

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MINAS

Dissertação de Mestrado

**Modificação do cimento ortopédico
com nanopartículas de prata**

Autor: Tadeu Henrique de Lima

Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfice

Fevereiro/2011

Tadeu Henrique de Lima

Modificação do cimento ortopédico com nanopartículas de prata

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Minas.

Área de Concentração: Ciência e Eng. Materiais.

Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfice

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Engenharia da UFMG

2011

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vii
DEDICATÓRIA.....	ix
ABREVIATURAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO GERAL.....	6
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 Biomateriais.....	7
3.2 Cimento ortopédico ou cimento ósseo acrílico.....	10
3.2.1 Cura do cimento ósseo.....	15
3.2.1a Polimerização via radical livre.....	15
3.2.1b Liberação do calor.....	18
3.2.1c Diminuição do volume.....	22
3.2.2 Monômero residual e liberação do monômero.....	23
3.2.3 Radiopacidade.....	24
3.2.4 Peso molecular e processo de esterilização.....	25
3.2.5 Propriedades mecânicas do cimento ortopédico.....	25
3.3 Nanopartículas de prata.....	26
3.3.1 Colóide de prata.....	29

3.3.2	Átomo de prata.....	30
3.3.3	Íon prata.....	31
3.3.4	Estabilidade Coloidal.....	31
3.4	Polímeros e nanopartículas metálicas.....	33
3.5	Mecanismos de ação das nanopartículas no combate aos microrganismos.....	34
3.6	Análise e caracterização das nanopartículas de prata e do nanocompósito.....	37
3.6.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	37
3.6.2	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta.....	39
3.6.3	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	42
3.6.4	Ultravioleta Visível (UV-vis).....	44
3.6.5	Resistência à compressão.....	48
3.6.6	Ângulo de contato.....	49
3.7	Teste de Citotoxicidade.....	53
4	METODOLOGIA.....	55
4.1	Preparação do cimento ortopédico.....	55
4.2	Confecção dos corpos de prova.....	57
4.3	Teste de resistência à compressão	56
4.4	Síntese das nanopartículas de prata.....	61
4.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	66
4.6	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta.....	68
4.7	Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	69
4.8	Ultravioleta Visível (UV-vis).....	69
4.9	Ângulo de contato.....	70
4.10	Teste de citotoxicidade.....	72
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	74
5.1	Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	74
5.2	Caracterização por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta.....	78
5.3	Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	81

5.4	Caracterização por Ultravioleta Visível (UV-vis).....	82
5.5	Resistência à compressão.....	83
5.6	Ângulo de Contato.....	86
5.7	Teste de Citotoxicidade.....	88
6	CONCLUSÃO.....	89
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	91
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

“Um coração tem razões que a própria razão desconhece. É o coração e não a razão que sente a Deus. Há verdades que são sentidas e verdades que são provadas, porque conhecemos a verdade não só pela razão, mas pela convicção intuitiva a que se pode chamar coração. As verdades primárias não são demonstráveis, e não obstante nosso conhecimento delas não é menos correto. A verdade pode estar acima da razão e não ser contrária a ela.”

Blaise Pascal

Fiquemo-nos por dois lugares comuns: a evolução é grande e as possibilidades são muitas. Fazem-se materiais inimagináveis há anos. Mas ainda tão rudimentares, que um gato, mesmo morto, é incomparavelmente mais perfeito.

Professor Mário Barbosa

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente na minha vida e tornar tudo possível.

A minha família, por todo o amor.

A minha mãe, por fazer-me acreditar que por meio dos estudos eu era capaz de mudar o meu destino. A Senhora sempre estará no meu coração e nos meus pensamentos.

Ao meu orientador Prof. Rodrigo Lambert Oréface, por me acolher, ensinar e acreditar no meu potencial. “O professor se liga à eternidade, ele nunca sabe onde cessa a sua influência”. O meu eterno muito obrigado.

As professoras Maria Auxiliadora e Simone Soares do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

As professoras Maria José e Luiza do Departamento de Química da UFMG.

Ao meu afilhado Paulo Henrique, por mostrar que nunca deixamos de ser criança.

Aos meus amigos e companheiros do laboratório: Janaína, Mercês, Mílvia, Regina, Anderson, Kássio, Lívio, Túlio, Joyce, Elke, Agda, Alexandra, Sandhra, Carol, Hilda e Vilma.

A Eliane, pela amizade e colaboração neste trabalho e também por tornar-me cada vez mais apaixonado pela pesquisa.

A minha grande amiga Magda, pelo incentivo e por demonstrar que quando possuímos grandes amigos os obstáculos da nossa vida se tornam fáceis de serem superados.

A Professora Marivalda, pela ajuda, compreensão e ensinamentos.

Ao Prof. Herman pelos ensinamentos.

Ao meu amigo Engenheiro Eduardo Ribeiro de Freitas por todo o apoio.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação da Engenharia Metalúrgica e de Minas da UFMG, Cida e Nelson.

A Todos os funcionários da Escola de Engenharia da UFMG.

Ao Prof. Dr. Carlos Garrido e toda a equipe do bloco cirúrgico do Hospital São Bento, em Belo Horizonte, pelo exemplo de profissionalismo, dedicação e por apoiar na realização deste trabalho.

A Empresa Biomecânica por ceder amostras do cimento ortopédico para a realização deste trabalho e por sempre contribuir para o desenvolvimento da ciência.

Agradeço também a todos aqueles que foram importantes para a realização deste trabalho e que porventura tenha esquecido de citar.

Dedico este trabalho a minha mãe,
Maria Santa de Lima “*In Memoriam*”,
pelo amor incondicional.

ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
CEBIO	Centro de Bioterismo da UFMG
D	Direito
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMPT	Dimethyl-p-toluidine
DP	Desvio padrão
E	Esquerdo
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IV	Infravermelho
LEPCOM	Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MMA	Metacrilato de metila
NBR	Norma Brasileira
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NIR	Infravermelho próximo (Near Infrared)
NPAg	Nanopartículas de Prata
PBO	Peróxido de Benzoíla
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
RL	Radical Livre

SFB	Soro Fetal Bovino
t	Tempo
T	Temperatura
T amb.	Temperatura ambiente
T Max	Temperatura Máxima
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV-Vis	Ultravioleta Visível

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1: Pé de uma múmia de 3000 anos mostrando o uso de “biomaterial”	7
Figura 3.2: Ilustração da posição da prótese, cimento ósseo e osso.....	12
Figura 3.3: Esquema de iniciação da polimerização do MMA. O peróxido de Benzoíla do componente sólido e o N,N-Dimethyl-p-toluidine do componente líquido do cimento reagem para formar radicais livres, iniciando a cura do cimento.....	16
Figura 3.4: Esquema de formação da cadeia polimérica. Início do crescimento da cadeia polimérica (à esquerda), propagação da cadeia (à direita) e terminação da cadeia (abaixo).....	16
Figura 3.5: Polimerização do PMMA por uma reação de adição. Note que o monômero MMA reage com um radical para formar um radical secundário que pode atacar a dupla ligação do outro monômero MMA.....	17
Figura 3.6: A temperatura máxima “ <i>in vivo</i> ” do cimento ortopédico durante o final do endurecimento.....	19
Figura 3.7: Variação da temperatura em função do tempo na fase de polimerização (t_0 = mistura do pó com o líquido, t_1 = tempo de formação de massa, t_0-t_1 = pré-massa, t_1-t_2 = massa).....	20
Figura 3.8: A imagem A mostra um cimento implantado após a mistura manual evidenciando a existência de vários poros neste cimento. A imagem B mostra um cimento implantado após a mistura à vácuo e evidencia a formação de poucos poros...23	
Figura 3.9: Monômero residual no cimento ósseo acrílico pós-polimerização e liberação com posterior degradação.....	24
Figura 3.10: O cálice de Lycurgus. Na figura (a) em luz refletida e na figura (b) em luz refratada (Cálice iluminado do interior).....	27
Figura 3.11: Comparação de estruturas de diferentes tamanhos.....	29
Figura 3.12: Esquema de processos de floculação, coagulação e sedimentação que podem ocorrer com sistemas coloidais.....	32
Figura 3.13: Os dois mecanismos fundamentais que afetam a estabilidade coloidal:	

repulsão estérica (à esquerda) e repulsão eletrostática (à direita).....	33
Figura 3.14: Esquema dos mecanismos de atuação das nanopartículas de prata e íons prata no combate aos microrganismos.....	36
Figura 3.15: Esquema dos mecanismos de atuação das nanopartículas de prata e íons prata no combate aos microrganismos.....	36
Figura 3.16: Esquema do princípio de funcionamento do MEV.....	38
Figura 3.17: Representação de dupla camada elétrica e variação do Potencial Zeta.....	42
Figura 3.18: Faixa de energia de grupos funcionais ativos no infravermelho.....	43
Figura 3.19: Ilustração de funcionamento básico de espectrofotômetro.....	45
Figura 3.20: Atenuação do feixe de radiação por uma solução.....	46
Figura 3.21: Curva teórica para um ensaio de compressão: curva hipotética de força versus deformação para ensaios de compressão.....	49
Figura 3.22: Figura representativa do ângulo de contato entre uma gota e dada superfície.....	51
Figura 3.23: Representação da geometria de uma gota sobre uma superfície sólida.....	51
Figura 4.1: Fluxograma para avaliação do cimento.....	55
Figura 4.2: Molde de Nylon utilizado para a produção dos corpos de prova para teste mecânico de compressão com 48 furos em formato cilíndrico possuindo 12mm de altura e 6mm de diâmetro.....	57
Figura 4.3: Foto mostrando as nanopartículas de prata em pó sendo adicionadas ao componente em pó do cimento ósseo.....	59
Figura 4.4: Máquina para o ensaio de compressão (EMIC – Modelo 3000) do Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos –LEPCOM.....	60
Figura 4.5: Fotografia do aparelho para teste de compressão mostrando em detalhe a célula de carga utilizada.....	61
Figura 4.6: Variáveis envolvidas na síntese de nanopartículas de prata por redução química de AgNO_3 por NaBH_4 mantidas sob controle.....	63
Figura 4.7: Sistema constituído para a síntese das nanopartículas de prata.....	65

Figura 4.8: Solução de nanopartículas de prata produzida pela redução do Nitrato de prata usando como agente redutor o Borohidreto de sódio.....	65
Figura 4.9: Aparelho para a metalização de superfícies (BALTEC MCS 010).....	67
Figura 4.10: Amostras do cimento ortopédico recobertas com fina camada de ouro e colocadas em placas de silício para posterior observação em Microscópio Eletrônico de Varredura.....	67
Figura 4.11: Esquema representativo do aparelho utilizado para a aferição do ângulo de contato entre a gota e as superfícies das amostras.....	73
Figura 5.1: Imagem das nanopartículas de prata sintetizadas (solução gotejada na placa de silício e seca).....	74
Figura 5.2: Imagem das nanopartículas de prata adquiridas comercialmente e em solução aquosa.....	75
Figura 5.3: Imagem das nanopartículas de prata sintetizadas (solução gotejada na placa de silício e seca).....	75
Figura 5.4: (A) Imagem da superfície interna após fratura criogênica do corpo de prova puro , (B) imagem da superfície interna após a fratura criogênica do corpo de prova com 2% de nanopartículas de prata em pó, (C) imagem da fratura interna do corpo de prova do cimento ortopédico com solução sintetizada de nanopartículas de prata.....	76
Figura 5.5: Imagem da superfície externa do corpo de prova de cimento ortopédico puro.....	77
Figura 5.6: Imagens por MEV da superfície externa do cimento ortopédico puro.....	77
Figura 5.7: (A) Superfície interna da fratura do corpo de prova feito com cimento ortopédico associado às nanopartículas de prata em pó, em (B) a superfície externa do mesmo corpo de prova.....	78
Figura 5.8: Superfície externa do corpo de prova feito com cimento ortopédico associado às nanopartículas de prata sintetizadas.....	78
Figura 5.9: Gráfico da porcentagem versus tamanho (d.nm) das nanopartículas de prata presentes na solução.....	79

Figura 5.10: Gráfico gerado a partir dos dados obtidos pela técnica Potencial Zeta.....	81
Figura 5.11: Espectros de FTIR do cimento ósseo puro e associado às nanopartículas de prata.....	82
Figura 5.12: Espectro de absorção de UV-Vis da solução de nanopartículas de prata sintetizadas via redução de AgNO_3 por NaBH_4	83
Figura 5.13: Gráfico tensão deformação do cimento ósseo puro.....	84
Figura 5.14: Gráfico tensão versus deformação do cimento ósseo com solução de nanopartículas de prata.....	84
Figura 5.15: Gráfico tensão versus deformação do cimento ósseo com 0,1% de nanopartículas de prata em pó.....	85
Figura 5.16: Gráfico tensão versus deformação do cimento ósseo com 0,5% de nanopartículas de prata em pó.....	85
Figura 5.17: Gráfico tensão versus deformação do cimento ósseo associado à 2% de nanopartículas de prata em pó.....	86
Figura 5.18: Comportamento da gota de água sobre superfícies produzidas a partir do cimento ósseo.....	87
Figura 5.19: Viabilidade celular a partir do ensaio de MTT.....	88

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1: Componentes do cimento ortopédico.....	13
Tabela 4.1: Parâmetros utilizados no aparelho para a medição do Potencial Zeta.....	68
Tabela 5.1: Porcentagem dos diferentes tamanhos de nanopartículas de prata presentes na solução.....	79
Tabela 5.2: Tabela relacionando os valores de pH, média de Potencial Zeta, número de partículas (n) e o valor de desvio padrão (DP).....	80
Tabela 5.3: Valores obtidos para a média dos ângulos de contato (n=3).....	86

RESUMO

O cimento ósseo, ortopédico ou acrílico, baseado no poli(metacrilato de metila) (PMMA), é um biomaterial empregado em cirurgias, principalmente na fixação de próteses. Além do preenchimento e reconstrução de segmentos ósseos, o cimento ósseo é colocado nos espaços vazios entre o implante e a superfície óssea endosteal, endurecendo em pouco tempo e assegurando a firme colocação da prótese ao preencher por completo o espaço vazio entre o osso e o implante. Há, no entanto, freqüentes complicações quando do uso deste biomaterial devido a ocorrência de infecções. Assim sendo, neste trabalho foi realizada a incorporação de nanopartículas de prata ao cimento ortopédico buscando usar sua ação bactericida na diminuição de infecções nas artroplastias totais de joelho e quadril onde este cimento é utilizado. O objetivo deste estudo foi avaliar possíveis alterações nas propriedades do cimento ortopédico com a adição de nanopartículas de prata em pó e em solução coloidal. Também foram avaliadas as modificações ocorridas no material em relação ao ângulo de contato, interação química da nanopartícula de prata com o PMMA e biocompatibilidade do biomaterial por meio do teste de citotoxicidade. Utilizou-se o cimento ortopédico Biomecânica que é baseado em um composto acrílico, autopolimerizável, obtido por um pó a base de poli(metacrilato de metila) e sulfato de bário com um iniciador de polimerização, peróxido de benzoíla; e por um componente líquido constituído por um monômero metacrilato de metila com ativador N,N-dimetil-p-toluidina. As nanopartículas de prata utilizadas foram sintetizadas por meio da redução do nitrato de prata pelo borohidreto de sódio e também nanopartículas de prata em pó adquiridas comercialmente. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem o nanocompósito como um material promissor para aplicações biomédicas, já que não foram notadas grandes alterações nas propriedades mecânicas e biocompatibilidade, quando da incorporação de nanopartículas de prata no cimento ósseo comercial.

ABSTRACT

Bone or acrylic cement, also known as poly(methyl methacrylate) (PMMA), is a biomaterial used mainly in the surgeries of prostheses fixation and also to fill and reconstruct bone segments. The bone cement is placed in the open spaces between the implant and endosteal bone surface and hardens in a short time, assuring the prosthesis to be attached to both bone and implant. However, infections are very often reported during the application of bone cements. Therefore, in this study, silver nanoparticles were incorporated into bone cements to provide bactericidal action and hence the reduction of infections in the knee and hip total arthroplasties. The goal of this study was to assess possible changes in the properties of bone cement due to the presence of silver nanoparticles both in powder form and colloidal solution. The Orthopedic Biomechanics bone cement, an acrylic self curing compound, was used. This compound is obtained by mixing poly(methyl methacrylate), barium sulfate and benzoyl peroxide as polymerization initiator with a second liquid component consisting of methyl methacrylate monomer and N,N-dimethyl-p-toluidine as activator. The silver nanoparticles were synthesized by reduction of silver ions from silver nitrate with sodium borohydride and also silver nanoparticles powder purchased commercially. The results of this work suggested that the developed nanocomposite is a promising material for biomedical applications since no major changes in mechanical properties as well as biocompatibility were observed when silver nanoparticles were added to commercial bone cements.

1 INTRODUÇÃO

Cimentos ósseos são materiais utilizados em cirurgias ortopédicas e dentárias para fixação de próteses nas articulações. Eles agem como um distribuidor de carga entre o implante e o osso, bem como material de preenchimento de auto-cura para o osso e cáries dentárias (ESPIGARES *et al.*, 2002). Sua principal função é preencher o espaço entre a prótese e o osso hospedeiro, atuando como interface elástica capaz de transmitir cargas de uma superfície à outra (KUEHN *et al.*, 2005).

Em 1960, Sir. John Charnley, considerado o inventor da recolocação moderna de juntas artificiais, introduziu, pioneiramente, o cimento ortopédico ou acrílico na cirurgia ortopédica, fixando com sucesso os componentes femoral e acetabular na artroplastia total de quadril e até hoje é utilizado na prática ortopédica (CHARNLEY *et al.*, 1970), devido à sua bioestabilidade e boas propriedades mecânicas (CAMERON *et al.*, 1974).

O cimento ósseo acrílico é um material composto pela mistura de dois componentes: um baseado no polímero PMMA (pó) e um baseado no monômero MMA (líquido). Unidos pelo processo de reação química denominada “polimerização”, esses componentes são conhecidos como poli(metacrilato de metila) (PMMA) (MOREJON *et al.*, 2005).

Desde o início de sua utilização, o cimento ortopédico continua a ser um componente essencial na prática ortopédica moderna. Houve uma evolução na compreensão de suas propriedades o que contribuiu para melhorar o design de implantes e a biomecânica. É provável que a utilização do cimento acrílico pelos cirurgiões ortopédicos continue de forma cada vez mais crescente e o conhecimento das propriedades e aplicações deste material se tornam cada vez mais essenciais (WEBB *et al.*, 2007).

Outras funções foram atribuídas ao longo do tempo ao cimento ortopédico. Uma das mais interessantes tem sido seu uso como veículo de liberação local de drogas tradicionalmente utilizadas por outras vias de administração (NELSON *et al.*, 2004).

As propriedades mecânicas do cimento ortopédico são afetadas pela associação com outras substâncias. Alguns estudos foram realizados com o cimento ortopédico associado a antibióticos e outros medicamentos como, por exemplo, anestésicos locais relacionando-os com variações nas suas propriedades mecânicas (GIORDANO *et al.*, 2007).

O cimento ósseo baseado no poli(metacrilato de metila) (PMMA) é o material mais bem adaptado para a ancoragem das juntas artificiais (BREUSCH *et al.*, 2000). Como vários biomateriais, o PMMA tem um risco elevado de infecção, quando implantado no corpo humano, em comparação com o tecido vital autógeno (GRISTINA *et al.*, 1987). Foi postulado na literatura a combinação do PMMA com antibióticos no sentido de diminuir a taxa de infecção e hoje em dia estes materiais são amplamente utilizados. O cimento ósseo carregado com antibiótico constitui em grande colaborador para o tratamento de infecções estabelecidas, mas seu papel na prevenção da infecção permanece controverso devido a questões relacionadas com a resistência à medicamentos e eficácia (JIRANEK *et al.*, 2006).

O desenvolvimento das próteses articulares representa um grande avanço na tecnologia biomédica. O implante de próteses, principalmente quadril e joelho, vem se tornando cada vez mais freqüente. Em 2001, houve 150.000 artroplastias de substituição de quadril realizadas nos Estados Unidos. Quando implantadas, propiciam significativa redução no desconforto dos pacientes acometidos de doenças da articulação coxo-femural e incomensurável melhora de sua mobilidade, especialmente quando não complicadas por processos infecciosos (LIMA *et al.*, 2001).

Em 2006 foram realizados mais de 500.000 procedimentos de substituição total de joelho somente nos Estados Unidos da América. Prevê-se que até 2030 o volume deste procedimento irá aumentar para mais de 3,48 milhões por ano devido à geração do *baby boom*, ao aumento da obesidade e indicações de substituição total de joelho que se estendem tanto para jovens quanto para indivíduos mais velhos. Estima-se também que os gastos hospitalares com substituição total de joelho chegarão a 40 bilhões de dólares anualmente até 2015 (*American Association of Orthopedic Surgeons*, 2006).

Cerca de 1 a 5% das próteses do quadril tornam-se infectadas; embora menos frequente do que as perdas mecânicas dos implantes, a infecção é considerada a mais devastadora das complicações, pois acarreta morbidades por internações prolongadas, intervenções cirúrgicas repetidas, podendo culminar na perda definitiva do implante com encurtamento do membro afetado, deformidades graves e perenes, bem como levar ao óbito em infecções culminantes. Além disso, todos os procedimentos envolvidos na tentativa de resolução da infecção envolvem custo elevado, estimado em 40 a 80 milhões de dólares por ano nos Estados Unidos (LIMA *et al.*, 2009).

Embora os cimentos ósseos sejam usados intensamente existem várias desvantagens associadas a eles. Estas desvantagens incluem a necrose térmica do osso, necrose química devido ao monômero liberado que não reagiu durante a polimerização, a má distribuição do cimento ao redor do implante, baixa adesão na interface cimento-osso e cimento-prótese, infecção do biomaterial, entre outras. Apesar dessas dificuldades, esses materiais são utilizados na prática médica devido as suas ótimas propriedades mecânicas. A determinação das propriedades mecânicas desse material se constitui um fator de extrema importância e deve ser levado em conta (GUERRA *et al.*, 2010).

A infecção associada ao biomaterial é a segunda causa mais frequente de falha dos implantes ortopédicos. O aumento da utilização de implantes de biomateriais nos últimos anos resultou em um aumento concomitante das infecções bacterianas. Os

organismos infectantes ou são introduzidos durante a implantação de uma prótese ou são transportados para a superfície do biomaterial por uma bacteremia temporária, onde aderem e crescem para formar um biofilme. Há uma série de condições médicas que envolvem o implante do biomaterial que requerem o uso profilático de antibióticos antes da cirurgia. A terapêutica e uso profilático de antibióticos para curar e prevenir as infecções associadas ao biomaterial tem contribuído para o desenvolvimento da resistência bacteriana (NEUT *et al.*, 2001).

O efeito antimicrobiano amplo da prata é bem conhecido e tem sido utilizado em diferentes campos da medicina como, por exemplo, na profilaxia da oftalmia neonatal, na cicatrização de feridas e em biomateriais. A prata (Ag) tem sido amplamente utilizada em dispositivos poliméricos na área médica por apresentar propriedades antimicrobianas para um largo espectro de microorganismos, incluindo bactérias gram positivas, negativas e fungos. Sua aplicação em polímeros resulta em inúmeras aplicações como cateteres venosos e urinários, fios de sutura, tendões artificiais, adesivos ortodônticos, máscaras cirúrgicas e tubos endotraqueais (CHEN *et al.*, 2008).

Há alguns relatos sobre a influência da composição química, morfologia, distribuição granulométrica e o peso molecular nas propriedades finais do cimento ósseo. O estudo de novas formulações é interessante devido ao seu interesse científico e prático. (BRAUER *et al.*, 1986_PASCUAL *et al.*, 1996).

Este trabalho objetiva estudar o efeito da incorporação de nanopartículas de prata ao cimento ortopédico (PMMA) nas propriedades deste biomaterial, avaliadas seguindo a normas ABNT, NBR e ISO. Além disso, será investigada a interação da nanopartícula de prata ao cimento por meio de FTIR, variações no ângulo de contato e avaliação da biocompatibilidade por meio de teste de citotoxicidade. Nanopartículas de prata obtidas de duas fontes diferentes serão testadas: aquelas provenientes de soluções obtidas por meio da redução de íons prata de nitrato de prata utilizando como agente redutor o

Borohidreto de Sódio e também nanopartículas de prata em pó adquiridas comercialmente.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar as propriedades do cimento ósseo modificado com a incorporação de nanopartículas de prata e sua biocompatibilidade por meio de teste de citotoxicidade.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir nanopartículas de prata por meio da redução de íons prata de nitrato de prata usando como redutor o borohidreto de sódio;
- Investigar as características estruturais (tamanho e morfologia) de nanopartículas de prata;
- Analisar a morfologia de cimentos contendo nanopartículas de prata;
- Avaliar a interação das nanopartículas de prata com o PMMA através da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).
- Avaliar alterações nas propriedades mecânicas e de superfície do nanocompósito com diferentes concentrações de nanopartículas de prata.
- Avaliar a biocompatibilidade do nanocompósito por meio do teste de citotoxicidade.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais

Biomateriais são materiais provenientes da natureza ou feitos pelo homem utilizados para direcionar, acrescentar ou substituir as funções dos tecidos vivos do corpo humano. O uso de biomateriais data da civilização antiga. Olhos, orelhas, dentes e narizes artificiais foram encontrados nas múmias egípcias (Figura 3.1). Chineses e indianos usaram ceras, colas e reconstruíram tecidos lesados ou partes do corpo com defeitos. Biomateriais na forma de implantes e dispositivos médicos são amplamente usados para substituição e restauração da função de tecidos traumatizados. Cada vez mais, consideráveis progressos têm ocorrido na compreensão da interação entre o tecido e o material (RAMAKRISHNA *et al.*, 2001).



FIG 3.1. Pé de uma múmia de 3000 anos mostrando uso de “biomaterial”, neste caso o material utilizado foi madeira.

Desde épocas passadas, o homem tem se preocupado em restaurar ou substituir partes danificadas do tecido ósseo humano. Em meados do século XVII, Fallopius implantou uma placa de ouro para restaurar um defeito craniano e, a partir daí, tem-se usado os implantes para substituição de partes danificadas do sistema ósseo (SANAN *et al.*, 1997). A procura por um material moldável para promover a reparação óssea foi a busca de vários pesquisadores e cirurgiões interessados em acelerar a consolidação de fraturas ou restituir defeitos ósseos (SCHMITZ *et al.*, 1999).

Um dos mais importantes biomateriais é o cimento ósseo ou acrílico (PMMA) e que tem sido utilizado como biomaterial desde 1930 (WILTSE *et al.*, 1957). Seu uso em ortopedia iniciou-se em 1940, como apoio interno da coluna vertebral e preenchimento de cavidades ósseas (CHANRLEY *et al.*, 1970).

Biocompatibilidade é um termo descritivo indicador de habilidade do material para realizar, com uma resposta apropriada do hospedeiro, uma aplicação específica. Esse termo simples implica em compatibilidade e harmonia do biomaterial com os sistemas vivos (RAMAKRISHNA *et al.*, 2001).

Os biomateriais são utilizados em dispositivos médicos para substituição temporária ou permanentemente implantada no corpo humano. Quanto ao tipo de material os biomateriais podem ser: polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e macromoléculas naturais (ex: biopolímeros) que são processados para se adequarem à utilização em dispositivos médicos que entram em contato com proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos. Os biomateriais devem ser atóxicos, não carcinogênicos, não antigênicos e não mutagênicos. Devem apresentar resistência à fadiga, bioestabilidade e bioatividade (ZIMMER *et al.*, 2006).

Biocompatibilidade se refere à compatibilidade entre um determinado material e o meio biológico no qual ele deve permanecer. Como a biocompatibilidade depende das interações entre o implante e os tecidos adjacentes e de vários fatores que podem variar de um indivíduo para outro e mesmo de uma região para outra do corpo de um mesmo indivíduo, não se pode afirmar, de uma maneira genérica, que um determinado material é biocompatível. A biocompatibilidade de um material para implante é considerada ótima quando há formação de tecido normal na superfície e quando estabelece com o meio biológico adjacente uma interface contínua capaz de suportar as cargas necessárias ao local do implante (ZIMMER *et al.*, 2006).

A biocompatibilidade é uma propriedade relativa à capacidade do material e de seus produtos de degradação serem tolerados pelos tecidos adjacentes sem causar dano ao organismo a curto ou em longo prazo. Para que um material possa ser considerado implantável, ele deve atender aos seguintes requisitos fundamentais (POTTER *et al.*, 2004).

