

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

Tese de Doutorado

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA  
PRODUÇÃO DE ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS  
POROSAS DE VIDRO BIOATIVO PARA APLICAÇÃO  
EM ENGENHARIA DE TECIDOS**

Autor: Marlene de Barros Coelho

Orientador: Prof<sup>a</sup> Marivalda de Magalhães Pereira, Dra.

Março/2003

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

Marlene de Barros Coelho

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA  
PRODUÇÃO DE ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS  
POROSAS DE VIDRO BIOATIVO PARA APLICAÇÃO  
EM ENGENHARIA DE TECIDOS

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas  
da Universidade Federal de Minas Gerais

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais  
Orientador: Prof<sup>a</sup> Marivalda de Magalhães Pereira, Dra.

Belo Horizonte  
Escola de Engenharia da UFMG

2003

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por iluminar meu caminho.

Ao meu marido Ricardo e minhas filhas Fernanda e Maria Luísa, pelo apoio incondicional, amor e carinho. À minha família pela amizade.

Aos meus amigos Elaine, Luciana, Odair, Sydnei, Wanderley e Ricardo pela simpatia, amizade e apoio.

À professora Marivalda de M. Pereira pela orientação do trabalho.

Aos professores Paulo Cetlin, Virgínia Ciminelli, Paulo Brandão, Dagoberto Santos e Vicente Buono pela utilização dos laboratórios.

À técnica Hilda pela presteza na realização dos ensaios, assim como os demais técnicos: Patrícia, Sandra, Viviane, Andréia, Rita, João, Urias, Ivair, Bruno, Isabel.

Ao aluno de iniciação científica Isaac pela ajuda na realização dos experimentos e ao aluno de mestrado Marcelo pela colaboração na realização da cultura de células.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>9</b>
3.1	BIOMATERIAIS	9
3.1.1	<i>Biomateriais Naturais</i>	11
3.1.2	<i>Biomateriais Sintéticos</i>	14
3.2	ENGENHARIA DE TECIDO	30
3.2.1	<i>Tecido Ósseo</i>	32
3.2.2	<i>Engenharia de tecido ósseo</i>	37
3.3	PROCESSAMENTO SOL-GEL	46
3.4	MATRIZ CERÂMICA POROSA	55
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>60</b>
4.1	SÍNTESE DAS ESTRUTURAS MACROPOROSAS DE VIDRO BIOATIVO	60
4.2	AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO E ESTABILIDADE DAS ESPUMAS	65
4.3	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS MATRIZES	67
4.4	TESTES <i>IN VITRO</i>	69
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>72</b>
5.1	FORMAÇÃO E ESTABILIDADE DAS ESPUMAS	72
5.2	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS MATRIZES OBTIDAS	82
5.2.1	<i>Difração de raios-X</i>	82
5.2.2	<i>Aspecto macroscópico e avaliação qualitativa dos macroporos</i>	84
5.2.3	<i>Porosimetria de mercúrio</i>	88
5.2.4	<i>Análise de imagem – Quantikov Image Analyzer</i>	90
5.2.5	<i>Adsorção de Nitrogênio</i>	94
5.2.6	<i>Resistência Mecânica</i>	98
5.2.7	<i>Espectroscopia de Infra-vermelho</i>	99
5.2.8	<i>Estudo da bioatividade e dissolução</i>	102
5.2.9	<i>Cultura de células in vitro</i>	110
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>118</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Representação esquemática da engenharia de tecido. ....	4
Figura 3.1 - Dependência da composição (% em peso) para as ligações ósseas e tecido mole com os vidros bioativos e vidro-cerâmicas. Todas as composições na região A têm 6% em peso de P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> . IB=índice de bioatividade, quanto maior mais bioativo é o material [HENCH, 1993]......	26
Figura 3.2 - Esquemas mostrando parte de um sistema de Havers e dois osteócitos (esquerda) [JUNQUEIRA, 1973]......	33
Figura 3.3 - Fase adiantada da ossificação intramembranosa. Na parte inferior da figura vê-se um osteoblasto sendo aprisionado pela matriz óssea [JUNQUEIRA, 1973]......	34
Figura 3.4 - Início da ossificação intramembranosa. Surge um blastema ósseo no mesênquima, do qual se originam os osteoblastos [JUNQUEIRA, 1973]. ....	36
Figura 3.5 - O processo mesengênico. As TCMs têm potencial para diferenciar em uma variedade de tecidos mesenquimais, tais como osso, cartilagem, tendão, músculo, medula, gordura, derme, etc. (reproduzida da ref. [CAPLAN, 1997])......	44
Figura 4.1 - Agitador e recipiente de Teflon usados na preparação das espumas. ....	64
Figura 4.2 - Rota de secagem das amostras de vidro bioativo. ....	64
Figura 4.3 - Representação esquemática do tratamento térmico de estabilização das amostras de vidro bioativo. ....	65
Figura 5.1 - Decaimento do volume de espuma versus tempo para a mistura: água deionizada e diversas concentrações de surfactante (a) LESS, (b) Tergitol, (c) LESS + Tergitol (L: LESS e T: Tergitol®). ....	75
Figura 5.2 - Decaimento do volume de espuma versus tempo, para a mistura: solução sol-gel e diversas concentrações de surfactante. ....	77
Figura 5.3 - Desenho esquemático da forma e evolução de objetos micelares híbridos descritos por Boissiere et al [BOISSIERE, 2001]. ....	78
Figura 5.4 - Estrutura macroporosa observada em MEV resultante da espuma formada pela solução 60S e o surfactante Tergitol. ....	79
Figura 5.5 - Fluxograma do procedimento elaborado para a produção de estruturas macroporosas de vidro bioativo. ....	62
Figura 5.6 - (a) Espuma sendo vertida em recipiente transparente e (b) recipiente de Teflon projetado para tornar mais eficiente a vazão da espuma. ....	63
Figura 5.7 - Espectro de difração de raios-X, amostras tratadas a 700°C, 4h. ....	83
Figura 5.8 - Difratoograma da amostra 60S tratada 4h nas temperaturas indicadas. ....	84
Figura 5.9 - Vidro bioativo macroporoso 60S após tratamento a 700°C, 4h.....	85
Figura 5.10 - Imagens obtidas em MEV do vidro bioativo 60S tratado a 700°C por 4h. Amostra vertida em recipiente (a) transparente de poliestireno, (b) individual de Teflon e (c) de Teflon especialmente projetado para essa aplicação, Figura 5.6(b). ....	86

