiram sugerir as etapas de degradação compostas por: (1) a estrutura do híbrido tem parcela do polímero hidrossolúvel ligada pela fase inorgânica multicomponente; (2) a introdução de cálcio e fósforo na fase silicato leva à ruptura da rede inorgânica, formando uma estrutura mais aberta e com menos ligações cruzadas; (3) sempre que esse tipo de híbrido é inserido em ambiente aquoso, ocorre reação hidrolítica com as ligações Si-O-Ca, rompendo a rede inorgânica e formando ligações Si-OH insaturadas; (4) a dissolução da fase inorgânica rompe as ligações cruzadas entre o silicato e a fase polimérica e (5) as cadeias poliméricas então movem e se dissolvem.

6.7 Ensaio de Resistência Mecânica à Compressão

A figura 6.26 mostra a resposta ao esforço de compressão em função da deformação de espumas híbridas de PVA-BaG reticuladas com glutaraldeído em até 5% (p/p) após 21 dias de imersão em água DI. As amostras submetidas a esses ensaios foram preparadas a partir da região mais homogênea dos híbridos e secas em dessecador até que fosse observado o equilíbrio de massa.

O comportamento mecânico dos híbridos macroporosos PVA-BaG após imersão em água DI por 21 dias se apresentaram frágeis e romperam com valores de deformação inferiores a 10% do comprimento inicial das amostras.

Por outro lado o comportamento das amostras reticuladas com GA nas concentrações de 1 e 5 % (p/p) se apresenta consoante com aquele descrito por Gibson (2005), com região inicial indicando

aumento da tensão proporcional à deformação. Em seguida o gráfico mostra um patamar relacionado com o colapso plástico e com o empilhamento das estruturas que delimitam os poros. O comportamento final do gráfico mostra aumento rapidamente da tensão de compressão em função da deformação devido à densificação da espuma.

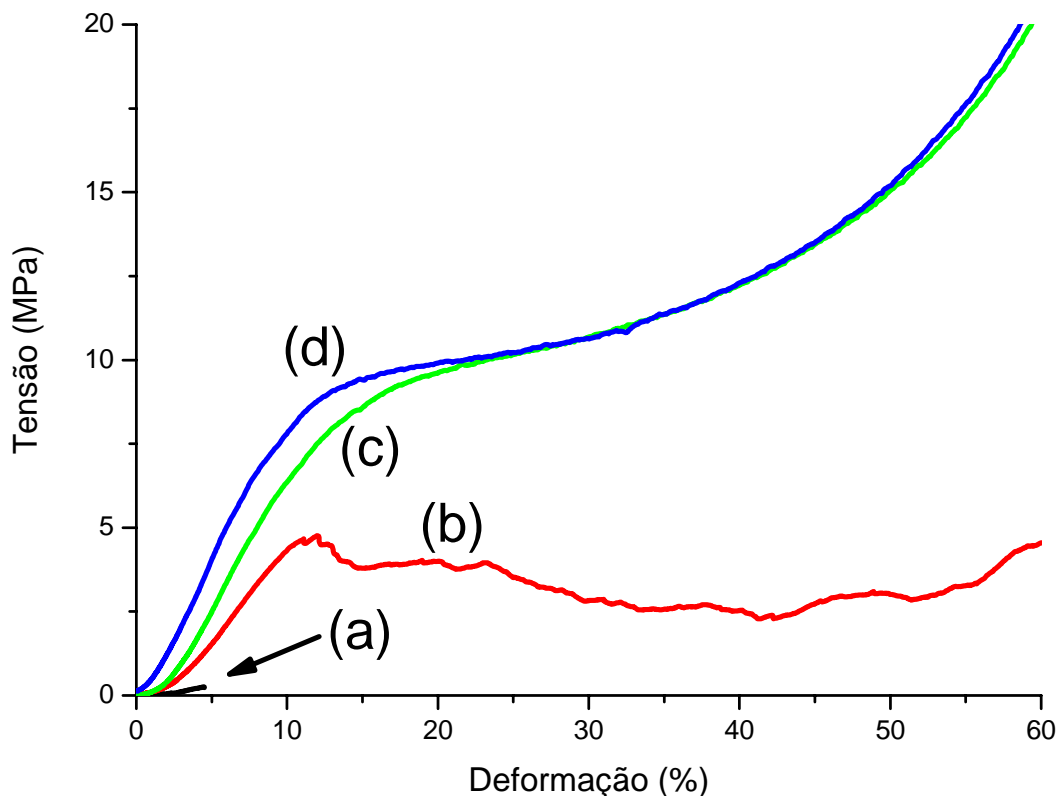


Figura 6.26 – Curvas tensão-deformação típicas obtidas por ensaio de compressão de híbridos PVA-BaG preparados nas concentrações de (a) 0% p/p; (b) 1% p/p; (c) 5% p/p de glutaraldeído e (d) amostras preparadas com 5% p/p de glutaraldeído e tratadas com solução de NH_4OH , após serem submetidas a processo de degradação pelo período de vinte e um dias.

Quando são comparadas a figura 6.26 e a figura 5.15 do capítulo anterior, fica marcante a diminuição na resistência das amostras preparadas sem agente reticulante, que pode ser evidenciada na interrupção do ensaio, ocasionada por ruptura ocorrida com valores inferiores a 5% de deformação submetida pelas amostras. Esse valor de deformação foi dez vezes menor que a deformação observada para amostras nas mesmas concentrações, ensaiadas antes da imersão no meio de degradação.

Considerando que amostras sem agente reticulante apresentam valores de degradação em torno de 50% da massa seca inicial, após o período de 21 dias de imersão, é de se esperar redução

significativa também nos valores de resistência. Aliado a isso pode ser acrescido o fato de se tratar de estrutura porosa, cuja elevada degradação fragiliza ainda mais as matrizes. Isso pode ser observado pelos valores do módulo de elasticidade que passaram de $(0,6 \pm 0,21)$ MPa antes da imersão em água DI para $(0,1 \pm 0,07)$ MPa após os 21 dias de degradação. Acompanhou a mesma tendência de redução o limite de escoamento e deformação no escoamento como apresentados na tabela 6.5.

O gráfico da figura 6.27 mostra que após 21 dias de imersão em água DI amostras submetidas ao ensaio de compressão apresentaram valores de limite de escoamento muito baixos para híbridos preparados sem reticulante, em torno de 0,3 MPa. A adição de 1% (p/p) de glutaraldeído promoveu, para amostras degradadas por 21 dias, aumento significativo do limite de escoamento para aproximadamente 5,0 MPa, sendo que o valor obtido para amostras preparadas com 5% de glutaraldeído foi da ordem de 5,6 MPa.

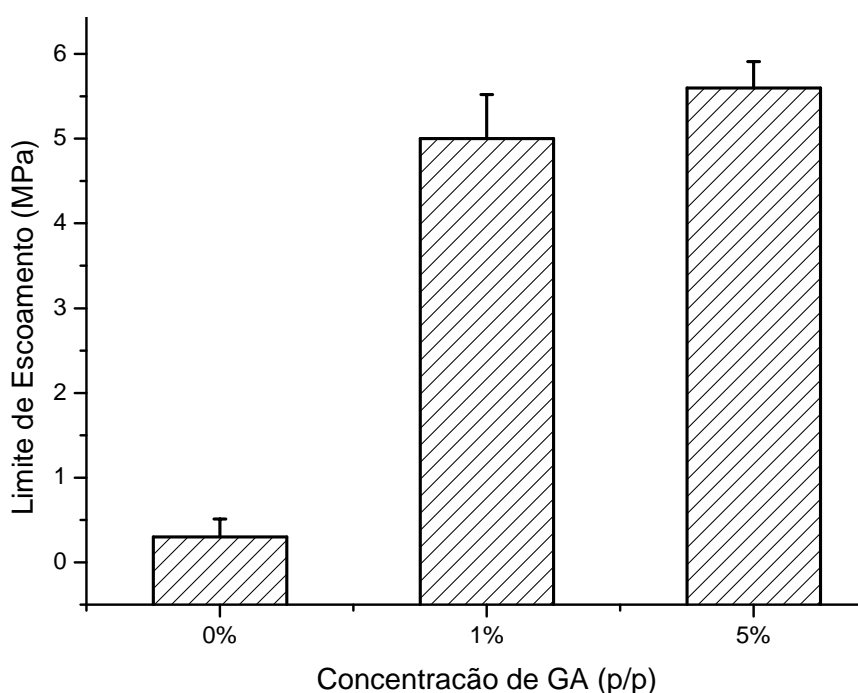


Figura 6.27 – Gráfico mostrando os valores do limite de escoamento em função da concentração de glutaraldeído utilizada no preparo dos híbridos PVA-BaG-GA, após 21 dias de degradação em água DI.

Quando comparados os valores do limite de escoamento obtidos para amostras antes e após 21 dias de degradação observa-se reduções de 90%, 25% e 40% para amostras preparadas sem reticulante, com 1% (p/p) e 5% (p/p) de glutaraldeído, respectivamente.

Pelo gráfico mostrado na figura 6.2, referente à perda de massa após imersão em meio aquoso, pode ser observado que a degradação em amostras preparadas com 1 e 5% (p/p) de GA foi semelhante durante todo período do ensaio. Dessa forma é aceitável uma redução similar nos valores do limite de escoamento, entretanto as concentrações de glutaraldeído atuaram de maneira a interferir na estrutura formada do híbrido. Em concentrações menores de GA é previsível a formação limitada de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas e manutenção de parte da estrutura do polímero livre dessas ligações cruzadas. Essa parcela não ligada é capaz de se cristalizar dadas as características semicristalinas do polímero.

De outra forma amostras preparadas com 5% (p/p) de GA devem formar estrutura polimérica mais reticulada, o que resulta em material menos cristalino e com menores limites de escoamento. É importante destacar que as mudanças ocorridas durante e após a imersão em água envolveram o inchamento e secagem do polímero, em tempo suficiente para permitir o rearranjo das cadeias e o conseqüente aumento da cristalização do polímero. Essas modificações são suficientes para influenciar as características mecânicas, conforme foi observado.

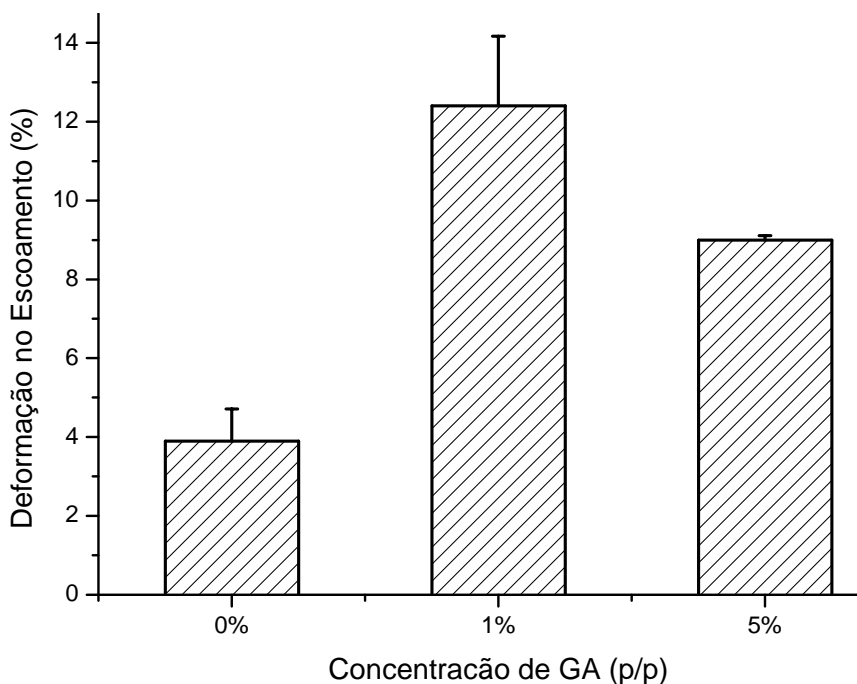


Figura 6.28 – Gráfico mostrando os valores da deformação no escoamento em função da concentração de glutaraldeído utilizada no preparo dos híbridos PVA-BaG-GA, após 21 dias de degradação em água DI.

A deformação no escoamento após 21 dias de degradação apresentou valores em torno de 4% para híbridos preparados sem glutaraldeído, Com a adição de 1% (p/p) de glutaraldeído foi observado

aumento da deformação no escoamento para 12% do comprimento inicial, após o período de degradação. Para amostras preparadas com 5% de GA os valores da deformação no escoamento se apresentaram em torno de 9%, valor menor que aquele indicado para amostras preparadas com 1% (p/p) de GA, todavia conforme pode ser observado pelo gráfico da figura 6.28, amostras preparadas com 5% (p/p) de GA mantêm aumento nos valores de compressão mesmo após o limite de proporcionalidade, enquanto amostras preparadas com 1% (p/p) de GA têm queda nítida nesse índice. Ou seja, embora os valores de deformação no escoamento de apresentem maiores para amostras com 1% (p/p) de GA ambas as amostras continuam a se deformar até as cargas máximas utilizadas no limite de segurança da máquina de ensaios.

Comparados os valores da deformação no escoamento após 21 dias de degradação notamos que houve redução em torno de 50 % e de 40% para amostras preparadas sem reticulante e com 5% (p/p) de GA, respectivamente. De outra forma, foi verificado aumento da deformação no escoamento para amostras preparadas com 1% (p/p) de GA. Essa divergência nos valores está relacionada mais uma vez ao comportamento apresentado pelas curvas tensão-deformação, onde amostras preparadas com 1% (p/p) de GA apresentaram caráter frágil e híbridos preparados com 5% (p/p) de GA apresentaram caráter elástico.

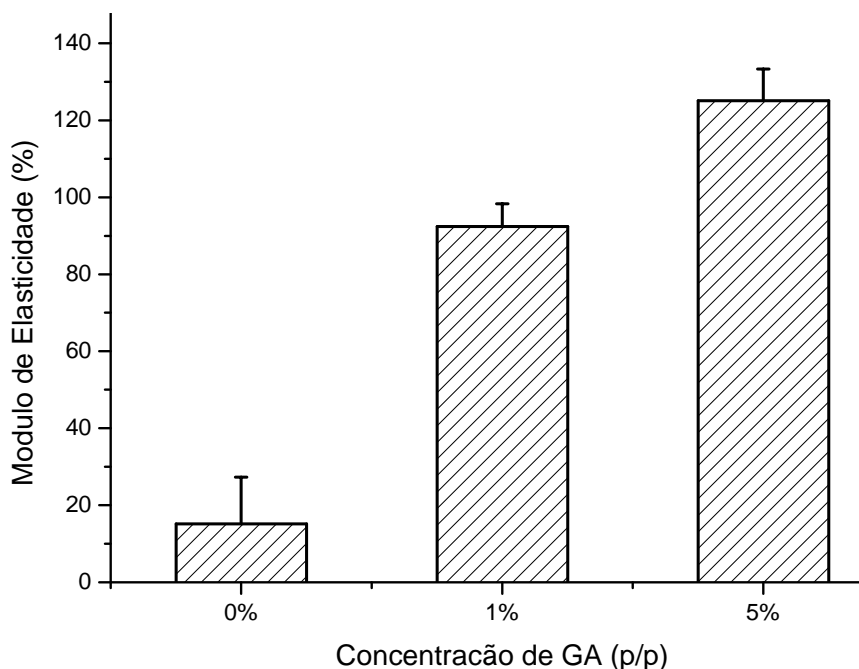


Figura 6.29 – Gráfico mostrando os valores do módulo de elasticidade em função da concentração de glutaraldeído utilizada no preparo dos híbridos PVA-BaG-GA, após 21 dias de degradação em água DI.