- O material não deve causar efeitos deletérios no local do implante ou no sistema biológico.
- Os tecidos não podem causar degradação do material gerando produtos não toleráveis ou alteração funcional do mesmo.
- O material deve ter características funcionais adequadas para cumprir, com êxito, a função desejada, pelo tempo desejado.
- O material deve ser passível de esterilização sem que haja alteração de sua composição química.
- O material não deve ser uma fonte passível de crescimento bacteriano.

Os biomateriais, de uma forma geral, se caracterizam pela sua biocompatibilidade, ou seja, não causam efeito nocivo no organismo; devem possuir resistência mecânica adequada além de uma resistência às condições adversas do meio fisiológico onde estão

inseridos. Podem ser utilizados durante um período determinado de tempo ou não, sendo empregados para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais como um todo ou parte integrante de um sistema (FONSECA *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2005).

Além da biocompatibilidade e reações inflamatórias a soldura de próteses pode ser originada, também, por processos de remodelamento ósseo ou processos infecciosos (SILVER *et al.*, 1989). O encapsulamento de fibrose que ocorre entre o cimento e a prótese compõe um material de baixas resistência e rigidez. Com isto, dependendo da quantidade de fibrose, podem ocorrer micromovimentos excessivos entre o conjunto cimento-prótese e o osso, e levar a soldura do implante (DOHMAE *et al.*, 1988; STRÖMBERG *et al.*, 2002).

No caso dos cimentos ósseos, a fibrose ocorre principalmente devido aos seguintes fatores: reação do tecido hospedeiro ao cimento acrílico (reação de biocompatibilidade); a própria natureza agressiva do ato cirúrgico para colocação de próteses; forma, dimensões e movimentação do implante; toxicidade do monômero residual do cimento, como é o caso do metacrilato de metila; aumento excessivo de temperatura, ocasionado pela reação de polimerização (MARCONCINI *et al.*, 1996).

3.2 Cimento ortopédico ou cimento ósseo acrílico

Nem todos os materiais foram exaustivamente testados em laboratório antes de serem implantados. Alguns materiais foram promovidos de agressores a implantes, por obra do acaso, do infortúnio ou da necessidade. Por exemplo, o PMMA foi “descoberto” para aplicações biomédicas durante a II Guerra Mundial, quando estilhaços de PMMA, causados por disparos de artilharia, ficaram alojados nos olhos de aviadores, provocando uma ligeira reação de corpo estranho (BARBOSA *et al.*, 1999).

O poli(metacrilato de metila), conhecido como cimento ósseo acrílico, foi patenteado na Alemanha em 1928, sendo produzido e comercializado por vários fabricantes com o nome Pexiglás[®], Perspex[®] e Lucite[®] entre outros. Inicialmente utilizado como biomaterial para formatar dentes artificiais e dentaduras (WEBB *et al.*, 2007).

Os cimentos ósseos aplicam-se em ortopedia em três funções principais: como massa para modelamento, sujeita a tensões baixas; no preenchimento de cavidades ósseas, que, dependendo da localização, tais como articulações, ficam sujeitos a cargas elevadas; na fixação de próteses em que o cimento forma uma interface entre a prótese e o osso e atua como homogeneizador e amortecedor de altas tensões, principalmente de compressão para a fixação nas substituições articulares (BARROS *et al.*, 2001).

A função do cimento ósseo é a fixação das articulações artificiais e a ancoragem do implante ao osso. Ele atua como um transferidor de carga entre o implante e o osso agindo de forma mais uniforme possível (Figura 3.2). Esta função de distribuição de tensões é decisiva para a estabilidade do implante em longo prazo. Quando a tensão externa é maior que a capacidade do cimento para transferir a carga essa tensão leva ao surgimento de uma fratura. Por essa razão, um requisito básico para o cimento é ser um ótimo distribuidor das cargas recebidas (KUEHN *et al.*, 2005).

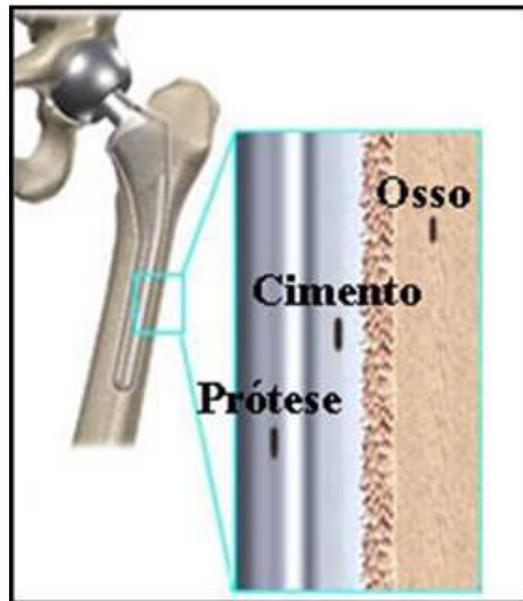


Figura 3.2: Ilustração da posição da prótese, cimento ósseo e o osso em uma substituição de quadril (Adaptado de OKTAR *et al.*, 2006).

O cimento ósseo baseado no poli(metacrilato de metila) (PMMA) é o material mais bem adaptado para a ancoragem das articulações artificiais. Como todos os biomateriais, o PMMA tem um risco elevado de infecção, quando implantados no corpo humano, em comparação com o tecido vital autógeno. Foi postulado na literatura a combinação do PMMA com antibióticos no sentido de diminuir a taxa de infecção e hoje em dia estes materiais são amplamente utilizados. Um aumento da porcentagem no total de infecções por microorganismos multiresistentes leva a necessidade de uma profilaxia adequada que muitas vezes não pode ser alcançada com a combinação do cimento acrílico com antibiótico (ZHILONG *et al.*, 2007).

O cimento ósseo ou acrílico é constituído de duas partes: uma parte líquida e uma parte sólida. A parte líquida contém tipicamente três componentes básicos: monômero acrílico (97% em volume), um inibidor para prevenir a polimerização prematura do monômero e um acelerador da decomposição do iniciador. A parte sólida consiste de esferas pré-polimerizadas de PMMA (89% em peso), um pó mineral como o sulfato de

bário ou dióxido de zircônio (10% em peso) atuando como radiopacificante e um iniciador de radical livre como o peróxido de benzoíla (YEUM *et al.*, 2005). Os componentes mais usuais das embalagens comerciais de cimento ortopédico e suas funções estão listados na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Componentes do Cimento Ortopédico.
Adaptado de WEBB *et al.*, 2007.

Componente	Função
<p align="center">Componente Sólido</p> <p>Polímero Co-polímeros (Ex: Metacrilato – Metilmetacrilato, MA-MMA) Sulfato de Bário ou dióxido de Zircônio Peróxido de Benzoil</p> <p>Antibiótico Corante</p>	<p>Polimetilmetacrilato Altera as propriedades físicas do cimento</p> <p>Radiopacificante Reage com o DMPT para catalisar a polimerização</p> <p>Profilaxia antibacteriana Distingue cimento de osso</p>
<p align="center">Componente Líquido</p> <p>Monômero N,N-dimethyl-p-toluidine (DMPT) Hidroquinona</p>	<p>Metilmetacrilato Promove a cura a frio do cimento Previne a polimerização prematura</p>

O principal componente da parte líquida do cimento ortopédico é o monômero MMA (metacrilato de metila). O MMA é um líquido incolor, inflamável e de odor intenso. Do ponto de vista químico, o MMA é um éster do ácido metacrílico com uma ligação dupla polimerizável. O ponto de ebulição do MMA é de 100°C e possui baixa solubilidade em água.

A parte sólida do cimento compreende polímeros esféricos em pó de PMMA ou copolímero de MMA contendo peróxido de benzoíla como iniciador necessário para iniciar a cura do cimento. O pó também contém um radiopacificante, como dióxido de zircônio ou sulfato de bário, necessário para a visualização do cimento em radiografia. Opcionalmente um antibiótico ou um corante pode estar presente. Radiopacificantes, corantes e antibióticos não estão envolvidos no processo de cura, que é uma reação química denominada polimerização via radical livre (KUEHN *et al.*, 2005).

O PMMA é um importante material polimérico incolor, com elevada resistência química e resistência à corrosão pelo intemperismo. Devido a estas características superiores, o PMMA tem sido extremamente usado em aditivos, revestimentos, agentes de polimento, ligantes, cimentos, fibras ópticas e aplicações em painéis eletrônicos (YEUM *et al.*, 2005).

A estrutura do monômero metacrilato de metila permite a polimerização à temperatura ambiente para produzir o PMMA sólido. O peso molecular do PMMA varia entre as marcas encontradas no mercado e de acordo com o método de esterilização. Sabe-se que a radiação gama encurta as cadeias poliméricas provavelmente afetando muitas propriedades mecânicas, mas isso não ocorre com a esterilização por óxido de etileno (WEBB *et al.*, 2007).

Geralmente os cimentos ósseos são divididos em duas categorias: cimentos de alta e baixa viscosidade. Cimentos ósseos de alta viscosidade possuem um tempo de mistura curto e possuem uma fase de trabalho maior, oferecendo ao cirurgião um tempo maior para a aplicação. Já os cimentos de baixa viscosidade possuem um tempo de mistura maior e curta janela de trabalho (KUEHN *et al.*, 2005).

3.2.1 Cura do cimento ósseo

3.2.1a Polimerização via radical livre

Dois diferentes processos são iniciados ao se misturar a parte sólida com a parte líquida dos cimentos ortopédicos comerciais. Primeiro, o pó polimérico absorve o monômero líquido, formando um fluido mais ou menos viscoso ou uma massa. As razões para este comportamento são os processos de tumefação e dissolução do monômero e o polímero em pó. Os processos de tumefação e dissolução são processos físicos importantes para as características de trabalho do cimento ortopédico (KUEHN *et al.*, 2005).

O iniciador, peróxido de benzoíla (PBO) e o ativador, N,N- Dimethyl-p-toluidine (DMPT) interagem para produzir radicais livres na chamada “reação de iniciação” (Figura 3.3). Estes radicais são capazes de iniciar a polimerização do MMA ligando as moléculas do monômero através da quebra das ligações duplas polimerizáveis. Isso resulta em um crescimento da cadeia polimérica formando macromoléculas por adição de moléculas de monômero. Devido ao elevado número de radicais gerados, as cadeias poliméricas são formadas rapidamente, portanto, há uma rápida conversão de MMA em PMMA. Se duas cadeias poliméricas se encontram as cadeias são terminadas pela combinação de ambas, resultando em uma molécula polimérica inativa sem a presença de nenhum radical livre (Figura 3.4) (KUEHN *et al.*, 2005).

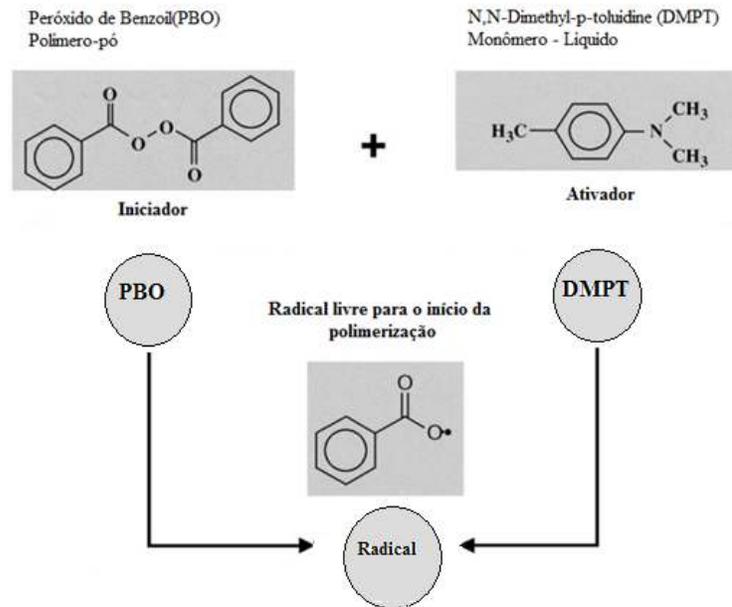


Figura 3.3. Esquema da iniciação da polimerização do MMA. O peróxido de benzoila do componente sólido e o N,N-Dimethyl-p-toluidine do componente líquido do cimento ortopédico reagem para formar radicais livres, iniciando a cura do cimento.
Adaptado de KUEHN *et al.*, 2005

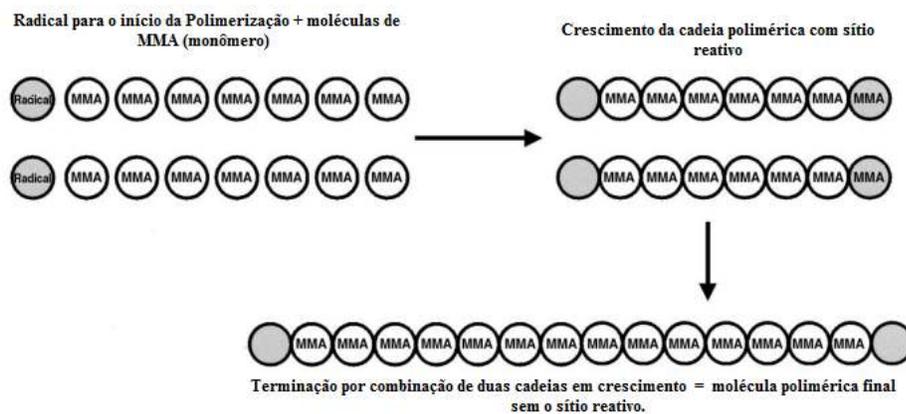


Figura 3.4: Esquema de formação da cadeia polimérica. Início do crescimento da cadeia polimérica (à esquerda), propagação da cadeia (à direita) e terminação da cadeia (abaixo). Adaptado de KUEHN *et al.*, 2005.

A polimerização começa pelo mecanismo de adição no qual um monômero torna-se instável pela reação com um radical livre (moléculas que contém um único elétron desemparelhado). Os radicais acoplados a monômeros podem atacar a dupla ligação do monômero seguinte segundo a figura 3.5:

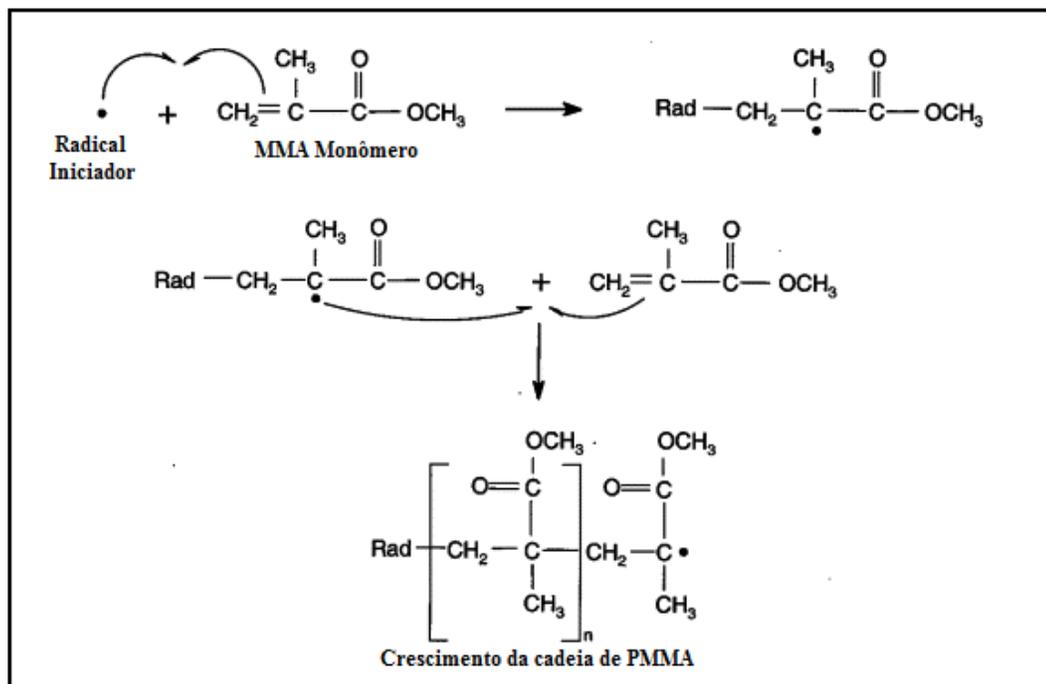


Figura 3.5: Polimerização de PMMA por uma reação de adição. Note que o monômero MMA reage com um radical para formar um radical secundário que pode atacar a dupla ligação de outro monômero MMA. (Adaptado de NUSSBAUM *et al.*, 2007).

Segundo Oréface (2006), em polimerizações realizadas através de reações de adição, a polimerização é caracterizada principalmente pela abertura ou quebra de ligações duplas entre átomos de carbono (C=C). Assim, quando uma ligação dupla é desfeita, há a liberação de elétrons livres associados aos átomos de carbono que podem ser usados na formação de novas ligações com outras moléculas dos reagentes (monômeros), levando assim ao crescimento das cadeias poliméricas. Ligações duplas entre átomos de carbono são bifuncionais, já que, quando abertas, permitem a ligação com duas

outras moléculas. Reações de poliadição são baseadas na inserção rápida de monômeros numa cadeia em crescimento.

As etapas das reações de poliadição via radical livre incluem: iniciação, propagação, transferência entre cadeias e terminação. A etapa de iniciação (geração de elétron desemparelhado) pode ser implementada através da decomposição térmica do monômero, decomposição térmica ou fotolítica de um iniciador, fonte eletrolítica, agentes redox, entre outros métodos. Os peróxidos são típicos agentes iniciadores de polimerização por adição. Os radicais livres formados a partir da decomposição dos agentes iniciadores da polimerização são capazes de abstrair um elétron confinado à ligação dupla do monômero, rompendo esta ligação e dando origem à formação de um elétron livre no átomo de carbono não atacado pelo agente iniciador decomposto (ORÉFICE *et al.*, 2006).

A reação entre o radical livre no final da cadeia em crescimento com outros monômeros permite a propagação da polimerização e aumento da massa molar das cadeias e a repetição desse processo com n monômeros leva à formação de cadeias poliméricas com n unidades de repetição. O término da polimerização pode ocorrer pela combinação de radicais livres presentes nas extremidades de duas cadeias em crescimento (ORÉFICE *et al.*, 2006).

3.2.1b Liberação de calor

A polimerização do MMA é uma reação exotérmica. Há formação de calor de 57kJ por mol de MMA (Massa Molar do MMA = 100g) resultando em um aumento da temperatura durante a cura do cimento. Esta temperatura máxima pode ser influenciada pela composição química do cimento, pela proporção pó-líquido e pelo radiopacificante. A máxima temperatura *in vitro* de acordo com as normas ISO 5833 e ASTM F451 (normas de relevância para o cimento acrílico) é de aproximadamente (60° - 80°C). Esta temperatura máxima em um curto espaço de tempo muitas vezes é

considerada como a principal causa de afrouxamento asséptico da prótese causada pelo calor que leva à necrose e indução da absorção óssea. O máximo da temperatura atingida *in vivo*, no entanto, é menor. Ensaio clínico demonstraram uma temperatura máxima de aproximadamente (40-47°C) determinada na interface do cimento e osso (Figura 3.6) (KUEHN *et al.*, 2005, MOREJÓN *et al.*, 2005).

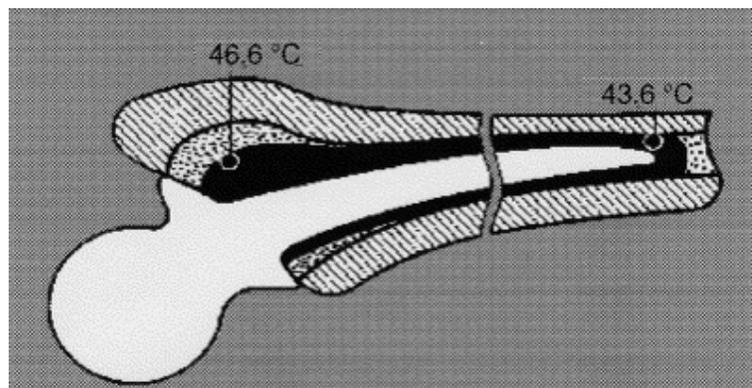


Figura 3.6: A temperatura máxima *in vivo* do cimento ortopédico durante o final do endurecimento. Adaptado de BIEHL *et al.*, 1974.

As razões para uma temperatura *in vivo* mais baixa do cimento ortopédico são: a fina camada de cimento ósseo (3-5 mm), circulação sanguínea, dissipação de calor para a prótese e para o tecido vital (RECKLING *et al.*, 1977).

O calor liberado pela reação de polimerização faz com que elevadas temperaturas sejam atingidas dentro do organismo, podendo levar as células que estão em contato com o cimento, à necrose. No entanto, em casos de retirada de tumores de dentro da cavidade óssea o aquecimento é benéfico, pois leva à destruição de células neoplásicas que, por ventura, não foram retiradas pelo ato cirúrgico (MARCONCINI *et al.*, 1996).

A temperatura de polimerização do cimento varia com o tempo e a massa obtida com a mistura do componente em pó com o líquido do cimento começa a se solidificar após alguns minutos (Figura 3.7) (MENDES *et al.*, 2006).

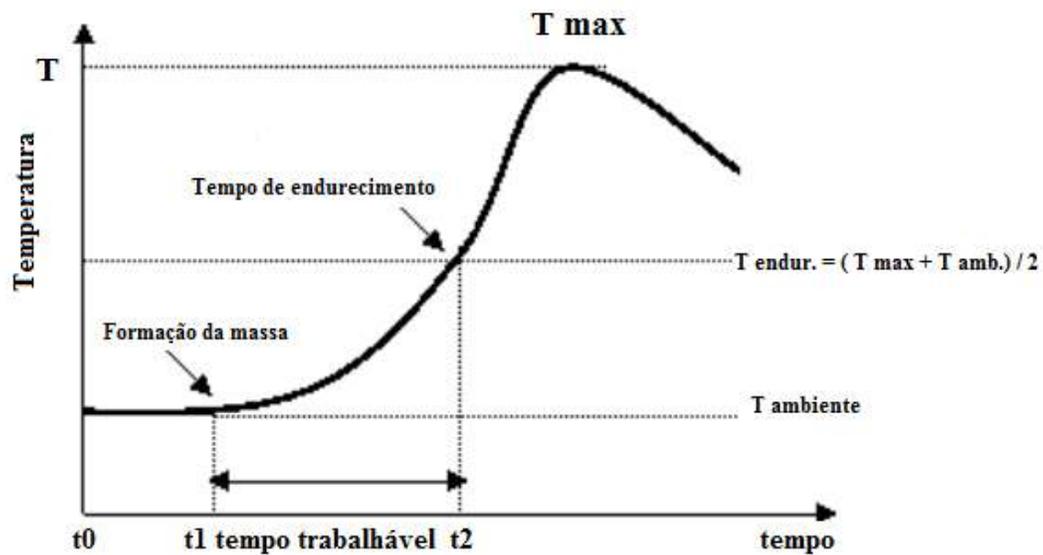


Figura 3.7: Variação da temperatura em função do tempo na fase de polimerização. (t_0 = mistura do pó com o líquido, t_1 = tempo de formação de massa, t_2 = tempo de endurecimento, t_0-t_1 = pré-massa, t_1-t_2 = massa). Fonte: MENDES *et al.*, 2006.

Na fase ($t_0 - t_1$) o cirurgião obtém uma massa homogênea, misturando-se o líquido ao pó (nesta ordem). A partir da mistura dos componentes chamada de tempo zero (t_0), o cimento apresenta-se sob uma forma viscosa denominada pré-massa. No intervalo de tempo entre t_0 e t_1 há um aumento da viscosidade com o decorrer da polimerização. Os cimentos já diferem bastante durante a fase da mistura. Alguns cimentos podem ser facilmente misturados, outros podem ser homogêneos somente com grande dificuldade e máximo cuidado (MENDES *et al.*, 2006).

A fase ($t_1 - t_2$) é o período trabalhável, durante o qual o cirurgião pode facilmente realizar a aplicação do cimento. Inicia-se no ponto ao qual a massa adquire consistência suficiente para ser manuseada não aderindo à luva do cirurgião, considerando que atingiu o tempo de formação da massa (t_1). Para a aplicação manual, o cimento não deve ser pegajoso, e a viscosidade não deve ser muito alta. Deve-se, contudo, garantir um mínimo de viscosidade para que o cimento possa suportar a pressão do sangramento no osso, pois inclusões de sangue no cimento devem ser vistas como pontos fracos com um alto risco de fratura do material (MENDES *et al.*, 2006). Este é o principal problema quando se usam cimentos de baixa viscosidade, pois os mesmos são frequentemente aplicados no corpo em um momento muito adiantado devido a sua curta fase de trabalho.

O período de tempo que se inicia em t_2 é denominado fase de endurecimento e indica o momento no qual o cirurgião pode esperar que o cimento seja completamente endurecido dentro do organismo. O tempo de endurecimento varia com relação ao pó-líquido do cimento, a temperatura do cimento e a temperatura ambiente.

O cimento convencional permanece no estado de pré-massa por 1 a 2 minutos antes de entrar na fase de massa, que varia de 3 a 7 minutos, até seu endurecimento total, entre 8 e 14 minutos, dependendo da marca comercial do cimento e das condições ambientais. Os cimentos de baixa viscosidade mantêm-se no estado de massa por 5 minutos e endurecem entre 6 e 8 minutos. Contudo, os cimentos do tipo convencional e os de baixa viscosidade são afetados pela temperatura, umidade relativa do ar e pelas condições de armazenamento, de forma similar. Ambientes quentes e úmidos diminuem a fase de massa, antecipando o endurecimento do cimento ósseo em até 5 minutos. O aumento da temperatura em 1°C pode acelerar o endurecimento do cimento em até 1 minuto. O armazenamento do cimento em um ambiente úmido por um período prolongado sofre efeitos similares (CHAN *et al.*, 2002).

3.2.1c Diminuição do Volume

Devido à conversão durante a polimerização de um grande número de moléculas de monômeros em um pequeno número de moléculas de polímero, há uma diminuição do volume durante a cura do cimento ortopédico. A razão para o encolhimento do cimento está na diminuição da distância molecular entre as moléculas de monômero livre antes da polimerização e a distância molecular das moléculas ligadas na cadeia polimérica. O MMA puro possui uma diminuição de volume de aproximadamente 21%. Isso significa que se houver a polimerização de 100 ml de MMA líquido resulta em 79ml de PMMA sólido (KUEHN *et al.*, 2005).

Utilizando o pó pré-polimerizado, o conteúdo do MMA em cimentos ósseos comercialmente disponíveis é reduzido para cerca de um terço da massa total. A diminuição teórica do volume de cimento total é de 6%-7% mas a retração real é menor devido à inclusão de ar na massa de cimento durante a mistura. Desta forma, o encolhimento do volume real do cimento ósseo misturado à mão pode ser menor do que o encolhimento do cimento misturado à vácuo, uma vez que na mistura à vácuo não há praticamente nenhum ar incluído na massa (BISHOP *et al.*, 1996) - Figura 3.8. Como o cimento acrílico absorve água durante a cura *in vivo*, a retração do volume é compensada pela absorção da água. Além disso, o encolhimento na interface cimento-osso pode beneficiar a formação de tecido ósseo (KUEHN *et al.*, 2005).

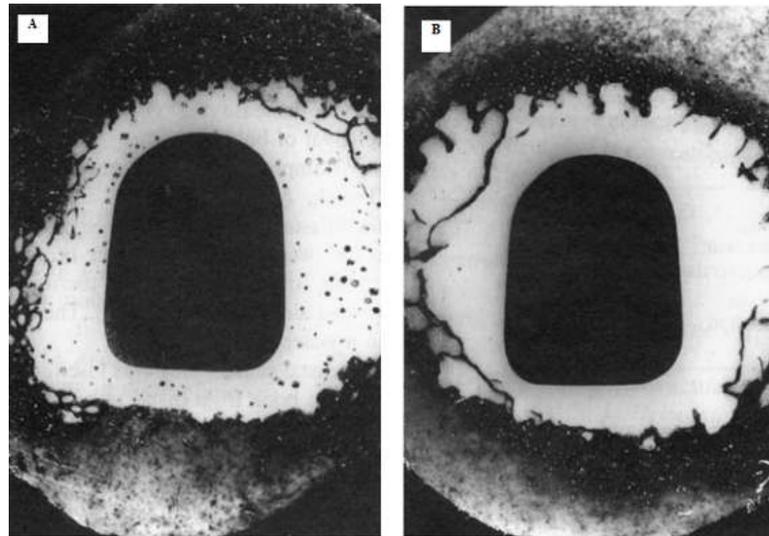


Figura 3.8: A imagem A mostra um cimento implantado após a mistura manual evidenciando a existência de vários poros neste cimento. A imagem B mostra um cimento implantado após a mistura à vácuo e evidencia a formação de poucos poros. (Adaptado de BISHOP *et al.*, 1996).