Figura 5.11 - Amostras 60S tratadas em diferentes temperaturas por 4h e que foram vertidas em recipientes individuais de Teflon, (a) 700°C, (b) 800°C e (c) 900°C.....	86
Figura 5.12 - Amostras 60S tratadas em diferentes temperaturas por 4h e que foram vertidas em recipiente de Teflon, (a) 700°C, (b) 800°C e (c) 900°C.....	87
Figura 5.13 - Amostra 50S (a), 60S (b) e 70S (c), tratadas a 700°C por 4h.....	87
Figura 5.14 - Aspecto microestrutural da parede da estrutura porosa. Amostra 50S (a), 60S (b) e 70S (c), tratadas a 700°C por 4h.....	88
Figura 5.15 - Curva de intrusão de mercúrio, volume acumulado normalizado.....	89
Figura 5.16 - Distribuição de tamanho de macroporos obtido por porosimetria de mercúrio, amostra 60S tratada a 700°C por 4h.....	89
Figura 5.17 - Representação de duas entre as sete áreas analisadas da amostra 50S impregnada com resina de embutimento. Observa-se o pouco contraste entre os elementos analisados e a matriz sólida.....	92
Figura 5.18 - Mesmas imagens da Figura 5.17 com os macroporos destacados para facilitar a binarização.....	92
Figura 5.19 - Distribuição de tamanho de poros de seções polidas da amostra macroporosa 50S, resultado da análise de imagem.....	93
Figura 5.20 - Frequência de distribuição de tamanho de poros aproximada.....	93
Figura 5.21 - Isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio de várias composições químicas do vidro bioativo.....	95
Figura 5.22 - Distribuição de mesoporos da adsorção de nitrogênio de várias.....	96
Figura 5.23 - Espectros de infra-vermelho (FTIR) das amostras de diferentes composições tratadas a 700°C por 4h.....	101
Figura 5.24 - Espectros de infra-vermelho (FTIR), antes da imersão, da amostra 60S tratada em diferentes temperaturas por 4h.....	101
Figura 5.25 - Espectro de FTIR da amostra 60S tratada a 700°C em diferentes condições de imersão.....	104
Figura 5.26 - Espectro de FTIR da amostra 60S tratada em diferentes temperaturas após 24h de imersão em SBF.....	105
Figura 5.27 - Espectro de FTIR da amostra 60S tratada em diferentes temperaturas após 24h de imersão em Tris.....	105
Figura 5.28 - Representação gráfica das concentrações de Ca, P e Si na solução SBF após imersão em tempos variáveis. Estruturas 60S tratadas em temperaturas diferentes.....	108
Figura 5.29 - Representação gráfica da concentração de P na solução SBF após imersão em tempos variáveis. Estruturas 60S tratadas em temperaturas diferentes.....	108
Figura 5.30 - Representação gráfica das concentrações de Ca, P e Si na solução SBF após imersão em tempos variáveis para as diferentes composições das estruturas de vidro bioativo.....	109
Figura 5.31 - Representação gráfica das concentração de P na solução SBF após imersão em tempos variáveis para as diferentes composições das estruturas de vidro bioativo.....	109
Figura 5.32 - Aspecto geral das células em cultura.....	111

Figura 5.33 - Resultado do ensaio de fosfatase alcalina. Manchas azuis, que aparecem escuras nas fotos, denotam atividade celular. Em duas semanas de cultura.....	111
Figura 5.34 - Ensaio de MTT mostrando células em função e metabolizando, que pode ser visto pela presença de cristais de formazan.....	112
Figura 5.35 - Células osteoblastos dentro de um poro aderidas e secretando substâncias ainda não identificadas, 2000x.....	112
Figura 5.36 - Osteoblasto aderido a parede do vidro bioativo 60S, emitindo prolongamentos e acima vê-se um poro, 2000x.....	113
Figura 5.37 - Idem a figura anterior sendo que as vesículas acima do osteoblasto mostram que esta célula estava em atividade e os prolongamentos mostram a adesão ao material, 3000x.....	113

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 3.1 - Tipos de adesão tecidual em biocerâmicas e classificação da biocerâmica. ....	22
Tabela 3.2 - Características, propriedades e capacidade de atuação exigidas de substituto para enxerto ósseo osteoindutivo manufacturado [BREKKE, 1998b]. ....	37
Tabela 4.1 - Composições nominais das amostras de vidro preparadas por sol-gel (mol%). ....	61
Tabela 4.2 - Concentração dos reagentes discriminada por amostra. ....	63
Tabela 4.3 - Soluções usadas na espumação de água deionizada mais surfactante.....	66
Tabela 4.4 - Soluções usadas na espumação de solução sol-gel mais surfactante. ....	67
Tabela 4.5 - Concentração iônica (mM) de SBF e plasma sanguíneo humano.....	71
Tabela 5.1 - Soluções usadas na espumação de água deionizada mais surfactante.....	74
Tabela 5.2 - Soluções usadas na espumação de solução sol-gel mais surfactante. ....	74
Tabela 5.3 - Concentração de LESS e tempo médio de gelação para cada composição química de vidro bioativo. ....	82
Tabela 5.4 - Resultados da adsorção de nitrogênio por tipo de amostra e temperatura de estabilização. ...	96
Tabela 5.5 - Densidade aparente obtida pela técnica de Arquimedes e verdadeira por picnometria de hélio. ....	97
Tabela 5.6 - Concentrações de elementos em SBF após 1h e 24h de imersão, medidas por análise de emissão por plasma (ICP). ....	107