A figura 6.29 mostra o gráfico da porcentagem do módulo de elasticidade de híbridos, após ensaio de degradação versus a concentração de glutaraldeído utilizada. Foi considerando como cem por cento o módulo de elasticidade obtido antes do ensaio de imersão em água de amostra preparada sem glutaraldeído. Os valores indicam que após 21 de imersão o módulo de elasticidade de amostra preparada sem reticulante foi 20% do valor inicial. Os valores do módulo de elasticidade com a adição de 1% (p/p) de GA foi de 90% e amostras preparadas com 5% (p/p) de GA foi de 125%, indicando a influência das ligações cruzadas no comportamento mecânico após processo de degradação em meio aquoso.

Tabela 6.4 – Dados do módulo de compressão axial, limite de escoamento e deformação no escoamento para híbridos PVA-BaG-GA antes e após 21 dias de imersão em água DI

[] GA (%)	Limite de Escoamento (MPa)	Deformação no Escoamento (%)	Módulo de Elasticidade (GPa)
0	0,3±0,21	3,9±0,81	0,1±0,07
1	5,0±0,52	12,4±1,77	0,6±0,04
5	5,6±0,31	9,0±0,11	0,8±0,05
5 - NH ₄ OH	6,0±0,93	7,4±1,13	0,9±0,02

Considerando o princípio de que as matrizes porosas devem suportar os esforços a que estejam submetidas, bem como se deformarem de maneira a preservar o material depositado dentro de seus poros e ainda evitar o bombeamento do conteúdo celular presente no seu interior, pelo menos até que o organismo do hospedeiro seja capaz de se regenerar a partir da matriz enxertada. As curvas que se mostraram com características mais favoráveis a esse propósito foram as referentes aos híbridos com maior concentração de reticulante. A tabela 6.4 mostra os valores para o módulo de elasticidade dos híbridos obtidos, calculados a partir das curvas apresentadas na figura 6.26.

6.8. Caracterização da Liberação de Íons por Espectroscopia de Absorção Atômica

Outra situação para avaliar a cinética de degradação dos híbridos refere-se aos testes para quantificação dos elementos químicos, após o período de imersão em H₂O DI, presentes nas soluções utilizadas nos ensaios de degradação. Para tal, as análises feitas por espectroscopia de absorção atômica, que apresentaram os resultados de acordo com a Figura 6.30.

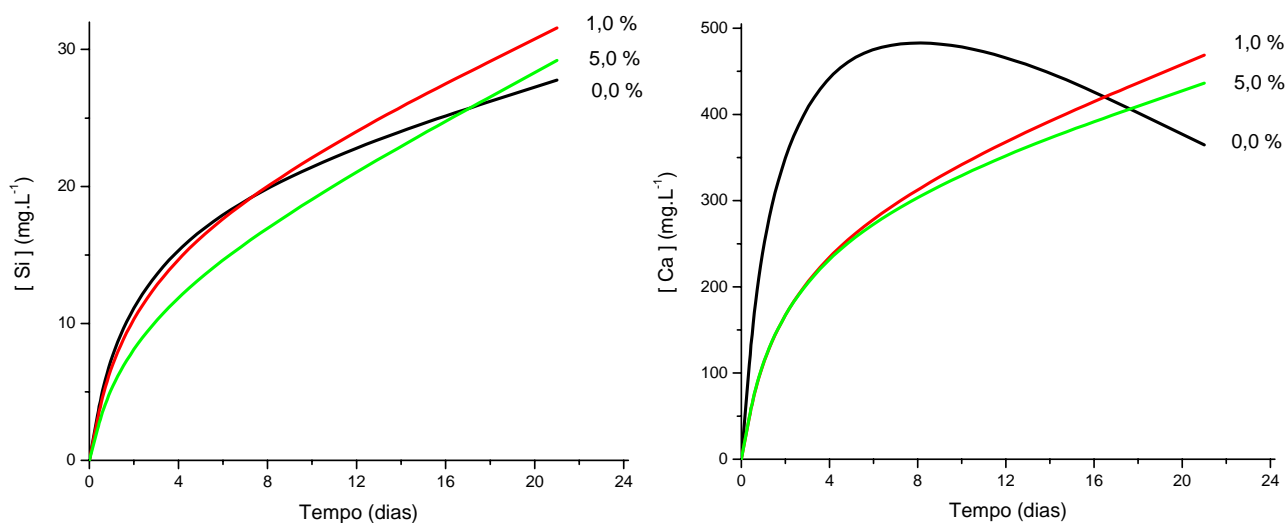


Figura 6.30 - Gráfico mostrando valores obtidos por análise química da solução de imersão dos híbridos, para os elementos Si e Ca, após imersão pelos períodos de tempo de até 21 dias.

Podemos perceber pelos ensaios de imersão em água deionizada que os íons Ca²⁺, para híbridos sem agente reticulante, foram liberados nos 02 primeiros dias de imersão a uma taxa quase três vezes o valor daquela liberada pelos híbridos reticulados com 1,0 e 5,0% de glutaraldeído. Além disso, percebemos pelo gráfico uma tendência da concentração de Ca²⁺ na solução utilizada no ensaio de degradação para os híbridos sem reticulação apresentar redução por volta do sétimo dia, atingindo ao final dos 21 dias, valores próximos daqueles obtidos para os híbridos reticulados, sugerindo uma possível redeposição na superfície dos híbridos, do cálcio disponível na solução.

Para as demais composições dos híbridos, que utilizaram glutaraldeído em sua composição, percebemos que a solução teve liberação gradual de cálcio para o meio em função do tempo de

imersão, sendo a taxa de liberação menor para as maiores concentrações de glutaraldeído utilizadas, conforme mostra a tabela 6.5.

Tabela 6.5 – Taxas de liberação de Si e Ca dos Híbridos PVA-BaG para meio de imersão

Elemento		[] de Glutaraldeído (% p/p)		
		0,0	1,0	5,0
Silício	R1 (mg / dia)	6,1	4,9	4,0
	R2(mg / dia)	0,6	0,9	0,9
Cálcio	R1 (mg / dia)	175,1	90,1	89,8
	R2 (mg / dia)	-10,8	11,4	10,1

A concentração de Si nas soluções de imersão teve aumento gradativo dos valores obtidos por absorção atômica, durante os períodos estudados, mas é interessante destacar que esses valores foram bem menores se comparados às concentrações do elemento cálcio, sugerindo a estabilidade do silício presente no biovidro, frente ao meio aquoso.

A baixa concentração de silício na solução deve indicar maior dificuldade desse elemento ser removido, resultado que é realmente percebido através do processo de dissolução e redeposição em sítios onde é realizada introdução de implantes, de acordo com a cinética de bioatividade descrita por Hench (1991), além da baixa liberação de silício em concentrações séricas observada para ensaios in vivo.

6.9. Análise da Citotoxicidade e Viabilidade Celular Avaliada por Ensaio de MTT

A figura 6.31 mostra gráfico de viabilidade celular através de MTT, para amostras de híbridos de PVA-BaG reticuladas com 5% de GA estabilizadas com NH₄OH em concentrações que variaram de 0,075 à 0,750M, por período de tempo entre 1 a 10 horas.

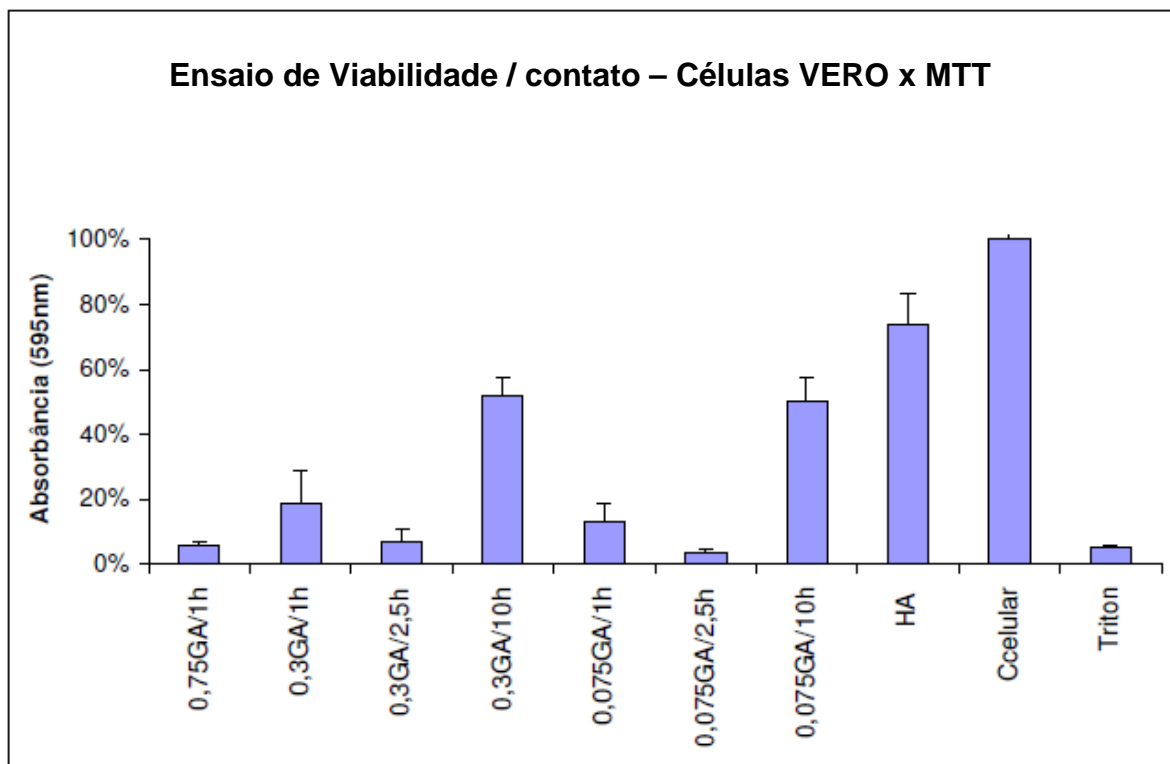


Figura 6.31 – Gráfico de viabilidade celular através de MTT, para amostras de híbridos de PVA-BaG reticuladas com 5% de GA estabilizadas com NH_4OH em concentrações que variaram de 0,075 à 0,750M, por período de tempo entre 1 a 10 horas.

Os ensaios biológicos de MTT conduzidos nas amostras estabilizadas com NH_4OH mostram que em todos os períodos de tempo utilizados na estabilização os resultados foram mais favoráveis para amostras tratadas com solução NH_4OH na concentração de 0,3M. As culturas mais viáveis foram obtidas para amostras estabilizadas por períodos de 10 horas, tanto nas concentrações de 0,3 como para as concentrações de 0,075M, cujos valores ficaram em torno de 50% dos valores obtidos para os controles celulares.

As figuras 6.32A, 6.32B e 6.32C mostram imagens feitas por microscopia eletrônica de varredura dessas amostras estabilizadas com NH_4OH , indicando a presença de células aderidas à superfície dos híbridos.

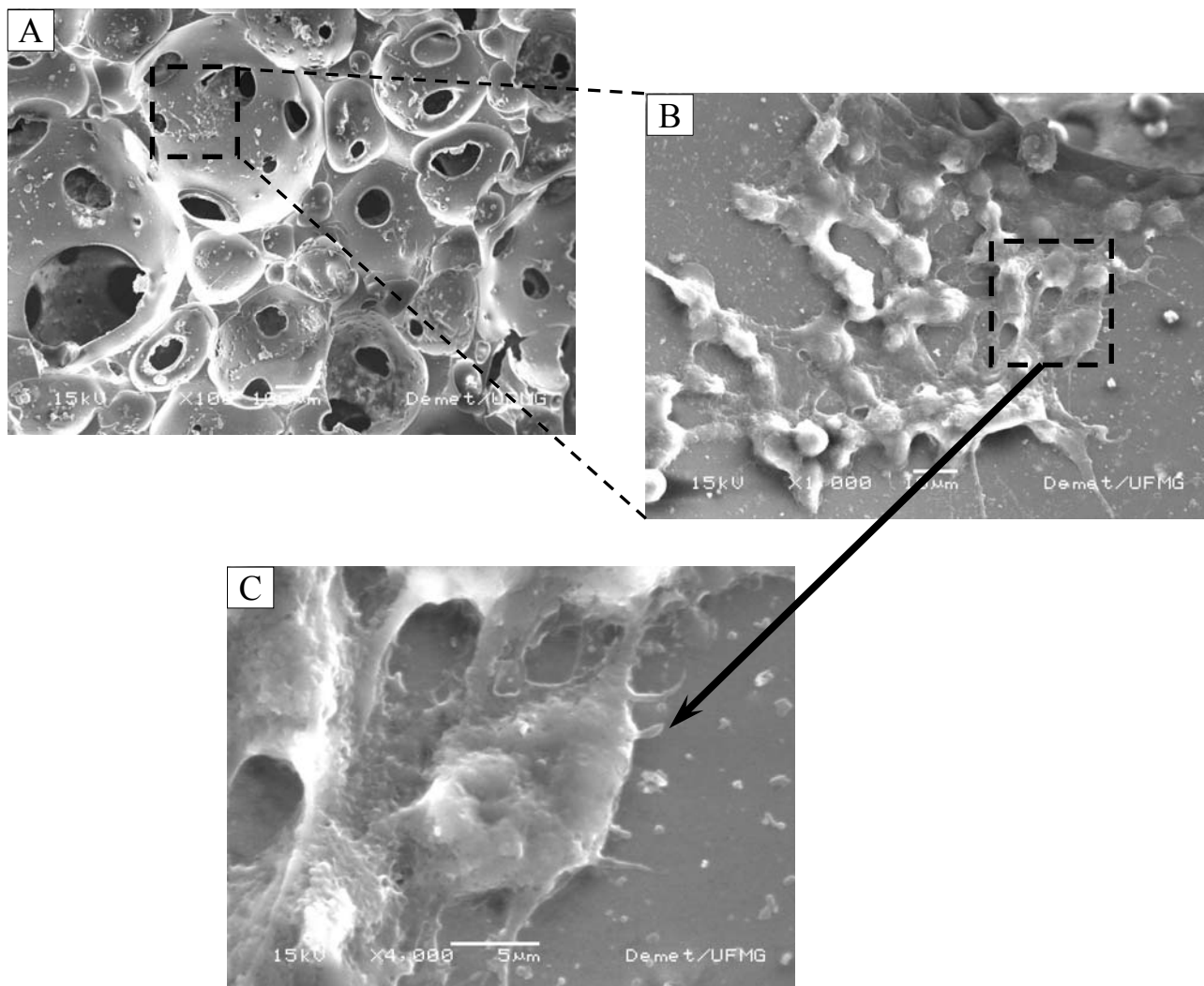


Figura 6.32 – Micrografia de (a) amostras de híbridos de PVA-BaG-GA estabilizadas com NH_4OH 0,3M por 10 horas após ensaio em meio de cultura celular, (b) ampliação da região indicada em “a” e (c) detalhe mostrando adesão celular.

Analisando os valores de viabilidade para amostras submetidas ao processo de degradação a figura 6.33 mostra os resultados de MTT realizados através de contato direto dos materiais sintetizados com as culturas de células e conduzidos em amostras de híbridos PVA-BaG-GA após terem sido submetidos aos ensaios de imersão em água DI, por períodos de até 21 dias. Essas amostras foram comparadas com os valores de MTT para híbridos estabilizados por 10 horas com solução 0,3M de NH_4OH .