Quanto menor a porosidade do cimento ortopédico maior será o volume reduzido. As fontes de porosidade do cimento acrílico são: o ar contido no componente pó do cimento e o aprisionamento do ar durante a mistura (KUEHN *et al.*, 2005).

3.2.2 Monômero residual e liberação de monômero

O MMA utilizado para a reação de polimerização no cimento ortopédico geralmente não é totalmente reagido devido à dificuldade na mobilidade molecular em altas taxas de conversão. O teor de monômero residual imediatamente após a cura é de aproximadamente 2%-6% (KUEHN *et al.*, 2000). Em três semanas seguintes este conteúdo diminui para 0,5%. A maior parte (aproximadamente 80%) do monômero residual é pós-polimerizada lentamente. Uma pequena parte do monômero residual é liberada e metabolizada a dióxido de carbono e água no ciclo do ácido cítrico (figura 3.9). Anteriormente, a liberação do monômero residual era considerada o fator para as alterações circulatórias e respiratórias do paciente submetidos ao implante. Estes efeitos, no entanto, são causados pelo aumento da pressão na medula óssea e pela

embolia gordurosa, não sendo efeito da liberação do monômero residual (KUEHN *et al.*, 2000).

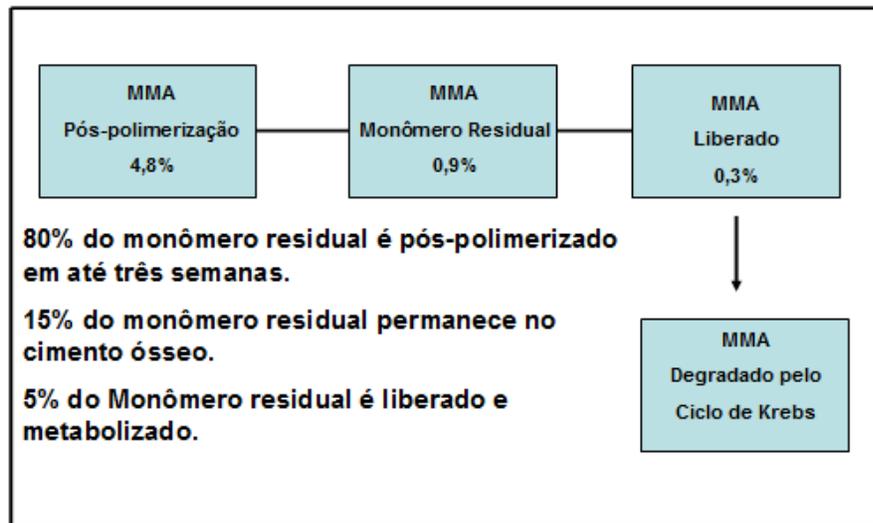


Figura 3.9: Monômero residual no cimento ósseo acrílico pós-polimerização e liberação com posterior degradação. (Adaptado de WENDA *et al.*, 1988).

3.2.3 Radiopacidade

Sem opacidades diferentes, o cirurgião não poderia monitorar de forma clara o processo de cicatrização após a substituição total da articulação, o que tornaria difícil perceber alguma falha ao longo do tempo. Esta é a razão pela qual os radiopacificantes são adicionados ao cimento ósseo. O sulfato de bário ou dióxido de zircônio são utilizados como opacificantes em todos os cimentos ósseos disponíveis no mercado. O radiopacificante não faz parte da cadeia polimérica. Ele está disperso uniformemente no polímero em pó e no cimento ósseo sólido resultante. As experiências com animais e estudos *in vivo* com diferentes culturas celulares mostram mais alterações osteolíticas quando se utiliza sulfato de bário comparado com o dióxido de zircônio. Por outro lado, as propriedades abrasivas do dióxido de zircônio podem ser uma desvantagem. (SABOKBAR *et al.*, 2001).

3.2.4 Peso molecular e processo de esterilização

A massa molar é o parâmetro característico para o comprimento das cadeias poliméricas incorporadas no pó polimérico ou resultante da polimerização do PMMA. A massa molar das partículas do pó polimérico é afetada fortemente pelo método utilizado para a esterilização. Esterilização por radiação γ e por radiação β diminuem significativamente o peso molecular enquanto que a esterilização por óxido de etileno não tem influência na massa molar do polímero. A massa molar influencia a contração durante a polimerização e as propriedades mecânicas do cimento ósseo (LEWIS *et al.*, 1998).

Esterilização por óxido de etileno é o método preferido para cimentos ósseos, porque não há nenhuma alteração nas características do material durante a esterilização. Esterilização com óxido de etileno é mais complexa e demorada do que a esterilização com a radiação γ ou a radiação β , tornando-se um processo mais caro (KUEHN *et al.*, 2005).

3.2.5 Propriedades Mecânicas do Cimento Ortopédico

As propriedades mecânicas do cimento devem ser bem controladas, para se evitar falhas deste material que poderiam ocasionar a soltura de próteses (HOLM *et al.*, 1980; MARKOLF *et al.*, 1976). A falha de uma prótese conduz inevitavelmente a novas cirurgias, denominadas revisões, para substituição do implante, acarretando vários e importantes riscos cirúrgicos para o paciente (DOHMAE *et al.*, 1988; VINCE *et al.*, 1991).

Os fatores que comumente acarretam problemas nas propriedades mecânicas do cimento são: a diminuição da resistência do cimento com o passar do tempo, ocasionada por uma degradação natural do polímero, adição de antibióticos, que fragilizam o polímero (WEINSTEIN *et al.*, 1976), e os problemas relacionados com a má homogeneização durante o preparo, que criam regiões de menor resistência, tais como:

mistura não adequada do pó com o líquido, excesso de porosidade no cimento, excesso de monômeros residuais e inclusão de sangue ou outros fluidos, que atuam como agentes expansores do polímero pela sua evaporação durante o aquecimento da mistura. Os problemas de homogeneização podem ser minimizados através de cuidados e a utilização de misturadores a vácuo e/ou centrifugação (BURKE *et al.*, 1990).

As propriedades mecânicas resultantes do conjunto (pó + líquido) do cimento ortopédico dependem da coesão entre o PMMA inicial e o monômero polimerizado. A falta de aderência entre a matriz de acrílico e as partículas inorgânicas radiopacificantes é, às vezes, responsável por uma ruptura prematura, por que as partículas se comportam como vazios para nucleação da trinca os quais podem crescer por propagação de trinca (YEUM *et al.*, 2005).

3.3 Nanopartículas de prata

Desde os séculos IV e V a.C os Egípcios e o Chineses utilizavam as nanopartículas de metais nobres para colorir vidros e cerâmicas. O cálice de Lycurgus (Figura 3.10), produzido em Roma, no século IV a.C, é um dos mais famosos exemplos. Análises revelaram que o cálice de Lycurgus, que é feito de vidro, contém pequenas quantidades de nanopartículas de Au/Ag embutidas e que possuem uma excepcional habilidade para colorir objetos mesmo em quantidades muito baixas. Vista do exterior, o cálice apresenta a figura mitológica de Lycurgus, nela gravada em verde. Iluminada do interior, a figura muda para o avermelhado (YAKUTIK *et al.*, 2004).

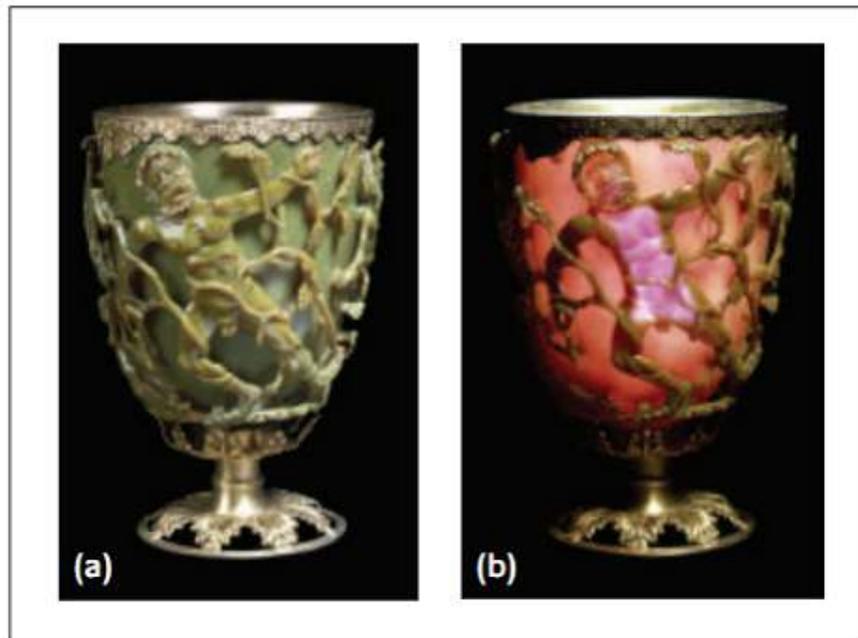


Figura 3.10: O cálice de Lycurgus. Na figura (a) em luz refletida e na figura (b) em luz refratada (cálice iluminado do interior). Fonte: (WALTERS *et al.*, 2009).

A diferença de cores decorre da diferença entre reflexão e refração. A luz refletida pela superfície do cálice filtra alguns comprimentos de onda devido à sua própria estrutura óptica. A luz que é refratada através do vidro, no entanto, além de ser absorvida como na superfície, também é absorvida pelas nanopartículas metálicas em seu interior, mudando, desta forma, o seu espectro visível (BOHREN *et al.*, 1983).

Uma classe de grande interesse para a fabricação de nanocompósitos de matriz poliméricas são as nanopartículas de metais nobres, sintetizados por via aquosa (CRESPILHO *et al.*, 2006). Tais nanopartículas têm atraído grande atenção em áreas como catálise, nanoeletrônica e paralelamente no estudo de suas potencialidades na área médica. A grande maioria dos estudos está relacionada à nanopartículas de prata, também referida como prata coloidal. Poucos microrganismos apresentam resistência contra as mesmas e essa resistência é possivelmente oriunda da produção de proteínas

que agiriam como quelatos, complexando a prata, diminuindo assim sua toxicidade (GUGGENBICHLER *et al.*, 1999).

A prata coloidal apresenta ação contra uma ampla faixa de microorganismos como bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e vírus. Seu efeito bactericida foi quantificado pela primeira vez por Von Naegelis contra algas, na forma de íons prata. O uso de colóides de prata, ou seja, partículas nanométricas em solução cujo tamanho varia de 10^{-9} a 10^{-6} m (KEY *et al.*, 2001) é relatado em documentos científicos do fim do século XVIII, sendo seu uso intensificado entre 1910 e 1920 (GIBBS *et al.*, 1999).

Além da prata, muitos outros metais foram estudados, resultando na seguinte escala de toxicidade contra microrganismos: Ag>Hg>Cu>Cd>Pb>Co>Au>Zn>Fe>Mn>Mo>Sn. Adicionalmente, a prata é o metal que apresenta a menor toxicidade para as células animais enquanto colóides de mercúrio mostraram-se extremamente tóxicos aos seres humanos (NETO *et al.*, 2008).

Com o descobrimento dos antibióticos, e sua introdução no uso medicinal, os colóides metálicos foram descartados. Todavia, cada vez mais as bactérias se tornam resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, forçando assim a síntese constante de novas drogas, que na maioria das vezes não acompanha a velocidade de imunogenicidade dos vírus e bactérias (GIBBS, 1999). Na busca por novos medicamentos antimicrobianos, os colóides de prata voltam a despertar o interesse na comunidade científica e, nesta linha, inúmeros trabalhos sobre os nanocompósitos contendo prata têm sido publicados, sendo o estudo focado em bactérias como a *Escherichia coli* e *Staphylococcus Aureus*, entre outras (SANPUI *et al.*, 2008).

A nanopartícula de prata também conhecida como prata coloidal apresenta ação contra uma ampla faixa de microorganismos. O efeito antimicrobiano amplo da prata é bem conhecido e tem sido utilizado em diferentes campos da medicina como, por exemplo, na profilaxia da oftalmia neonatal, na cicatrização de feridas e em biomateriais. As atividades antimicrobianas da prata estão relacionadas com suas dimensões. A

superfície ativa da nanopartícula de prata é de $4\text{m}^2/\text{g}$, em comparação com $1\text{-}2\text{m}^2/\text{g}$ de pó de prata comercial. As nanopartículas de prata formam agregados de $2\text{-}5\mu\text{m}$. A porosidade das nanopartículas de prata é de $85\text{-}95\%$ em comparação com 0% de porosidade da prata em pó comercial. Enquanto as nanopartículas de prata possuem tamanho $<100\text{nm}$, o pó de prata possui cerca de $500\text{-}1000\mu\text{m}$ (Figura 3.11) (VOLKER *et al.*, 2003).

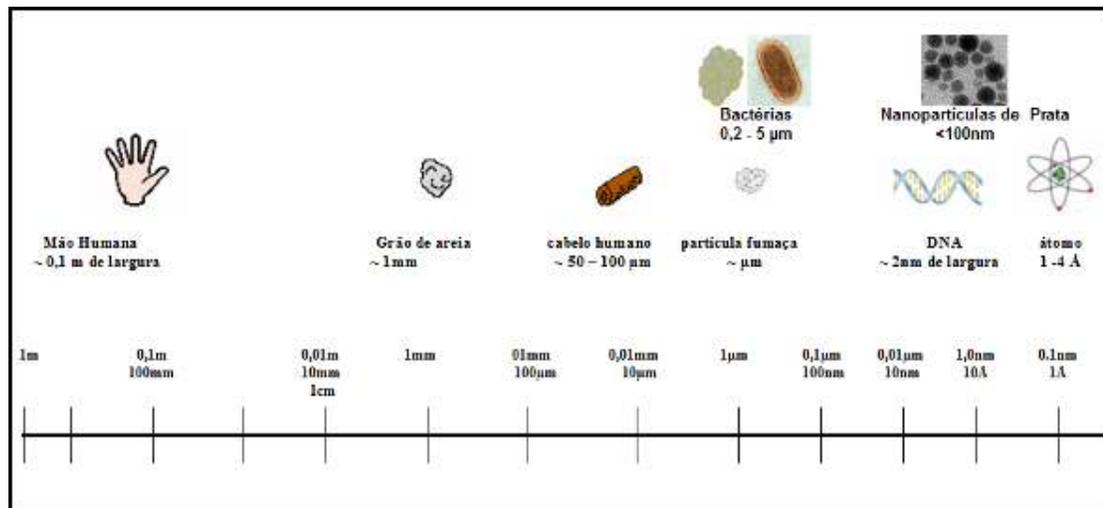


Figura 3.11: Comparação de estruturas baseadas em prata de diferentes tamanhos.

3.3.1 Colóide de prata

A prata coloidal é um tipo de colóide que consiste em partículas sólidas suspensas em um líquido. O sólido é constituído por partículas muito pequenas, medidas em nanômetros, de prata metálica e o líquido é a água. A prata coloidal possui, desta forma, partículas de prata em suspensão. A prata coloidal também possui prata iônica. A diferença entre solução, colóide e suspensão é definida pelo tamanho das partículas:

Soluções: $<10^{-9}\text{m}$ (menor que 1 nm)

Colóides: 10^{-9}m a 10^{-6}m (1 nm a 1000 nm)

Suspensões: $>10^{-6}\text{m}$ (maior que 1000nm)

A prata coloidal é composta por prata em duas formas distintas (partículas de prata metálica e íons). A quantidade total de prata que é relatada como a concentração de prata (em partes por milhão) é a soma total da prata contida nas partículas e a soma da prata dos íons prata. A medição precisa do conteúdo total de prata requer uma medida por absorção atômica ou emissão atômica dos átomos de prata. A espectrometria de absorção atômica é frequentemente usada para se obterem resultados precisos. Para medir a concentração de íons prata por absorção atômica é necessário que as partículas sejam removidas por centrifugação deixando apenas os íons. Alternativamente, um eletrodo seletivo para íons de prata em solução pode ser utilizado. As medidas utilizando um eletrodo seletivo para os íons prata são menos precisas quando se comparado à utilização do espectrômetro de absorção atômica.

A concentração de partículas de prata é determinada pela subtração da concentração iônica da concentração de prata total. Normalmente os íons de prata compõem 75-99% do total de prata enquanto apenas 1-25% do total é de partículas de prata. Uma solução contendo apenas prata iônica não é considerada coloidal uma vez que não há partículas sólidas de prata em suspensão. Por outro lado, se 100% da prata estiver na forma de partículas e nenhuma na forma iônica, a solução seria um colóide puro. Uma medida da qualidade da prata coloidal pode ser dada pela porcentagem de partículas de prata. Idealmente, toda a prata contida deveria estar na forma de partículas sem a presença de íons (KEY *et al.*, 2001).

3.3.2 Átomo de prata

Um único átomo de prata pode ser considerado uma partícula do tamanho de um átomo de prata. O diâmetro de um átomo de prata é de 0,288nm. Embora seja teoricamente possível ter uma partícula de prata metálica que consiste de um único átomo, na prática as partículas são bem maiores e compostas de muitos átomos. Por exemplo, uma partícula de prata de 1nm de diâmetro pode ser formada de 31 átomos de prata em uma

partícula de 5nm de diâmetro pode ter cerca de 3900 átomos, enquanto uma partícula de 20nm de diâmetro pode conter cerca de 250.000 átomos de prata (KEY *et al.*, 2001).

3.3.3 Íon prata

Um íon de prata é um único átomo de prata que perdeu ou ganhou um elétron em sua camada de valência. A prata preferencialmente formará cátions, devido a sua facilidade em perder o elétron do subnível $5s^1$. O diâmetro de um íon de prata é de 0,230nm, que é ligeiramente menor do que o diâmetro do átomo porque perdeu um elétron. A prata (Ag) tem a configuração eletrônica $[\text{Kr}] 4d^{10} 5s^1$. Quando a prata (Ag) perde um elétron é o $5s^1$ que ela perde, transformando-se em Ag^+ . A perda do elétron torna o íon positivamente carregado e ocasiona mudanças nas suas propriedades físicas. A prata metálica não é solúvel em água enquanto a prata iônica possui uma solubilidade finita e mensurável. Ao perder um elétron a prata fica com carga positiva. A carga atribuída aos íons é carga elétrica e é devido a perda ou ganho de elétrons. Já a carga das partículas é devido à adsorção de espécies carregadas. As partículas de prata encontradas em prata coloidal são carregadas negativamente, diferente dos íons positivos (KEY *et al.*, 2001) .

3.3.4 Estabilidade Coloidal

Fatores externos ou a gravidade podem fazer com que partículas em dispersão formem agregados de tamanho maior pela adesão de umas às outras. Um agregado inicialmente formado é chamado de floco e a sua formação é conhecida como floculação. Este processo é reversível, cujo inverso é a defloculação. Se os agregados mudam para uma forma mais densa, dizemos que sofreu coagulação, que é um processo irreversível (Figura 3.12) (ANDRADE, 2008).

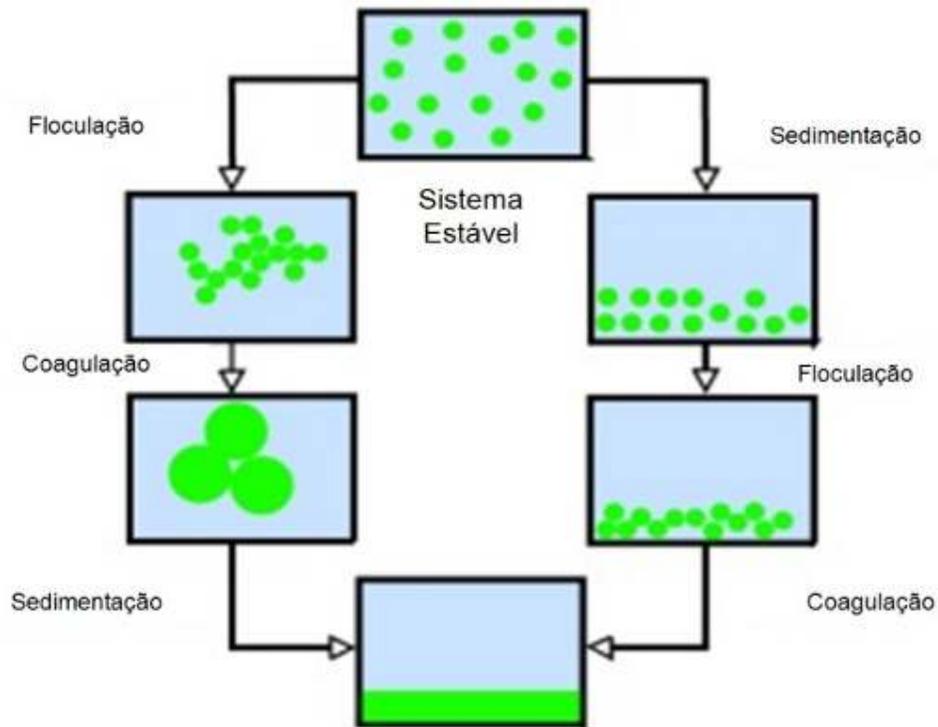


Fig.3.12: Esquema de processos de floculação, coagulação e sedimentação que podem ocorrer com sistemas coloidais. Fonte: (ANDRADE, 2008).

Em 1940, Derjaguin, Verway, Landau e Overbeek desenvolveram a teoria que trata da estabilidade coloidal, que ficou conhecida como teoria DVLO (cujo nome é formado pelas iniciais dos nomes dos seus criadores). Essa teoria forneceu à ciência dos colóides e de superfície os fundamentos de um modelo quantitativo para as interações entre macro-partículas onde dois tipos de forças, as forças eletrostáticas da dupla camada e as forças atrativas de Van der Waals, agem entre as partículas em função da distância entre elas. A estabilidade de um sistema coloidal é determinada pela soma destas forças (ANDRADE, 2008).

A teoria DVLO propõe que uma barreira de energia, resultante das forças repulsivas, impede que duas partículas se aproximem e que ocorra adesão entre elas. Porém, se a partícula possui energia suficiente para romper esta barreira, a força atrativa irá puxá-las e colocá-las em contato irreversivelmente. Existem dois mecanismos fundamentais que

afetam a estabilidade coloidal: a repulsão estérica e a repulsão eletrostática (Figura 3.13). Fonte: (ANDRADE, 2008)

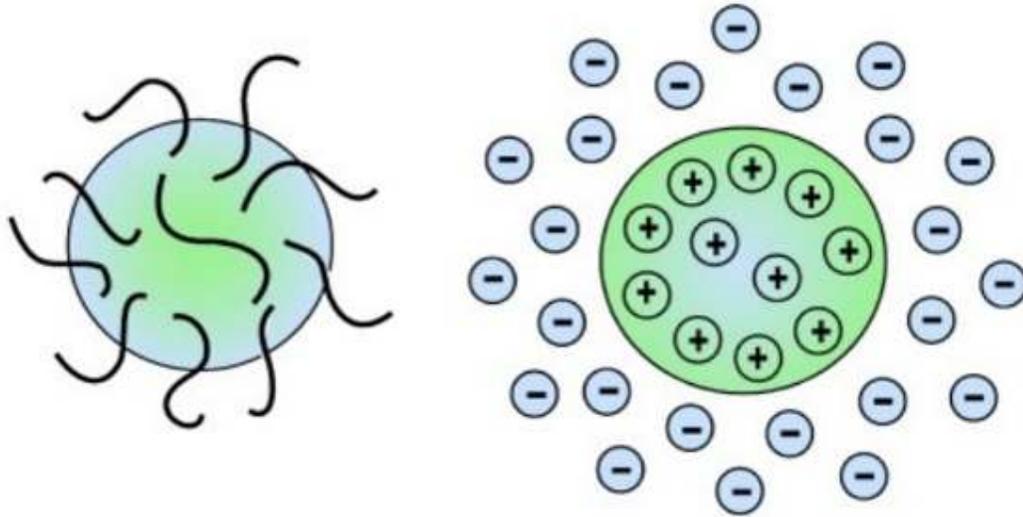


Figura 3.13: Os dois mecanismos fundamentais que afetam a estabilidade coloidal: repulsão estérica (esquerda) e a repulsão eletrostática (direita). Fonte: (ANDRADE, 2008).

A repulsão estérica envolve a adição de polímeros apropriados, por um processo simples, no qual o polímero se adsorve na superfície das partículas causando repulsão. O inconveniente nesta técnica é a dificuldade em flocular o sistema posteriormente caso seja necessário, e a presença do polímero que pode não ser desejada. Já a repulsão eletrostática é um efeito da interação de partículas devido à distribuição de espécies carregadas no sistema. A estabilização ou a floculação do sistema pode ser modificada simplesmente pela alteração da concentração de íons no sistema, além de ser um processo reversível (BAO *et al.*, 2005).

3.4 Polímeros e Nanopartículas Metálicas

Polímeros são considerados um bom meio para nanopartículas inorgânicas. A incorporação de nanopartículas inorgânicas que possuem elevada superfície pode afetar significativamente as propriedades da matriz polimérica (KICKELBICK *et al.*, 2003 e CASERI *et al.*, 2000). Os nanocompósitos obtidos podem apresentar melhorias nas propriedades ópticas, térmicas, mecânicas, elétricas, magnéticas entre outras (BASAK *et al.*, 2006, AYMONIER *et al.*, 2003 e MBHELE *et al.*, 2003). As propriedades dos compósitos poliméricos dependem do tipo de incorporação das nanopartículas, do seu tamanho e forma, sua concentração e interação com a matriz polimérica (SINGH *et al.*, 2007).

3.5 Mecanismos de ação das nanopartículas de prata no combate aos microorganismos

O mecanismo de ação bactericida da nanopartícula de prata ainda não é bem conhecido. O mecanismo de ação antimicrobiana das nanopartículas de prata é bastante complexo e ainda possui muitas controvérsias (STEVENS *et al.*, 2009). Nanopartículas de prata podem atacar a superfície da membrana celular e atrapalhar suas funções de permeabilidade e respiração. Pode-se afirmar que a ligação das partículas na bactéria depende da área de superfície disponível para a interação. Partículas menores possuem uma maior área de superfície disponível para interagir com a bactéria sendo, por isso, mais eficazes no combate às bactérias quando comparadas com as partículas maiores (MORONES *et al.*, 2005).

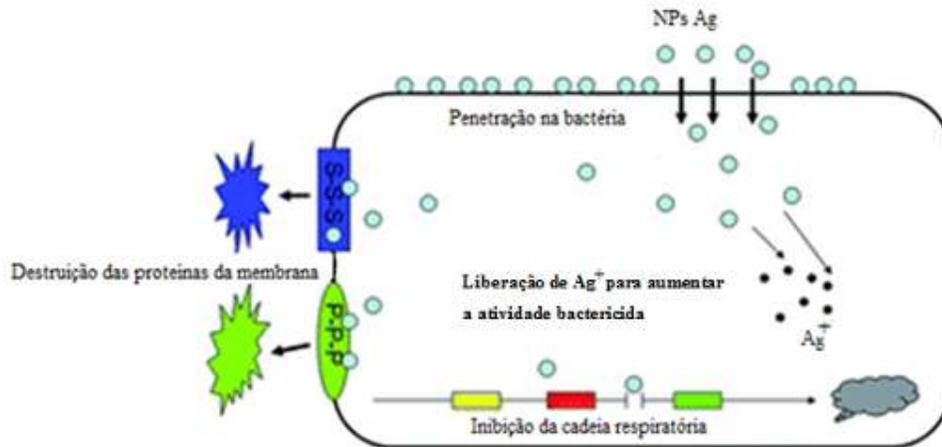
Nanopartículas de prata de 1 a 100 nm em contato com bactérias podem ser encontradas tanto no interior das bactérias como em suas membranas, porém a interação com aglomerados de prata não é observada (MORONES *et al.*, 2005). As nanopartículas de prata têm grande afinidade com grupos que possuem os elementos enxofre e fósforo, que são encontrados tanto nas membranas como no interior das bactérias. Sua interação ocorre com a membrana celular causando danos no processo de respiração celular e, no

interior das mesmas, interagem com o DNA impedindo a divisão celular (MORONES *et al.*, 2005).