## RESUMO

Para conseguir características estruturais apropriadas à engenharia de tecido, desenvolveu-se nesse trabalho um método de obtenção de matrizes macroporosas a partir da formação de espumas em solução sol-gel de vidro bioativo, sistema  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ , com adição de surfactantes. Variou-se a composição química do material base das estruturas e a temperatura de tratamento térmico. Testes de bioatividade *in vitro* e dissolução das estruturas de diferentes composições e tratadas em diferentes temperaturas de estabilização foram realizados. Discutiu-se a caracterização das estruturas, após tratamento térmico, dividindo-a em dois níveis de distribuição de tamanho de poros, macro e meso. Para isso foram realizadas análises de porosimetria de mercúrio, análise de imagem (*software* Quantikov) e adsorção de nitrogênio, complementando essas informações determinou-se ainda, a porosidade por técnica de Arquimedes. Foram realizadas também análises por difração de raios-X, espectroscopia de infra-vermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectrometria de emissão por plasma (ICP). Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas e utilizadas para observação qualitativa do aspecto geral das estruturas. Apresenta-se também alguns resultados preliminares de cultura de células do tecido ósseo.

Os materiais das estruturas tratadas a  $700^\circ\text{C}$  se apresentaram amorfos e alguns picos de fases cristalinas foram determinados para temperaturas mais altas de tratamento ( $800^\circ\text{C}$  e  $900^\circ\text{C}$ ). Os mesoporos apresentaram distribuição de tamanho de poros em torno de 10-30nm, variando com a composição em mol do vidro bioativo. O valor de área superficial analisado foi de  $60\text{-}170\text{m}^2/\text{g}$ , sendo que as amostras tratadas a temperaturas acima de  $700^\circ\text{C}$  apresentaram uma diferença significativa de área superficial e volume de poros indicando uma alta densificação da estrutura mesoporosa a partir dessa temperatura. A distribuição dos diâmetros de macroporos analisada variou na faixa de  $70\text{-}500\mu\text{m}$ . Os teste *in vitro* e a análise de FTIR indicaram que os vidros de diferentes composições foram bioativos.

## ABSTRACT

In order to reach these specific structural features, it was developed during the present work a processing method to obtain the macroporous structure by foaming different compositions of sol-gel derived bioactive glasses solution, system CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>, with the addition of surfactants. It was evaluated structures with different chemical composition and temperatures of heat treatment. In vitro bioactivity and dissolution tests were conducted. The characterization results of the structures after the stabilization heat treatment were discussed. The network of the scaffolds was divided in two levels, macroporous and mesoporous. Physical characterization of the samples consisted of microstructural observation, pore size and textural analysis. For this the mercury porosimetry, scanning electron microscopy, image analysis by software Quantikov and nitrogen adsorption were performed. The porosity were calculated from Archimedes' technique and compared with porosity analyzed by mercury porosimetry. Complementary analysis of the materials was got from Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction and Inductive Coupled Plasma Spectroscopy (ICP), for dissolution evaluating. In addition, it was shown some results of the cell culture.

After thermal treatment at the 700°C for 4h, the material remained amorphous and some crystallization could be observed for samples treated at 800°C and 900°C, in such case some peaks of the crystalline phases Wollastonite, Bredigite and Nagelschimidtite were identified. The mesoporous presented pore size distribution ranging from 10 to 30nm and a specific surface area of 60-170m<sup>2</sup>/g at 700°C, varying with glass compositions. For higher temperatures of stabilization this value was huge smaller, 3-7m<sup>2</sup>/g with small pore volumes, this can be an indication of the high densification of the structures. Pore diameters were in the range of 70-500µm for the macroporous network. It was observed from the *in vitro* tests and FTIR analysis that the structures developed in this work were bioactivities.

## 1 INTRODUÇÃO

Grande parte dos avanços dos últimos 20 anos em biologia e medicina tem sido o resultado dos avanços em biotecnologia. O amadurecimento e o refinamento destas tecnologias têm sido diretamente responsáveis pelo explosivo avanço no conhecimento e procedimentos terapêuticos que nós temos observado. À medida que a ciência biomédica se direciona para o século 21, o desenvolvimento de novas tecnologias e de alternativas de menor custo para o tratamento de patologias ganha importância considerável por facilitarem o processo de cura. Muitos avanços recentes em biotecnologia têm sido os resultados de colaborações entre biólogos e físicos ou engenheiros, tais como o desenvolvimento de imagem por ressonância magnética, técnicas de tomografia e laparoscopia assistidas por computador, biomateriais adequados ao uso como tecidos artificiais ou como implantes de próteses.

A busca por novos biomateriais ou o aprimoramento destes, se justifica pela imensa necessidade que o ser humano (e alguns animais) possui em repor ou regenerar uma parte do seu organismo. Isso porque à medida que envelhecemos diversos órgãos do nosso organismo estão sujeitos à falhas devido a doenças degenerativas que surgem com a idade. E, se não é por causa desse processo natural, é porque nós adquirimos uma enorme capacidade de mutilação através de fratura e desfiguração do corpo humano, que acontece em acidentes com veículos, armas, ferramentas e prática de esportes. Há ainda os problemas ou deficiências congênitas. Além de trágico, a perda da função de um órgão ou tecido é um problema de custo muito elevado. Foi estimado que anualmente nos EUA os gastos com saúde, associados a problemas como os descritos, superam 400 bilhões de dólares [LANGER, 1997].