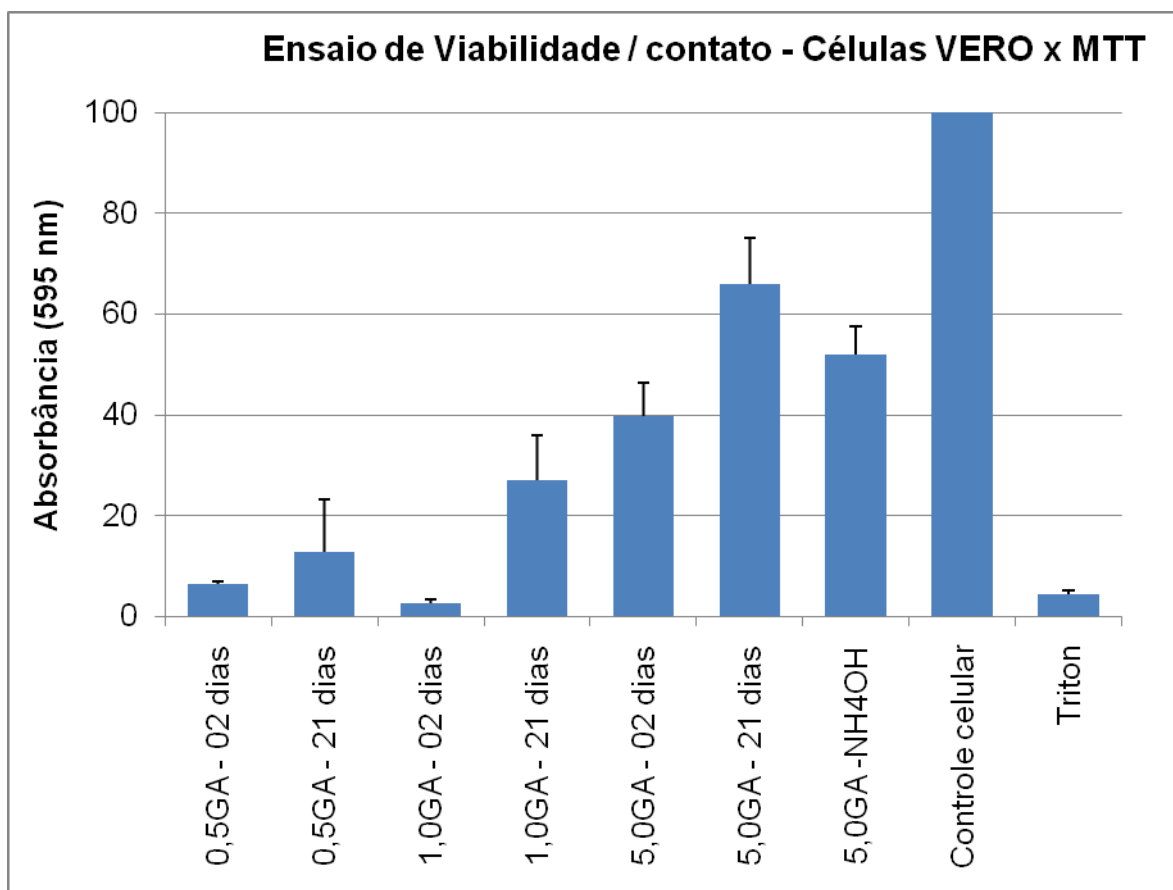


Figura 6.33 – Gráfico de viabilidade celular por contato direto através de MTT, conduzidos após períodos de até 21 dias de imersão em água DI, para amostras de híbridos PVA-BaG reticulados com GA, em concentrações variando de 0,5% p/p a 5% p/p e amostras reticuladas com 5% p/p submetidas à estabilização com solução de NH₄OH.

A medida de redução do MTT é definida na literatura como apropriada para a estimativa de citotoxicidade (HANSEN et. al., 1989; SCHWEIKL & SCHMALZ, 1996) e se baseia na capacidade que a enzima succinato desidrogenase (presentes nas mitocôndrias de células viáveis) têm de converter o sal de tetrazolium (dimetiltiazol difenil tetrazolium, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Somente células vivas possuem essa capacidade, indicando atividade mitocondrial e conseqüente viabilidade celular (SOUZA COSTA et. al., 1999; SLETTEN & DAHL, 1999).

Em estudos anteriores (PEREIRA et. al., 2005; COSTA et. al., 2008a; MANSUR & COSTA, 2008) onde os ensaios de viabilidade celular foram conduzidos a partir de extratos do material, ou seja,

contato indireto, os resultados apresentaram viabilidade celular próxima dos valores alcançados pelo controle celular. Entretanto para ensaios conduzidos com amostras inseridas no meio de cultura, o chamado contato direto, as mesmas composições de híbridos utilizadas por Costa et. al., (2008a) e Mansur & Costa (2008) apresentaram-se como citotóxicas.

Diante disso, fica evidente a representatividade dos níveis de viabilidade celular obtidos para as amostras PVA-BaG-GA submetidas aos tratamentos de estabilização e bloqueio, posto que os resultados de viabilidade alcançados são elevados e conduzidos através do contato direto.

A viabilidade mostrada no gráfico da figura 6.31 referente ao ensaio de MTT com amostras neutralizadas NH_4OH é confirmada também através da imagem de MEV mostrada na figura 6.32, que destaca células aderidas à superfície dos híbridos PVA-BaG-GA estabilizadas, evidenciando a presença de prolongamentos citoplasmáticos e características de espalhamento sobre a superfície, que indicam células viáveis adaptadas favoravelmente ao meio.

Quando foram avaliadas as amostras submetidas aos ensaios de degradação em água DI os resultados indicaram que todas as concentrações de glutaraldeído utilizadas os índices de viabilidade foram maiores para as amostras imersas em água DI pelo período de 21 dias. Além disso, para amostras reticuladas com glutaraldeído na faixa de até 5% p/p, quanto maior a concentração do reticulante utilizada maiores os índices de viabilidade celular alcançados. As amostras reticuladas com 5% p/p de glutaraldeído e imersas em água DI por 21 dias apresentaram valores, em torno de 65% dos valores obtidos para os controles celulares.

A comparação dos resultados mais favoráveis dos híbridos imersos em água DI com resultados obtidos de amostras reticuladas com 5% p/p de glutaraldeído e estabilizadas com solução 0,3M de NH_4OH por 10 horas, podemos destacar melhora significativa nos índices de viabilidade. Os resultados indicam que a imersão em água DI foi capaz de proporcionar a remoção de resíduos citotóxicos e preparar o material para o contato com o meio celular.

Diante disso, fica evidente a representatividade dos níveis de viabilidade celular obtidos para as amostras PVA-BaG-GA submetidas aos tratamentos de estabilização e bloqueio, posto que os resultados de viabilidade alcançados são elevados e conduzidos através do contato direto.

7. REFORÇO MECÂNICO DE HÍBRIDOS PVA-BaG-(NTC-COOH)

7.1 Caracterização de Híbridos PVA-BaG-(NTC-COOH)

Amostra de híbrido PVA-BaG preparada com adição de 0,25% de nanotubos em relação a concentração de PVA pode ser vista na figura 7.1A, com destaque para a marcante alteração de cor promovida pela adição dos nanotubos quimicamente modificados (NTC-COOH), conforme mostrado na comparação com a figura 7.1B relativa a amostra PVA-BaG sem nanotubos.

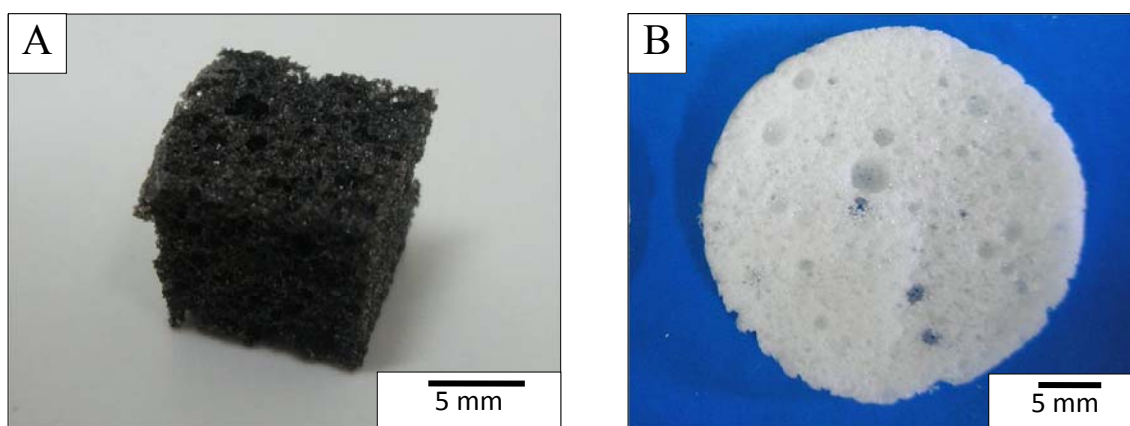


Figura 7.1 – Fotografia da estrutura do híbrido PVA-BaG (a) preparado com a adição de 0,25% (p/p) de nanotubos de carbono quimicamente modificados e (b) amostra PVA-BaG sem nanotubos de carbono.

7.1.1 Avaliação Morfológica dos Híbridos PVA-BaG-(NTC-COOH)

A figura 7.2 mostra microscopia eletrônica de varredura de híbridos PVA-BaG preparados com e sem adição de nanotubos de carbono quimicamente modificados.

Pelo ponto de vista da microestrutura as amostras de híbridos PVA-BaG preparadas com e sem (NTC-COOH) exibiram macroporos, sendo que os híbridos obtidos sem nanotubos de carbono os poros foram mais regulares, conforme pode ser observado pela comparação das figuras 7.2A e 7.2B. Para as ampliações de 5000 vezes realizadas na superfície dos híbridos foi observada a diferença entre as matrizes.

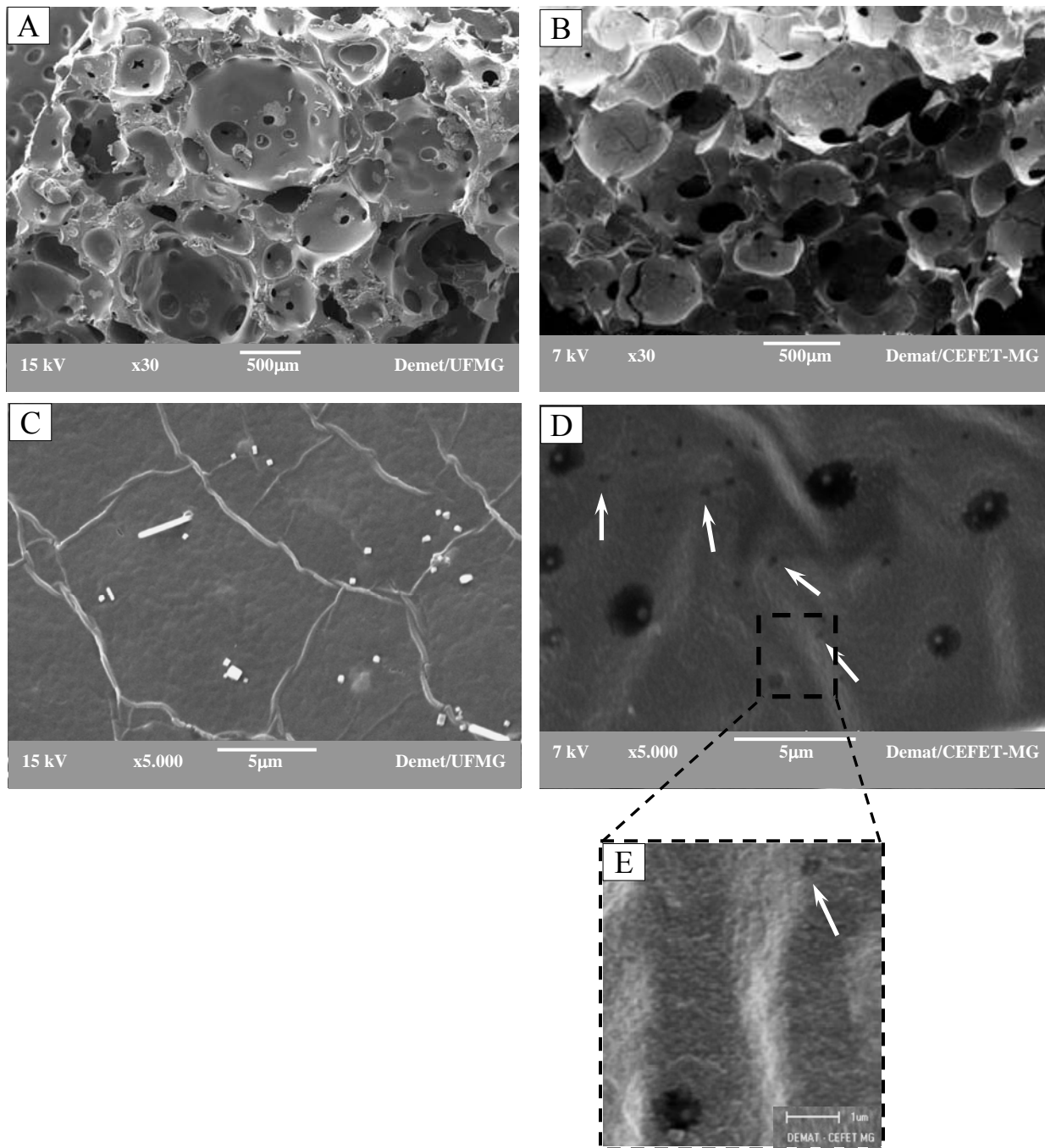


Figura 7.2 – MEV de híbridos (a) PVA-BaG e (b) PVA-BaG reforçados com NTC-COOH. As imagens (c) e (d) mostram ampliações da superfície de poro das figuras “a” e “b”, respectivamente. A imagem (e) mostra ampliação da região destacada em “d” (10.000x). Setas das figuras “d” e “e” indicam os nanoporos presentes no híbrido.

Os híbridos PVA-BaG apresentaram superfície regular com presença de algumas estrias de espessura nanométrica, como mostrado na figura 7.2C. Por outro lado, amostras dos híbridos preparados com (NTC-COOH) a superfície se mostrou com evidência de irregularidades na forma de desníveis, presença de poros com tamanho na faixa de 1 a 2 μ m e vários poros da ordem nanométrica conforme indicados pelas setas da figura 7.2D e 7.2E.

7.1.2 Ensaio de Resistência Mecânica à Compressão de Híbridos PVA-BaG-(NTC-COOH)

A figura 7.3 apresenta as curvas típicas tensão-deformação obtidas nos ensaios de compressão de híbridos PVA-BaG preparados com as concentrações de 0 e 1%(p/p) de glutaraldeído e amostras preparadas sem glutaraldeído e reforçadas com 0,25% (p/p) de (NTC-COOH). As propriedades mecânicas analisadas através de teste de compressão axial, para híbridos PVA-BaG preparados com e sem nanotubos de carbono, são sumarizados na tabela 7.1.

Tabela 7.1- Propriedades mecânicas obtidas por ensaio de compressão axial para híbridos PVA-BaG e PVA-BaG-(NTC-COOH).