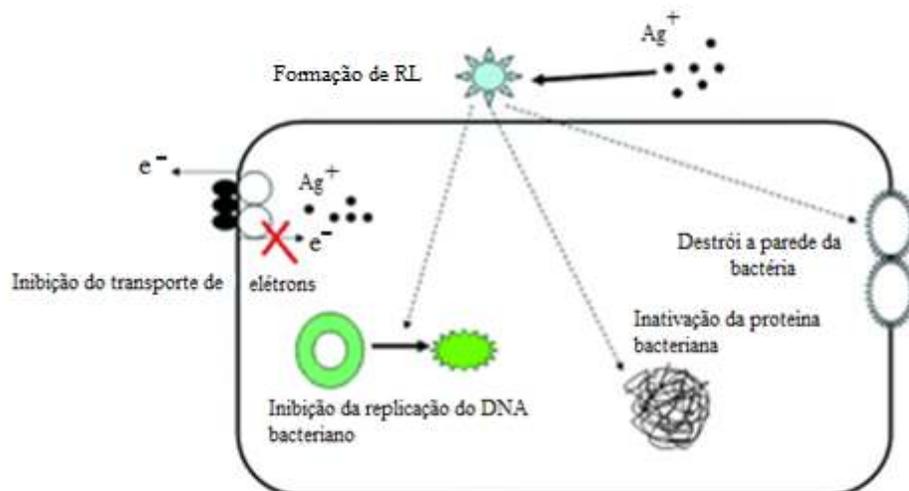
A ação das nanopartículas de prata se difere da ação de seus íons, que se caracteriza pelo desenvolvimento de uma região de baixo peso molecular no centro da bactéria, a qual se acredita que seja formada por proteínas produzidas pela bactéria a fim de complexar os íons de prata (GUGGENBICHLER *et al.*, 1999).

Atualmente, o aumento da resistência bacteriana aos agentes bactericidas é considerado um grave problema no tratamento de doenças infecciosas. Cada vez mais novas espécies de bactérias, tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, se tornam resistentes a medicamentos exigindo o estudo e produção de novos componentes que combatam esses microrganismos (PANACEK *et al.*, 2005).

Os mecanismos pelos quais as nanopartículas de prata e os íons eliminam as bactérias são supostamente os seguintes: (A) a prata na escala nanométrica possui um melhor contato com os microrganismos devido sua elevada área de superfície. Desta forma, essas nanopartículas atacam a superfície bacteriana e também penetram no interior desses organismos. (B) As membranas bacterianas possuem proteínas cujas estruturas contém enxofre e fósforo e tanto as nanopartículas de prata quanto os íons prata podem interagir com essas proteínas. Podem ainda inibir as funções do DNA ao interagirem com esses grupos. (C) As nanopartículas de prata e/ou os íons prata podem atacar a cadeia respiratória na mitocôndria bacteriana e levar a célula à morte. (D) Nanopartículas de prata podem ter uma liberação sustentada de Ag^+ uma vez dentro das células bacterianas os quais podem formar radicais livres e induzir o estresse oxidativo, reforçando sua atividade bactericida (WONG *et al.*, 2010). As Figuras 3.14 e 3.15 mostram os mecanismos das nanopartículas de prata e íons prata no combate aos microrganismos.



Figuras 3.14: Esquema dos mecanismos de atuação das nanopartículas de prata e íons prata no combate aos microrganismos.



Figuras 3.15: Continuação: Esquema dos mecanismos de atuação das nanopartículas de prata e íons prata no combate aos microrganismos.

3.6 Análise e caracterização das nanopartículas de prata e do nanocompósito

3.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a obtenção de imagem ampliada e tridimensional da amostra a partir da interação do feixe de elétrons com o material, desde que este não seja transparente aos elétrons. Esta técnica proporciona imagens com alta resolução e profundidade de campo, possibilitando aumentos de dezenas de milhares de vezes que são utilizadas em pesquisas das áreas biomédicas e de materiais (PISCITELLI *et al.*, 2004).

A técnica de MEV requer ambiente de vácuo para que os elétrons desloquem na câmara. As amostras precisam sofrer um processo de desidratação quando necessário e fixadas de modo a suportar um ambiente de vácuo. Amostras não condutoras devem ser recobertas com ouro ou carbono para torná-las condutoras (MANSUR *et al.*, 2001).

A microscopia eletrônica de varredura usa de quase todos os sinais gerados pela interação entre o feixe de elétrons e o espécime, promovendo uma grande riqueza de informações adicionais sobre os materiais. No MEV, um feixe de elétrons varre a superfície do espécime. São produzidos raios-x, elétrons retroespalhados e elétrons secundários que são detectados e analisados. Podem ser obtidos aumentos de até 200.000 vezes, com resoluções da ordem de alguns nanômetros e em geral possui efeitos destrutivos para a amostra.

O princípio de funcionamento do MEV (Figura 3.16) consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio mediante a aplicação de uma diferença de potencial. Dentro da coluna de alto vácuo, os elétrons gerados a partir de um

filamento de tungstênio são acelerados por uma diferença de potencial. O feixe gerado passa por lentes condensadoras que reduzem o seu diâmetro por uma lente objetiva que o focaliza sobre a amostra. Logo acima da lente objetiva existem dois estágios de bobinas eletromagnéticas responsáveis pela varredura do feixe sobre a amostra.

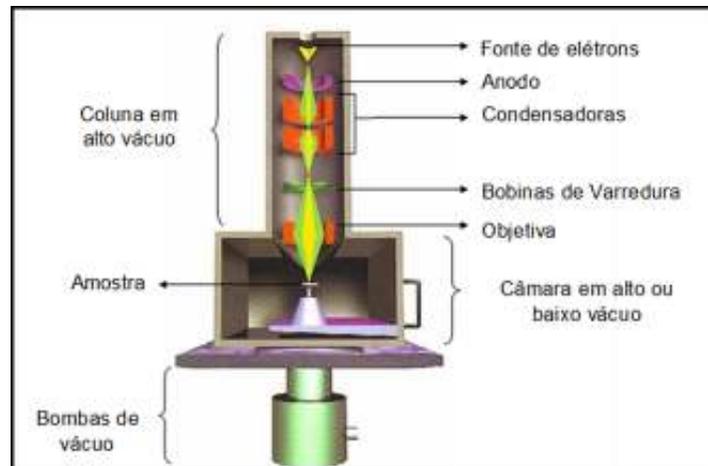


Figura 3.16: Esquema do princípio de funcionamento do MEV.

3.6.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta

O espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês, *dynamic light scattering*) é uma técnica utilizada para a determinação do tamanho de partículas em soluções coloidais. Nesta técnica, a amostra é iluminada por um laser e a intensidade da luz espalhada resultante é dependente do tamanho da partícula. Análises dessas flutuações de intensidade dão o coeficiente de espalhamento e através deste pode-se calcular o tamanho das partículas. Quando o feixe laser encontra as partículas, a luz é espalhada, podendo ser medida a intensidade e a frequência deste espalhamento, sendo estas medidas convertidas para o tamanho médio das partículas em suspensão (Instruments Zetasizer Nano User Manual, 2007).

Partículas suspensas em líquido nunca estão paradas, estão se movendo constantemente devido ao movimento Browniano e devido às colisões aleatórias com as moléculas do

líquido que envolvem a partícula. A característica importante do movimento Browniano para o DLS é que partículas pequenas movem-se mais rapidamente que as partículas maiores. Ou seja, partículas maiores se movem mais lentamente e espalham mais o laser. Partículas menores se movem mais rapidamente e espalham menos o laser (Malvern Instruments Zetasizer Nano User Manual, 2007).

A técnica consiste na medida das flutuações dependentes do tempo e da intensidade da luz espalhada pelas partículas que estão em constante movimento Browniano, e relaciona este com o tamanho da partícula. Isto decorre do fato que uma partícula pequena, iluminada por uma fonte de luz espalhará luz em todas as direções. Os resultados de um experimento de DLS podem ser apresentados como uma distribuição da porcentagem em função do diâmetro destas partículas.

Já o potencial zeta pode ser definido como o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado por mudanças na interface com o meio externo, decorrente da dissociação com grupos funcionais presentes na superfície ou da adsorção de espécies iônicas do meio de dispersão. O potencial zeta geralmente é determinado por medidas de mobilidade eletroforética que correspondem à velocidade das partículas em suspensão quando submetidas há um campo elétrico. Quanto maior a carga superficial, maior será a velocidade com que as partículas deslocam em direção aos eletrodos de carga oposta (ASSIS *et al.*, 2007).

As partículas de prata que estão suspensas em água pura para formar um colóide irão assumir uma carga negativa (Potencial Zeta). A maioria dos sólidos desenvolve um Potencial Zeta negativo quando dispersos em água de baixa concentração iônica. A carga adquirida pelas partículas é particularmente devido a adsorção de íons na solução. A carga da superfície dá origem a uma distribuição de potencial em torno da superfície. O valor deste potencial no plano de escorregamento é definido como o Potencial Zeta. O plano de escorregamento é devido a existência de uma dupla camada de íons em

torno da partícula (uma região interior, onde os íons estão fortemente ligados e uma região externa, onde estes estão fracamente associados). Na região interior à camada externa a partícula atua como uma entidade única (KEY *et al.*, 2010).

O Potencial Zeta das soluções coloidais de prata que contém íons de prata normalmente apresenta valores de -35 a -45 milivolts (mV), dependendo do conteúdo iônico e é calculado a partir da velocidade obtida pela avaliação do efeito Doppler da luz do laser dispersada. O Potencial Zeta de prata coloidal que não contém íons prata poderá apresentar um potencial negativo maior (cerca de -50mV). Quanto maior o teor iônico menos negativo será o potencial Zeta uma vez que a carga positiva dos íons de prata irá cancelar algumas das cargas negativas das partículas. A redução do conteúdo de prata iônica torna o Potencial Zeta mais negativo aumentando a estabilidade do colóide. Quando o valor do Potencial Zeta apresenta valores mais negativos que -30mV este é considerado estável pois as partículas apresentam repulsão mútua assegurando a estabilidade da suspensão. Valores mais positivos do que -15mV indicam uma suspensão no limiar de aglomeração. A coagulação ou floculação se torna mais rápida quanto o Potencial Zeta é de $0\text{mV} \pm 3\text{mV}$ (KEY *et al.*, 2010).

Os instrumentos utilizados para medir o valor do Potencial Zeta o fazem submetendo a amostra a um campo elétrico e em seguida observando o movimento das partículas em direção a um eletrodo de uma célula de eletroforese. O sinal da carga das partículas no campo elétrico determina a direção do movimento. A carga negativa sobre a partícula faz com que ela se mova em direção ao eletrodo positivo. A carga positiva sobre a partícula a fará movimentar-se em direção ao eletrodo negativo. A velocidade do movimento das partículas é determinada pela quantidade de carga estando diretamente relacionada (KEY *et al.*, 2010).

A maioria das partículas em uma dispersão coloidal aquosa carrega uma carga elétrica. Esta carga da superfície pode ter muitas origens, dependendo da natureza da partícula e

do meio ao redor. Uma das origens é devido à dissociação de alguns grupos ácidos (H^+) ou básicos (OH^-), que deixa a superfície da partícula carregada negativamente ou positivamente, respectivamente. Além disso, a magnitude da carga na superfície dependerá da força que os ácidos e bases exercem na superfície, e do pH da solução (GUINGAB *et al.*, 2007).

Uma distribuição de cargas na superfície da partícula afeta a distribuição de íons em volta da região de interface, resultando num aumento de contagem de íons (íons de carga oposta àquela partícula) perto da superfície. Desta forma, uma dupla camada de íons existirá em volta de cada partícula como representado na figura 3.17.

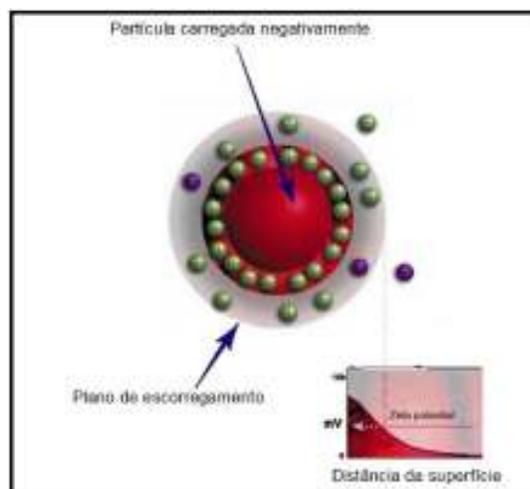


Figura 3.17: Representação de dupla camada elétrica e variação de Potencial Zeta.

(Fonte: GUINGAB *et al.*, 2007)

Como o Potencial Zeta é um bom índice da magnitude da interação entre partículas coloidais suas medidas podem ser utilizadas para avaliar a estabilidade dos sistemas coloidais. O fator mais importante que afeta o Potencial Zeta é o pH. Um valor de Potencial Zeta sozinho sem um pH associado e sem a descrição do ambiente é um número sem sentido. Por exemplo, se temos uma partícula com Potencial Zeta negativo em solução, e adicionamos a essa solução uma base (OH^-) então a partícula tenderá adquirir mais carga negativas. Se, do contrário, ácido for adicionado (H^+) chegará um

ponto em que a carga negativa se neutralizará. Aumentando-se a concentração do ácido, a partícula terá carga positiva (GUINGAB *et al.*, 2007).

3.6.3 Espectroscopia de Infra Vermelho (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho é um poderoso método para análises de materiais e estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria. A região do espectro infravermelho possui elevada importância para os diversos campos da ciência devido a sua abrangente utilização no estudo das moléculas orgânicas e compostos inorgânicos, sendo usado geralmente na faixa de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1} . A absorção de radiações eletromagnéticas por átomos e moléculas exige que elas tenham energia apropriada e que haja um mecanismo de interação que permita a transferência de energia (MANSUR, 2005).

O infravermelho é classicamente dividido em três regiões: próximo (próximo do visível), médio e distante.

10 a 400 cm^{-1} infravermelho distante.

400 a 4000 cm^{-1} infravermelho médio.

4000 a 12820 cm^{-1} infravermelho próximo.

A maior parte dos estudos em infravermelho (IV) refere-se à região média, onde se localizam as frequências vibracionais fundamentais (Figura 3.18). As frequências vibracionais de uma molécula dependem da natureza do movimento, massa dos átomos, geometria da molécula, natureza das ligações químicas e ambiente químico/físico. (CANEVAROLO *et al.*, 2004).

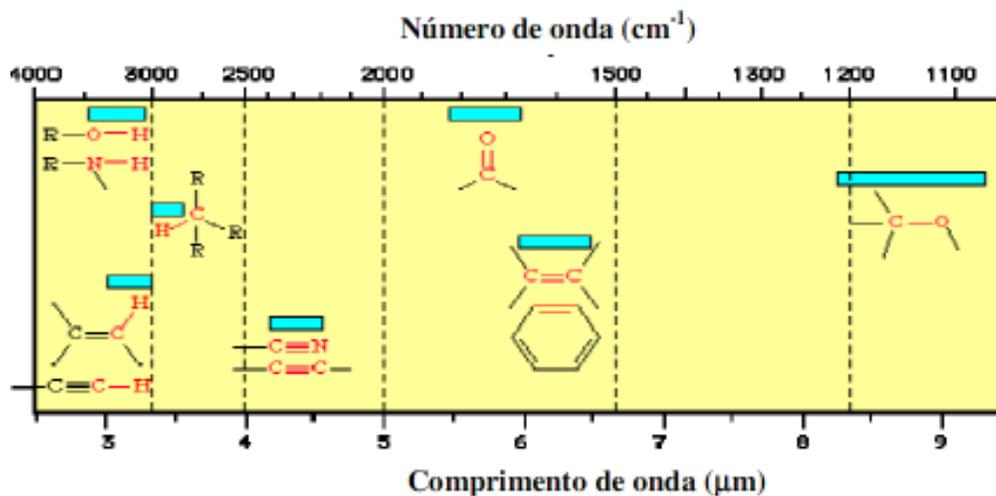


Figura 3.18: Faixa de energia de grupos funcionais orgânicos ativos no infravermelho (Fonte: MANSUR, 2005).

A espectroscopia por reflexão difusa permite analisar as amostras como recebidas ou na forma de dispersões em matrizes que não as absorvem, tais como o KBr para análises qualitativas. A Espectroscopia de Refletância Difusa por Transformada de Fourier oferece as seguintes vantagens:

- Análise de amostras sem preparação ou com mínima preparação prévia.
- Elevada sensibilidade.
- Habilidade de analisar a maioria dos materiais que não refletem, incluindo materiais de elevada opacidade ou materiais fracamente absorventes.
- Habilidade de analisar superfícies irregulares ou recobrimentos.
- Respeitável aplicabilidade para amostras muito grandes.

Quando a radiação na região do infravermelho é direcionada à superfície de uma amostra sólida, pode ocorrer a refletância especular (radiação que reflete diretamente da superfície da amostra) e a refletância difusa (radiação que penetra dentro da amostra e

depois emerge). A amostra é normalmente granulada ou misturada a um material (KBr), que atua à maneira de uma matriz não absorvente. Por intermédio da diluição da amostra em uma matriz não absorvente, incrementa-se a proporção do feixe de infravermelho refletido de forma difusa pela amostra (MANSUR, 2005).

A Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier tem sido considerada um instrumento útil para o cálculo de variações da cristalinidade em amostras não homogêneas, onde uma elevada resolução espacial é requerida e é aplicada para análises qualitativas e quantitativas de compostos orgânicos e inorgânicos (MANSUR *et al.*, 2005). Aspectos qualitativos da espectroscopia por infravermelho são atributos significativos dessa técnica analítica que, publicada em termos de absorção fundamental de frequência, conhecido também como grupos de frequências, são necessários à identificação da relação estrutura-espectro das vibrações moleculares associadas (COATES *et al.*, 2000).

3.6.4 Ultra Violeta Visível (UV-vis)

A medida de espectroscopia de UV-Vis se baseia no fenômeno de ressonância da banda plasmônica, observado em nanopartículas metálicas. Neste caso, uma onda eletromagnética incide sobre uma nanopartícula metálica (1-100nm e onda eletromagnética na região do visível) ocasionando oscilação em ressonância da nuvem eletrônica da nanopartícula (NOGUEZ *et al.*, 2007).

As diferentes estruturas existentes propiciam diferentes modos de vibração, resultando assim em diferentes espectros de absorção (emissão de diferentes cores pelas nanopartículas). Quando os espectros de UV-Vis mostram picos centrados por volta de 400nm isso evidencia nanopartículas de formato esférico (NOGUEZ *et al.*, 2007).

A espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis) ou espectrofotometria utiliza fótons na faixa do ultravioleta próximo (UV: $200 < \lambda < 380\text{--}400$ nm), do visível (Vis: $380\text{--}400\text{nm} < \lambda < 700\text{--}800$ nm), e do infravermelho próximo (NIR, do inglês, *near infrared*: $800\text{ nm} < \lambda < 3300\text{nm}$). Esses fótons (nesta faixa de energia) interagem com as moléculas provocando transições eletrônicas moleculares (SKOOG, *et al* 2009). A espectroscopia de UV-Vis é uma das mais importantes técnicas utilizadas para caracterizar a estrutura das nanopartículas de prata (PAL *et al.*, 2007).

O instrumento usado na espectroscopia UV-Vis é o espectrofotômetro (Figura 3.19) que basicamente é composto pelos seguintes instrumentos: uma fonte de radiação eletromagnética (luz), um conjunto de componentes ópticos que levam esta radiação até a amostra, um compartimento de amostra (cela ou cubeta) e um ou mais detectores que medem a intensidade de radiação (SKOOG *et al.*, 2009).

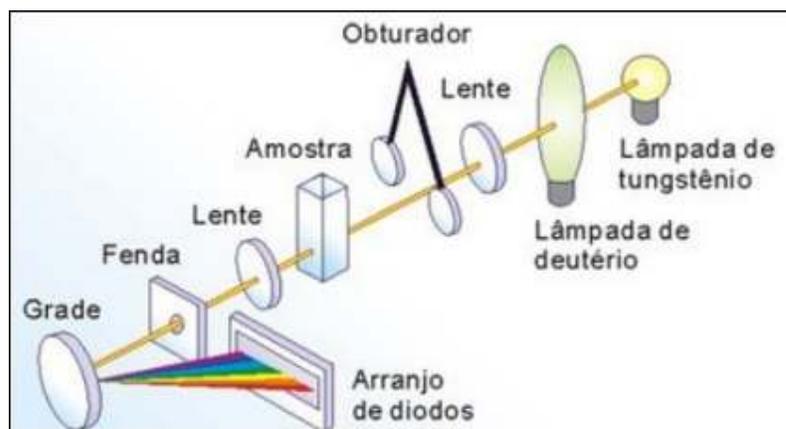


Figura 3.19: Ilustração de funcionamento básico de espectrofotômetro. Mostrando duas fontes de radiação eletromagnética, que geralmente são lâmpadas de deutério (que emitem na região do ultravioleta) e de tungstênio-halogênio (que emitem na região do visível e infravermelho próximo).

A luz emitida pelas lâmpadas de deutério e tungstênio-halogênio é focalizada por meio de uma lente. O feixe focalizado passa pelo obturador e atinge a amostra. Desta forma incidem sobre a amostra todos os comprimentos de onda emitidos pelas lâmpadas. A amostra fica numa cela, que não absorve no comprimento de onda utilizado e com

largura de geralmente 10mm. Essa largura, que será a distância pela qual o feixe atravessa a amostra é chamada de caminho óptico (SKOOG *et al.*, 2002).

Atravessando o caminho óptico, parte da radiação incidente é absorvida pela amostra. O restante atinge uma lente que novamente focaliza a radiação transmitida para uma fenda e atinge uma grade de difração. A grade de difração tem por objetivo difratar a radiação, espalhando-a em seus diferentes comprimentos de onda. A radiação atinge o sistema detector que converte o sinal de intensidade de cada comprimento de onda em sinal elétrico que é interpretado como absorbância (SKOOG *et al.*, 2002).

Um dos termos amplamente utilizados em espectrometria UV-Vis é a absorbância A . A figura 3.20 mostra uma solução absorvente de concentração c dentro de uma cubeta de caminho óptico b . Através dela passa um feixe de radiação de intensidade P_0 (feixe incidente) e após passar pela amostra (feixe emergente) a intensidade passa a ser P .

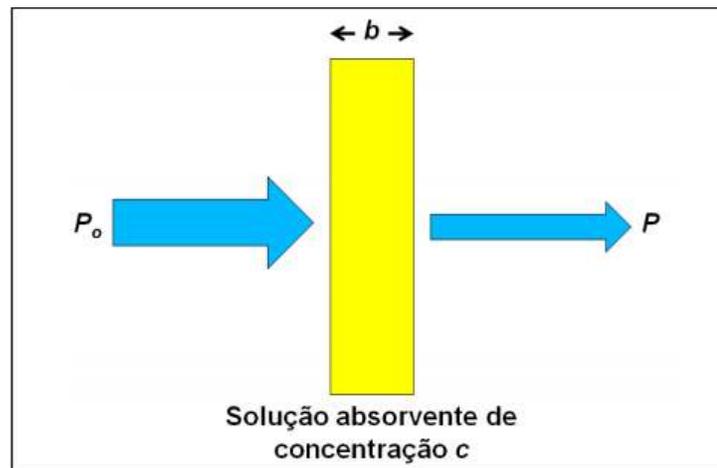


Figura 3.20: Atenuação do feixe de radiação por uma solução.

A absorvância A de um meio é definida pela equação:

$$A = \log \frac{P_o}{P}$$

A absorvância cresce quando a atenuação do feixe torna-se maior. Segundo a Lei de Beer, a absorvância A é proporcional ao caminho óptico b através do meio, à concentração das espécies absorventes e ϵ é uma constante de proporcionalidade conhecida como absorvidade molar ou coeficiente de extinção e que varia de acordo com a substância (SKOOG *et al.*, 2002).

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c = \log \frac{P_o}{P}$$

Quando a radiação atravessa um material, algumas frequências são removidas ou atenuadas pela absorção. A energia é transferida para átomos, íons ou moléculas que compõem a amostra. Se forem comparados, os comprimentos de onda da radiação absorvida com as correspondentes cores do espectro, verifica-se que a cor da solução corresponde às cores complementares do espectro absorvido (SKOOG *et al.*, 2002).

A partir do espectro de absorção no UV-Vis de uma solução coloidal de nanopartículas de prata pode-se retirar parâmetros importantes como a banda de absorção óptica que é característica dos plasmons superficiais das nanopartículas de prata, o valor máximo de absorção óptica (A_{max}), o comprimento de onda no máximo de absorção (λ_{max}). A partir desses parâmetros pode-se obter informações dos colóides estudados como tamanho, geometria etc. (GUINGAB *et al.*, 2007).

Colóides de nanopartículas de prata possuem tipicamente uma coloração amarelada, que corresponde ao espectro resultante da absorção de fótons com comprimento de onda em torno de 400nm que pode variar dependendo da rota de síntese usada e do tamanho das nanopartículas presentes. Os espectros em torno de 400nm de comprimento de onda indicam nanopartículas de prata de formato esféricos com tamanho em torno de 20nm (PAL *et al.*, 2007).

3.6.5 Resistência à compressão

As propriedades mecânicas dos materiais poliméricos são de grande importância e interesse científico e tecnológico, devido aos requisitos e/ou exigências que os diversos polímeros existentes devem atender na maior parte de suas aplicações. Valores de propriedades mecânicas, tais como resistência à tensão, módulo de elasticidade entre outros, podem servir como base de comparação para avaliação dos efeitos decorrentes da modificação do polímero base (reforços, cargas, aditivos etc.). Os valores de propriedades mecânicas são obtidos através de ensaios mecânicos padronizados, dentre os quais está o ensaio de resistência à compressão (CANTO *et al.*, 2004).

O ensaio de compressão é o mais apropriado para indicar se um material possui boa resistência à compressão, se não deforma facilmente e se possui boa precisão dimensional quando solicitado por esforços de compressão. Por meio de um equipamento apropriado, máquina universal para ensaio de compressão, gráficos força/tensão versus deformação são gerados (Figura 3.21) (GAETI *et al.*, 2010).

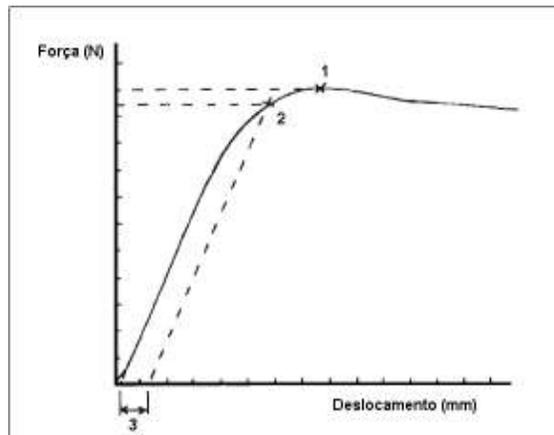


Figura 3.21: Curva teórica para um ensaio de compressão: Curva hipotética de Força versus deformação para ensaios de compressão. Método gráfico para a determinação do limite superior de escoamento (1) e limite convencional de elasticidade (2) para o deslocamento de 2% (3) do comprimento inicial.

Em ensaios mecânicos de compressão, os corpos de prova são dispostos entre duas bases com superfícies paralelas. Estas bases são acopladas às travessas fixa e móvel da máquina de ensaios. Estes ensaios são usados quando se deseja saber o comportamento de um material submetido a deformações grandes e permanentes. (CALLISTER *et al.*, 2009). Nos ensaios de compressão não existe uma tensão final como ocorre nos ensaios de tração pois o material se comprime até a máquina não suportar mais (BERTONI, *et al.*, 2008).

A compressão é um esforço axial que tende a provocar um encurtamento do corpo submetido a este esforço. Nos ensaios de compressão, os corpos de prova são submetidos a uma força axial para dentro, distribuída de modo uniforme em toda a seção transversal do corpo de prova. Esses corpos sofrem uma deformação elástica e em seguida uma deformação plástica (GAETI *et al.*, 2010).

3.6.6 Ângulo de contato

Na maioria das situações, a adesão de microrganismos à superfície sólida é indesejável, pois, de uma maneira geral, está associada à deterioração da superfície e/ou ambiente circundante. Nas ciências médicas, os biofilmes apresentam-se geralmente com um caráter nocivo uma vez que estão associados a um grande número de problemas de saúde, tais como infecções em tecidos, infecções no trato urinário, infecções e consequente rejeição de próteses e implantes. Entre os processos que mais contribuem para o aumento da quantidade do biofilme, tem-se a adesão de células microbianas à superfície sólida, o seu crescimento e reprodução e a adesão de células suspensas ao biofilme (WILCOX *et al.*, 1993; NEOH *et al.*, 2010).