Uma consequência destas causas naturais ou adquiridas de deterioração do corpo humano é que desde vários séculos A.C. o homem utiliza diversos materiais para reposição de partes do corpo como por exemplo pernas de madeira, olhos de vidro, dentes de porcelana, silicone, cerâmicas, metais, etc. Alguns dados mais recentes servem para demonstrar que o uso de biomateriais está se ampliando e os dispositivos biomédicos necessitam cada vez mais imitar biologicamente as funções dos órgãos e

tecidos. Só nos EUA mais de 4 milhões de pacientes sofrem queimaduras, infecções e úlceras de pele; mais de 12 milhões sofrem de diabetes; e, 2 milhões de pacientes sofrem devido à perda ou má formação das estruturas de suporte tais como ossos longos, cartilagens, tecido de ligação e os discos da coluna vertebral [LANGER, 1997]. Entre 1990 e 1997, a incidência de procedimentos de enxerto ósseo neste país aumentou de 200.000 para 275.000/ano [BREKKE, 1998a].

No Brasil o quadro é muito mais dramático na medida que os níveis de renda e saúde, representados pelos altos índices de mortalidade infantil e baixa expectativa de vida em relação aos países de primeiro mundo, são baixos para a maioria da população. Problemas de disponibilidade de transplantes e aquisição de implantes sintéticos de última geração esbarram em dificuldades técnicas e econômicas.

Segundo dados do Sistema Único de Saúde (SUS) para cada um milhão de habitantes, por ano, há cinquenta a sessenta mortes encefálicas contra duzentas a trezentas pessoas que desenvolvem insuficiência renal crônica necessitando de transplantes, ou seja, a chance de ser doador é quatro a cinco vezes menor que a necessidade de um transplante renal. Também segundo o SUS, noventa por cento em média das cirurgias que envolvem transplantes ou implantes é coberto financeiramente pelo Governo. Isto representa parte considerável dos gastos de saúde do Governo que em 2000 foram de 3,17% do Produto Interno Bruto (PIB), ou seja, aproximadamente vinte bilhões de dólares. A maioria dos planos privados de saúde não cobre este tipo de tratamento, cujo custo médio pode variar de R\$8000,00 a R\$40000,00. A fundação São Paulo Interior Transplante (SPIT), da Universidade de São Paulo (USP), estima em mais de quatro mil o número de pacientes na fila de espera do Hospital das Clínicas da USP, e mais de trinta e duas mil pessoas a espera de doadores no Brasil, número este que aumenta em oito pessoas por dia tornando o quadro muito dramático.

Dados dos Estados Unidos mostram que mais de 8 milhões de cirurgias são realizadas por ano no intuito de ser reparar falhas em órgãos e tecidos motivadas por patogenias ou traumas. O autoenxerto é reconhecido como o material padrão para enxerto ósseo para a maioria, ou todas, as indicações de implantes. Entretanto, os autoenxertos possuem

limitações conhecidas, tais como depressão local no doador, potencial de reabsorção, tamanho que não combina e um volume inadequado de material para enxerto. Uma alternativa para o autoenxerto é a preparação de ossos de doadores da mesma espécie e organismo diferente (aloenxerto), procedimento que oferece algumas vantagens e riscos como a transmissão de doenças. A disponibilidade de proteínas osteoindutivas altamente puras tornou possível considerar a fabricação de dispositivos sintéticos, osteoindutivos para substituir os enxertos ósseos [BREKKE, 1998a].

Atualmente o melhor meio de se recuperar a perda de órgão ou tecido é a cirurgia reconstrutiva ou transplante, ou o uso de dispositivos mecânicos (ex. máquina de diálise). A reconstrução cirúrgica pode resultar em problemas de longo prazo e o transplante é limitado pela escassez de doadores [LANGER, 1997].

Para contornar esses problemas, um novo campo de pesquisa, conhecido como Engenharia de Tecido têm crescido nos últimos anos. Engenharia de Tecido pode ser definida como a "combinação dos princípios e métodos das ciências da vida com aqueles de engenharia para elucidar o entendimento fundamental das relações estrutura-função em tecidos normais e doentes, para desenvolver materiais e métodos de reparação de tecido danificado ou enfermo e para criar substitutos completos para tecidos" [PUTNAM, 1996]. A Figura 1.1 representa de forma esquemática a engenharia de tecido. Células são retiradas de tecido adjacente ao sítio de defeito ósseo. Dispositivos são construídos com essas células quando estas se desenvolvem em uma estrutura tridimensional porosa bioabsorvível, resultando no que se pode chamar de um compósito, material sintético como substrato e células. Esse dispositivo pode ser implantado no local que necessita recuperação.

A essência das tendências atuais é despertar a capacidade do corpo para regeneração dando a este assistência na forma de matrizes tridimensionais, remodeláveis e bioabsorvíveis, moléculas e células instrutivas, se essas não estão disponíveis para serem mobilizadas. Para se alcançar esse objetivo é necessário esforço multidisciplinar incluindo microanatomia, biologia celular e molecular desenvolvidas, imunologia, ciência de materiais e alguns ramos da engenharia [BELL, 1997].