[] GA %(p/p)	[] NTC %(p/p)	Limite de Escoamento (MPa)	Deformação no Escoamento (%)	Módulo de Elasticidade (MPa)
0	-	2,3 \pm 0,87	7,5 \pm 0,34	0,6 \pm 0,21
	0,25	4,4 \pm 0,95	9,6 \pm 1,09	0,8 \pm 0,27
1	-	6,7 \pm 3,27	9,1 \pm 2,87	0,8 \pm 0,07
Tensão do osso trabecular/esponjoso (b)	2-12 MPa			

(b) - Referências (SHI & JIANG, 1998; MONTJOVENT et. al., 2005)

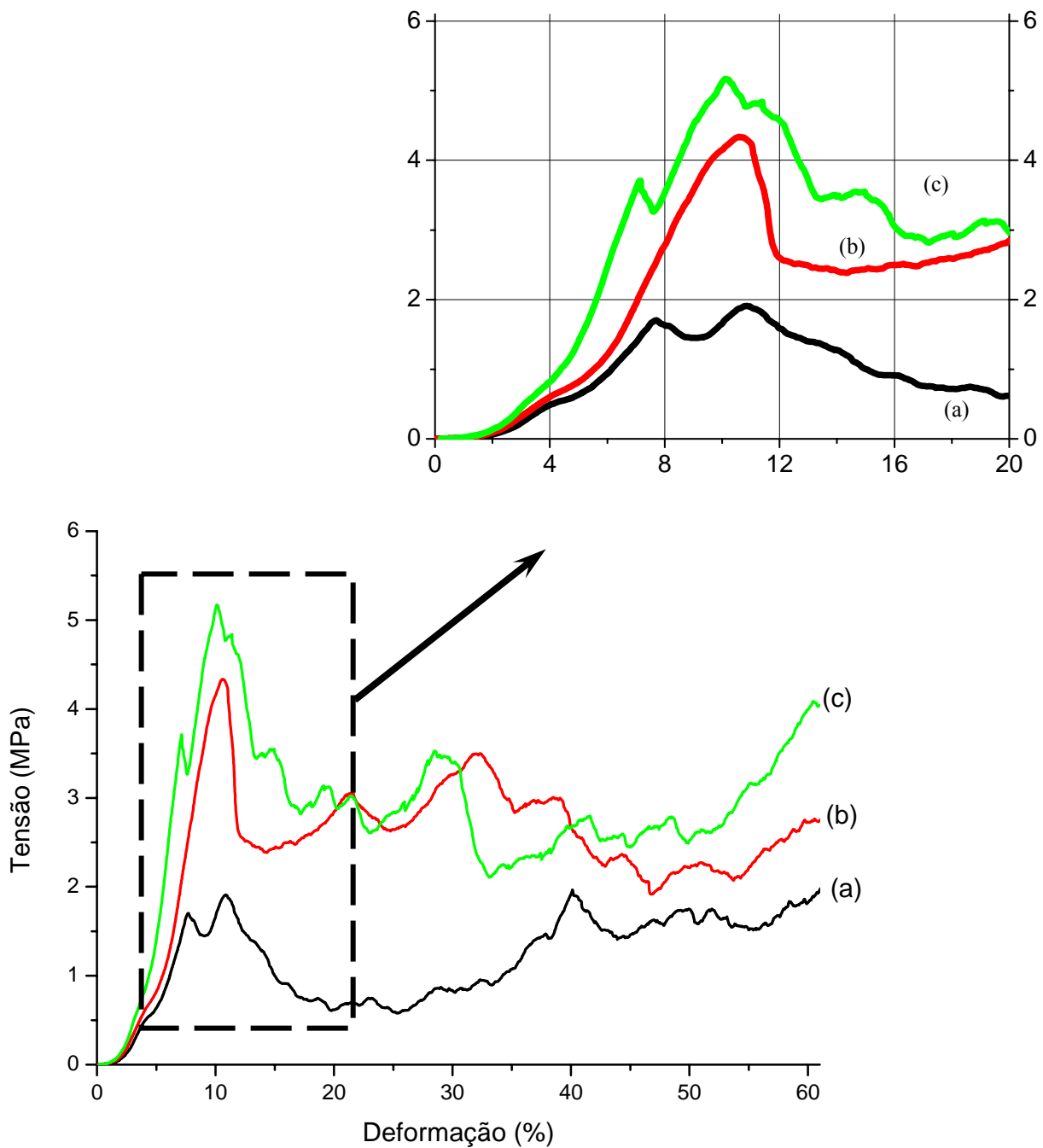


Figura 7.3 – Curvas típicas tensão-deformação obtidas por ensaio de compressão de híbridos PVA-BaG preparados com as concentrações de (a) 0% p/p de glutaraldeído; (b) 1% p/p de glutaraldeído e (c) amostras preparadas sem glutaraldeído e reforçadas com 0,25% (p/p) de nanotubos de carbono quimicamente modificados.

A figura 7.4 apresenta gráfico das propriedades mecânicas: limite de escoamento, deformação no escoamento e módulo de elasticidade, para híbridos PVA-BaG preparados com adição de nanotubos de carbono quimicamente modificados. Os resultados foram apresentados de forma a correlacionar o acréscimo ocorrido nas propriedades mecânicas dos híbridos com a adição de (NTC-COOH), em relação aos valores obtidos com híbridos PVA-BaG preparados sem (NTC-COOH). Os cálculos foram conduzidos utilizando as equações Eq.(6), Eq.(7) e Eq.(8).

$$\%LE = (LE_{Hib-NTC} - LE_{Hib-PVA/BaG}) / LE_{Hib-PVA/BaG} \times 100 \quad (6)$$

$$\%DE = (DE_{Hib-NTC} - DE_{Hib-PVA/BaG}) / DE_{Hib-PVA/BaG} \times 100 \quad (7)$$

$$\%ME = (ME_{Hib-NTC} - ME_{Hib-PVA/BaG}) / ME_{Hib-PVA/BaG} \times 100 \quad (8)$$

onde %LE, %DE e %ME referem-se aos acréscimos obtidos nos valores do limite de escoamento, deformação no escoamento e módulo de elasticidade, respectivamente e os índices Hib-NTC e Hib-PVA-BaG referem-se aos híbridos preparados, respectivamente com e sem nanotubos de carbono.

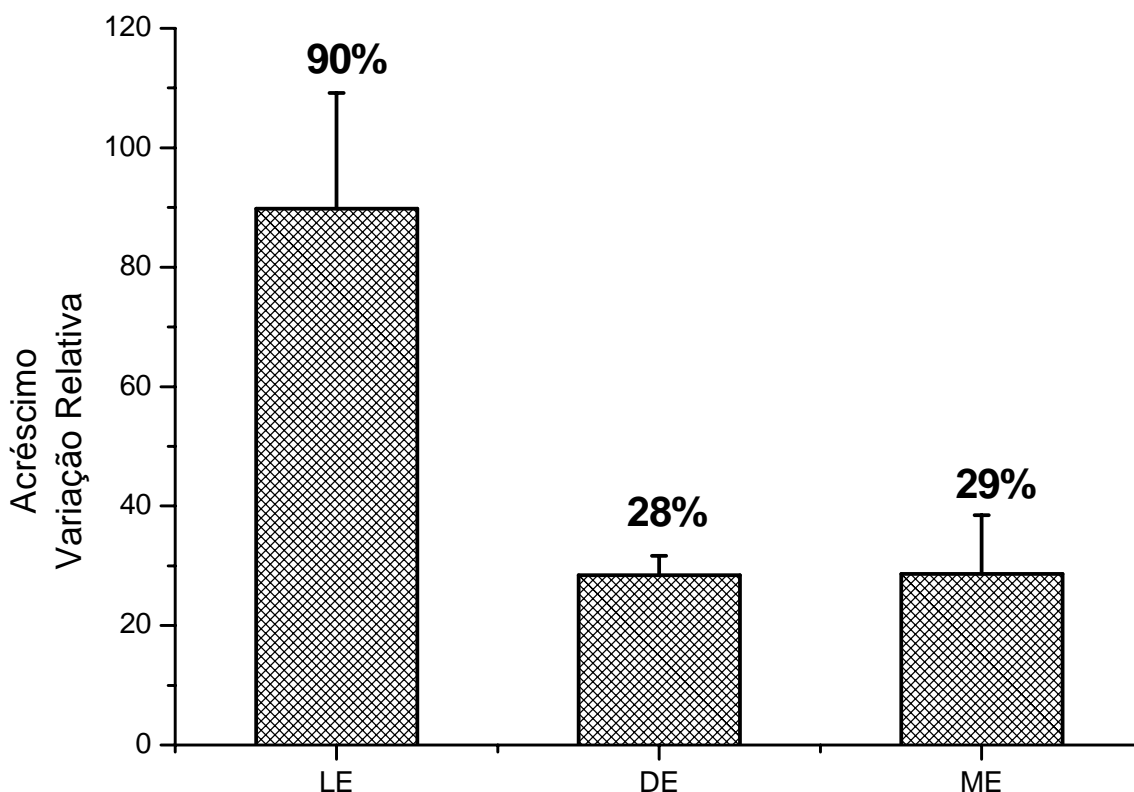


Figura 7.4 – Gráfico mostrando efeito da adição de (NTC-COOH) nas propriedades mecânicas: (LE) limite de escoamento, (DE) deformação no escoamento e (ME) módulo de elasticidade para híbridos PVA-BaG.

Os resultados relativos ao limite de escoamento, deformação no escoamento e módulo de elasticidade para híbridos PVA-BaG preparados com adição de nanotubos de carbono apresentaram diferença estatística em relação aos valores obtidos para híbridos preparados sem nanotubos de carbono quimicamente modificados ($p < 0,01$).

Pelos dados pode ser visto que a adição de 0,25% (p/p) de (NTC-COOH) melhorou as propriedades mecânicas estudadas dos híbridos PVA-BaG. Se observarmos o acréscimo promovido pela adição dos (NTC-COOH) o limite de escoamento foi 90% superior, a deformação no escoamento foi 28% superior e o módulo de elasticidade apresentou incremento de 29% em relação aos valores dos híbridos preparados sem nanotubos de carbono, conforme mostra o gráfico da figura 7.4.

Considerando a excelente resistência mecânica dos nanotubos de carbono e dos nanotubos de carbono funcionalizados, a experimentação viabiliza o uso desses componentes como agente de reforço de materiais compósitos, em especial se considerarmos matrizes para crescimento de tecido ósseo.

Realizando a comparação do comportamento mecânico das amostras preparadas com adição de nanotubos de carbono quimicamente modificados observamos que o desempenho dessas amostras chegou a ser superior ao obtido com amostras de híbridos PVA-BaG reticuladas com 1% (p/p) de glutaraldeído, conforme fica destacado no gráfico da figura 7.4.

Grande parte da literatura mostra que (NTC-COOH) desempenham muito bem o papel de reforço. Para transferir efetivamente a carga para os (NTC-COOH), uma boa dispersão e adesão interfacial são necessárias. Estudos em compósitos a base de PVA com nanotubos de carbono quimicamente modificados mostraram que o PVA é capaz de formar um recobrimento cristalino ao redor dos nanotubos, maximizando a transferência da força interfacial (COLEMAN et. al, 2006a; COLEMAN et. al, 2006b RYAN et. al., 2007). Essa deve ser uma das razões pelo qual as propriedades mecânicas dos híbridos são melhores quando comparadas às do PVA puro.

Além disso, a funcionalização dos NTC utilizando solução de HNO_3 promove a adição de grupos carbonila, carboxila e fenol na superfície dos NTC (PARK et. al., 2006). Esses grupos ajudam na interação através de ligações de hidrogênio entre os NTC e as moléculas de PVA, ambos com caráter hidrofílico como mostrado na figura 7.5.

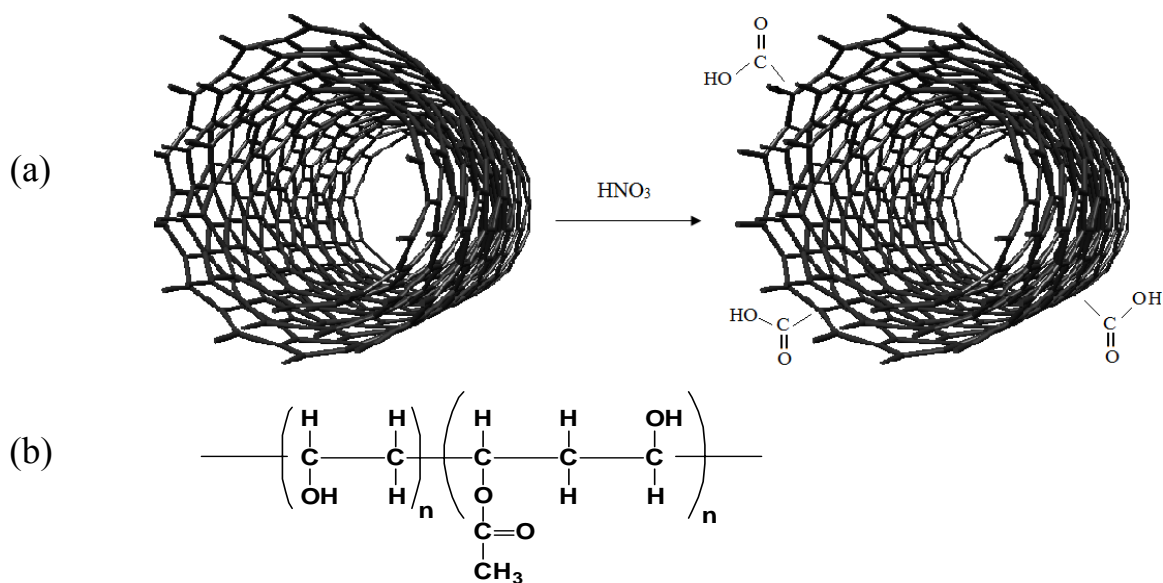


Figura 7.5 – (a) Nanotubos de carbono funcionalizados e (b) fórmula química do poli (álcool vinílico-co-acetato de vinila).

O mecanismo de modificação química dos nanotubos de carbono atua de maneira que a incorporação de grupos carboxílicos seja possível torná-los parcialmente hidrofílicos e promover formação de ligações de hidrogênio com silanois (SiOH) e álcool (PVA-OH). Para teores baixos de (NTC-COOH) a interação entre os (NTC-COOH) é menor que a interação entre as moléculas de PVA e o (NTC-COOH), então os (NTC-COOH) podem dispersar homogeneamente na matriz de PVA e promover reforço mecânico da estrutura (SPITALSKYA et. al., 2010).

A figura 7.6 apresenta um esquema da estrutura da formação de ligações entre os nanotubos de carbono funcionalizados com grupos carboxílicos e as hidroxilas do PVA. Essa estrutura quando preparada com o vidro bioativo pode combinar com a introdução de ligações entre os grupos silanol do vidro e as hidroxilas do PVA, conforme mostra o esquema da figura 7.7, resultando em um híbrido reforçado no nível nanoestrutural.

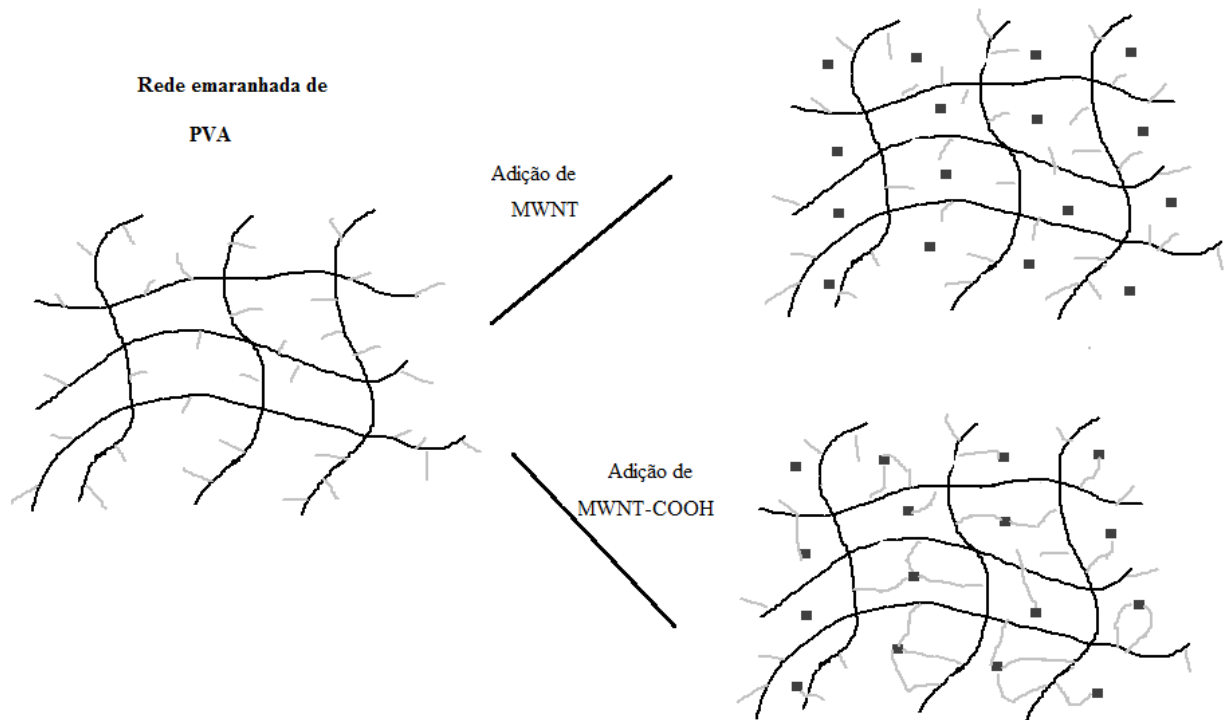


Figura 7.6 - Mecanismo de formação da rede de PVA com a incorporação dos nanotubos de carbono quimicamente modificados (onde: os traços cinza representam os grupos hidrofílicos do PVA e os quadrados pretos os nanotubos de carbono). Adaptado de Santos (2011).