Alguns fatores inerentes à morfologia da superfície do material podem ser determinantes na adesão de bactérias, tais como sua porosidade, composição e rugosidade, hidrofobia e carga superficial. O aumento da rugosidade da superfície tem sido associado com o aumento da retenção microbiana em polímeros como o PMMA uma vez que a o aumento da rugosidade aumenta a área de contato para a adesão bacteriana (PEREIRA *et al.*, 2000).

Para a quantificação das energias envolvidas na adesão de microrganismos a superfícies é necessário determinar as propriedades superficiais das entidades interagentes. As principais propriedades superficiais que química e fisicamente influenciam a adesão são a carga superficial e a hidrofobia. Uma das técnicas utilizadas para medir a hidrofobia é a medição de ângulo de contato. Para a realização desta técnica, os sólidos devem ser planos, lisos e homogêneos.

As características hidrofóbicas e hidrofílicas da superfície de um material podem influir na aderência bacteriana, essas características podem ser rapidamente alteradas por adsorção de proteínas e formação de biofilme. Na maioria dos casos a adesão bacteriana diminui sobre a superfície de um biomaterial com o aumento do ângulo de contato (ZHAO *et al.*, 2007).

O ângulo de contato (ou ângulo de molhabilidade) representa uma medida quantitativa da molhabilidade de um material, sendo definido pela interseção de dois planos tangentes ao líquido, à superfície sólida de contato e uma terceira fase, geralmente, o ar ou vapor d'água, como representado na figura 3.22. Considera-se que, quando $\theta < 30^\circ$, a superfície se molha totalmente pelo líquido. Por outro lado, se $30^\circ < \theta < 90^\circ$, a superfície pode ser tratada como parcialmente molhável. Por último, quando $\theta \geq 90^\circ$, a superfície é hidrofóbica e não se molha pelo líquido (Figura 3.23). Formalmente, o θ entre uma gota de um líquido com uma tensão superficial conhecida e uma superfície sólida depende da relação entre as forças adesivas (da superfície) e as forças coesivas (do líquido) (KARBOWIAK *et al.*, 2010).

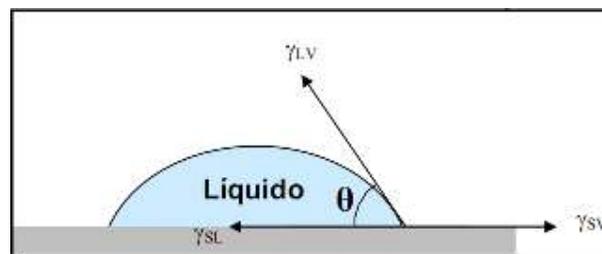


Figura 3.22: Figura representativa do ângulo de contato entre uma gota e dada superfície (Adaptado de HANSEN *et al.*, 2005).

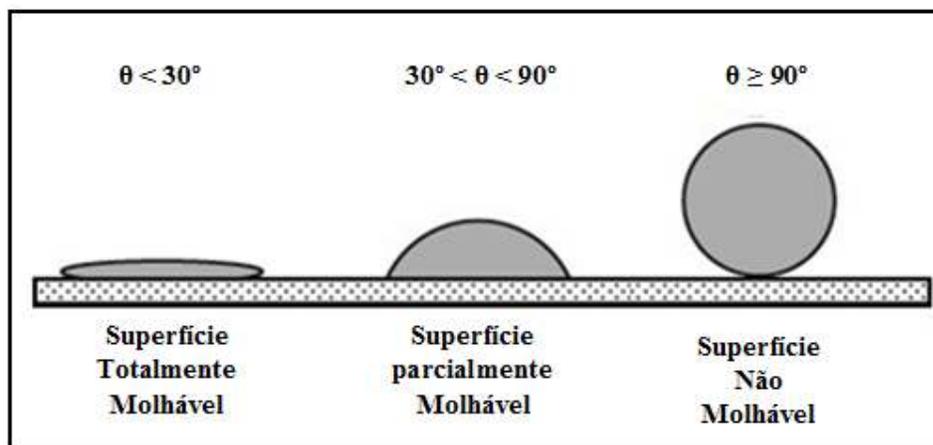


Figura 3.23: Representação da geometria de uma gota sobre uma superfície sólida.

A primeira etapa do processo de bioadesão, caracterizada pelo estágio de contato entre a superfície e o microrganismo, tende a ser maior quanto maior a molhabilidade do material (SRIAMORNSAK *et al.*, 2010). Eventos de molhabilidade na interface sólido/líquido podem ser estudados por medidas do ângulo θ que, por sua vez, pode ser correlacionado à capacidade de adesão de microrganismos ao polímero, já que, quanto mais hidrofílico o material, maior será a possibilidade deste último se molhar e da ocorrência de adesão *in vivo* (KARBOWIAK *et al.*, 2006).

A gota do líquido nem sempre apresenta os mesmos valores de ângulo de contato para o lado direito e esquerdo e, numa situação real, o que se tem é uma faixa de variação de ângulo de contato, ou seja, a falta de simetria nos dois lados da gota proporciona uma alteração no ângulo de contato. Essa variação ocorre entre outros fatores pela rugosidade da superfície, pela não neutralidade elétrica da superfície sobre a qual se depositou a gota do líquido entre outros (VIANA *et al.*, 2002).

O ângulo de contato formado entre a gota de um líquido com uma tensão superficial conhecida e a superfície sólida depende da relação entre as forças adesivas que espalham a gota sobre a superfície e as forças coesivas do líquido que contraem a gota a uma esfera com uma superfície mínima. Se o líquido é polar e a superfície tem grupos polares, a gota tende a se espalhar pelas interações eletrostáticas. Dessa forma, o ângulo de contato formado apresenta um valor pequeno. Porém, se o líquido é polar e a superfície apolar, a tensão superficial do líquido define que a gota não se espalha pela superfície, o que resulta em um valor grande de ângulo de contato. Quanto maior o ângulo de contato formado entre a gota de um líquido e o substrato sólido, menor será sua molhabilidade, diminuindo assim a área de contato entre o líquido e o sólido, ou seja, quando a gota se restringe na superfície por falta de afinidade com esta (superfície hidrofóbica) tem-se um ângulo de contato maior do que a gota espalhada (superfície hidrofílica) (VIANA *et al.*, 2002).

3.7 Teste de Citotoxicidade

Os materiais a serem usados em contato com tecidos humanos devem ser testados com o objetivo de simular reações biológicas e ajudar no entendimento de respostas obtidas. O protocolo MTT é dos mais utilizados para se determinar a citotoxicidade de materiais de diversas naturezas sobre células em cultura. Os testes de citotoxicidade são recomendados para todos os materiais utilizados na área de saúde. Este teste permite uma rápida avaliação e também, devido a sua sensibilidade, permite que materiais tóxicos sejam descartados previamente aos experimentos com animais.

A citotoxicidade é um fenômeno complexo *in vivo*, o qual resulta em um amplo espectro de efeitos, desde a morte celular até aberrações metabólicas, onde ocorrem alterações funcionais ou em alguma via específica. O efeito citotóxico é causado por um irritante primário e as reações podem variar de um eritema à necroses, dependendo da toxicidade do irritante primário, de sua concentração e do tempo de exposição. Testar a citotoxicidade é a primeira etapa para assegurar a biocompatibilidade de um dispositivo médico e pode ser feita através de três tipos de testes: *in vitro*, utilizando-se culturas de células, *in vivo*, utilizando-se experimentos em animais e através de estudos clínicos. Um resultado negativo indicará que o material estará livre de produtos prejudiciais ou que sua quantidade é insuficiente para causar efeitos agudos em células isoladas do corpo. Entretanto, apesar do mérito do teste, não se pode afirmar que o material pode ser considerado biocompatível, uma vez que o teste de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro passo para a análise do material em estudo (COSTA *et al.*, 2005).

O ensaio de MTT (avaliação do metabolismo celular) é um dos mais utilizados para se determinar a citotoxicidade de materiais de diversas naturezas sobre células em cultura. Ao se testar a citotoxicidade, os parâmetros a serem analisados são os tipos de células empregados, a duração da exposição e os métodos de avaliação. Destes, o tipo de célula é o que pode ser o fator mais importante, porque cada função e mecanismo celular são basicamente diferentes (PARK *et al.*, 2002).

A avaliação de citotoxicidade pode ser avaliada através do teste de MTT (3- (4,5 – dimethylthiazol-2-yl) – diphenyl tetrazolium bromide) que é um sal de tetrazolím, solúvel em água e que pode ser utilizado em ensaios quantitativos colorimétricos para avaliar a sobrevivência e a proliferação de células de mamíferos. O ensaio detecta as células vivas e o sinal é dependente do grau de ativação dessas células. Esse método pode, portanto, ser utilizado para medir a citotoxicidade, a proliferação ou a ativação celular (MOSMANN *et al.*, 1983).

O MTT, que possui sua estrutura molecular em forma de anel, é clivado por uma enzima mitocondrial, a desidrogenase succínica, dando origem aos cristais de formazan de coloração violeta e insolúveis. Para que seja possível a leitura do resultado, o produto violeta insolúvel em água deve ser dissolvido em um solvente específico (isopropanol acidificado – HCL 0,04N em isopropanol) e a leitura da intensidade de cor da solução pode ser feita em um leitor de microplacas com um filtro de 570nm. A clivagem do MTT tem várias propriedades desejáveis para a amostragem de sobrevivência e proliferação celular. É clivado por todas as células vivas, metabolicamente ativas, que foram testadas, mas não pelas células mortas ou por eritrócitos. A quantidade de formazan gerado é diretamente proporcional ao número de células. Células ativadas produzem mais Formazan que as células adormecidas (MOSMANN *et al.*, 1983).

4 METODOLOGIA

A partir do objetivo deste trabalho, foi proposto o seguinte fluxograma para a avaliação do cimento ortopédico modificado (Figura 4.1).

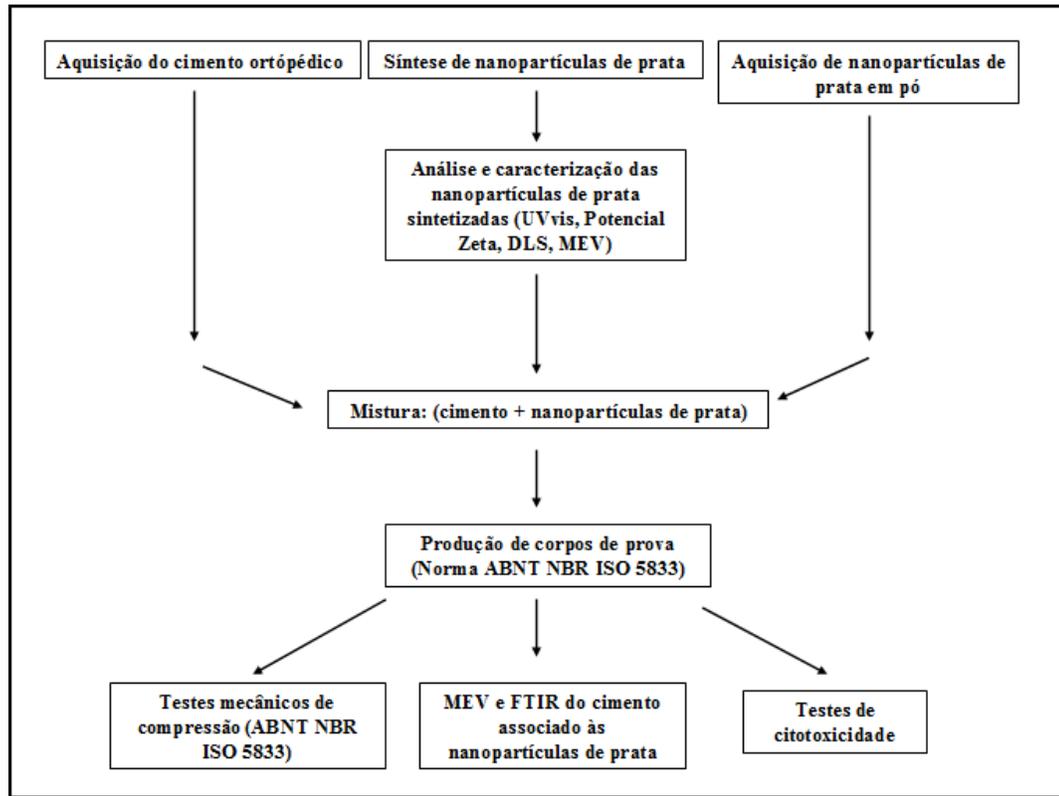


Figura 4.1: Fluxograma para a avaliação do cimento.

4.1 PREPARAÇÃO DO CIMENTO ORTOPÉDICO

A preparação do cimento ortopédico foi realizada segundo as orientações do fabricante (método de mistura manual). O cimento ortopédico foi armazenado à temperatura de 23°C por 24 horas, já que os cimentos são muito sensíveis à temperatura e qualquer temperatura diferente desta pode levar a alterações nos tempos de pré-massa, massa e de trabalho do cimento.

No método de mistura manual, o conteúdo em pó da embalagem de cimento foi transferido para um recipiente de vidro e logo em seguida adicionou-se o componente líquido da embalagem sobre o pó. Foi utilizada a própria espátula que acompanha a embalagem comercial do cimento ortopédico para a realização da mistura. A homogeneização foi feita com movimentos lentos, a fim de evitar a incorporação de bolhas de ar ao produto, que pode prejudicar seu desempenho mecânico. O cimento ortopédico foi misturado durante um intervalo de tempo de 2 a 5 minutos. Mesmo a homogeneização sendo feita de forma lenta, ainda ocorre a incorporação de ar no material e sua viscosidade natural permite que apenas as grandes bolhas migrem para a superfície, deixando um número considerável de bolhas menores que 1mm.

Aproximadamente após 1 minuto do início, a mistura foi verificada cuidadosamente com os dedos com luva cirúrgica isenta de pó e foi observada a formação de fibras entre o cimento e a luva cirúrgica. Repetiu-se o procedimento em intervalos de 15s, expondo uma superfície fresca para cada exame e uma região dos dedos não ensaiada anteriormente. O momento no qual, pela primeira vez, o dedo se separava de forma limpa, não havendo aderência entre a luva e o cimento, era então registrado como o tempo de formação de massa da mistura e a mistura estava pronta para a próxima etapa (confeção dos corpos de prova).

4.2 Confeção dos corpos de prova

Os corpos de prova foram produzidos seguindo a norma ABNT NBR ISO 5833. Tais amostras foram confeccionadas utilizando molde de Nylon com 48 furos no formato cilíndrico para produção de corpos de prova com 12mm de altura e 6mm de diâmetro. Três discos de Nylon foram utilizados e em um deles foram feitos os furos com as dimensões citadas para posterior aplicação do cimento e produção dos corpos de prova. Os outros dois discos eram colocados recobrendo as superfícies do primeiro e então fixados por um sistema composto por parafusos para que o cimento pudesse curar no interior dos orifícios.

A única alteração feita em relação a norma ABNT NBR ISO 5833 foi em relação ao número de orifícios para a produção dos corpos de prova. Enquanto a norma ISO 5833 cita apenas 5 orifícios, foram usados 48 orifícios (NORMA ASTM F451). Desta maneira conseguiu-se uma margem de segurança já que os cilíndricos devem apresentar altura de 12mm e diâmetro de 6mm, com tolerância de $\pm 0,1$ mm para ambas as medidas (Figura 4.2).

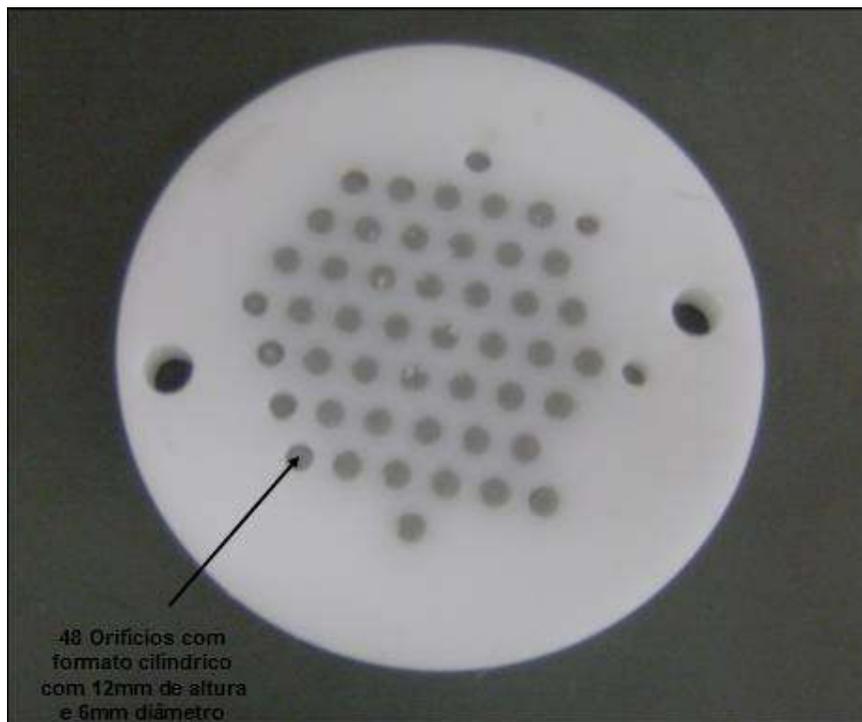


Figura 4.2: Molde de Nylon utilizado para a produção dos corpos de prova para teste mecânico de compressão com 48 furos em formato cilíndrico possuindo 12 mm de altura e 6 mm de diâmetro.

Após a mistura dos componentes do cimento (pó + líquido) e produção da massa os orifícios do molde foram preenchidos com ligeiro excesso de cimento e então as duas placas foram ajustadas sobre as faces superior e inferior do molde e fixadas pelos parafusos. Após aproximadamente 1 hora, foram retiradas as placas das superfícies e ambas as superfícies do molde foram lixadas (lixa de papel grana 400), realizando assim o faceamento das extremidades dos corpos de prova. Terminado este procedimento, os

cilindros de cimento foram sacados do molde por meio de um pino de remoção, identificados e armazenados em frascos plásticos. Decorridas 24 horas após a mistura do cimento, foram medidas a altura e o diâmetro (duas medidas para cada) utilizando um paquímetro digital e calculando em seguida a média aritmética das medidas da altura e do diâmetro.

Foram feitos corpos de prova do cimento ortopédico puro, cimento ortopédico com 5% de solução de nanopartículas de prata (2000 μ l) baseada na massa de polímero (40g), cimento ortopédico com 0,1% de nanopartículas de prata em pó (baseada na massa do polímero), cimento ortopédico com 0,5% de nanopartículas de prata em pó e cimento ortopédico com 2% de nanopartículas de prata em pó (em relação à massa do polímero). As nanopartículas de prata em pó foram adquiridas comercialmente (<100 nm, Sigma Aldrich).

O conteúdo de nanopartículas de prata (sintetizadas em meio aquoso) adicionadas ao total do cimento, assumindo-se o máximo de conversão da prata do nitrato de prata é de aproximadamente 54 μ g. A concentração de nanopartículas de prata da solução é de 27.000 μ g.L⁻¹ referente a um valor de concentração 270 mil vezes maior do que a necessária para combater microrganismos que é de 0,1 μ g.L⁻¹.

Para a produção dos corpos de prova com as nanopartículas de prata em solução adicionou-se a quantidade desejada da solução de nanopartículas sintetizada (com o auxílio de uma pipeta automática) ao componente líquido do cimento ortopédico (metacrilato de metila). Depois disso, seguiram-se todas as recomendações feitas pelo fabricante para a mistura dos componentes, como já citado anteriormente neste trabalho.

Para a produção dos corpos de prova com as nanopartículas de prata em pó, primeiro pesou-se a quantidade desejada de nanopartículas em uma balança eletrônica de

precisão (Bioprecisa). Logo depois as nanopartículas foram colocadas em um gral e maceradas com o auxílio de um pistilo durante 20 minutos com movimentos circulares até que todo o conteúdo ficasse com um aspecto de um pó extremamente fino.

Após estes procedimentos as nanopartículas foram adicionadas ao componente em pó do cimento ortopédico (Figura 4.3) para posterior mistura com o componente líquido seguindo as recomendações do fabricante.

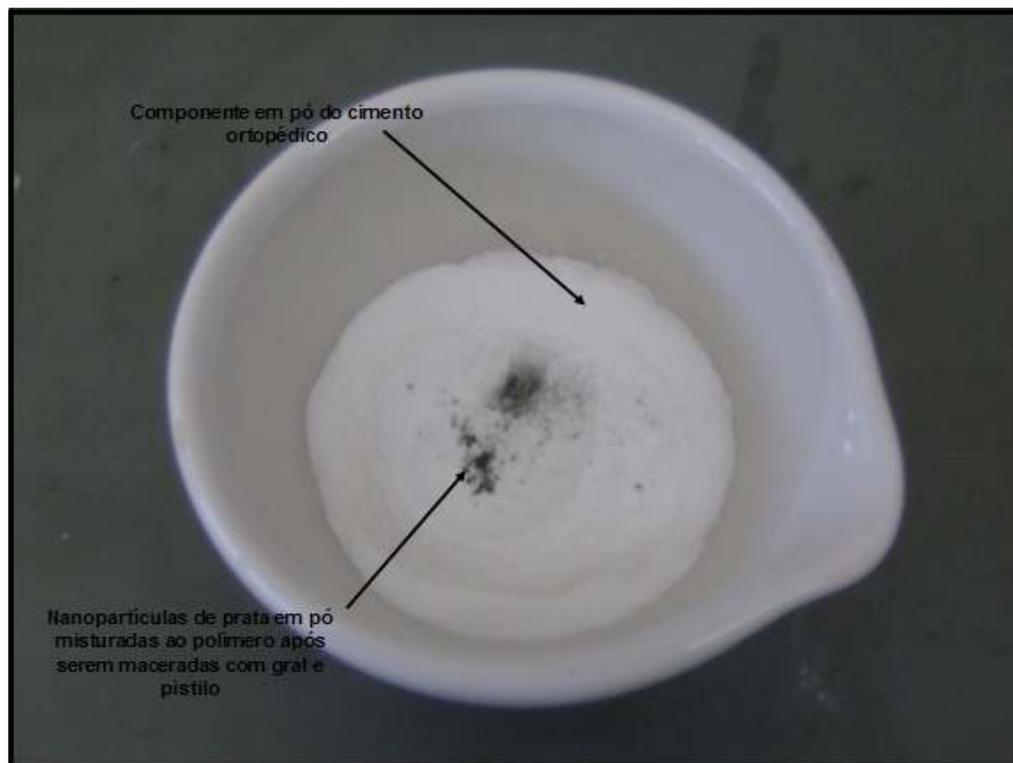


Figura 4.3: Foto mostrando as nanopartículas de prata em pó sendo adicionadas ao componente em pó do cimento ósseo.

4.3 Teste de Resistência à Compressão

De acordo com a norma ABNT NBR ISO 5833, em seu Anexo E, a resistência à compressão é determinada através da aplicação de uma força axial sobre cilindros de cimento polimerizado. Foram ensaiados 05 cilindros de cada amostra de cimento (puro e com as diferentes concentrações de nanopartículas de prata). Os corpos de prova foram colocados em um equipamento para ensaio mecânico de compressão da marca EMIC (Modelo DL3000) mostrado na figura 4.4 e dotado de uma célula de carga de 5000N (Figura 4.5).



Figura 4.4: Máquina para o ensaio de compressão (EMIC – Modelo DL 3000) do Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos – LEPCOM (Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da UFMG)

A velocidade de compressão utilizada no ensaio foi de 20mm/min (entre 19,8 e 25,6 segundo a norma ABNT NBR ISO 5833). Os dados de força, deformação e módulo de elasticidade foram armazenados em um computador e gráficos do tipo tensão versus deformação foram gerados. A norma ABNT NBR ISO 5833 determina que a resistência à compressão média dos 5 cilindros deve ser igual ou superior a 70MPa. O ensaio era

interrompido na ocorrência da ruptura do cilindro ou quando o limite superior de escoamento era ultrapassado.



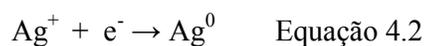
Figura 4.5: Fotografia do aparelho para teste de compressão mostrando em detalhe a célula de carga utilizada.

4.4 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.

Foram sintetizadas soluções coloidais de nanopartículas de prata por meio da redução química de nitrato de prata (AgNO_3) por borohidreto de sódio (NaBH_4) (KIM *et al.*, 2007), segundo a reação (equação 4.1).



Nesta rota de síntese há a redução de íons de prata (Ag^+) para prata metálica (Ag^0) seguida de uma agregação controlada resultando na formação das nanopartículas de prata metálica, segundo a reação (equação 4.2).



A rota seguida constitui-se em uma rota muito simples, uma vez que não exige a utilização de instrumentação cara, mas exige bastante cuidado durante a síntese, principalmente no que se refere ao controle das variáveis envolvidas nesta rota o que pode levar a uma difícil reprodutibilidade.

Inicialmente foram utilizadas concentrações de AgNO_3 e NaBH_4 (agente redutor) ambos nas concentrações de $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$, pois em concentrações maiores foram encontradas maiores dificuldade em se manter o colóide estável. Nestas concentrações, pequenas adições de AgNO_3 gerava o escurecimento da solução coloidal, seguido pela precipitação. Esse fenômeno pôde ser observado imediatamente ou em poucas horas após a síntese.

A concentração inicial dos reagentes tem um papel de extrema importância na estabilidade e concentração final do colóide. Variáveis tais como a temperatura, velocidade de gotejamento, velocidade de agitação, aliados à concentração inicial, determinam a possibilidade de colisão e agregação dos átomos de prata metálica formados. Estas colisões levam à nucleação de partículas cujo tamanho é limitado, *a priori*, por estas mesmas variáveis. A presença de impurezas e a exposição à radiação eletromagnética (luz) induzem um aumento descontrolado das nanopartículas o que desestabiliza totalmente o colóide. (GUINGAB *et al.*, 2007).

Para a síntese da solução coloidal de nanopartículas de prata foram mantidas sob o controle, para maior reprodutibilidade, variáveis importantes como temperatura de síntese, concentração final e inicial de reagentes, velocidade de agitação e velocidade de gotejamento de AgNO_3 (Figura 4.6).

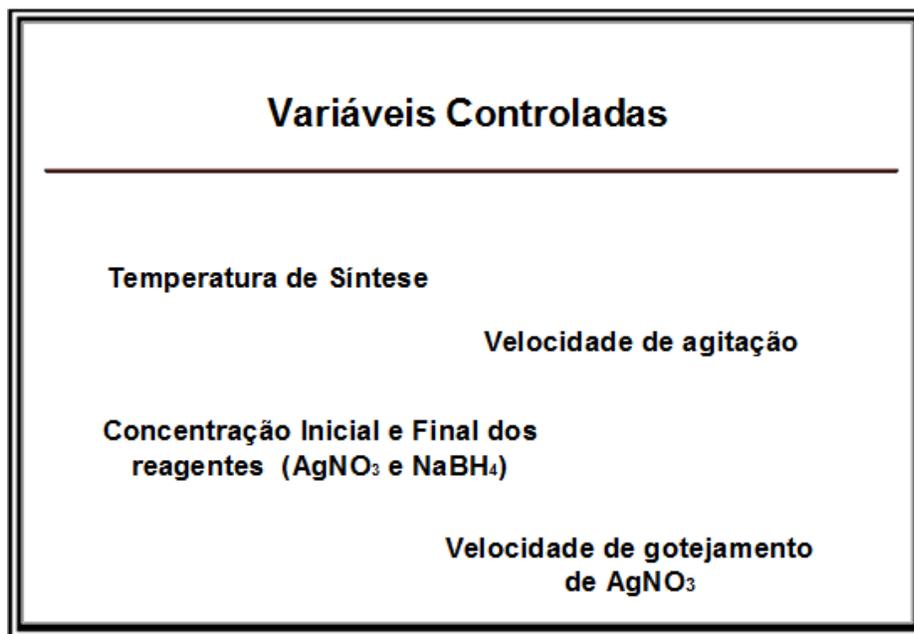


Figura 4.6: Variáveis envolvidas na síntese de nanopartículas de prata por redução química de AgNO₃ por NaBH₄ mantidas sob controle.