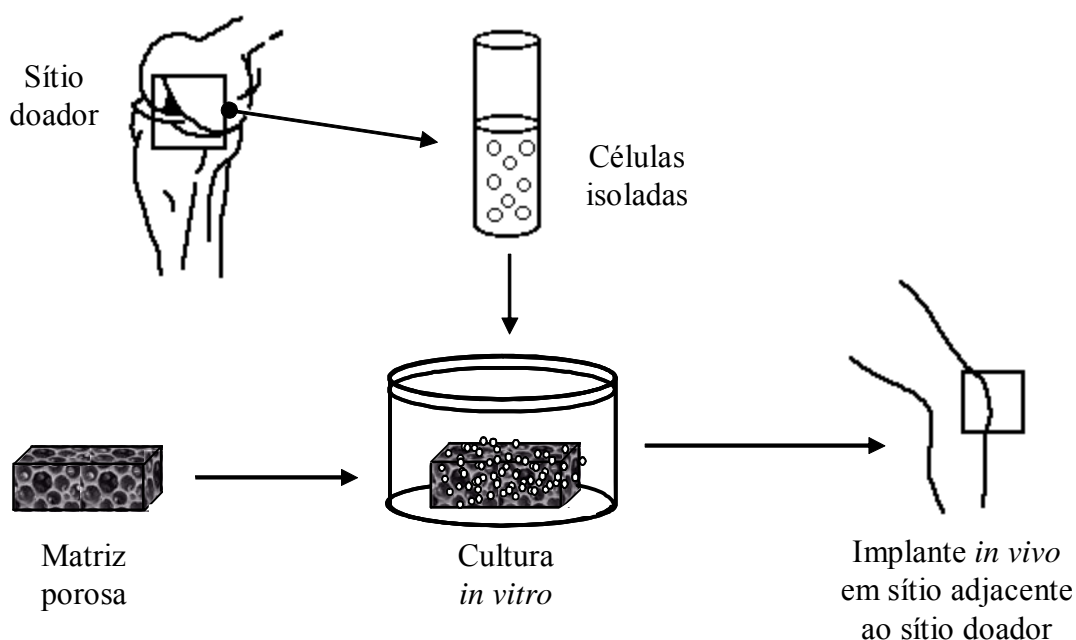


Figura 1.1 - Representação esquemática da engenharia de tecido.

Assim, o que antes era chamado cirurgia reconstrutiva passou a ser chamado Engenharia de Tecido, porque o foco da atenção em projetos de componentes substitutos para partes do corpo mudou drasticamente para os componentes biológicos dos tecidos, as células do corpo e a matriz extracelular. As células são responsáveis pela construção dos tecidos em organismos vivos durante seu desenvolvimento e através da vida e a matriz extracelular consiste de um complexo de secreções celulares.

As origens da matriz extracelular devem ser bem analisadas quando se concentra em projeto de tecidos. Os tecidos são comunidades de células nas quais individualmente ou em pequenos grupos, assim como grandes aglomerados ou placas, são rodeadas ou apoiadas pelas matrizes extracelulares. A matriz extracelular é um material extremamente complexo de alta diversidade molecular e singularidade microarquitetural. Se a matriz tridimensional ou *scaffold*, usada como o componente extracelular do tecido que está sendo projetado, for muito simplificada sua aplicação nesse caso pode ser limitada. Se esta não for capaz de fornecer os sinais necessários para as células, que são semeadas nesta matriz *in vitro* ou mobilizadas por esta *in vivo*, construir o tecido, todo o processo de regeneração pode falhar. Um atributo potencialmente valioso dos materiais não celulares, instalados *in vivo* como precursores

de tecidos, é a habilidade destes em mobilizar células apropriadas dos tecidos vizinhos, circulando fluidos corporais ou fontes de células mãe ou células tronco (*stem cells*), tornando desnecessário povoar as próteses com células antes da implantação.

A matriz porosa fornece o suporte necessário para as células preservarem sua função de diferenciação e define a forma limite do novo tecido [CRANE, 1995]. Estruturas macroporosas desenvolvidas a partir de polímeros sintéticos, cerâmicas (hidroxiapatita, fosfatos de cálcio), vidros bioativos e alguns materiais naturais como osso, corais e compósitos colágeno-glicosaminoglicano (pele artificial) [LANGER, 1997], estão sendo investigados como análogos aos elementos estruturais das matrizes extracelulares naturais a fim de fornecerem resistência e integridade estrutural ao tecidos projetados [MALEKZADEH, 1998; CRANE, 1995; DEGROOT, 1997; WINTERMANTEL, 1996 etc]. Tais estruturas fornecem um mecanismo para o transplante e a localização celular, definem o espaço potencial para o desenvolvimento do tecido pelo fornecimento de suporte mecânico e determinam a morfologia grosseira do tecido projetado. Estes dispositivos estão bem adaptados para liberação de um grande número de células devido à alta porosidade e grande área superficial. A estrutura macroporosa permite ainda, a vascularização e a integração estrutural do novo tecido com o tecido natural circundante. Outro aspecto importante a ser considerado nestes dispositivos é a sua biodegradação. A degradação da matriz porosa acompanhando o desenvolvimento do tecido conduzirá a um novo tecido completamente natural sem nenhum elemento sintético permanente [PUTNAM, 1996].

O foco desse trabalho é o desenvolvimento de substratos para engenharia de tecido ósseo. Há muitas razões clínicas para desenvolver alternativas para a regeneração deste tecido, incluindo a necessidade por materiais de preenchimento mais eficientes que podem ser usados na reconstrução de grandes defeitos ortopédicos. Os dispositivos para engenharia de tecido ósseo e cartilagem devem apresentar sinergia para ambas estratégias indutivas e condutivas sujeitas ao controle pelo movimento e a biomecânica [REDDI, 1994]. Alguns estudos prévios têm mostrado que as cerâmicas de fosfato de cálcio são capazes de induzir a osteogênese quando implantadas em sítios não ósseos, mas essa habilidade depende tanto das espécies de animais [YANG, 1996], quanto dos

tipos de cerâmica, que podem ter diferentes composições de fases e estrutura porosa e da superfície [YANG, 1997; KLEIN, 1994; GARDELLA, 1996; PEREIRA, 1995]. Os vidros bioativos tanto quanto a hidroxiapatita (HA) e alguns fosfatos de cálcio (trifosfato de cálcio-TCP, tetrafosfato de cálcio-TTCP) promovem também a formação óssea com mecanismo distinto para esses materiais [GARCÍA, 1998; FURUSAWA, 1998]. Já se sabe que a taxa de degradação dos vidros bioativos é maior [GREENSPAN, 1998; PEREIRA, 1994b] do que a dos fosfatos de cálcio (HA, TCP) e o controle dessa característica é melhor para os vidros pois nesse caso a degradação depende da composição química do material [HENCH, 1980; CHEN, 1998] e em fosfatos de cálcio depende da fase presente. O TCP possui uma taxa de degradação mais elevada do que HA [ZYMAN, 1998].