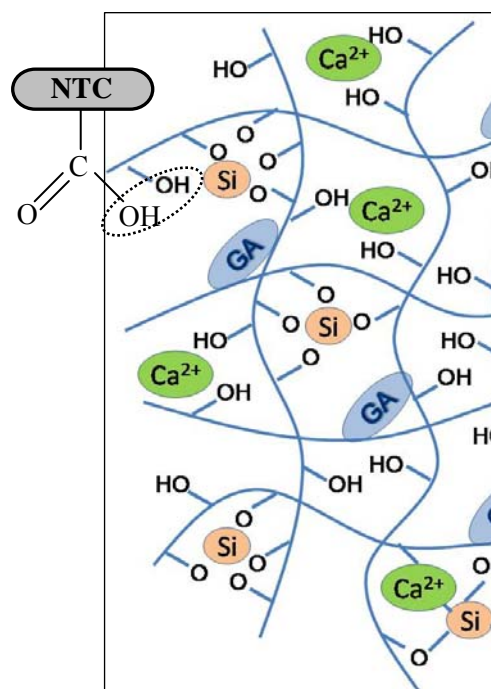


Figura 7.7 – Esquema da estrutura dos híbridos PVA-BaG reticulados com GA formando as pontes entre as redes poliméricas com a matriz inorgânica dispersa na matriz polimérica.

7.2 Degradação de Híbridos PVA-BaG-NTC

A figura 7.8 mostra o gráfico obtido através de ensaio de degradação dos híbridos PVA-BaG com e sem adição de nanotubos de carbono quimicamente modificados, conduzidos em água deionizada por período de tempo de 7 dias.

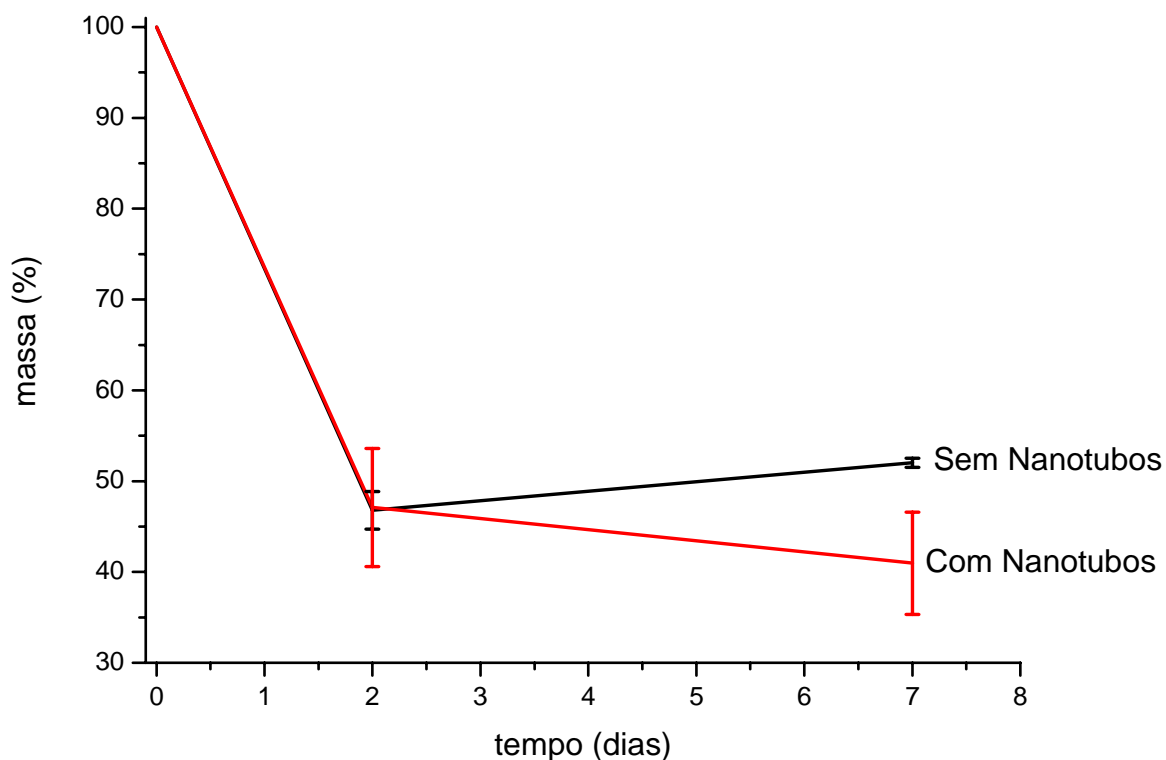


Figura 7.8 – Gráfico obtido através de ensaio de degradação realizado em amostras PVA-BaG preparadas com e sem nanotubos de carbono quimicamente modificados, conduzidos em período de 7 dias de imersão em água DI.

Os resultados mostram que a maior perda de massa ocorreu nos dois primeiros dias de imersão, sendo que os híbridos PVA-BaG preparados sem (NTC-COOH) estabilizaram a parte de massa e os híbridos preparados com (NTC-COOH) apresentaram continuidade da perda de massa até o período de 7 dias de imersão.

7.2.1 Morfologia dos Híbridos PVA-BaG-NTC após Degradação

A análise por microscopia eletrônica de varredura dos híbridos PVA-BaG com e sem (NTC-COOH) após serem submetidos à ensaio de degradação em meio aquoso é apresentada na figura 7.9. Os resultados mostraram que após 7 dias de imersão em água deionizada ocorreram alteração na morfologia, com poros mostrando evidencia de perda de material em parte da estrutura.

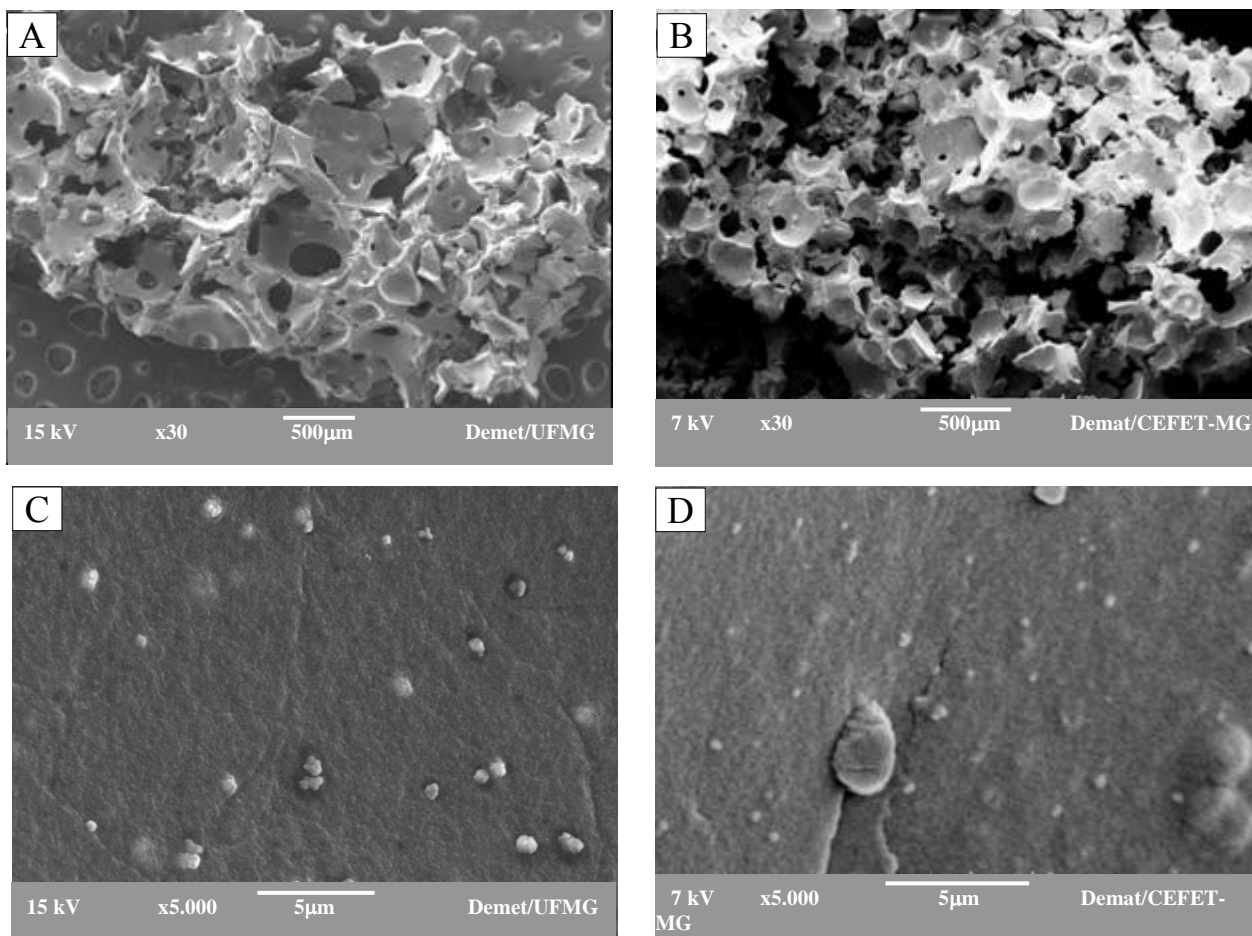


Figura 7.9 – MEV de híbridos (a) PVA-BaG e (b) PVA-BaG reforçados com (NTC-COOH), após serem submetidas a processo de degradação pelo período de 7 dias. As imagens (c) e (d) mostram ampliações da superfície de poro das figuras “a” e “b”, respectivamente.

Nas imagens dos híbrido em ampliação, figuras 7.9C e 7.9D o aspecto apresentado por ambas as amostras foi muito semelhante com destaque para presença de depósitos de cálcio que se apresentaram maiores nas amostras preparadas sem nanotubos de carbono quimicamente modificados, entretanto em menor numero que nas amostras que tiveram nanotubos de carbono em

sua composição. Esse efeito pode estar relacionado ao acúmulo de pequenas partículas de cálcio que se concentram na solução de imersão e tendem a se aglutinarem e depositarem na superfície.

7.2.2 Resistência Mecânica à Compressão de Híbridos PVA-BaG-NTC após Degradação

A resistência mecânica de amostras dos híbridos PVA-BaG preparados com e sem adição de (NTC-COOH) foi avaliada após imersão em água deionizada pelo período de 7 dias. Os resultados obtidos através de ensaio de compressão axial são sumarizados na tabela 7.2.

Tabela 7.2- Propriedades mecânicas obtidas por ensaio de compressão axial para híbridos PVA-BaG e PVA-BaG-(NTC-COOH) após imersão por 7 dias em água deionizada.

[] GA %(p/p)	[] NTC %(p/p)	Limite de Escoamento (MPa)	Deformação no Escoamento (%)	Módulo de Elasticidade (MPa)
0	-	0,1±0,05	2,1±0,05	0,05±0,01
	0,25	0,5±0,17	16,3±2,46	0,04±0,01
Tensão do osso trabecular/esponjoso (b)	2-12 MPa			

(b) - Referências (SHI & JIANG, 1998; MONTJOVENT et. al., 2005)

A figura 7.10 apresenta gráfico das propriedades mecânicas: limite de escoamento, deformação no escoamento e módulo de elasticidade, para híbridos PVA-BaG preparados com adição de nanotubos de carbono quimicamente modificados e submetidos à degradação em água DI. Os resultados apresentam o acréscimo ocorrido nas propriedades mecânicas dos híbridos com a adição de (NTC-COOH) após a degradação, em relação aos valores obtidos com híbridos PVA-BaG preparados sem nanotubos de carbono, também submetidos a degradação. Os cálculos foram conduzidos utilizando as equações Eq.(6), Eq.(7) e Eq.(8) com obtidos após o período de imersão.

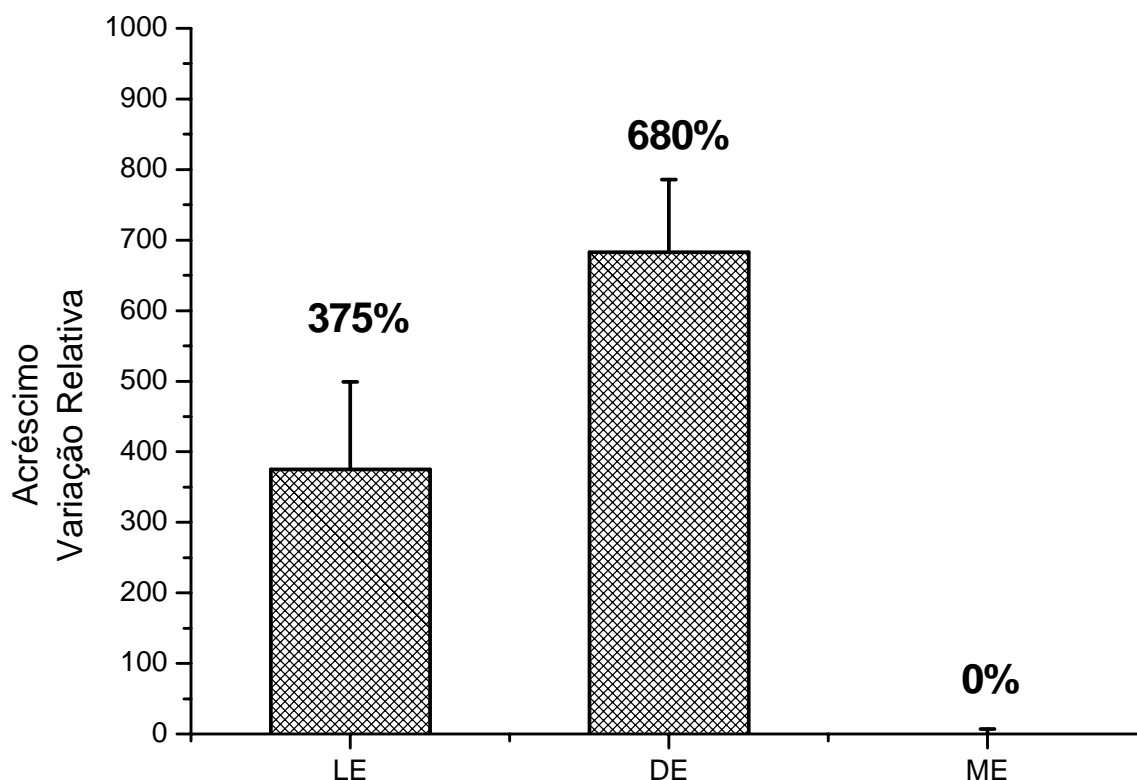


Figura 7.10 – Gráfico mostrando efeito da adição de nanotubos de carbono quimicamente modificados nas propriedades mecânicas: (LE) limite de escoamento, (DE) deformação no escoamento e (ME) módulo de elasticidade para híbridos PVA-BaG após imersão por 7 dias em água deionizada.