Reagentes:

Os reagentes utilizados foram: nitrato de prata - AgNO₃ (Synth), borohidreto de sódio - NaBH₄ (Synth), água deionizada.

O nitrato de prata e o borohidreto de sódio foram armazenados em dessecador para evitar a absorção de água. Também foram utilizados sem novos processos de purificação, ou seja, utilizados da maneira que foram adquiridos. Eles foram envoltos em papel alumínio para minimizar efeitos da exposição à luz e também lacrados com filme de parafina para minimizar ainda mais os efeitos da umidade.

Foram utilizados recipientes de vidro nesta síntese, os quais foram lavados previamente com detergente neutro e depois enxaguados diversas vezes com água deionizada. Foram utilizados, para as medidas de volumes maiores, balões volumétricos e para volumes

menores, pipetadores automáticos com ponteiros descartáveis de polipropileno. Para a pesagem dos reagentes foi utilizada uma balança eletrônica de precisão (Bioprecisa).

Toda a água utilizada nos experimentos foi deionizada com resistividade maior que 18 M Ω .cm.

Síntese:

Foram colocados 85ml da solução aquosa de NaBH₄ a 10⁻³ mol/L em um béquer em banho gelado e levada ao agitador magnético deixando-a em agitação até atingir a temperatura de 5°C. Após atingir esta temperatura iniciou-se o gotejamento de 15ml da solução de AgNO₃ a 10⁻³ mol/L e à temperatura de 5°C, sempre sob agitação. A temperatura do sistema foi mantida constante utilizando-se banho de gelo. Para o monitoramento da temperatura utilizou-se um termômetro de mercúrio graduado de -10°C a 100°C. (Figura 4.7).

O gotejamento da solução de nitrato de prata foi feito por meio de uma seringa plástica descartável de 5ml com a agulha de aço inoxidável acoplada, sem o êmbolo, presa sobre o sistema de agitação permitindo uma velocidade de gotejamento de cerca de 1ml/min. Este sistema, bastante simples, foi muito eficiente para manter a velocidade de gotejamento praticamente constante. A pequena quantidade de solução de AgNO₃ adicionada a cada gota (volume médio: 12 ± 0,4 μ L) facilitou o processo de redução química. Já nas primeiras gotas da solução de nitrato de prata verificou-se uma mudança de cor na solução de borohidreto de sódio de transparente para amarelada. Essa mudança na cor é um indício da formação das nanopartículas de prata (Figura 4.8).

Após o gotejamento dos 15ml da solução de nitrato de prata o sistema foi deixado sob agitação por mais 15 minutos e após esse tempo a agitação foi desligada. Em seguida, o colóide foi retirado do banho gelado e esperou-se atingir a temperatura ambiente.

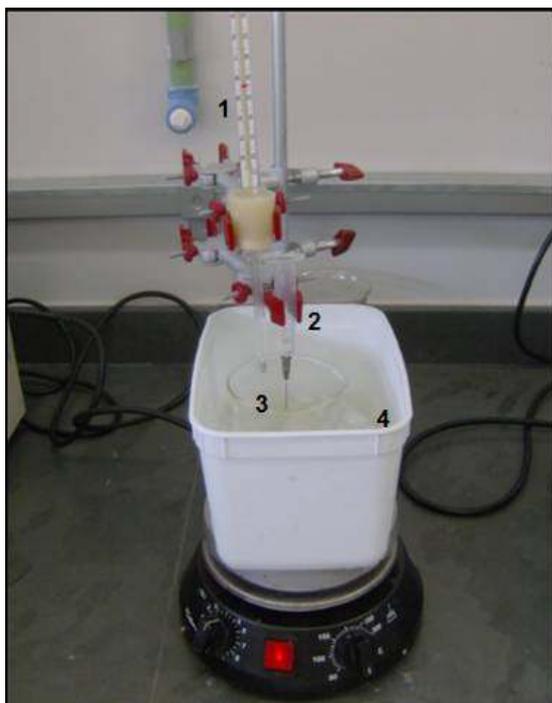


Figura 4.7: Sistema para a síntese das nanopartículas de prata. (1) termômetro, (2) seringa de 5ml sem o êmbolo, (3) bēquer com a solução de Borohidreto de sódio e (4) gelo e água.

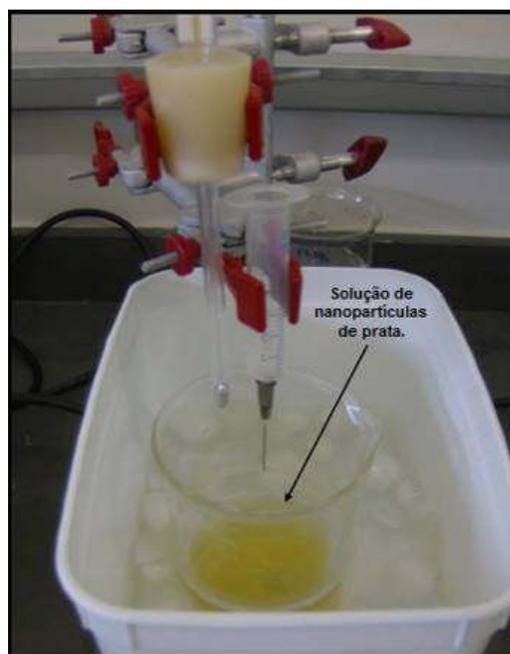


Figura 4.8: Solução de nanopartículas de prata produzida pela redução do nitrato de prata usando como agente redutor o Borohidreto de sódio.

4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram feitas imagens com o microscópio eletrônico de varredura (JEOL, modelo JSM – 6360LV, Thermo Noran) e com microscópio eletrônico de varredura (Quanta 200 – FEG) no Centro de Microscopia da UFMG. A preparação das amostras também foi feita no Centro de Microscopia da UFMG em laboratório para este fim.

Preparo das amostras:

Para as amostras líquidas: amostras das soluções de nanopartículas de prata foram gotejadas em uma placa de silício e deixadas secar à temperatura ambiente. Depois de secas foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura por meio do qual foram formadas imagens das nanopartículas (para as soluções sintetizadas e para as soluções produzidas com nanopartículas de prata adquiridas comercialmente).

Para os corpos de prova: os corpos de prova do cimento ortopédico com formatos cilíndricos e com diferentes concentrações de nanopartículas de prata foram imersos em nitrogênio líquido (-196°C) por três minutos e depois fraturados com a ajuda de dois alicates. Este procedimento foi realizado para que a superfície interna do material fosse observada.

Após a fratura criogênica, as amostras foram fixadas em staves com fita adesiva de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro (5nm) com auxílio de um aparelho de metalização de superfície (Marca BAL-TEC, modelo MCS 010) e colocadas em placas de silício (Figuras 4.9 e 4.10).



Figura 4.9: Aparelho para metalização de superfície (BAL-TEC MCS 010)



Figura 4.10: Amostras do cimento ortopédico recobertas com fina camada de ouro e colocadas em placas de silício para posterior observação no Microscópio Eletrônico de Varredura.

4.6 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta

Foram feitas análises de tamanho e distribuição de partículas com o aparelho de espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) do Departamento de Química da UFMG.

Para as medidas de DLS não foi realizado nenhum processo após a produção da solução de nanopartículas de prata, como por exemplo, a centrifugação para a separação das nanopartículas maiores das menores, ou a utilização de ultra-som para provocar a desaglomeração de possíveis aglomerados de nanopartículas.

Para a medida de tamanho das partículas, utilizou-se cubetas de poliestireno que acompanham o equipamento.

As amostras foram analisadas três vezes e os dados obtidos foram integrados por meio de um software gerando um gráfico porcentagem versus diâmetro.

Para as medidas de Potencial Zeta foi utilizado o aparelho de Potencial Zeta do Departamento de Engenharia de Minas da UFMG. A cela do aparelho foi devidamente limpa com água e sabão e a solução de nanopartículas foi colocada no interior da mesma. Foram utilizados os parâmetros da tabela 4.1, a seguir:

Tabela 4.1: Parâmetros utilizados no aparelho para medição do Potencial Zeta.

Parâmetros Utilizados	
Voltagem	50V
Intensidade da Luz	Alta
Escala	1/4
Número de partículas	10

Para cada amostra foram realizadas 10 medidas e o próprio aparelho calculou a média e o desvio padrão nos diferentes pH do valor do Potencial Zeta.

4.7 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A caracterização por espectroscopia de infravermelho aconteceu na região do infravermelho médio com número de onda entre 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} utilizando-se o aparelho Spectrometer Spectrum 1000 da marca Perkin Elmer.

Para a realização da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) os corpos de prova de cimento ortopédico puro e com diferentes concentrações de nanopartículas de prata foram fracionados com a utilização de um ralador de aço inoxidável e posteriormente foram feitas pastilhas utilizando KBr.

Etapas da preparação das pastilhas.

- 1) 0,2 g de KBr foram pesados em uma balança eletrônica de precisão (Bioprecisa).
- 2) 0,002 g de pó de cimento ortopédico foram pesados, correspondendo a 1% da quantidade de KBr utilizada.
- 3) O pó do cimento ortopédico foi misturado com o KBr e a mistura colocada num molde que posteriormente foi levado para uma prensa hidráulica, o molde foi pressionado durante 1-5 minutos para a produção da pastilha. Aplicou-se uma pressão em torno de 8 toneladas.
- 4) O molde foi desmontado e retirada a pastilha de KBr, evitando sua quebra e colocando-a imediatamente no suporte de pastilha.

4.8 Ultra Violeta Visível (UV-vis)

Foi utilizada a técnica de espectroscopia na região do ultra-violeta visível com o Espectrofotômetro UV-Vis Lambda, fabricado pela Perkin Elmer, no Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da UFMG.

Este aparelho pode realizar medidas de absorção óptica na faixa de 190 e 1100nm. O equipamento utiliza duas cubetas, uma de referência (contendo água deionizada) e outra para análise das amostras (solução coloidal). Neste trabalho foram utilizadas duas cubetas de quartzo de caminho óptico de 10mm.

Em todos os experimentos de absorção óptica, a linha base foi realizada utilizando água deionizada, por tratar-se do solvente utilizado. Desta forma, nos espectros obtidos já estão desconsiderados os efeitos da absorção da água.

Para a realização das medidas de UV-Vis fez-se a diluição de 1:2 (nanopartículas:água deionizada), à temperatura ambiente.

4.9 Ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato foram feitas no Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos (LEPCOM) do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais, utilizando-se o Goniômetro Digidrop. As medidas foram realizadas pela adição de uma gota de água na superfície das diferentes amostras constituídas de cimento ortopédico puro, cimento ortopédico com solução de nanopartículas de prata, cimento ortopédico com 0,1% de nanopartículas de prata em pó e cimento ortopédico com 2% de nanopartículas de prata em pó.

As superfícies utilizadas para a realização da aferição do ângulo de contato foram produzidas em moldes de Nylon que possuíam uma superfície plana e tomou-se o

cuidado de utilizar luvas para seu preparo evitando a contaminação com gordura e outros contaminantes.

Após a mistura dos componentes sólido e líquido do cimento ortopédico e as devidas concentrações de nanopartículas de prata, os moldes que possuíam dimensões aproximadas de 120mm X 100mm X 30mm, foram preenchidos e após 2 horas as amostras foram retiradas e levadas para o goniômetro.

As amostras foram colocadas separadamente no suporte do aparelho adaptado para este fim e foi gotejada uma gota de água deionizada por meio de um dispositivo do aparelho. A queda da gota foi realizada com cuidado, sem mover a agulha em torno da mesma, para evitar distorções que falseiam os resultados. A determinação do ângulo formado sobre a superfície foi feita imediatamente após a colocação da gota e as medições foram realizadas pelo próprio aparelho por meio de um sistema de análise de imagem que permite captar as imagens utilizando-se de uma câmera e digitalizando-as em um computador acoplado ao aparelho (Figura 4.11)

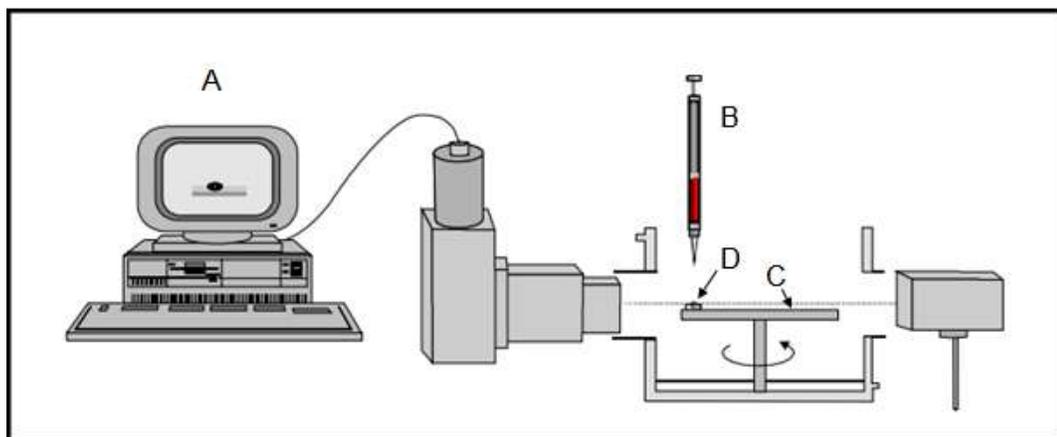


Figura 4.11: Esquema representativo do aparelho utilizado para a aferição do ângulo de contato entre a gota e a superfícies das amostras (A: Computador, B: Dispositivo para liberar a gota de água, C: Suporte onde são colocadas as amostras, D: Amostra).

Todas as medições foram feitas à temperatura ambiente utilizando a água deionizada como líquido e as medidas de ângulo de contato foram feitas em ambos os lados da gota (lado direito e lado esquerdo) e calculado o seu valor médio. Foram feitas três medições para cada amostra (n=3) calculando-se a média e o desvio padrão das mesmas.

4.10 Teste de citotoxicidade

Animais. Ratos Wistar (6-8 semanas de idade, 220 a 250 g) obtidos a partir do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO) foram utilizados para todos os estudos. Os animais foram mantidos em dieta padrão e alojados em um ciclo de 12 horas claro-escuro. O estudo está em conformidade com o Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório publicado pelo 'National Institute of Health' dos EUA (NIH publicação n ° 85-23, revista em 1996). Este procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais da UFMG.

Isolamento e cultura de osteoblastos. Foram extraídos osteoblastos de calvária de ratos neonatos Wistar. Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e suas calvárias foram retiradas e cortadas em pedaços de 2mm/2 mm. Depois foram imersos em 4mL de solução digestiva contendo: 2mg/mL de collagenase tipo II (Gibco-Invitrogen Corporation, NY, USA), 0,25% de tripsina (DIFCO Laboratories, MI, USA) em 20mL de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL, NY, USA) por 30 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida foram feitas mais três digestões de 20 minutos cada, em estufa nas mesmas condições citadas anteriormente. A primeira digestão foi descartada e foram criadas assim três populações celulares. As células foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura celular utilizado foi o DMEM com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL, NY, USA) complementado com 1% de PSA (Penicilina, Estreptolisina e Antimicótico) (Gibco BRL, NY, USA). A partir desse ponto quando atingiram confluências de 90% foram tripsinizados e repicados criando assim várias passagens. Os experimentos foram feitos em células da terceira passagem.

Ensaio de citotoxicidade por MTT. Os osteoblastos da terceira passagem foram tripsinizados e plaqueados (1×10^3 células/mm³ por poço) em placas de 96 poços. As populações celulares foram normalizadas com meio sem soro durante 24 horas. Após esse período, o meio foi aspirado e trocado por meio contendo soro fetal bovino (SFB). Foi utilizado 10mg/mL de cada amostra de biomaterial. Foram utilizados controles com células e meio DMEM com 10% de SFB e controles com células e meio DMEM sem SFB. Como controle positivo foi usado PBS (2x) e como controle negativo lascas de eppendorf (polipropileno) (10mg/mL). O método de esterilização foi radiação ultravioleta. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (n=3). Após 24 horas todo o meio foi aspirado sendo colocado 70µL de meio de cultura com soro em cada poço. Foram acrescentados 50µL de MTT (5mg/mL; SIGMA-ALDRICH, USA) em cada poço e incubadas por 4 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida foram colocados 50µL de solução de isopropanol/ 4% HCL. Após 10 minutos foram retirados 100µL de cada poço e transferidos para outra placa de 96 poços plana e a quantificação foi feita em espectrofotômetro (ADAP 1.6, Anthos Labtec Instruments) com filtro de 595nm (análise estatística- t test/ GraphPad Prism).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens feitas pela Microscopia Eletrônica de Varredura (Figuras 5.1 e 5.2) evidenciaram a existência de nanopartículas em formato esférico para a solução sintetizada utilizando o borohidreto de sódio como agente redutor. As imagens obtidas permitem notar uma variação no tamanho das nanopartículas entre 20 e 40nm de diâmetro.

A Figura 5.3 mostra imagem de nanopartículas de prata obtidas comercialmente na forma de pó. Pode-se perceber uma grande aglomeração destas nanopartículas possivelmente ocorrida durante a preparação das amostras para a microscopia eletrônica. As nanopartículas de prata da Figura 5.3 se mostram irregulares e com dimensões que variam entre 30nm e 120nm de diâmetro.

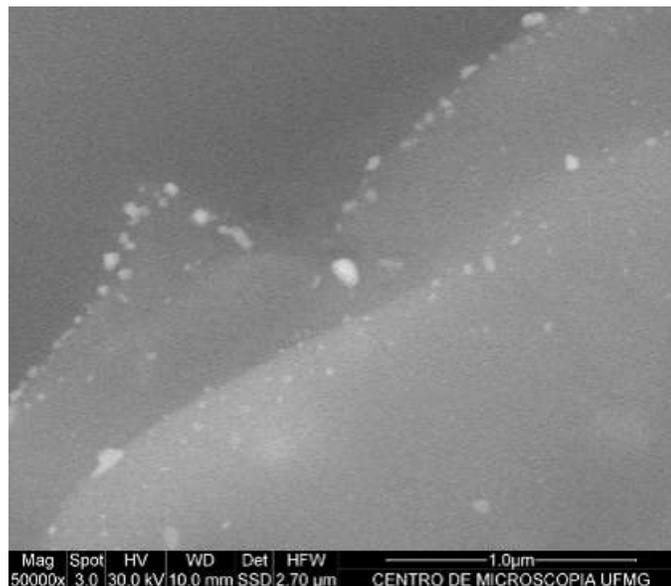


Figura 5.1: Imagem das nanopartículas de prata sintetizadas (solução gotejada na placa de silício e seca).

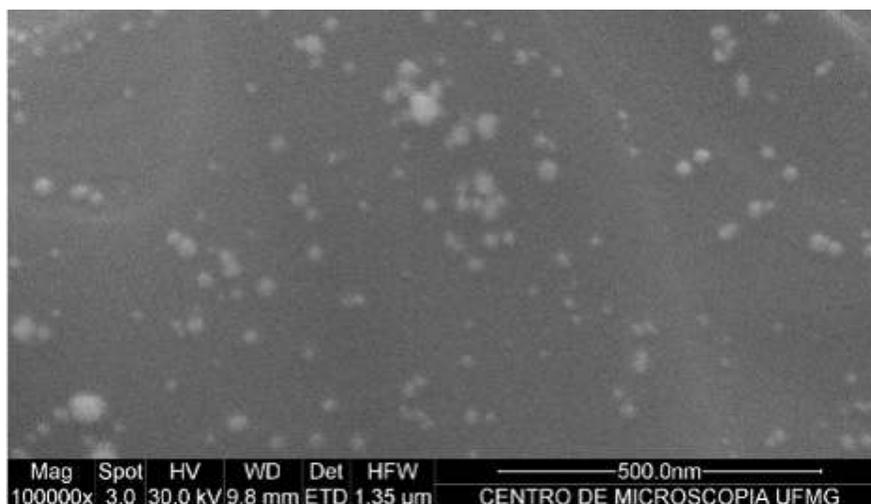


Figura 5.2: Imagem das nanopartículas de prata sintetizadas (Solução gotejada na placa de silício e seca).

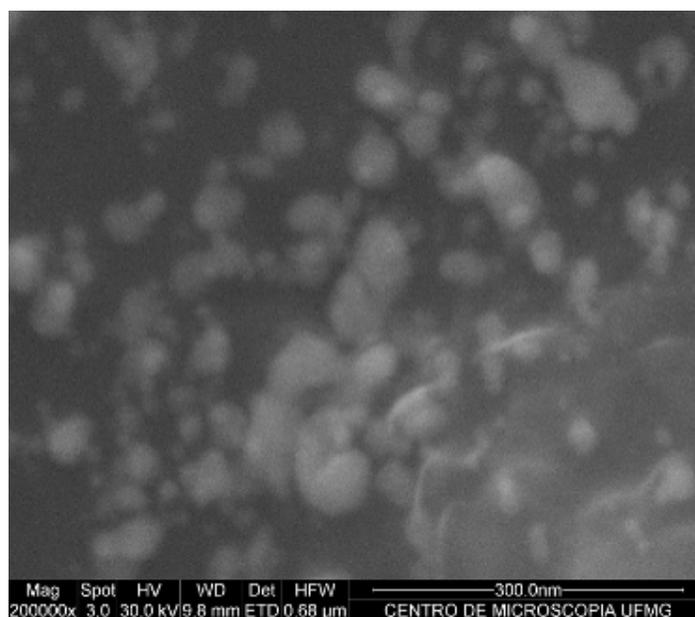


Figura 5.3: Imagem das nanopartículas de prata adquiridas comercialmente e em solução aquosa. A solução foi gotejada na placa de silício, seca em temperatura ambiente e levada ao MEV.

As imagens da superfície da fratura dos cimentos contendo ou não nanopartículas de prata são mostradas na Figura 5.4 e evidenciam a existência de poros no material oriundos da incorporação de ar neste. A Figura 5.5, que reporta a imagem da superfície de cimentos produzidos, também denota a presença de bolhas de ar. A figura 5.6 mostra a superfície do cimento ortopédico puro. As figuras 5.7 e 5.8 mostram superfícies internas e externas do corpo de prova feito com cimento ortopédico associado a 0,5% de nanopartículas de prata em pó. Na figura 5.9 é mostrada a superfície externa do corpo de prova de cimento ortopédico com nanopartículas de prata sintetizadas.

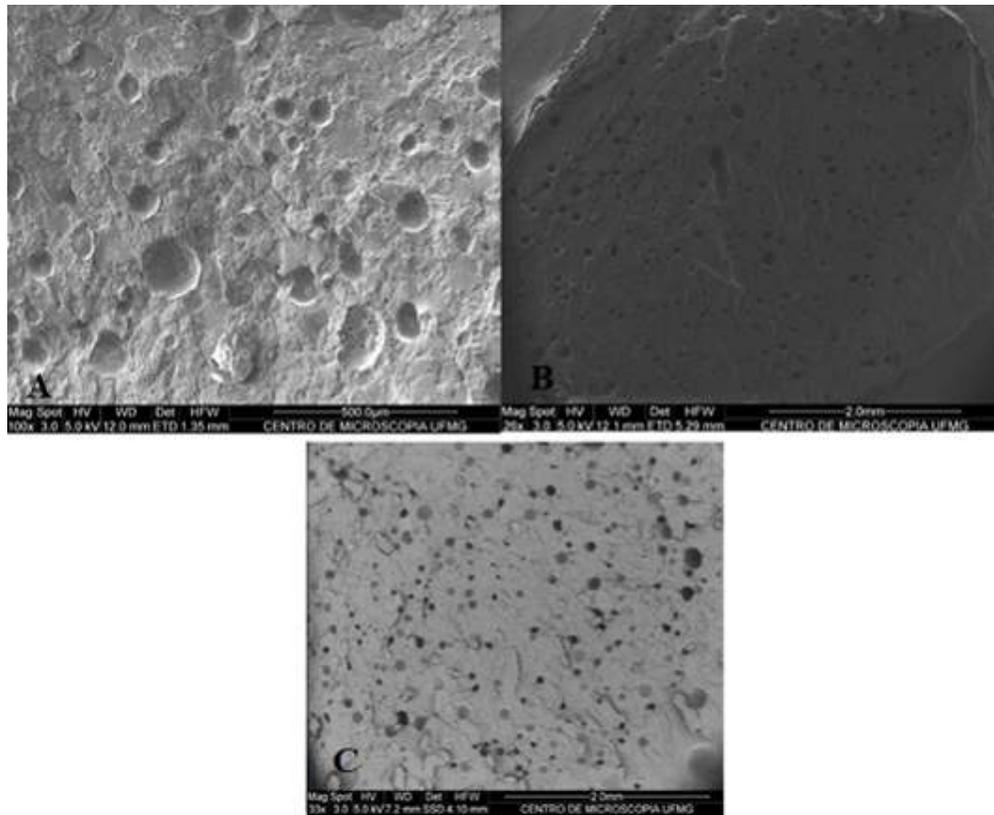


Figura 5.4: (A) Imagem da superfície interna após fratura criogênica do corpo de prova de cimento puro. (B) Imagem da superfície interna após a fratura criogênica de cimento com 2% de nanopartículas de prata em pó. (C) imagem da fratura interna do corpo de prova de cimento ortopédico com solução sintetizada de nanopartículas de prata. A, B e C mostram os poros existentes no cimento ortopédico formados devido ao aprisionamento de ar durante o processo de mistura dos componentes sólido e líquido.

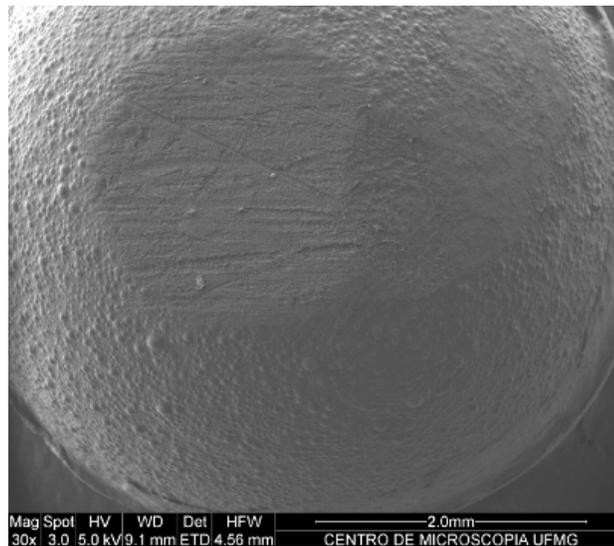


Figura 5.5: Imagem da superfície externa do corpo de prova de cimento ortopédico puro. Pode-se perceber a existência de uma rugosidade na superfície devido à presença de bolhas de ar que foram formadas durante a mistura do componente em pó e do componente líquido para a produção do corpo de prova.

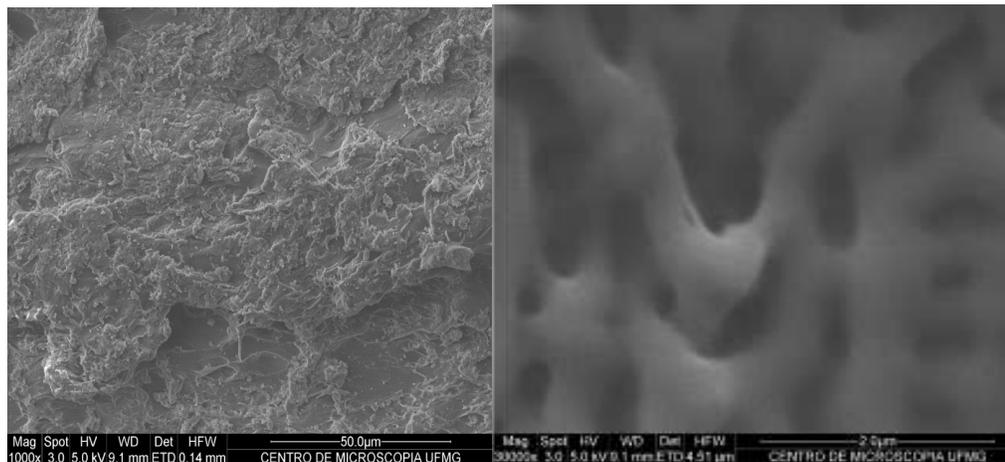


Figura 5.6: Imagens por MEV da superfície externa do cimento ortopédico puro.