Muitos materiais já usados como materiais para implantes apresentam características que os tornam candidatos para serem usados em engenharia de tecido ósseo, se obtidos com uma arquitetura e composição adequados. O vidro bioativo foi escolhido para como material-base para a construção de estruturas tridimensionais porosas porque muitos resultados apresentados na literatura mostram que esse biomaterial apresenta excelentes propriedades de osteoindução e osteocondução, bioatividade e degradabilidade controlada quando o pó é utilizado em culturas de células. É de fundamental importância conhecer o comportamento das estruturas tridimensionais apropriadas para engenharia de tecidos em testes de bioatividade e dissolução além da cultura de células.

Assim, será apresentada uma revisão nos próximos capítulos abordando todos os aspectos relacionados à engenharia de tecido ósseo. Isso significa uma revisão sobre (i) alguns biomateriais candidatos à regeneração deste tecido, com enfoque nos vidros bioativos que serão utilizados; (ii) revisão das definições clássicas de Engenharia de Tecido e questões biológicas e de engenharia relacionadas ao assunto; (iii) processamento sol-gel, que foi utilizado juntamente com técnicas de formação de espumas na síntese das matrizes porosas e (iv) relação de processos de obtenção de matrizes porosas. Em seguida apresenta-se o capítulo Metodologia onde foi descrito o procedimento utilizado para a determinação do método de obtenção das espumas de sol-

gel e procedimentos relacionados. O capítulo de Resultados e Discussões apresenta os resultados de análise das estruturas obtidas comparados aos resultados da literatura. Completando, há o capítulo das conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

## 2 OBJETIVOS

Desenvolver um método para elaboração de matrizes tridimensionais de vidro bioativo, sistema  $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ , com poros interconectados, bioreabsorvível com taxa de degradação controlável, para aplicação em engenharia de tecido ósseo. Introduzir a hierarquia desejada, macroporos e mesoporos, às estruturas através de espumas produzidas em solução sol-gel com adição de surfactante. Variar alguns parâmetros do processamento, composição química do vidro, concentração de surfactante, temperatura de tratamento térmico, etc, relacionando-os às características desejáveis para a aplicação. Avaliar a bioatividade e dissolução das estruturas porosas em fluido fisiológico simulado (ou *Simulated Body Fluid-SBF*).

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Biomateriais**

O grande desafio das pesquisas com biomateriais é que todos os dispositivos para implante substituem tecidos vivos cujas propriedades físicas, químicas e ópticas, etc. são um resultado de milhares de anos de evolução, e, os quais têm a capacidade de crescer, regenerar e se reparar em alguns casos. A interação dos diversos fatores físico, biológico, clínico e tecnológico deve ser considerada quando os biomateriais são usados para reparação ou regeneração de partes do corpo humano [HENCH, 1998b].

Os materiais utilizados na substituição de ossos devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos. Tais propriedades caracterizam a biocompatibilidade. Os materiais sintéticos comumente utilizados para estes fins podem ser metais, polímeros, compósitos, cerâmicas e vidros.

A biocompatibilidade e o controle da interface biomaterial/tecido são problemas primordiais neste campo das ciências dos materiais. Biocompatibilidade é a capacidade de um material funcionar com uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica. Refere-se à habilidade do dispositivo continuar exercendo a sua função por um período de tempo tão longo quanto necessário. Para que um material seja biocompatível, este não deve afetar negativamente o ambiente fisiológico que por sua vez não afetaria o material prejudicialmente. Exemplos de possíveis efeitos dos biomateriais em ambientes vivos devido à deficiência de compatibilidade sangüínea são trombogenicidade e a indução da destruição das células vermelhas do sangue. Os biomateriais não devem ser carcinogênicos, mutagênicos e provocar resposta imunológica. Além disso, devem apresentar estabilidade química ou comportamento químico compatível com a sua aplicação, às vezes se deseja que estes sejam reabsorvíveis.

As reações que podem ocorrer na interface biomaterial/tecido dependem, dentre diversos fatores do tipo de material usado na confecção do implante. Se o material é tóxico o tecido adjacente morre; se o material é atóxico e biologicamente inativo, uma cápsula de tecido fibroso se forma ao redor do implante, com espessura variável; se o material é não tóxico e biologicamente ativo (bioativo), estabelecem-se ligações que unem os dois lados formando uma interface entre o implante e os tecidos adjacentes; e, finalmente, se o material é atóxico e se dissolve (reabsorvível), então o tecido adjacente o substitui.

Um exame detalhado em nível molecular dos eventos na interface implante/tecido é possível atualmente devido aos avanços nos procedimentos de isolamento e cultura de células, uso da biologia molecular associada a técnicas de bioquímica e o estabelecimento de um novo campo de pesquisa biológica/biomédica: engenharia de tecido e celular [DEE, 1996].