Pelos dados podemos ver que a adição de 0,25% (p/p) de (NTC-COOH) melhorou as propriedades mecânicas, limite de escoamento e deformação no escoamento para híbridos PVA-BaG. Se observarmos o acréscimo promovido pela adição dos nanotubos de carbono quimicamente modificados o limite de escoamento foi 375% maior e a deformação no escoamento foi 680% superior em relação aos valores dos híbridos preparados sem nanotubos de carbono, conforme mostra o gráfico da figura 7.10. Por outro lado o módulo de elasticidade apresentou, após 7 dias de imersão em água deionizada, valores muito próximos para amostras com e sem (NTC-COOH).

Os híbridos preparados com (NTC-COOH), apesar de terem apresentado modificação na sua estrutura com presença de micro e nanoporos, aos esforços mecânicos se comportaram com propriedades melhores que os híbridos preparados sem nanotubos. Mesmo após imersão em meio aquoso por 7 dias as propriedades de amostras preparadas com (NTC-COOH) apresentaram valores superiores de limite de resistência e deformação no escoamento.

Considerando que a perda de massa foi maior para os híbridos preparados com (NTC-COOH), como indicado pelo gráfico da figura 7.8, o mecanismo que deve ter prevalecido na formação dos híbridos com nanotubos quimicamente modificados contempla a existência de grupos carboxílicos superficiais interagindo com os grupos hidroxila do PVA, estabilizando a estrutura polimérica. Com esse mecanismo as propriedades dos (NTC-COOH) auxilia na estruturação e aumento da resistência de híbridos PVA-BaG.

8. CONCLUSÕES

- Nesse trabalho foram sintetizados híbridos a base de poli (álcool vinílico) e vidro bioativo visando sua utilização na Engenharia de Tecido Ósseo. As matrizes obtidas apresentaram estrutura tridimensional macroporosa com poros conectados.

- A adição de glutaraldeído durante a síntese do híbridos PVA-BaG conservou a matriz com estrutura tridimensional porosa, com presença de conexões entre os poros e promoveu aumento na resistência mecânica.

- Através de ensaio de degradação *in vitro* foi verificado que a adição de glutaraldeído diminui os valores de perda de massa em meio aquoso. A adição de glutaraldeído permitiu realização de tratamento de estabilização para controle do pH dos híbridos. Além disso os híbridos mantiveram sua morfologia de poro e conectividade entre os poros mesmo após imersão em água por 21 dias.

- Os híbridos PVA-BaG reticulados com glutaraldeído apresentaram viabilidade celular em contato direto com cultura de células. Foi verificado aumento da viabilidade para híbridos preparados com maiores concentrações de glutaraldeído e submetidos por períodos maiores de imersão em água DI.

- A adição de nanotubos de carbono modificados em híbridos porosos a base de PVA-BaG promoveu reforço mecânico nos materiais.

- Os materiais obtidos indicam potencial para crescimento celular, demonstrando serem candidatos para aplicação como matrizes na engenharia de tecido ósseo.

9. TRABALHOS FUTUROS

- Realizar ensaio com implantação dos híbridos *in vivo*, avaliando resposta inflamatória, crescimento e diferenciação de células ósseas e maturação de tecido ósseo calcificado.
- Adicionar aos híbridos, nanotubos funcionalizados conjugados com proteínas, e avaliar a liberação desses fatores de crescimento ósseo.
- Avaliar o efeito de condução de impulsos elétricos em híbridos preparados com adição de nanotubos de carbono.
- Realizar ensaio mecânico em amostra dentro de meio fisiológico para simular a comportamento em situação mais próxima da real.
- Ensaiar outros meios para neutralização dos híbridos de forma a removerem menor quantidade de material inorgânico, especificamente cálcio e silício.
- Avaliar a degradação em meio contendo enzimas, para aumentar os parâmetros observados no processo de reparação *in vivo*.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABARRATEGI, Ander; GUTIERREZ, Maria C.; MORENO-VICENTE, Carolina; HORTIGUELA, Maria J.; RAMOS, Viviana; LOPEZ-LACOMBA, Jose' L.; FERRER, Maria L.; MONTE, Francisco del. **Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes**. *Biomaterials*, v.29, p.94–102, 2008.
2. ABRAHAM, Leah C.; DICE J. Fred; FINN, Patrick F.; MESIRES Nicholas T.; LEE, Kyongbum; KAPLAN, David L. **Extracellular matrix remodeling – Methods to quantify cell-matrix interactions**. *Biomaterials*, v. 28. p. 151-161, 2007.
3. AFONSO, R. J. C. F. *Espectrometria de Fluorescência e Difração de Raios X*. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, 2003.
4. ALBERTS, Bruce; BRAY, Dennis; HOPKIN, Karen; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter. **Essential Cell Biology**. 2.ed. Nova York: Garland Pub., 2003. 896p.
5. ALLO, Bedilu A.; RIZKALLA, Amin S.; MEQUININT, Kibret. Synthesis and electrospinning of ϵ -polypolycaprolactone-bioactive glass hybrid biomaterial via sol-gel process. *Langmuir*, IN PRESS.
6. ALMEIDA, R. M.; PANTANO, C. G. **Structural investigation of silica gel films by infrared spectroscopy**. *Journal of Applied Physics*, v.68, p.1225-1232, 1990.
7. AMAL, M.K; MAHMOUD, Esawi; FARAG, M. **Carbon nanotube reinforced composites: potential and current challenges**. *Materials and Design*, v.28, p.2394–2401, 2007
8. ANDRADE, Giovanna Ivo; STANCIOLI, Edel Figueiredo Barbosa ; MANSUR, Alexandra Ancelmo Piscitelli; MANSUR, Herman Sander. **Small-angle X-ray Scattering and FTIR Characterization of Nanostructured Poly (vinyl alcohol)/Silicate Hybrids for Immunoassay Applications**. *Journal of Materials Science*, v. 43, p.450-463, 2008.
9. ANSELME, K. **Osteoblast adhesion on biomaterials**. *Biomaterials*. v.21, p.667-681, 2000.
10. ANUSAVICE, K. J. Phillips. **Materiais Dentários**. 10ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998. 412p.

11. ARANHA, Isabele B.; LUCAS, Elizabete F. **Poli(álcool vinílico) modificado com cadeias hidrocarbônicas: avaliação do balanço hidrófilo/lipófilo.** *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.11, p.174-81, 2001.
12. AZEVEDO, Helena S.; REIS Rui L. **Encapsulation of α -amylase into starch-based biomaterials: An enzymatic approach to tailor their degradation rate.** *Acta Biomaterialia*, v. 5, p. 3021–3030, 2009.
13. BANDYOPADHYAY, Abhijit.; SARKAR, Mousumi.; BHOWMICK, Anil K. **Structure-property relationship in sol-gel derived polymer/silica hybrid nanocomposite prepared at various pH.** *Journal of Materials Science*, v.41, p.5981-5993, 2006.
14. BERGER, J. et al. **Structure and interaction in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, p.19-34, 2004
15. BOYNE, Philip J.; LILLY, Leslie C.; MARX, Robert E.; MOY, Peter K.; NEVINS, Myron; SPAGNOLI, Daniel B.; TRIPLETT, R. Gilbert. **De novo induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation.** *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.63, p.1693-1707, 2005.
16. BREITENBACH, A.; PISTEL, K. F.; KISSEL, T. **Biodegradable comb polyesters. Part II. Erosion and release properties of poly(vinyl alcohol)-*g*-poly(lactic-*co*-glycolic acid).** *Polymer*, v. 41, p.4781–4792, 2000.
17. BRINKER, C. Jeffrey; SCHERER, George W. **Sol–Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol–Gel Processing**, 1.ed. New York: Academic Press, 1990. 908p
18. BRISCOE, B; LUCKHAM, P.; ZHU, S. **The effects of hydrogen bonding upon the viscosity of aqueous poly(vinyl alcohol) solutions.** *Polymer*, v. 41, p. 3851–3860, 2000.
19. BURG, Karen J. L.; PORTER, Scott; KELLAM, James F. **Biomaterials developments for bone tissue engineering.** *Biomaterials*, v.21, p.2347-2359, 2000.
20. BURKERSRODA, Friederike von; SCHEDL, Luise; GOPFERICH, Achim. **Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion.** *Biomaterials*, v.23, p.4221–4231, 2002.

21. CELANESE CHEMICALS. Poly (vinyl alcohol). Disponível em: www.celanesechemicals.com/index/productsmarkets_index/products_markets_pvoh/pvoh_our_products.htm). Acesso em: 23 de dezembro de 2010.
22. CERRUTIA, Marta; GREENSPAN, David; POWERS, Kevin. **Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass 45S5**. *Biomaterials*, v. 26, p.1665-1674, 2005
23. CHEN, Xiaofeng; HENCH, Larry L.; GREENSPAN, David; ZHONG, Jipin; ZHANG, Xiaokai. **Investigation on phase separation, nucleation and crystallization in bioactive glass-ceramics containing fluorphlogopite and fluorapatite**. *Ceramics International*, v.24, p.401-410, 1998.
24. CHEN, Q.; ROETHER J. A.; BOCCACCINI A. R. **Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials**. *Topics in Tissue Engineering*. v.4, 2008.
25. CHIELLINI, Emo; CORTI, Andrea, D'ANTONE Salvatore; SOLARO Roberto. **Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based materials**. *Progress Polymer Science*, v.28, p.963–1014, 2003.
26. CHUNG, Hyun Jung; PARK, Tae Gwan. **Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p.249–262, 2007.
27. COATES, John. **Encyclopedia of analytical chemistry: Interpretation of infrared spectra, a practical approach**. R. A. Meyers. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000. p.10815-10837.
28. COLEMAN, Jonathan N, KHAN, Umar; BLAU, Werner J.; GUN'KO, Yurii K. **Small but strong: a review of the mechanical properties of carbon nanotube–polymer composites**. *Carbon*, v.44, p.1624-1652, 2006a.
29. COLEMAN, Jonathan N.; CADEK, Martin; RYAN, Kevin P.; FONSECA, Antonio; NAGY, Janos B.; BLAU, Werner J.; Ferreira, Mauro S. **Reinforcement of polymers with carbon nanotubes. The role of na ordered polymer interfacial region. Experiment and modeling**. *Polymer*, v.47, p.8556-61, 2006b.

30. COSTA, Hermes de Souza; ROCHA, Magda Francisca; ANDRADE, Giovanna Ivo; BARBOSA-STANCIOLI, Edel Figueiredo; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; ORÉFICE, Rodrigo Lambert; VASCONCELOS, Wander Luiz; MANSUR, Herman Sander. **Sol-gel derived composite from bioactive glass-polyvinyl alcohol**. Journal of Materials Science, v.43, p.494-502, 2008a.
31. COSTA, Hermes de Souza; OLIVEIRA, Agda Aline Rocha; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; ORÉFICE, Rodrigo Lambert; MANSUR, Herman Sander. **Tailoring mechanical behavior of PVA-bioactive glass hybrid foams**. Key Engineering Materials, v.361-363, p.289-292, 2008b.
32. COSTA, Hermes de Souza; MANSUR, Alexandra Ancelmo Piscitelli; BARBOSA-STANCIOLI, Edel Figueiredo; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; MANSUR, Herman Sander. **Hybrid bioactive glass-polyvinyl alcohol prepared by sol-gel**. Key Engineering Materials, v.587-588, p.62-66, 2008c.
33. COSTA, Hermes de Souza; BARBOSA-STANCIOLI, Edel Figueiredo; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; ORÉFICE, Rodrigo Lambert; MANSUR, Herman Sander. **Synthesis, neutralization and blocking procedures of organic/inorganic hybrid scaffold for bone tissue engineering applications**. Journal of Materials Science, 2008d.
34. DAI, W. S.; BARBARI, T. A. **Hydrogel membranes with mesh size asymmetry based on the gradient crosslinking of poly(vinyl alcohol)**. Journal of Membrane Science, v.156, p.67-79, 1999.
35. DELATTE, M.; VON DEN HOFF, J. W.; MALTHA, J. C., KUIJPERS-JAGTMAN, A. M. **Growth stimulation of mandibular condyles and femoral heads of newborn rats by IGF-I**. Archives of Oral Biology, v.49, p.165-175, 2004.
36. DROSSE, Inga; VOLKMER, Elias; CAPANNA, Rodolfo; BIASE, Pietro De; MUTSCHLER, Wolf; SCHIEKER, Matthias. **Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. Injury**. International Journal of the Care of the Injured, v.39. 9-20, 2008.
37. DRURY, Jeanie L.; MOONEY, David J. **Hydrogels for Tissue Engineering Scaffolds Design Variables and Applications**. Biomaterials, v.24, p.4337-4351, 2003.

38. DU, Rui Lin; CHANG, Jiang; NI, Si Yuu; ZHAI, Wan Yin. **Characterization and *in vitro* bioactivity of zinc-containing bioactive glass and glass-ceramics.** Journal of Biomaterials Applications, v.20, p.341-360, 2006.
39. FERREIRA, Hadma Sousa; RANGEL, Maria do Carmo. **Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise.** Química Nova, v.32, n.7, 2009.
40. FINCH, C. A. **Poly Vinyl Alcohol, Properties and Applications**, 3.ed. New York: John Wiley & Sons, 1973.
41. FUJIWARA, Masahiro; SHIOKAWA, Kumi; MORIGAKI, Kenichi; ZHU, Yingchun; NAKAHARA, Yoshiko. **Calcium carbonate microcapsules encapsulating biomacromolecules.** Chemical Engineering Journal, v.137, p.14-22, 2008.
42. GIBSON, Lorna J. **Biomechanics of cellular solids.** Journal of Biomechanics, v.38, p.377-399, 2005.
43. GOPFERICH, Achim. **Mechanisms of polymer degradation and erosion.** The Biomaterials Silver Jubilee Compendium, v 17, p. 103-114, 1996.
44. GRIFFITH, L. G. **Polymeric biomaterials.** Acta Materialia, v.48, p.263-277, 2000.
45. GUPTA, Piyush; VERMANI, Kavita; GARG, Sanjay. **Hydrogels:from controlled release to pH-responsive drug delivery.** Drug Discovery Today, v.7, p.569-579, 2002.
46. GUPTA, Radha; KUMAR, Ashok. **Bioactive materials for biomedical applications using sol-gel technology.** Biomedical Materials. v.3. Disponível em stacks.iop.org/BMM/3/034005. Acesso em : 11 set. 2008.
47. GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica.** 9.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997. 1014p.
48. HABRAKEN, W. J. E. M.; WOLKE, J. G. C.; JANSEN, J. A. **Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering.** Advanced Drug Delivery Reviews, v.59, p.234-248, 2007.
49. HANKS, C. T.; WATAHA, J. C.; SUN, Z. **In vitro models of biocompatibility: a review.** Dental Materials, v.12, p.186-93, 1996.

50. HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. **Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill.** Journal of Immunological Methods, v.119, p.203-210, 1989.
51. HARADA, Y. et al. **Differential effects of different forms of hydroxyapatite and hydroxyapatite/tricalcium phosphate particulates on human monocyte/macrophages in vitro.** Journal of Biomedical Materials Research, v.31, p.19-26, 1996.
52. HCUP - Healthcare Cost & Utilization Project, Agency for Healthcare Research and Quality, 2007. MERRILL, Chaya; ELIXHAUSER, Anne. Hospital Stays Involving Musculoskeletal Procedures, 1997–2005. Disponível em <http://www.hcup-us.ahrq.gov/reports/statbriefs/sb34.pdf>. Acesso em 03/12/2010.
53. HCUP - Healthcare Cost & Utilization Project, Agency for Healthcare Research and Quality, 2010. HINES, Anika; STRANGES, Elizabeth; ANDREWS, Roxanne M. Trends in Hospital Risk-Adjusted Mortality for Select Diagnoses by Patient Subgroups, 2000–2007. Statistical Brief #98. (HCUP). Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, MD. Disponível em www.hcup-us.ahrq.gov/reports/statbriefs/sb98.jsp. Acesso em 03/12/2010.
54. HENCH, Larry L. **Bioceramics: from concept to clinic.** Journal of American Ceramic Society, v.74, p.1487-1510, 1991.
55. HERATH, H. M. T. U.; DI SILVIO, L.; EVANS, J. R. G. **Porous hydroxyapatite ceramics for tissue engineering.** Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics, v.3, p.192-198, 2005.
56. HERFORD, Alan S.; BOYNE, Philip J. **Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2).** Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, v.66, p.616-624, 2008.
57. HO, Saey Tuan; HUTMACHER, Dietmar W. **A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds.** Biomaterials, v.27, p.1362–1376, 2006
58. HOLLAND, B. J.; HAY, J.N. **The thermal degradation of poly(vinyl alcohol).** Polymer, v.42, p.6775-6783, 2001.
59. HONGJIE. Dai, **Carbon nanotubes: opportunities and challenges.** Surface Science, v.500, p.218-241, 2002.

60. HOOTMAN, Jennifer M.; HELMICK, Charles G. **Projections of US prevalence of arthritis and associated activity limitations.** Arthritis and Rheumatism, v. 54, p.226–229, 2006.
61. HUI, T. Y.; CHEUNG, K. M. C.; CHEUNG, W. L.; CHAN, D.; CHAN, B. P. **In vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen microspheres: Influence of cell seeding density and collagen concentration.** Biomaterials, v.29, p.3201–3212, 2008.
62. HUNT, J.A.; WILLIAMS, D. F. **Quantifying the soft tissue response to implanted materials.** Biomaterials, v.16, p.167-70, 1995.
63. HUTMACHER, Dietmar Werner. **Scaffold in Tissue Engineering Bone and Cartilage.** Biomaterials, v.21, p.2529-2543, 2000.
64. IGNJATOVIC, Nenad; TOMIC, Simonida; DAKIC, Momcilo; MILJKOVIC, Miroslav; PLAVSIC, Milenko; USKOKOVIC, Dragan. **Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials.** Biomaterials, v.20, p.809-816, 1999.
65. IJIMA, S. **Helical microtubules of graphitic carbon.** Nature; v.354, p.56–8, 1991.
66. JONES, R. Julian; EHRENFRIED, Lisa M.; HENCH, Larry L. **Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering.** Biomaterials, v. 27, p.964–973, 2005.
67. JONES, Julian R., POOLOGASUNDARAMPILLAI, Gowsihan; ATWOOD, Robert C.; BERNARD, Dominique; LEE, Peter D. **Non-destructive quantitative 3D analysis for the optimisation of tissue scaffolds.** Biomaterials, v.28, p.1404–1413, 2007.
68. KANEO, Yoshiharu; HASHIHAMA, Shiori; KAKINOKI, Atsufumi; TANAKA, Tetsuro; NAKANO, Takayuki; IKEDA, Yuka. **Pharmacokinetics and biodisposition of poly(vinyl alcohol) in rats and mice.** Drug Metabolism and Pharmacokinetics, v.20, p.435-442, 2005.
69. KARAGEORGIU, Vassilis; KAPLAN, David. **Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis.** Biomaterials, v.26, p.5474-5491, 2005.
70. KIM, In-Yong; SEO, Seog-Jin; MOON, Hyun-Seuk; YOO, Mi-Kyong; PARK, In-Young; KIM, Bom-Chol; CHO, Chong-Su. **Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications.** Biotechnology Advances, v.26, p.1-21, 2008.

71. KLUMPP, Ce'dric; KOSTARELOS, Kostas; PRATO, Maurizio; BIANCO, Alberto. **Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1758, p.404-412, 2006.
72. KOKUBO, T.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T. **Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W.** *Journal Biomedical Materials Reserch*. v.24, p.721-34, 1990.
73. KRISTOFFERSSON, A.; RONCARI, E.; GALASSI, C. **Comparison of different binders for water-based tape casting of alumina.** *Journal of the European Ceramic Society*, v.18, p.2123-31, 1998.
74. KUM, Maxwell C.; A., Kanchan; CHEN Joshi Wilfred; MYUNG, V., Nosang; MULCHANDANI Ashok. **Biomolecules-carbon nanotubes doped conducting polymer nanocomposites and their sensor application.** *Talanta*, v.74, p.370-375, 2007.
75. KWON, S. H.; JUN, Y. K.; HONG, S. H.; LEE, I. S.; KIM, H. E. KWON, S. H. et al. **Calcium phosphate bioceramics with various porosities and dissolution rates.** *Journal of the American Ceramic Society*. v.85, n.12, p. 3129-31, 2002.
76. LAVIK, E.; LANGER, R. **Tissue engineering: current state and perspectives.** *Applied Microbiology Biotechnology*, v.65, p.1-8, 2004.
77. LE HUEC, J. C.; SCHAEVERBEKE, T.; CLEMENT, D.; FABER, J.; LE REBELLER, A. **Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress.** *Biomaterials*, v.16, n.02, p.113- 18, 1995.
78. LEE, Kuen Yong; YUK, Soon Hong. **Polymeric protein delivery systems.** *Progress in Polymer Science*, v.32, p.669-697, 2007.
79. LEE, Soo-Hong; SHIN, Heungsoo. **Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p.339-359, 2007.
80. LEONG, K. F.; CHEAH, C. M.; CHUA, C. K. **Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs.** *Biomaterials*, v.24, p.2363-78, 2003.

81. LI, X. Jian. **Different osteogenic pathways between rhBMP-2/ACS and autogenous bone graft in 190 maxillary sinus floor augmentation surgeries.** Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, v.65, p.36.e2, 2007.
82. LIU, J; RINZLER, AG; DAI, H; HAFNER, JH; BRADLEY, RK; BOUL, PJ, *et al.* **Fullerene pipes.** Science, v.6, p. 280-1253, 1998.
83. LIU, Lin-Shu.; THOMPSON, Andrea Y.; HEIDARAN, Mohammad A.; POSER, James W.; SPIRO, Robert C. **An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration.** Biomaterials, v.20, p.1097-1108, 1999.
84. LOGEART-AVRAMOGLU, Delphine; ANAGNOSTOU, F.; BIZIOS, R.; PETITE, H. **Engineering bone: challenges and obstacles.** Journal of Cellular and Molecular Medicine, v.9, p.72–84, 2005.
85. MA, Peter X. **Biomimetic materials for tissue engineering.** Advanced Drug Delivery Reviews, v.60, p.184-98, 2008.
86. MACDONALD, Brian R.; GOWEN, Maxine. **The cell biology of bone.** Baillière's Clinical Rheumatology, v.7, p.421-443, 1993.
87. MACKIE, E. J.; AHMED, Y. A.; TATARCZUCH, L.; CHEN, K. –S.; MIRAMS, M. **Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v.40, p.46–62, 2008.
88. MALLAPRAGADA, S. K.; PEPPAS, N. A. **Dissolution mechanism of semicrystalline poly(vinyl alcohol) in water.** Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics. v.34, p.1339-1346, 1996.
89. MANSUR, Herman Sander; ORÉFICE, Rodrigo Lambert; MANSUR, Alexandra Ancelmo Piscitelli. **Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogel and pva-derived hybrids by small-angle scattering and ftir spectroscopy.** Polymer, v.45, p.7193-7202, 2004.

90. MANSUR, Herman Sander; SADAHIRA, Carolina Mieko; MANSUR, Alexandra Ancelmo Piscitelli. **FTIR Spectroscopy Characterization of Poly (vinyl alcohol) Hydrogel with different Hydrolysis Degree and Chemically Crosslinked with Glutaraldehyde.** Materials Science & Engineering C - Biomimetic Materials, Sensors and Systems, v. 28, p.539-548, 2008.
91. MANSUR, Herman Sander; COSTA, Hermes de Souza. **Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly (vinyl alcohol)/chitosan/bioactive glass hybrid scaffold for biomedical applications.** Chemical Engineering Journal, v.137, p.72-83, 2008.
92. MARIEB, Elaine Nicpon.; MALLATT, Jon; WILHELM, Patricia Brady. **Human Anatomy.** 5.ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2008, 896p.
93. MARQUES, P. A. A. P. et al. **Ceramic in vitro mineralisation protocols: a supersaturation problem.** Engineering Materials, v.254-256, p.143-6, 2004.
94. MERKLI, A.; TABATAKAY, C.; GURNY, R.; HELLER, J. **Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs.** Progress in Polymer Science, v.23, p.563-580, 1998.
95. MEYER, U. ; JOOS, U.; WIESMANN, H. P. **Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering - part I.** International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery, v.33, p.325–332, 2004.
96. MELISSA, Paradise; TARUN, Goswami. **Carbon nanotubes: production and industrial applications.** Materials and Design, v.28, p.1477-1489, 2007.
97. MENDES, Renato M.; SILVA, Gerluza A.B.; CALIARI, Marcelo V.; SILVA, Edelma E.; LADEIRA, Luiz Orlando, FERREIRA, Anderson J. **Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair.** Life Sciences, v. 87, p.215-222, 2010.
98. MONTJOVENT, Marc-Olivier; MATHIEU, Laurence; HINZ, Boris; APPLLEGATE, Lee Laurent; BOURBAN, Pierre-Etienne; ZAMBELLI, Pierre-Yves; MANSON, Jan-Anders; PIOLETTI, Dominique P. **Biocompatibility of Bioresorbable Poly(L-lactic acid) Composite Scaffolds Obtained by Supercritical Gas Foaming with Human Fetal Bone Cells.** Tissue Engineering, v.11, p.1640-1649, 2005.

99. NANDA, Gopal Sahoo; SRAVENDRA, Ranab; JAE, Whan Chob; LIN Li A; SIEW Hwa Chan. **Polymer nanocomposites based on functionalized carbon nanotubes**. Progress in Polymer Science, v.35, p.837-867, 2010.
100. NGUYEN, T.K.; THANH, B; LUKE, A.W. Green. **Functionalisation of nanoparticles for biomedical Applications**. Nano Today, v.5, p.213-230, 2010.
101. National Institutes of Health. (2001). Stem Cells: Scientific Progress And Future Research Directions. Retirado do National Institutes of Health na World Wide Web: <http://stemcells.nih.gov/StaticResources/info/scireport/PDFs/frontmatter.pdf>
102. NEREM, R. M. **Tissue engineering: confronting the transplantation crisis**. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers – part H, v. 214, p.95–99, 2000.
103. ORLOFF, Lisa A.; DOMBB, Abraham J.; TEOMIMB, Doron; FISHBEIN, Ilia; GOLOMB, Gershon. **Biodegradable implant strategies for inhibition of restenosis**. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 24, p.3-9, 1997.
104. OKI, Aderemi; QIU, Xiangdong; ALAWODE, Olajide; FOLEY, Bridget. **Synthesis of organic-inorganic hybrid composite and its thermal conversion to porous bioactive glass monolith**. Materials Letters, v.60, p.2751-2755, 2006.
105. PADILLA, S.; SANCHEZ-SALCEDO, S.; VALLET-REGÍ, M. **Bioactive glass as precursor of designed-architecture scaffolds for tissue engineering**. Journal of Biomedical Materials Research, v.81, p. 224–232, 2007.
106. PANA, Dipanjan; LANZAA, Gregory M.; WICKLINEA, Samuel A.; CARUTHERS, Shelton D. **Nanomedicine: perspective and promises with ligand-directed molecular imaging**. European Journal of Radiology, v.70), p.274-285, 2009.
107. PARIDA, Sudam K.; DASH, Sukalyan; PATEL, Sabita; MISHRA, B. K. **Adsorption of organic molecules on silica surface**. Advances in Colloid and Interface Science, v.121, p.77-110, 2006.
108. PARK, H.; ZHAO, J.; LU, J.P. **Effects of sidewall functionalization on conducting properties of single wall carbon nanotubes**. Nano Lett, v.6, p.916, 2006

109. PATEL, Zarana S.; YAMAMOTO, Masaya; UEDA, Hiroki; YASUHIKO, Tabata; MIKOS, Antonios G. **Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2.** *Acta Biomaterialia*, v.4, p.1126-1138, 2008.
110. PAUL, Willi; SHARMA, Chandra P. **Nanoceramic matrices: biomedical applications.** *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, v.2, p.41-48, 2006.
111. PEITL, Oscar; ZANOTTO, Edgar Dutra; HENCH, Larry L. **Highly bioactive P₂O₅-Na₂O-CaO-SiO₂ glass-ceramics.** *Journal of Non-Crystalline Solids*, v.292, p.115-126, 2001.
112. PEREIRA, Ana Paula Viana; VASCONCELOS, Wander Luiz; ORÉFICE, Rodrigo Lambert. **Novel multicomponent silicate-poly(vinyl alcohol) hybrids with controlled reactivity.** *Journal of Non-Crystalline Solids*, v.273, p.180-185, 2000.
113. PEREIRA, Marivalda Magalhães; JONES, Julian R.; OREFICE, Rodrigo Lambert; HENCH, Larry L. **Preparation of bioactive glass-polyvinyl alcohol hybrid foams by the sol-gel method.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.16, p.1045-1050, 2005.
114. PETROV, Petar; GEORGIEV, Georgi; MOMEKOVA, Denica; MOMEKOV, Georgi; TSVETANOV, Christo B. **UV-assisted grafting of polymers: a method towards biocompatible carbon nanotubes.** *Polymer*, v. 5, p. 2465-2471, 2010.
115. PICCOLI, Rosaura; MEXIAS; Andre; FIGUEIRA, Renato; MONTEDO, Oscar; BERTAN, Fernando. Características das principais técnicas analíticas aplicadas a caracterização de materiais. In: 17^o CBECIMAT - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, v.01, p.289-300, 2006, Foz do Iguaçu.
116. PINTO, Lúcio C. M. Quantikov – Um analisador microestrutural para o ambiente windowsTM. São Paulo:IPEN da Universidade de São Paulo, 1996. (Tese de Doutorado).
117. PONS, M. N.; BONTÉ, S. L.; POTIER, O. **Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterization.** *Journal of Biotechnology*, v.113, p.211-30, 2004.
118. RAHUL, Sem; S. Suzuki; H. Kataura; Y. Achiba. **Growth of single-walled carbon nanotubes from the condensed phase.** *Chemical Physics Letters*, v.349, p.383-388, 2001.
119. RAMAY, H. R.; ZHANG, M. **Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods.** *Biomaterials*, v.24, p.3293-3302, 2003.