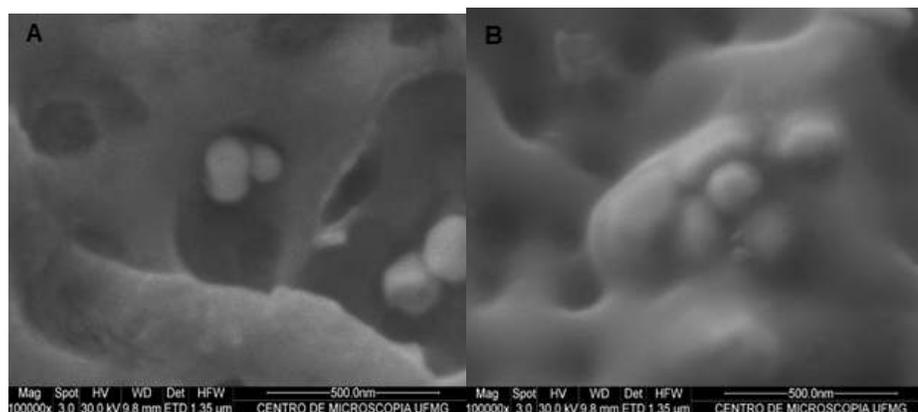


Figura 5.7: (A) Superfície interna da fratura do corpo de prova feito com cimento ortopédico com 0,5% de nanopartículas de prata em pó, em (B) a superfície externa do mesmo corpo de prova.

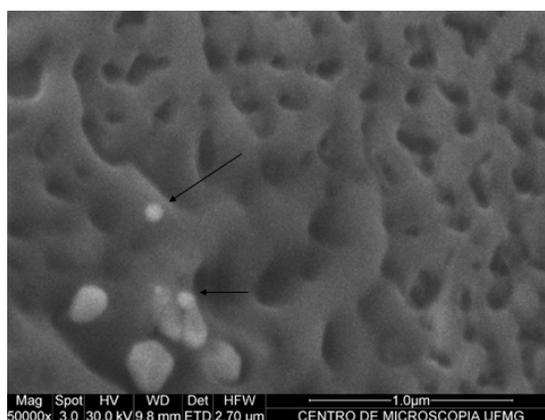


Figura 5.8: Superfície externa do cimento associado às nanopartículas de prata sintetizadas.

5.2 Caracterização por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta.

Com a realização da técnica de espalhamento dinâmico de Luz (DLS) foi gerado o gráfico porcentagem versus tamanho das nanopartículas de prata produzidas pela redução do nitrato de prata na solução aquosa. O gráfico evidencia a presença de um

grande número de nanopartículas de prata entre 20nm e 30nm de diâmetro, perfazendo 57,43% do total de nanopartículas presentes conforme a Figura 5.9 e a Tabela 5.1.

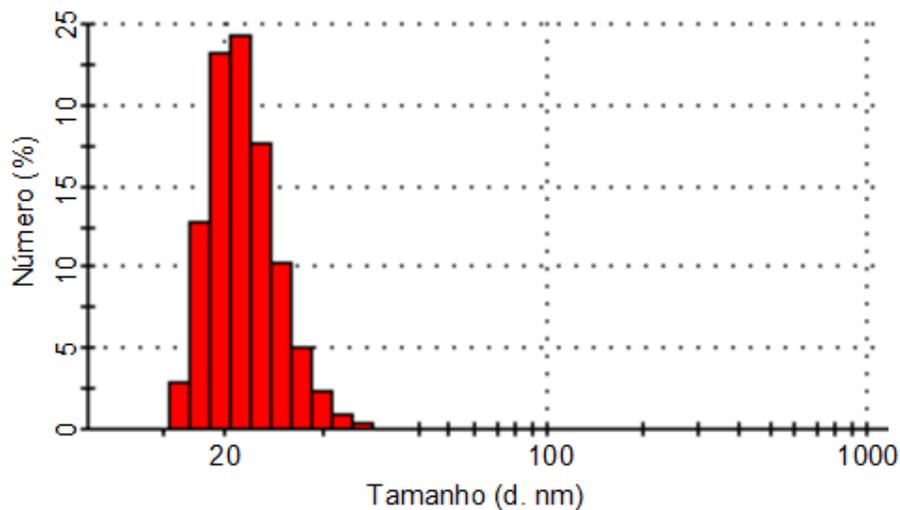


Figura 5.9: Gráfico da porcentagem versus tamanho (em nm) das nanopartículas de prata presentes na solução.

TABELA DLS	
Tamanho (d.nm)	Porcentagem(%)
17,19	2,90
18,33	12,70
19,64	23,22
21,17	24,23
22,94	17,70
24,99	10,30
27,36	5,20
30,10	2,40
33,28	0,95
36,96	0,40

Tabela 5.1: Porcentagem dos diferentes tamanhos de nanopartículas de prata presentes na solução.

Já na análise de potencial Zeta foram obtidos os valores reportados na Tabela 5.2 para a solução de nanopartículas de prata (preparadas via redução de nitrato de prata) avaliada em diferentes pH.

Tabela 5.2: Tabela relacionando os valores de pH, Média de Potencial Zeta (mV) , número de partículas avaliadas (n) e o valor de desvio padrão (DP).

pH	Média do Potencial Zeta	n	DP
2	-38,6	10	2,11
4	-39,3	10	2,00
6	-41,0	10	2,32
8	-37,8	10	2,20
10	-38,5	10	2,50
12	-39,6	10	2,27

Todas as partículas em suspensão possuem um valor de Potencial Zeta, e com o conhecimento deste, é possível caracterizar se um colóide é estável ou não. A estabilidade total de um colóide vai depender de seu potencial total, que é a soma do potencial devido ao solvente, do potencial atrativo e do potencial repulsivo. Para não ocorrer o fenômeno de aglomeração o potencial repulsivo deve ser maior que o potencial atrativo.

A partir dos dados obtidos gerou-se um gráfico (Figura 5.10) de Potencial Zeta versus pH. Por meio do gráfico pode-se observar que o valor do Potencial Zeta das soluções de nanopartículas de prata está entre -37,8mV e -41,0mV. Pode-se afirmar, a partir desses resultados, a estabilidade das nanopartículas de prata mesmo com a variação de pH. Ou seja, o Potencial Zeta das nanopartículas encontra-se fora da faixa de +30mV a -30mV, em que os colóides são considerados instáveis.

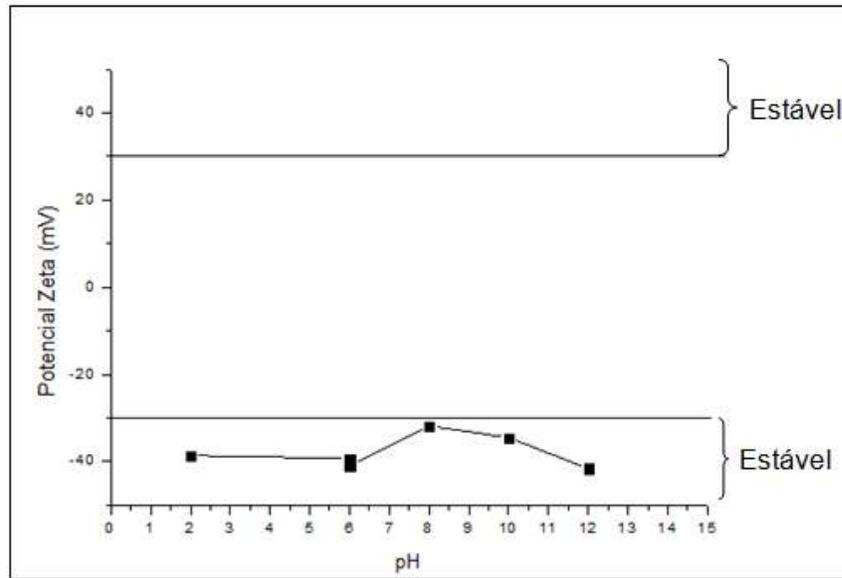


Figura 5.10: Gráfico gerado a partir dos dados obtidos pela técnica de Potencial Zeta.

5.3 Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

A Figura 5.11 mostra espectros de FTIR obtidos de cimentos contendo nanopartículas de prata. Nestes espectros pode-se notar as principais bandas de absorção relativas ao poli(metacrilato de metila) que é a base do cimento ósseo: banda em 2948cm^{-1} (C–H), banda em 1725cm^{-1} (C=O), banda em 1440cm^{-1} (CH_2), banda em 1148cm^{-1} (C–O–C). A ausência da banda em 1630cm^{-1} evidencia que ocorreu conversão das ligações duplas C=C durante a polimerização.

Como os espectros de FTIR obtidos dos nanocompósitos são muito parecidos com o espectro do cimento puro, pode-se afirmar que não há evidências de interações químicas entre as nanopartículas de prata e o cimento ósseo (como formação de ligações de hidrogênio entre a carbonila do metacrilato e as nanopartículas de prata).

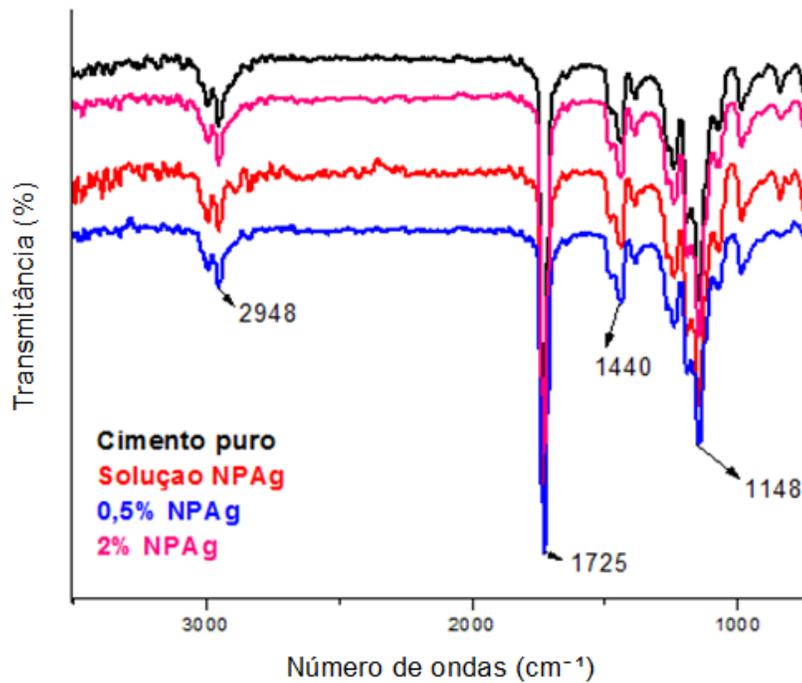


Figura 5.11: Espectros de FTIR do cimento ósseo puro e associado às nanopartículas de prata: banda em 2948cm^{-1} (C-H), banda em 1725cm^{-1} (C=O), banda em 1440cm^{-1} (CH_2), banda em 1148cm^{-1} (C-O-C) (TORRES *et al.*, 2010).

5.4 Caracterização por Espectroscopia na região do Ultravioleta Visível (UV-Vis)

Os resultados de espectroscopia UV-vis da solução de nanopartículas de prata sintetizada via redução por borohidreto de sódio mostram que há apenas um único pico de absorção óptica em torno de 390 nm, devido às oscilações coletivas dos plasmons superficiais, isto é, oscilações coletivas dos elétrons da banda de condução dos átomos constituintes das nanopartículas, induzidas pela luz incidente. O pico único (Figura 5.12) indica que as nanopartículas produzidas possuem geometria próxima da esférica, fazendo com que haja apenas um modo de oscilação dos plasmons superficiais (GUINGAB *et al.*, 2007). A análise por UV-Vis evidencia a formação de nanopartículas

de prata em formato esférico condizente com os resultados encontrados na técnica de MEV.

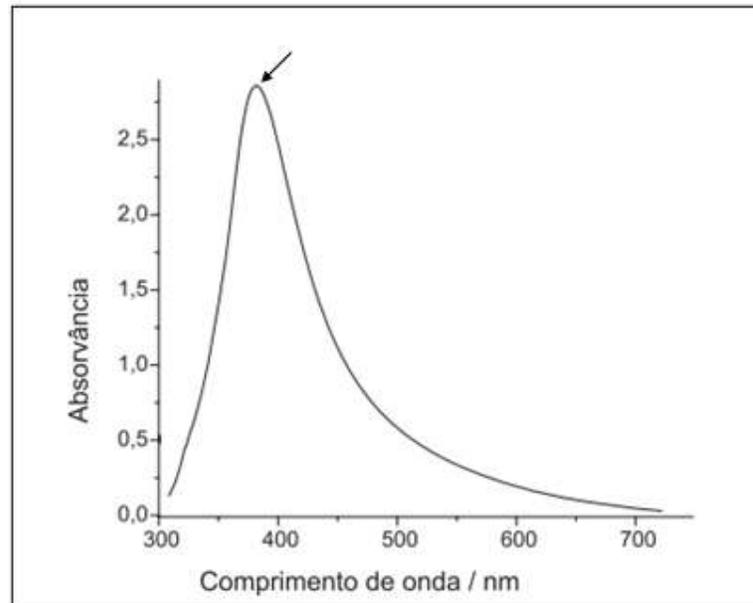


Figura 5.12: Espectro de absorção do UV-Vis da solução de nanopartículas de prata sintetizada via redução de AgNO_3 por NaBH_4 . A figura mostra o comprimento de onda da banda de absorção do plasmon por volta de 390nm.

5.5 Resistência à Compressão

As curvas Tensão versus Deformação dos diversos cimentos ósseos modificados com nanopartículas de prata são mostradas nas figuras 5.13, 5.14, 5.15, 5.16 e 5.17. A partir da análise dos resultados, pode-se afirmar que os cimentos ortopédicos modificados com as diferentes concentrações de nanopartículas de prata apresentam valores médios de resistência à compressão (tensão máxima suportada pelas amostras) superiores a 70MPa. Tais valores são considerados pela norma ABNT NBR ISO 5833 satisfatórios e viabilizam o uso dos cimentos ósseos modificados por nanopartículas de prata em aplicações ortopédicas no que diz respeito a propriedades mecânicas.

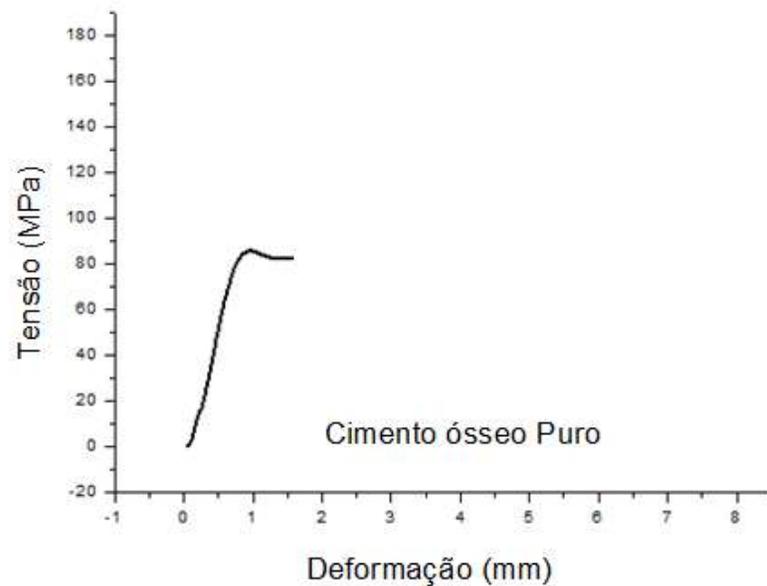


Figura 5.13: Gráfico Tensão versus Deformação do cimento ósseo puro (média de cinco corpos de prova testados conforme relata a Norma ABNT NBR ISO 5833). O gráfico evidencia a Tensão máxima em torno de 89,8MPa. (Desvio Padrão = 2,11).

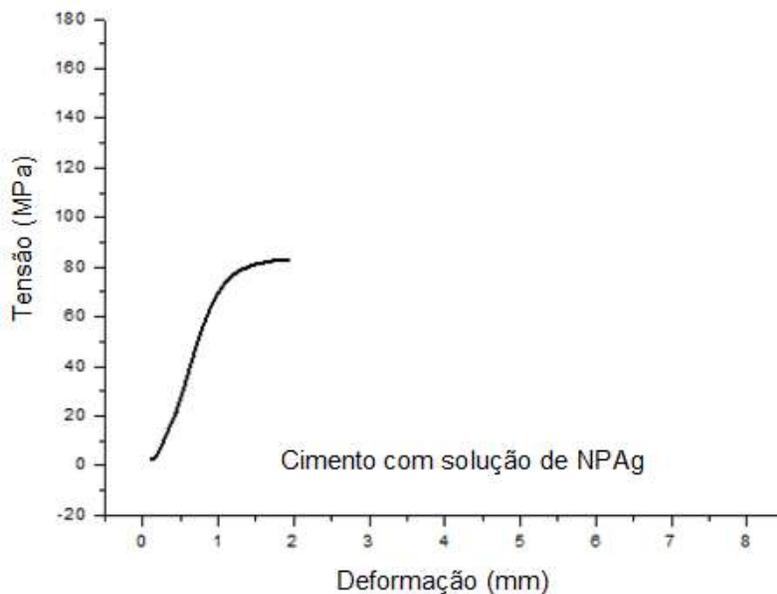


Figura 5.14: Gráfico Tensão versus Deformação do cimento ósseo com a solução de nanopartículas de prata produzida (5% de solução baseada na massa de polímero = 2000 μ L). A tensão máxima de compressão está em torno de 81,3MPa. (DP=2,30)

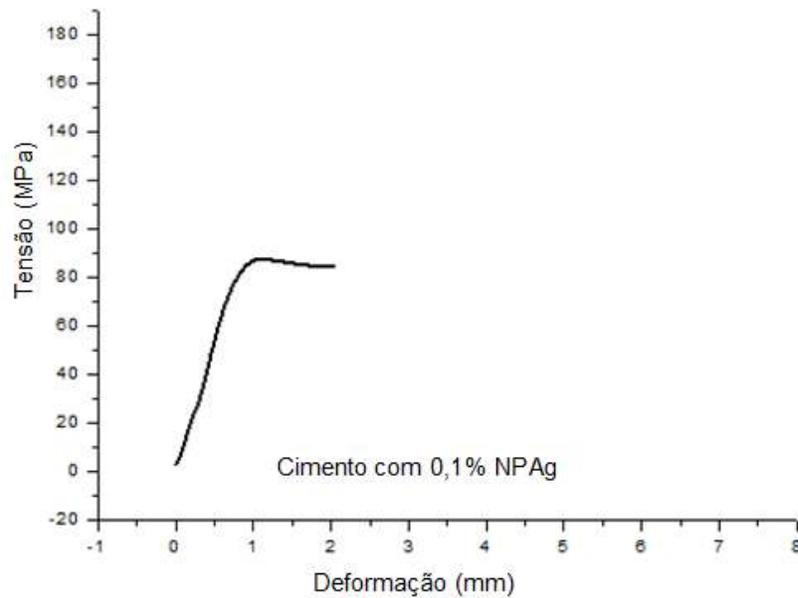


Figura 5.15: Gráfico da Tensão versus Deformação do cimento ósseo com 0,1% de nanopartículas de prata em pó (média dos resultados de cinco corpos de prova testados). A tensão máxima de resistência à compressão está em torno de 91,3MPa. (DP= 2,42)

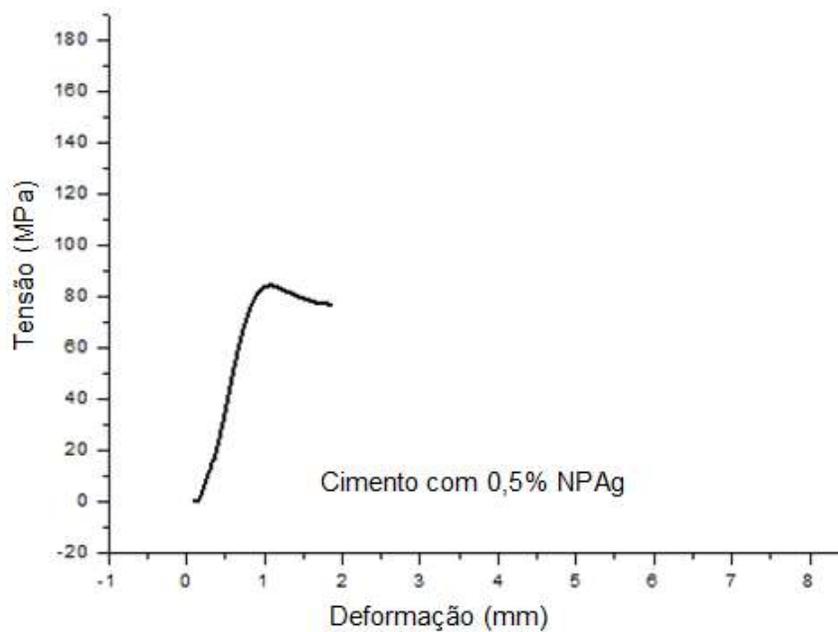


Figura 5.16: Gráfico da Tensão versus Deformação do cimento ósseo com 0,5% de nanopartículas de prata em pó (média dos valores de cinco corpos de prova testados DP= 2,37). A Tensão máxima de resistência é 88,4MPa.

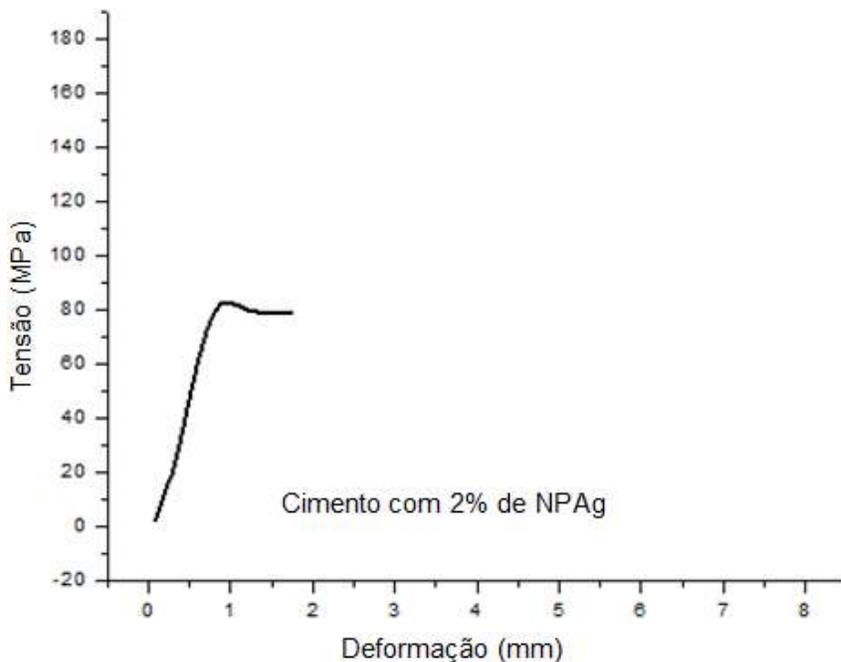


Figura 5.17: Gráfico da Tensão versus Deformação do cimento ósseo associado a 2% de nanopartículas de prata em pó (média de cinco corpos de prova testados). A Tensão máxima de resistência à compressão neste caso está em torno de 86,2MPa. (DP=2,83)

5.6 Ângulo de contato

A Tabela 5.3 e Figura 5.18 mostram os resultados da avaliação do ângulo de contato das amostras de cimento ósseo contendo nanopartículas de prata. O ângulo esquerdo é representado por E e o ângulo direito é representado por D.

Tabela 5.3: Valores obtidos para a média dos ângulos de contato (n=3).

AMOSTRA	ÂNGULO DE CONTATO (°)			Desvio Padrão
	Ângulo E	Ângulo D	Média	
Cimento Puro	55,6	55,2	55,4	2,01
Cimento com solução de NPAg	77,4	76,8	77,1	1,55
Cimento com 0,1% de NPAg em pó	60,0	61,4	60,7	1,41
Cimento com 2% de NPAg em pó	67,0	67,2	67,1	1,60

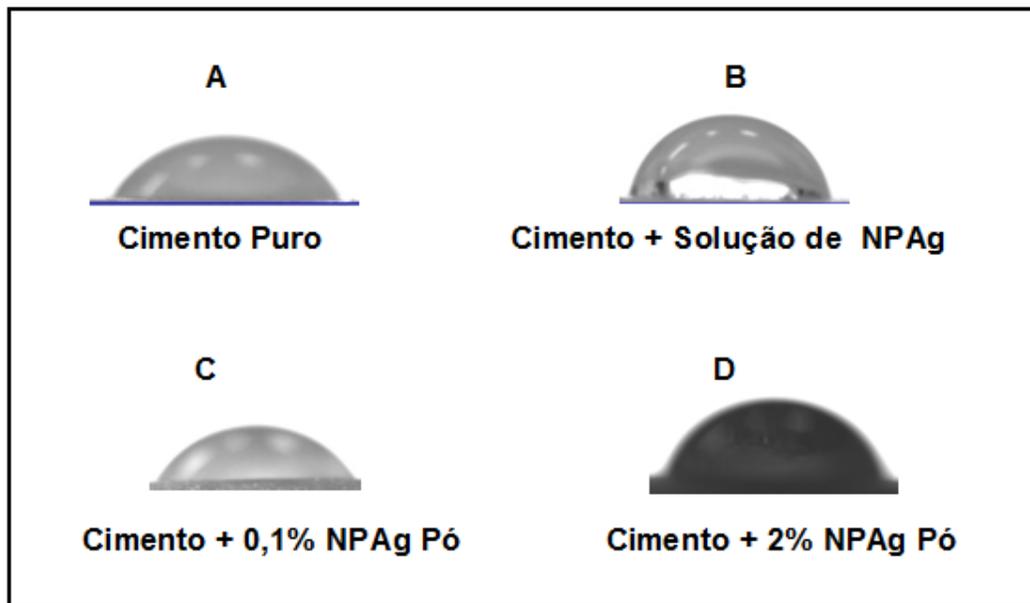


Figura 5.18: Comportamento da gota de água sobre superfícies produzidas a partir do Cimento Ósseo.

Pelos resultados obtidos pode-se perceber que os valores dos ângulos de contato aumentaram com a adição das nanopartículas de prata tanto em solução aquosa quanto em pó. Tal resultado se deve ao fato das nanopartículas serem intrinsecamente hidrofóbicas e agregar este caráter no cimento. A hidrofobicidade é uma das propriedades mais importantes envolvidas no fenômeno de adesão bacteriana e, na maioria dos casos, a adesão bacteriana diminui sobre a superfície com o aumento do ângulo de contato. Desta forma, os valores de ângulo de contato encontrados sugerem que o material possui uma tendência menor para a adesão bacteriana e posterior formação de biofilme. O aumento da hidrofobicidade do material poderá ainda contribuir para uma menor absorção de água na cura do cimento *in vivo* favorecendo suas propriedades mecânicas.

5.7 Teste de Citotoxicidade

O ensaio de MTT analisa quantitativamente a redução do sal de tetrazolium (MTT) pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase presente nas mitocôndrias com a formação de um produto final de cristais de formazan que são mensurados em espectrofotômetro a 595nm. Esse ensaio é usado especificamente para a funcionalidade mitocondrial e avalia a toxicidade do material através da viabilidade celular. Os osteoblastos quando em contato com as amostras 1, 2, 3, 4 ou 5 não apresentaram diferença estatística da viabilidade celular quando comparadas com o grupo controle (células em meio DMEM com SFB) após 24 horas (Figura 5.19).

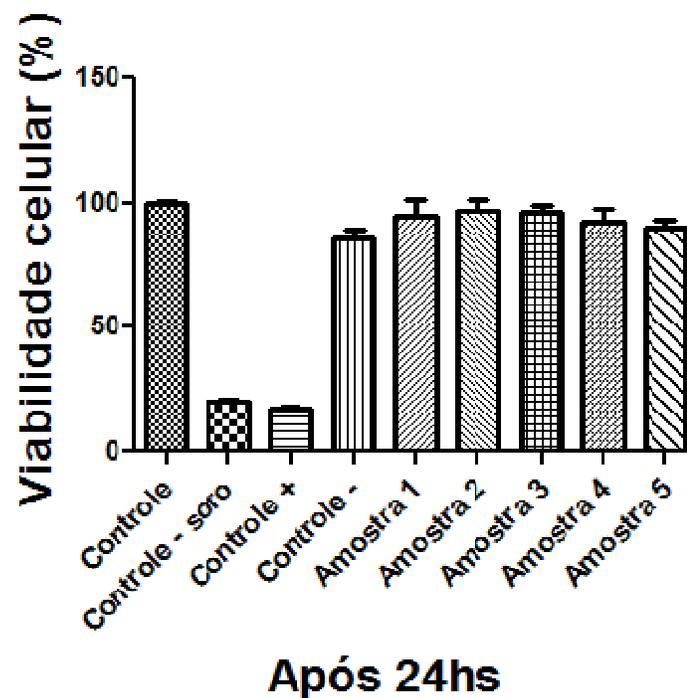


Figura 5.19: Viabilidade celular via método MTT das populações celulares em contato direto com cimentos ósseos modificados com nanopartículas de prata em relação ao grupo controle utilizando a técnica do MTT. Controle: Célula em meio DMEM com SFB; Controle (+) : PBS; Controle (-): Lascas de Eppendorf; Amostra 1: Cimento puro; Amostra 2: Cimento com solução de nanopartículas; Amostra 3: Cimento com 0,1% de nanopartículas de prata em pó; Amostra 4: Cimento com 0,5% de nanopartículas de prata em pó; Amostra 5: Cimento com 2% de nanopartículas de prata em pó.