É importante para quem vai desenvolver os dispositivos biomédicos ter diversas opções de biomateriais disponíveis, já que cada aplicação exige um único ambiente para interações célula-célula. Tais aplicações relacionadas por Lanza *et al* incluem: (a) suporte para o crescimento do novo tecido (a comunicação célula-célula, a disponibilidade de nutrientes, fatores de crescimento e agentes farmacologicamente ativos devem ser maximizados); (b) prevenção da atividade celular (é indesejável, onde o tecido cresce, como por exemplo em adesões cirurgicamente induzidas); (c) resposta guiada do tecido (realçando uma resposta particular da célula enquanto se inibem outras); (d) aumento da fixação celular e sua subsequente ativação (fixação de fibroblastos, proliferação e produção de matriz extracelular); (e) inibição de fixação celular e/ou ativação (por exemplo fixação de plaquetas em um enxerto vascular); (f) prevenção de resposta biológica (por exemplo bloqueando anticorpos contra enxertos provenientes de outras espécies ou da mesma espécie, que são usados em transplantes) [LANZA, 1997].

A aplicação de biomateriais adaptados para substituição óssea é limitada pelas propriedades desses materiais. Para a substituição de articulações sujeitas à carga, em

particular a substituição total de quadril, os metais ainda são escolhidos por causa da estabilidade mecânica que esses materiais apresentam, apesar do problema de fratura por corrosão ter sido observado em alguns estudos de longo período. O tempo de sobrevivência da maioria dos implantes metálicos é limitado devido à carência de biocompatibilidade. Os aços inoxidáveis e as ligas Co-Cr são relatadas por mostrarem desgaste e corrosão durante contato por longo tempo com fluido fisiológico e tecidos. Algumas vezes um indesejável derrame de íons metálicos tóxicos provenientes do implante, causa uma resposta inflamatória nos tecidos vizinhos resultando na formação de uma encapsulação fibrosa do implante.

Atualmente tem-se dado maior atenção aos materiais bioativos. As cerâmicas de fosfato de cálcio e os vidros bioativos estão sendo amplamente estudados por apresentarem excelentes propriedades de ligação com o osso. As cerâmicas de fosfato de cálcio têm uma grande semelhança com a hidroxiapatita, o mineral mais importante da constituição do tecido ósseo vivo [VROUWENVELDER, 1993]. Outros materiais apresentam algumas propriedades igualmente favoráveis à sua aplicação como substrato para regeneração do tecido ósseo. Alguns serão brevemente descritos ao longo desse capítulo.

Os biomateriais se dividem em naturais e sintéticos. Entre os biomateriais naturais estão por exemplo o osso autógeno e o colágeno. Já os biomateriais sintéticos subdividem-se em: polímeros, compósitos, cerâmicas e metais.

### **3.1.1 Biomateriais Naturais**

#### *Tecidos biológicos e osso*

A retirada de tecido de um paciente do sítio doador e o transplante deste para um sítio hospedeiro, às vezes até mantendo o suprimento de sangue, tem sido o melhor padrão de muitos procedimentos cirúrgicos tais como fusão vertebral e cirurgia de revisão, devido ao fato de não existir a possibilidade de rejeição, pois o material é obtido do tecido ósseo do próprio paciente. Este tipo de enxerto, chamado autoenxerto, provoca

preocupações éticas ou imunológicas mínimas, mas possui importantes limitações como disponibilidade, principalmente, tendência à reabsorção e algumas vezes um comprometimento das propriedades biomecânicas.

O osso autógeno pode ser obtido de duas maneiras para a utilização em cirurgias. A primeira é a criação de um alvéolo cirúrgico provocado próximo ao sítio da cirurgia. Após trinta dias o alvéolo é reaberto, o material osteóide do alvéolo é retirado com uma cureta e colocado no leito cirúrgico previamente preparado. O fator limitante é que deve haver osso disponível para a criação do alvéolo cirúrgico e a quantidade de material conseguido é muito pequena restringindo-se então a pequenas cirurgias. O fator desgastante para o paciente é a necessidade de três intervenções cirúrgicas.

Uma solução parcial para algumas das limitações do autoenxerto é o uso de transplante de tecido de doadores humanos, um homoenxerto, assim como transplante vivo (ex. coração, coração-pulmão, rim, fígado, retina) ou a partir de cadáveres (osso congelado a seco). A disponibilidade, a necessidade de drogas imunossupressoras, preocupações com contaminações virais, etc, as questões éticas e religiosas, todos esses fatores limitam o uso dos homoenxertos.

A segunda maneira de obtenção de osso autógeno é a retirada cirúrgica de fragmentos de osso calcificado do tecido ósseo distante da intervenção cirúrgica. O tecido ósseo escolhido pode ser de diversas partes do corpo como maxilar, quadril, fêmur etc [HENCH, 2000].

A terceira opção nesse sentido seria os transplantes de outras espécies vivas e não-vivas, chamado heteroenxerto ou xenoenxerto. Os xenoenxertos não-vivos, quimicamente tratados são rotineiramente usados como substituições de válvulas cardíacas (suíno) mas os substitutos de ossos de bovinos têm sido gradualmente abandonados. O uso de heteroenxerto vivo, modificado geneticamente, é controverso e raramente usado atualmente [HENCH, 2000].

### *Colágeno*

O colágeno é o principal componente dos tecidos das articulações dos mamíferos representando aproximadamente 30% de toda a proteína contida no corpo humano. É encontrado em todos os principais tecidos que requerem resistência e flexibilidade (por exemplo pele, osso). Quatorze tipos de colágeno já foram identificados, o mais abundante é o tipo I. Por causa da sua abundância e propriedades físicas e biológicas únicas, o colágeno tipo I tem sido usado extensivamente na formulação de materiais biomédicos. Este tipo de colágeno é encontrado em altas concentrações em tendões, pele e osso, os quais são, conseqüentemente, fontes convenientes e abundantes para isolamento deste polímero natural.