120. RAY, Suprakas Sinha; BOUSMINA, Mosto. **Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world.** Progress in Materials Science, v.50, p.962–1079, 2005.
121. REZWANA, K.; CHENA, Q. Z.; BLAKERA, J. J.; BOCCACCINI, Aldo Roberto. **Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering.** Biomaterials, v.27, p.3413–3431, 2006.
122. ROOHANI-ESFAHANI, S. I.; NOURI-KHORASANI, S.; LU, Z. F.; APPELYARD, R. C. ZREIQAT, H. **Effects of bioactive glass nanoparticles on the mechanical and biological behavior of composite coated scaffolds.** Acta Biomaterialia, v.7, p.1307–1318, 2011.
123. ROUQUEROL, J.; AVNIR, D.; FAIRBRIDGE, C. W.; EVERETT, D. H.; HAYNES, J. H.; PERNICONE, N.; RAMSAY, J. D. F.; SING, K. S. W.; UNGER, K. K. **Recommendations for the characterization of porous solids.** Pure & Applied Chemistry, v. 66, p.1739-1758, 1994.
124. RYAN, Kevin P.; CADEK, Martin; NICOLOSI, Valeria; BLOND, David; RUETHER, Manuel; ARMSTRONG, Gordon; SWAN, Harry; FONSECA, Antonio; NAGY, Janos B.; MASER, Wolfgang K.; BLAU, Werner J.; COLEMAN, Jonathan N. **Carbon nanotubes for reinforcement of plastics? A case study with poly(vinyl alcohol).** Composites Science and Technology, v.67, p.1640–1649, 2007
125. SACKETT, Chelsea K.; NARASIMHAN, Balaji. **Mathematical modeling of polymer erosion: Consequences for drug delivery.** International Journal of Pharmaceutics. IN PRESS.
126. SAITO, N.; OKADA, T.; HORIUCHI, H.; OTA, H.; TAKAHASHI, J.; MURAKAMI, N.; NAWATA, M.; KOJIMA, S.; NOZAKI, K.; TAKAOKA, K. **Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers.** Bone, v.32, p.381-386, 2003.
127. SALGADO, Antônio J.; COUTINHO, Olga P.; REIS, Rui L. **Bone-tissue engineering: state of the art and future trends.** Macromolecular Bioscience, v.4, p.743–765, 2004.
128. SANCHEZ, C; ROZES, L.; RIBOT, F.; LABERTY-ROBERT, C.; GROSSO, D.; SASSOYE, C.; BOISSIERE, C.; NICOLE, L. **“Chimie douce”: A land of opportunities for the designed construction of functional inorganic and hybrid organic-inorganic nanomaterials.** Comptes Rendus Chimie, v.13, p.3–39, 2010.

129. SANTOS, Joyce Cristina da Cruz. Síntese e caracterização de nanocompósitos PVA/nanotubos de carbono para potencial aplicação biomédica. Belo Horizonte:Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Minas da UFMG, 2011. 128p. (Dissertação de Mestrado).
130. SAY, C. A.; EARL, D. A.; THOMPSON, M. J. **Optimization of sintered density of aluminum oxide compacts.** Materials Letters. v.53, p.262-67, 2002.
131. SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G. **Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines.** European Journal of Oral Science, v.104, p.292-299, 1996.
132. SETO, I.; MARUKAWA, E.; ASAHINA, I. **Mandibular reconstruction using a combination graft of rhBMP-2 with bone marrow cells expanded in vitro.** Plast. Reconstr. Surg. v.117, p.902-908, 2006.
133. SHAO, Xin Xin; HUTMACHER, Dietmar W.; HO, Saey Tuan; GOH, James C.H.; LEE, Eng Hin. **Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits.** Biomaterials, v.27, p.1071-1080, 2006.
134. SHI, Donglu; JIANG, Gengwei. Synthesis of hydroxyapatite films on porous Al₂O₃ substrate for hard tissue prosthetics. **Materials Science and Engineering C.** v.6, p.175-182, 1998.
135. SILVA, E. E., **Síntese e aplicação de nanotubos de carbono em biotecnologia.** Belo Horizonte:Departamento de Física da UFMG, 2007. 198p. (Tese de Doutorado).
136. SIMS, Natalie A.; GOOI, Jonathan H. **Bone remodeling: multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption.** Seminars in Cell & Developmental Biology, v.19, p.444-451, 2008.
137. SINGH, Baljit; SHARMA, Nisha. **Mechanistic implications of plastic degradation.** Polymer Degradation and Stability, v. 93, p.561-584, 2008.
138. SKOOG, D. A. Princípios de análise instrumental. 5d. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.
139. SLETTEN, G.B.; DAHL, J. E. **Cytotoxic effects of extracts of compomers.** Acta Odontologica Scandinavica, v.57, p.316-322, 1999.
140. SOARES, Glória. Biomateriais. Fórum de Biotecnologia Biomateriais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

141. SONG, Wenhui; ZHENG, Zhen; TANG, Weiliang; WANG, Xinling. **A facile approach to covalently functionalized carbon nanotubes with biocompatible polymer.** *Polymer*, v.48, p. 3658-3663, 2007.
142. SOUZA COSTA, C. A.; VAERTEN, M. A.; EDWARDS, C. A.; HANKS, C. T. **Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23.** *Dental Materials*, v.15, p.434-441, 1999.
143. SPITALSKYA, Zdenko; TASISB, Dimitrios; PAPAGELIS, Konstantinos; GALIOTIS, Costas. **Carbon nanotube–polymer composites: chemistry, processing, mechanical and electrical properties.** *Progress in Polymer Science*, v.35, p.357–401, 2010.
144. STUDART, André R.; GONZENBACH, Urs T.; TERVOORT, Elena; GAUCKLER, Ludwig J. **Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review.** *Journal of American Ceramic Society*, v.89, p.1771-1789, 2006.
145. TAKAFUJI, H.; SUZUKI, T.; OKUBO, Y.; FUJIMURA, K.; BESSHO, K. **Regeneration of articular defects in the temporomandibular joint of rabbits by fibroblast growth factor-2: a pilot study.** *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v.36, p.934-937, 2007.
146. TAKAHASHI, Yoshitake; YAMAMOTO, Masaya; TABATA, Yasuhiko. **Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and β -tricalcium phosphate.** *Biomaterials*, v.26, p.4856-4865, 2005.
147. TANG, Yu-Feng; DU, Yu-Min.; HU, Xian-Wen; SHI, Xiao-Wen; KENNEDY, John F. **Rheological Characterization of a Novel Thermosensitive Chitosan/Poly(vinyl alcohol) Blend Hydrogel.** *Carbohydrate Polymers*, v.67, p.491–499, 2007.
148. TEMENOFF, Johnna S.; MIKOS, Antonios G. **Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering.** *Biomaterials*, v.21, p.2405–2412, 2000.
149. TESSMAR, Joerg K.; GÖPFERICH, Achim M. **Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p.274–291, 2007.
150. THAMARAISELVI, T. V.; RAJESWARI, S. **Biological evolution of bioceramic materials – a review.** *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, v.18, p.9-17, 2004.

151. THESS, A; LEE, R.; NIKOLAEV, P.; DAI, H.; PETIT, P.; ROBERT, J.; XU, C.; LEE, Y.H.; KIM, S.G.; RINZLER, A.G.; COLBERT, D.T.; SCUSERIA, G.E.; TOMANEK, D.; FISCHER J.E.; SMALLEY, R.E., **Science**, v.273, p. 483, 1996.
152. THOSTENSON, Erik T.; REN, Zhifeng; CHOU, Tsu-Wei. **Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review**. Composites Science and Technology, v. 61, p. 1899-1912, 2001.
153. TONG, Xin; ZHENG, LU, Jingjing; Yancheng; ZHANG, Zhenfang; CHENG, Huiming. **Swelling and mechanical behaviors of carbon nanotube/poly (vinyl alcohol) hybrid hydrogels**. Materials Letters, v.61, p.1704-1706, 2007.
154. ULRICH, A. Stock; VACANTI, Joseph P. **Tissue engineering: current state and prospects**. Annual Reviews Medicine, v. 52, p.443–51, 2001.
155. VALLET-REGÍ, Maria; GONZÁLEZ-CALBET, José María. **Calcium phosphates as substitution of bone tissues**. Progress in Solid State Chemistry, v.32, p.1–31, 2004.
156. VERT, Michel. **Polymeric biomaterials: strategies of the past vs. strategies of the future**. Progress in Polymer Science, v.32, p.755-761, 2007.
157. VILAÇA, Marcos Vinícios. Relatório de Avaliação de Programa: Programa Doação, Captação e Transplante de Órgãos e Tecidos. Brasília : TCU, Secretaria de Fiscalização e Avaliação de Programas de Governo, 2006. 134 p.
158. WANG, T, et al. **Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel**. Polymer International, v.53, p.911-918, 2004.
159. WANG, Luying; LI, Jiding; LIN, Yangzheng; CHEN, Cuixian. **Crosslinked poly(vinyl alcohol) membranes for separation of dimethyl carbonate/methanol mixtures by pervaporation**. Chemical Engineering Journal, v.146, p.71–78, 2009.
160. WEI, Guobao; JIN, Qiming; GIANNOBILE, William V.; MA, Peter X. **Nano-fibrous scaffold for controlled delivery of recombinant human PDGF-BB**. Journal of Controlled Release, v.112, p.103-110, 2006.
161. WEI, Guobao; JIN, Qiming; GIANNOBILE, William V.; MA, Peter X. **The enhancement of osteogenesis by nano-fibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres**. Biomaterials, v.28, p.2087-2096, 2007.

162. WEINER, Ashley A.; MOORE, Marc C.; WALKER, Amanda H.; SHASTRI, V. Prasad. **Modulation of protein release from photocrosslinked networks by gelatin microparticles.** International Journal of Pharmaceutics, v.306, p.107-114, 2008.
163. WEIPING, Sui; HUANG, Liangliang; WANG, Jun; BO, Qibing. **Preparation and properties of chitosan chondroitin sulfate complex microcapsules.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.65, p.69-73, 2008.
164. WILLIAMS, David F. **On the mechanisms of biocompatibility.** Biomaterials, v.29, p.2941-2953, 2008.
165. WU, Linfeng; BRAZEL, Christopher S. **Modifying the release of proxiphylline from PVA hydrogels using surface crosslinking.** International Journal of Pharmaceutics, v. 349, p.144-151, 2008.
166. WU, Chia-Jung; GAHARWAR, Akhilesh K.; SCHEXNAILDER, Patrick J.; SCHMIDT Gudrun. **Development of Biomedical Polymer-Silicate Nanocomposites: A Materials Science Perspective.** Materials, v.3, p.2986-3005, 2010.
167. YAKOBSON, B.I.; SMALLEY, R.E.; **Fullerene nanotubes: C1;000;000 and beyond,** Am. Sci., v.85, p. 324–337, 1997.
168. XENOPOULOS, C.; MASCIA, L; SHAW, S. J. **Variables analysis in the gelation of alkoxysilane solutions for the production of polyimide-silica hybrids.** Materials Science and Engineering C, v.6, p.99-114, 1998.
169. XU, Yao; LI, Zhihong; FAN, Wenhao; WU, Dong; SUN, Yuhan; RONG, Lixia; DONG, Baozhong. **Density fluctuation in silica–PVA hybrid gels determined by small-angle X-ray scattering.** Applied Surface Science, v.225, p.116–123, 2004.
170. YAMAMOTO, Masaya; TABATA, Yasuhiko; HONG, Liu; MIYAMOTO, Susumu; HASHIMOTO, Nobuo; IKADA, Yoshito. **Bone regeneration by transforming growth factor β 1 released from a biodegradable hydrogel.** Journal of Controlled Release, v.64, p.133-142, 2000.
171. YAMAOKA, T.; TABATA, Y.; IKADA, Y. **Comparison of body distribution of poly(vinyl alcohol) with other water-soluble polymers after intravenous administration.** Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.47, p.479–486, 1995.

172. YOUNG, Simon; WONG, Mark; TABATA, Yasuhiko; MIKOS, Antonios G. **Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules.** *Journal of Controlled Release*, v.109, p.256–274, 2005.
173. YUNOS, Darmawati Mohamad; BRETCANU, Oana; BOCCACCINI, Aldo R. **Polymer-bioceramic composites for tissue engineering scaffolds.** *Journal Materials Science*, v.43, p.4433-4442, 2008.
174. ZEITLER, Todd R.; CORMACK, A. N. Interaction of water with bioactive glass surfaces. *Journal of Crystal Growth*, v.294, p.96–102, 2006.
175. ZHANG, Xiaoke; SREEKUMAR, TV.; LIU, T; KUMAR, S. **Properties and structure of nitric acid oxidized single wall carbon nanotube films.** *J. Phys Chem B*, v.40, p.108:16435, 2004.
176. ZHANG, Xiaoke; MENG, Lingjie; LU, Qinghua; FEI C., Zhaofu; DYSON, Paul J. **Targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells using modified single wall carbon nanotubes.** *Biomaterials*, v.30, p.6041–6047, 2009.
177. ZHANG, Faming; WEIDMANN, Arne, J; NEBE, Barbara; BURKEL, Eberhard. **Osteoblast cell response to surface-modified carbon nanotubes.** *Materials Science and Engineering*, v.xx, p.xxx–xxx, 2010.
178. ZHAO, Qinghe; LI, Bingyun. **pH-controlled drug loading and release from biodegradable microcapsules.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2008.

11. PUBLICAÇÕES DO AUTOR

1. COSTA, Vilma Conceição; COSTA, Hermes de Souza; VASCONCELOS, Wander Luiz; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; ORÉFICE, Rodrigo Lambert; MANSUR, Herman Sander. **Preparation of hibrids biomaterials for bone tissue engineering.** Journal Materials Research, v.10, p.21-26, 2007.
2. COSTA, Hermes de Souza; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; ANDRADE, Giovanna Ivo; BARBOSA-STANCIOLI, Edel Figueiredo; MANSUR, Herman Sander. **Characterization of calcium phosphate coating and zinc incorporation on the porous alumina scaffold.** Journal Materials Research, v.10, p.27-29, 2007.
3. COSTA, Hermes de Souza; ROCHA, Magda Francisca; ANDRADE, Giovanna Ivo; BARBOSA-STANCIOLI, Edel Figueiredo; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; ORÉFICE, Rodrigo Lambert; VASCONCELOS, Wander Luiz; MANSUR, Herman Sander. **Sol-gel derived composite from bioactive glass-polyvinyl alcohol.** Journal of Materials Science, v.43, p.494-502, 2008.
4. COSTA, Hermes de Souza; MANSUR, Alexandra Ancelmo Piscitelli; BARBOSA-STANCIOLI, Edel Figueiredo; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; MANSUR, Herman Sander. **Morphological, mechanical, and biocompatibility characterization of macroporous alumina scaffold coated with calcium phosphate/PVA.** Journal of Materials Science, v.43, p.510-524, 2008.
5. COSTA, Hermes de Souza; OLIVEIRA, Agda Aline Rocha; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; ORÉFICE, Rodrigo Lambert; MANSUR, Herman Sander. **Tailoring mechanical behavior of PVA-bioactive glass hybrid foams.** Key Engineering Materials, v.361-363, p.289-292, 2008.
6. COSTA, Hermes de Souza; MANSUR, Alexandra Ancelmo Piscitelli; BARBOSA-STANCIOLI, Edel Figueiredo; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; MANSUR, Herman Sander. **Hybrid bioactive glass-polyvinyl alcohol prepared by sol-gel.** Key Engineering Materials, v.587-588, p.62-66, 2008.

7. MANSUR, Herman Sander; COSTA, Hermes de Souza. **Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly (vinyl alcohol)/chitosan/bioactive glass hybrid scaffold for biomedical applications.** Chemical Engineering Journal, v.137, p.72-83, 2008.

8. COSTA, Hermes de Souza; BARBOSA-STANCIOLI, Edel Figueiredo; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; ORÉFICE, Rodrigo Lambert; MANSUR, Herman Sander. **Synthesis, neutralization and blocking procedures of organic/inorganic hybrid scaffold for bone tissue engineering applications.** Journal of Materials Science, v.20, p.529-535, 2009.