6 CONCLUSÃO

A produção de soluções coloidais de nanopartículas de prata utilizando o borohidreto de sódio como agente redutor da prata constitui-se numa rota relativamente simples e barata. Foi detectada a formação de nanopartículas esféricas, cujo tamanho variou em torno de 20nm a 30nm de diâmetro de acordo com as técnicas de UV-Vis, MEV e DLS.

Os resultados obtidos pela técnica de ângulo de contato permitiram observar que a incorporação de nanopartículas de prata no cimento ósseo geram biomateriais mais hidrofóbicos, sugerindo uma menor tendência de adesão de bactérias e posterior formação de biofilme. Todos os valores de ângulo de contato (θ) obtidos ficaram na faixa de $30^\circ < \theta < 90^\circ$, classificando as superfícies em questão como parcialmente molháveis.

Espectros de FTIR mostraram uma similaridade entre os nanocompósitos com diferentes concentrações de nanopartículas de prata e o material puro sugerindo a não interação química da nanopartícula de prata com o cimento.

Os resultados obtidos pelos testes de compressão mecânica permitiram definir o cimento ósseo com nanopartículas de prata como apropriado para a utilização em artroplastias quando se leva em consideração a norma ABNT NBR ISO 5833 e apenas este requisito. Segundo esta norma, o material deve apresentar resistência à compressão maior que 70MPa. Houve uma redução da resistência à compressão do cimento ósseo combinado com a solução de nanopartículas de prata, mas, mesmo com esta alteração, o cimento ainda possui uma resistência acima do que a norma estipula como adequada para a aplicação *in vivo*.

Segundo o teste de citotoxicidade, o cimento modificado com nanopartículas de prata exibe viabilidade celular semelhante ao controle negativo e ao cimento ósseo puro.

A partir do exposto acima, pode-se aferir que a associação de nanopartículas de prata ao cimento ósseo não altera significativamente suas propriedades e não impossibilita sua utilização como agente de fixação de próteses. Mas é necessário ressaltar que outros testes ainda são necessários para afirmar o efeito do nanocompósito em questão no combate aos principais microrganismos causadores de infecções em artroplastias totais de joelho e quadril.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Realização de testes biológicos para evidenciar a eficácia do nanocompósito (nanopartículas de prata associadas ao cimento ortopédico) como agente bactericida em relação aos microorganismos mais prevalentes nas infecções das artroplastias totais de joelho e quadril.

Avaliação *in vivo* da atividade do cimento ortopédico combinado com nanopartículas de prata por meio da inoculação de determinadas espécies de bactérias no canal intramedular da tíbia de coelhos submetidos a cirurgias nas quais serão utilizadas o nanocompósito.

Incorporação de nanopartículas de prata ao PMMA concomitantemente a anestésicos locais e o estudo de suas propriedades mecânicas.

Avaliação do potencial bactericida do cimento ortopédico associado à nanopartículas de prata com diferentes formatos e tamanhos.

Avaliação da condutividade elétrica do cimento combinado com diferentes concentrações da nanopartículas de prata e sua interação com as próteses metálicas.

Avaliação das propriedades mecânicas dos cimentos ortopédicos associados às nanopartículas de prata submetidos a diferentes métodos de esterilização.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, D. N. Biodistribuição do Fluconazol Marcado com ^{99m}Tc Tecnécio, livre e encapsulado em nanocápsulas, em um modelo experimental de infecção com *Candida Albicans*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 114p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *ABNT NBR ISO 5833*: Implantes para cirurgia – Cimentos de resina acrílica, Segunda edição. Rio de Janeiro, 2004. 22p.

AYMONIER, C.; BORTZMEYER, D.; THOMANN, R.; MULLHAUPT, R. Poly(methyl methacrylate)/palladium nanocomposites: synthesis and characterization of the morphological, thermomechanical, and thermal properties. *Chem Mater*, v.15, n.25, p.4874-4878, 2003.

BAO, H.; CHUMANOV, G.; CZERW, R.; FOULGER, S. H. Synthesis of core-shell silver colloidal particles by surface immobilization of an azo-initiator. *Colloid and Polymer Science*, v.6, n.283, p.653-661, 2005.

BARBOSA, M. A. Os materiais e a vida, um osso duro de roer. Laboratório de Biomateriais do Instituto de Engenharia Biomédica (INEB), 1999.

BASAK, D.; KARAN, S.; MALLIK, B. Size selective photoluminescence in poly(methyl methacrylate) thin solid films with dispersed silver nanoparticles synthesized by a novel method. *Chemical Physics Letters*, v.420, n.1-3, p.115-119, 2006.

BELL, C.J.; WLAKER, P.S.; ABEYSUNDERA, M.R.; SIMMONS, J. M. H.; KING, P. M.; BLUNN, G. W. Effect of Oxidation on Delamination of Ultrahigh-molecular-weight polyethylene Tibial Componentes. *The Journal of Arthroplasty*, v.13, N.13, p. 280-289, 1998.

BIEHL, G.; HARMS, J; HANSER, U. Experimental studies on heat development in bone during polymerization of bone cement. Intraoperative measurement of temperature in normal blood circulation and in bloodlessness. *Orthopadische Archiv und fur Chirurgie Unfall*, v.1, n.78, p. 62-69, 1974.

BOHREN, C. F.; HUFFMAN, D. R. Absorption and Scattering of Light by Small Particles. *Wiley-Interscience*: New York, 1983.

BONASPETTI, G.; DI FABIO, S.; FENU, R.; COSTA, L.; PAZZAGLIA, U. E. Polyethylene wear in primary knee arthroplasty. *J. Orthopaed Traumatol*, v.6, p15-20, 2005.

BRACCO, P.; BRUNELLA, V.; LUDA, M. P.; ZANETTI, M.; COSTA, L. Radiation-induced crosslinking in the presence of co-agents: chemical and mechanical characterization. *Polymer*, v.46, p.10648-10657, 2006.

BRANDI C. CARR.; TARUN GOSWAMI. Knee implants - Review of models and biomechanics. *Materials and Design*. Department of Biomedical, Industrial and Human factors Engeneering, Dayton.OH, p. 398-412, 2008.

BRAUER, G. M.; STEINBERGER, D. R.; STANSBURY, J. W. Dependência do tempo de cura, temperatura de pico e as propriedades mecânicas da composição do cimento ósseo. *Journal Biomed. Mater. Res.*, n.20, p.839-852, 1986.

BREUSCH, S. J.; ALDINGER, P. R.; THOMSEN, M.; EWERBECK, V.; LUKOSCHEK, M. Anchoring principles in hip endoprostheses. I: prosthesis stem. *Unfallchirurg*, v.11, n.103, p.918-931, 2000.

BURKE, D. W.; GATES, E. I.; HARRIS, W. H. Centrifugation as a method of improving tensile and fatigue properties of acrylic bone cement. *Bone Joint Surgery*, v.66, n.8, p.1265-1273, 1990.

CALLISTER, J. Ciência e Engenharia dos Materiais. 5ª edição, editora LTC, Rio de Janeiro, 2002, p.328-332.

CAMERON, H. U. M. B.; MILLS, R. H. B.; JACKSON, R. W. The Structure of Polymethylmethacrylate Cement. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, v.100, p. 287-291, 1974.

CANEVAROLO, J.; SEBASTIÃO, V. Técnicas de caracterização de polímeros. São Paulo, Artliber, 448 páginas, 2004.

CANTO, L. B. Resistência à tração, flexão e compressão. In: CANEVAROLO, J. Técnicas de caracterização de polímeros. São Paulo: Artliber, 2004. v.2, p.341-360.

CASERI, W. Nanocomposites of polymers and metals or semiconductors: historical background and optical properties. *Macromol Rapid Commun*, v.21, n.11, p.705-722, 2000.

CHAN, K.; AHMED, A. M.; JOHSON, J. A. *Polymethylmethacrylate. Reconstructive Surgery of the Joints*, 2^a ed, 2002.

CHARNLEY, J. Anchorage of the femoral head prosthesis of the femur. *Journal Bone Joint Surg Br*, v.42-B, p.28-30, 1970.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*. Tuebingen, n.176, p.1-12, 2008.

COSTA, C. A. S.; HEBLING, J.; SOUZA, P. P. C. Testes de Citotoxicidade em Cultura de Células. *Metodologia Científica*, 2^a edição, SP, Artes Médicas, pp.213-230, 2005.

CRESPILHO, F. N.; ZUCOLLOTO, V.; BRET, C. M. A.; OLIVEIRA, O. N.; NART, F. C. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM-encapsulated gold nanoparticles. *Journal of physical Chemistry B*, Washington, v.110, n.35, p.17478-17483, 2006.

DOHMAE, Y.; BECHTOLD, J. E.; SHERMAN, R. E.; PUNO, R. M.; GUSTILO, R. B. Reduction in Cement-Bone Interface Shear Strength Between Primary and Revision Arthroplasty. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, v.236, p.214-220, 1988.

ESPÍGARES, I.; ELVIRA, C.; MANO, J. F.; ROMAN, J. S.; REIS, R. L. New partially degradable and bioactive acrylic bone cements based on starch blends and ceramic fillers. *Biomaterials*, v.23, p.1883-1895, 2001.

FLANNERY, M.; McGLOUGHLIN, T.; JONES, E.; BIRKINSHAW, C. Analysis of wear and friction of total knee replacements part.I. Wear assessment on a three station wear simulator. *Wear*, v.265, p.999-1008, 2008.

FONSECA, K. B.; PEREIRA, H. H.; SILVA, S. N. Avaliação de Falhas em Implantes Metálicos Coxo-Femoral e de Joelho Retirados de Pacientes. *Matéria*, v.10, n.3, p.472-480, 2005.

GENCUR, S. J.; RIMMAC, C. M.; KURTZ, S. M. Failure micromechanisms during uniaxial tensile fracture of conventional and highly crosslinked ultra-high molecular weight polyethylenes used in total joint replacements. *Biomaterials*, v.24, p.3947-3954, 2003.

GIBBS, R. J. Silver Colloids: *Do they work*. [S. l.]: Edição do Autor, 1999.

GIORDANO, V.; RIOS, H.; MOREIRÃO, M.; GIORDANO, M.; AMARAL, N.; PALLOTINO, A.; OLIVEIRA, S. Ensaio mecânico da resistência ao impacto do cimento ósseo puro e associado a duas drogas anestésicas locais. *Revista Brasileira de ortopedia*, v.42, p.225-230, 2007.

GLADKIS, L. G.; LI, R. W.; SCARVELL, J. M.; SMITH, P. N.; TIMMERS, H. Exploration of the size, shape and abundance of UHMWPE wear particles using atomic force microscopy. *Wear*, v.267, p.632-638, 2009.

GRISTINA, A. G., Biomaterial-centered infection; microbial adhesion versus tissue integration. *Science*, n.237, p.1588-1595, 2000.

GUERRA, N. B.; HERNÁNDEZ, M. L.; SANTOS, R. G. Cementos óseos acrílicos Modificados con Hidroxiapatita/Acetato de Vinilo. Caracterización Mecânica, Termoanalítica y Bioactividad in vitro. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.20, n.2, p. 98-106, 2010.

GUGGENBICHLER, J. P.; BOSWALD, M.; LUGAUER, S.; KRALL, T. A New Technology of Microdispersed Silver in Polyurethane Induces Antimicrobial Activity in Central Venous Catheters. *Infection*, München, v.27, supplement 1, p.S16-S23, 1999.

GUINGAB, J. D.; LAULY, B.; SMITH, B. W.; OMENETTO, N.; WINEFORDNER, J. D. Stability of silver colloids as substrate for surface enhanced Raman spectroscopy detection of dipicolinic acid. *Talanta*, Gainesville, v.72, n.2, p.271-274, 2007.

HANSEN, F. K. The measurement of surface energy of polymer by means of contact angles of liquids on solid surfaces – A short overview of frequently used methods, Oslo, 2004.

HATCHETT, D. W.; HENRY, S. J. Electrochemistry of sulfur adlayers on the low-index faces of silver. *Journal of Physical Chemistry*, n.100, p.9854-9859, 1996.

HOLM, N. J. The formation of stress by acrylic bone cements during fixation of acetabular prosthesis. *Acta Orthop. Scand*, v.51, p.719-826, 1980.

<http://www.bonecement.com/cementing-techniques/bonecement/properties> > acesso em 07/2010.

<http://www.ibm.com/developerworks/lotus/library/pareto/> > acesso em: 09/2009.

IULIAN, A.; LAPTOIU, D.; MICULESCU, F.; ISTRATE, R.; TRISCA-RUSU, C. Microscopy Analysis of Total Knee Prosthesis Failure Caused by Polyethylene Wear. *European Cells and Materials*, v.16, Suppl. 1, p.18, 2008.

JIRANEK, W. A.; HANSEN, A. D.; GREENWALD, A. S. Antibiotic-Loaded Bone Cement for Infection Prophylaxis in total Joint. *Journal of Bone and Joint Surgery*, n.88, p.2487-2500, 2006.

KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Importance of surface tension characterization for food, pharmaceutical and packaging products: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*. v.50, p.693-698, 2010.

KATHLEEN, S. S.; BISTOLFI, A.; BELLARE, A.; PRUITT, L. A. The combined effects of crosslinking and high crystallinity on the microstructural and mechanical properties of ultra high molecular weight polyethylene. *Biomaterials*, v.27, p. 1688-1694, 2006.

KATSIKOIANNI, M.; SPILIOPOULOU, I.; DOWLING, D. P.; MISSIRLIS, Y. F. Adhesion of slime producing *Staphylococcus epidermidis* strains to PVC and diamond-like carbon/silver/fluorinated coatings. *J. Mater. Sci. Mater Med.*, v.17, n.8, p.679-689, 2006.

KEY, F. S.; MAASS, G. Ions, Atoms and Charged Particles. 2001. Disponível em: <http://www.silver-colloids.com/Papers/IonsAtoms&ChargedParticles.PDF> > acesso em: 28/07/2010.

KICKELBICK, G. Concepts for the incorporation of inorganic building blocks into organic polymers on a nanoscale. *Progress in Polymer Science*, v.28, n.1, p.83-114, 2003.

KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J. H.; PARK, S. J.; HWANG, C.; JEONG, D. H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. v.3, p.95-101, 2007.

KUEHN K. D. Bone cements. Up-to-date comparison of physical and chemical properties of commercial materials. *Heldelberg: Springer Verlag*; p.7-20, 2000.

KUEHN, K.; EGE, W.; GOPP, U. Acrylic Bone Cements: Composition and Properties. *Orthopedic Clinics of North America*, v.36, n.1, p.17-28, 2005.

KUEN, K. D.; EGE, W.; GOPP, U. Acrylic bone cements: mechanical and physical properties. *Orthop clin North Am*, v.6, p.29-39, 2005.

KURTZ, S. M.; MAZZUCCO, D.; RIMNAC, C. M.; SCHROEDER, D. Anisotropy and oxidative resistance of highly crosslinked UHMWPE after deformation processing by solid-state ram extrusion. *Biomaterials*, v.27, p.24-34, 2006.

LEWIS, G.; MLADSI, S. Effect of Sterilization method on properties of palacos R acrylic bone cement. *Biomaterials*, v.1-3, n.19, p.117-124, 1998.

LIMA, A. L. M.; BARONE, A. A. Hospital Infections in 46 Patients Submitted to Total Hip Replacement. *Acta Ortopédica Brasileira*, v.9, n.1, 2009.

MARCONCINI, J. M. *Avaliação da qualidade dos cimentos ósseos encontrados no mercado nacional*. Projeto de Iniciação Científica- Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, 1996.

MARKOLF, K. L.; AMSTUTZ, H. C. Penetration and flow of acrylic bone cement. *Clinical Orthopaedic*, v.121, p.99-102, 1976.

MBHELE, Z. B.; SALEMANE, M. G.; VAN SITTERT, C. G. C. E.; NEDELJKOVIC, J. M.; DJOKOVIC, V.; LUYT, A. S. Fabrication and characterization of silver-polyvinyl alcohol nanocomposites. *Chem Mater*, v.15, n.26, p.5019-5024, 2003.

MEDEL, J.; GARCÍA-ALVAREZ, F.; GOMEZ-BARRENA, A.; PUERTOLAS, J. A. Microstructure change of extruded ultra high molecular weight polyethylene after gamma irradiation and shelf-aging. *Polymer Degradation and Stability*, v.88 p. 435-443, 2005.

MENDES, R. *Estudo Experimental Comparativo dos Cimentos Ósseos Nacionais*. Rio de Janeiro: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 2006. 156 páginas. Departamento de Engenharia Civil, Mestrado, área de Estruturas.

MOREJÓN, L. E.; MENDIZÁBEL, J. A.; DELGADO, N.; DAVIDENKO, F.; DELLAMARY L. R.; MANRÍQUEZ, M. P.; GINEBRA, F. J. Síntese e caracterização de grânulos poliméricos de poli (estireno – metacrilato de metila) para cimentos ósseos. *Latino Americano de Investigação Aplicada*, n.35, p.175-182, 2005.

MORONES, J.; ELECHIGUERRA, J.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J.; RAMIREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, Bristol, v. 16, p. 23462353, 2005.

MOSMANN, T. Rapid Calorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol Methods*, v.65, pp. 55-63, 1983.

NASCIMENTO, M. O.; RODARTE R. R. P.; FILHO G. M. Causas de falha encontradas nas artroplastias totais de joelho primárias. *R. Into*, v.3, n.2, p1-36, 2005.

NELSON, C. L. The current status of material used for depot delivery of drugs. *Clinical Orthopaedic & Related Research*, v.427, p.72-18, 2004.

NETO, E. A. B.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTI, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação em sanitização de embalagens. *Comunicado Técnico EMBRAPA*, São Carlos, v.99, p.1-4, 2008.

NEUT, D.; STOKROOS, I.; VAN HONR, J. R.; BUSSCHER, H. J. Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.47, p.885-891, 2001.

NEVELOS, J. Surface engineering of prosthetic knee components. *The knee*, v.11, p.163-167, 2004.

NOGUEZ, C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The influence of shape and physical environment. *Journal of Physical Chemistry*. Washington, v.11, p.3806-3819, 2007.

NUSSBAUM, D. A.; GAILLOUD, P.; MURPHY, K. The Chemistry of Acrylic Bone Cements and Implications for Clinical Use in Image-guided Therapy. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, v.5, n.2, parte 1, p.121-126, 2004.

OKTAR, F. N. Hydroxyapatite –TiO₂ composites. *Materials Letters*, v.60, p.2207-2210, 2006.

OLIANI, W. L.; PARRA, D. F.; LUGÃO, A. B. Microscopia, importante artifício investigativo no estudo da degradação do HMS-PP. 18º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – 18º CBECIMat, 2008, Porto de Galinhas, PE, Brasil.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. *Biomateriais; Fundamentos e Aplicações*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538 páginas.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*, *American Society for microbiology: Applied and Environmental Microbiology*, Seoul, v.73, n.6, p.1712-1720, 2007.

PANACEK, A.; KVITEK, L.; PRUCEK, R.; KOLAR, M.; VECEROVA, R.; PIZUROVA, N.; SHARMA, N. P.; NEVECNA, T.; ZBORIL, R. Silver colloids nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry*, n.110, p.16248-16253, 2006.

PARK, J. C.; PARK, B. J.; LEE, D. H.; SUH, H.; KIM, D. G.; KWON, O. H. Evaluation of the cytotoxicity of Polyetherurethane (PU) film containing zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) on various cell lines. *Yonsei Med. J.*, v.43, pp.518-526, 2002.

POTTER, J. K.; ELLIS III, E. Biomaterials for reconstruction of the internal orbit. *J. Oral Maxillofac Surg.* v.62, p.1280-1297, 2004.

QUADROS, A. M. Papel NOMEX utilizado em transformadores: avaliação das características e degradação térmica. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006, 59p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Engenharia dos Materiais)

RAMAKRISHNA, S.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; KAM, W. L. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composites Science and Technology*, v.61, p. 1189-1224, 2001.

RECKLING, F. W.; DILLON, W. L. The bone-cement interface temperature during total joint replacement. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.59, n.1, p.80-82, 1977.

ROCHA, M. F. G. Análise do envelhecimento acelerado e da ação estabilizadora do ácido ascórbico na degradação oxidativa do polietileno de ultra-elevada massa molar para aplicação biomédica. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2009. 166p. (Tese, Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas).

ROCHA, M. F. G. Análise e caracterização do polietileno de ultra-elevado peso molecular para aplicação em prótese total de joelho. Escola de Engenharia da UFMG, 2006. 126p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Minas).

ROCHA, M.; MANSUR, A.; MANSUR H.S. Characterization and Accelerated Ageing of UHMWPE Used in Orthopedic Prosthesis by Peroxide. *Materials*, v.2, p.562-576, 2009.

SABOKBAR, A.; ATHANASOU, N. A.; MURRAY, D. W. Osteolysis induced by radio-opaque agents. Bone cement and cementing technique. *Springer Verlag*, p.149-162, 2001.

SANAN, A.; HAINES, S. Repairing Holes in the Head: A History of Cranioplasty. *Neurosurgery*, v.40, n.3, p.588-603, 1997.

SANPUI, P.; MURUGADOSS, A.; DURGA PRASAD, P. V.; GHOSH, S.; CHATTOPADHYAY, A. The antibacterial properties of a novel chitosan Ag-nanoparticle composite. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.124, p. 142-146, 2008.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O.; MILAM, S. B. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.57, p.1122-1126, 1999.

SHIBATA, N.; TOMITA, N.; IKEUCHI, K. Gamma-irradiation aggravates stress concentration along subsurface grain boundary of ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) under sliding fatigue environment. *Bio-Medical Materials and Engineering*, v.13, p.35-45, 2003.

SHIBATA, N.; TOMITA, N.; IKEUCHI, K. Microscopic destruction of ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) under uniaxial tension. *Biomedical Materials and Engineering*, v.13, p.47-57, 2003.

SHORT, A.; GILL, H.S.; MARKS, B.; WAITE, J.C.; KELLETT, C.F.; PRICE, A.J.; O'CONNOR, J.J.; MURRAY, D. W. A novel method for in vivo knee prosthesis wear measurement. *Journal of Biomechanics*, v.38, p. 315-322, 2005.

SINGH, N.; KHANNA, P. K. In situ synthesis of silver nano-particles in polymethylmethacrylate. *Materials Chemistry Physics*, v.104, n.2-3, p.367-372, 2007.

SKOOG, D. A. *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª edição, Porto Alegre: Editora Bookman, 2009. 838 páginas.

SOARES, M . H.; FILHO, G. R.; CERQUEIRA, D. A.; ASSUNÇÃO, R. M. N. SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, XII, 2008, Uberlândia. *Reciclagem de copos plásticos e bandejas de alimentos à base de poliestireno para a recuperação de prata de resíduos de empresas reveladoras de foto*. Seminário de Iniciação científica da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

SOBIERAJ, M. C.; KURTZ, S. M.; RIMNAC, C. M. Large deformation compression induced crystallinity degradation of conventional and highly crosslinked UHMWPE. *Biomaterials*, v.26, p.6430-6439, 2005.

SRIAMORNASK, P. Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using Calcium pectinate gel beads. *International Journal of Pharmaceutics*. v.169, p.213-220, 2008.

STEVEN, M. K.; ORTHUN, K.; MURATOGLU, A; MARK, E.; AVRAM, A. E. Advances in the processing, sterilization, and crosslinking of ultra-high molecular weight polyethylene for total joint arthroplasty. *Biomaterials*, v.20, p.1659-1688, 1999.

STRÖMBERG, C. N.; HERBERTS, P.; PALMERTZ, B. Cemented revision hip arthroplasty – a multicenter 5-9-year study of 204 first revisions of loosening. *Acta Orthop. Scand*, v.63, p.111-119, 1992.

TORRES, L. S. A.; LOPEZ, L. M.; ANITA, R. E. N.; PADRON, G. H.; CASTANO, V. M. Biocompatible Metal-Oxide Nanoparticles: Nanotechnology Improvement of Conventional Prosthetic Acrylic Resins. *Journal of Nanomaterials*. v.2011, p.8, 2010.

VIANA, H. M. Estudo da resistência à corrosão de aço carbono protegido por um sistema de pintura epóxi/poliuretano como pré-tratamento à base de siloxano e pirrol plasma-polimerizado. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2002. 232 páginas. (Tese de doutorado, Engenharia Química).

VINCE, G. D.; HUNT, J. A.; WILLIAMS, D. F. Quantitative assessment of tissue response to implanted biomaterials. *Biomaterials*, v.12, p.731-36, 1991.

WALTERS, G.; PARKIN, I. V. The incorporation of noble metal nanoparticles into host matrix thin films: synthesis, characterization and applications. *Journal of Materials Chemistry*. n.19, p.574-590, 2009.

WANG, A.; ESSNER, A.; POLINENI, V. K.; STARK, C.; DUMBLRTON, J. H. Lubrication and wear of ultra-high molecular weight polyethylene in total joint replacements. *Tribology International*, v.31, n.1-3, p.17-33, 1998.

WANG, A.; ZENG, H.; YAU, S-S.; ESSNER, A.; MANELY, M.; DUMBLETON, J. *Journal of Physics D: Appl. Phys*, v.39, p.3213-3219, 2006.

WEBB, J. C. J.; SPENCER, R. F. The Role Polymethylmethacrylate Bone Cement in Modern Orthopaedic Surgery. *J. Bone and Joint Surgery*, v.89-B, n.7, p.851-857, 2007.

WEINSTEIN, A. M.; ALLAN, M.; BINGHAM, D. N.; SAUER, B. W.; LUNCENFFORD, E. M. The Effect of High Pressure Insertion and Antibiotic Inclusions Upon the Mechanical Properties of Polymethylmethacrylate. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, v.121: p.67-73, 1976.

WENDA, K.; SCHEUERMANN, H.; WEITZEL, E.; RUDIGIER, J. Pharmacokinetics of methylmethacrylate monomer during total hip replacement in man. *Arch Orthop Trauma Surg*, v.5, n.107, p.316-321, 1988.

WONG, K. K. Y.; LIU, X. Silver Nanoparticles – The Real “Silver Bullet” in Clinical medicine? *Med. Chem. Commun*, v.1, pp.125-131, 2010.

YAKUTIK, I. M.; SHEVCHENKO, G. P.; RAKHMANOV, S. K. The Formation of Monodisperse Spherical Silver Particles Colloids and Surfaces A: *Physicochemical and Engineering Aspects*, n.242, p.175-179, 2004.

YEN-SHUO, C. M. D.; CHEN, W. M.; CHING-KUEI, H.; CHIANG, C. C.; CHEN, T. H. Fracture of the polyethylene Tibial Post in a Nexgen Posterior- Stabilized Knee Prosthesis. *The Journal of Arthroplasty*, v.19, n.8, p.1045-1048, 2004.

YEUM, J. H.; GHIM, H.; DENG, Y. Low Temperature Suspension Polymerization of Methacrylate for the Preparation of High Molecular Weight Poly(methyl methacrylate)/ Silver Nanocomposite Microspheres. *Fibers and Polymers*, v.6, n.4, p.277-283, 2005.

ZHAO, Q. Bacterial Adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces. *Applied Surface Science*, v.256, p.8674-8681, 2007.

ZHILONG, S.; NEOH, K. G.; KANG, E. T.; WANG, W. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, v.27, p.2440-2449, 2006.

ZIMMER, C. G.; STROHAECKER. R.; STROHAECKER. T. Análise de Material de Prótese de Joelho Explantada. 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais - 17º CBECIMat – 17º CBECIMat, 2006, Foz do Iguaçu-PR, Brasil.