As moléculas individuais de colágeno se polimerizam espontaneamente *in vitro* em fortes fibras que podem ser subseqüentemente transformadas em estruturas organizadas maiores.

O uso de matrizes colágenas oferece um benefício adicional para reparo de tecido mole, já que sua resistência mecânica, a úmido e a seco, permite suturar o material ao tecido, dessa maneira fornecendo um molde para seu o crescimento global.

### *Fosfatos e Carbonatos Naturais*

Material encontrado na natureza em corais e crustáceos, o chitin é composto principalmente de carbonatos. A degradação de chitin resulta em água, íons carbonatos e dióxido de carbono. Compostos não tóxicos. Estes compostos já são comuns no organismo. O ácido carbônico, por exemplo, é um controlador do nível de pH do sangue e os seus subprodutos podem ser facilmente decompostos e excretados através da respiração. A estrutura do chitin é muito similar à do osso, isso favorece seu uso em reparos de tecido ósseo [WAN, 1998]. Infelizmente esse material não possui resistência mecânica suficiente para reparar ossos longos. E ainda, medicamentos devem ser usados para prevenir coagulação e sua rejeição pelo organismo. Alguns trabalhos de pesquisa

[SIVAKUMAR, 1996] mostraram também a obtenção de um tipo de hidroxiapatita a partir do processo de troca hidrotermal, onde o carbonato de cálcio presente em um coral marinho (coral do gênero *Goniopora*) é convertido em hidroxiapatita, denominada hidroxiapatita coralina. Esse coral existe em abundância na costa sudeste da Índia e, também por apresentar uma estrutura porosa com poros interconectados, acredita-se que esse material possa ser desenvolvido para aplicação em substitutos ósseos.

### **3.1.2 Biomateriais Sintéticos**

#### *Polímeros Biodegradáveis*

Os polímeros biodegradáveis têm sido amplamente empregados como materiais de implante e são também largamente investigados como substrato para engenharia de tecido, como pele artificial por exemplo [PACHENCE & KOHN, 1997].

A principal razão de se querer um material degradável é que os médicos desejam ter dispositivos que possam ser usados como um implante e que não necessitem uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção. Além de eliminar a necessidade de uma segunda cirurgia, a biodegradação pode oferecer outras vantagens. Por exemplo, um osso fraturado que foi fixado por um implante de aço inoxidável rígido, não-biodegradável pode fraturar novamente durante a remoção desse implante. Como a tensão é suportada pelo rígido aço inoxidável, o osso não é capaz de receber carga suficiente durante o processo de recuperação. Portanto, um implante fabricado a partir de um polímero biodegradável pode ser projetado para degradar a uma taxa em que vagarosamente se transferirá carga para o osso em recuperação. Outro uso interessante para o qual os polímeros biodegradáveis oferecem enorme potencial é como base para liberação controlada de medicamentos, tanto como um sistema único como em conjunção em um dispositivo médico [PACHENCE & KOHN, 1997].

Na primeira metade do século passado, as pesquisas sobre materiais sintéticos a partir de ácido glicólico e outros ácidos  $\alpha$ -hidróxidos foram abandonadas porque os polímeros resultantes eram muito instáveis para uso industrial de longo prazo. Entretanto, esta

grande instabilidade, fundamental para a biodegradação, tem sido considerada de extrema importância em aplicações médicas há mais de três décadas. Os polímeros preparados a partir do ácido glicólico e ácido lático têm uma variedade muito grande de usos na indústria médica, iniciando com as suturas biodegradáveis aprovadas pela primeira vez nos anos 60. Desde então, diversos produtos baseados nos ácidos lático e glicólico e outros materiais, incluindo poli(dioxanone), copolímeros poli(carbonato trimetileno) e copolímeros e homopolímeros poli( $\epsilon$ -caprolactone)-têm sido aprovados para o uso como dispositivos médicos. Além desses dispositivos já aprovados, diversas pesquisas continuam sobre polianidridos, poliortoesters, polifosfazanos e outros polímeros biodegradáveis.

Os polímeros biodegradáveis sintéticos oferecem maiores vantagens do que os materiais naturais. Esses materiais podem ser projetados para oferecer uma faixa mais ampla de propriedades e uniformidade mais previsível por lote do que os materiais provenientes de fontes naturais. Os polímeros sintéticos representam também uma fonte mais confiável de matérias-primas, a qual está livre de preocupações com imunogenicidade.

O critério geral para seleção de um polímero que será usado como biomaterial é combinar as propriedades mecânicas e o tempo de degradação à necessidade da aplicação. O polímero ideal para uma determinada aplicação deve:

- Ter propriedades mecânicas que combinem com a aplicação, permanecendo suficientemente resistente até que o tecido em torno do implante seja recuperado.
- Não provocar uma resposta tóxica ou inflamatória.
- Ser metabolizado pelo organismo após cumprir seu propósito, sem deixar traços.
- Ser facilmente processável na forma do produto final.
- Demonstrar validade aceitável.
- Ser facilmente esterilizado.

Os fatores que afetam a performance mecânica de polímeros biodegradáveis incluem seleção de monômeros, seleção de iniciadores, condições de processo e a presença de

aditivos. Estes fatores por sua vez influenciam a hidrofiliicidade e a cristalinidade dos polímeros, as temperaturas de fusão e transição vítrea, o peso molecular, a distribuição do peso molecular, os grupos extremos, a seqüência de distribuição (aleatória ou blocos) e a presença de monômeros residuais ou aditivos. Além disso, estudam-se também os efeitos das variáveis acima sobre a biodegradação.

A seguir apresentam-se algumas características de polímeros biodegradáveis que estão sendo comumente usados ou investigados para uso em fechamento de ferimentos (suturas, grampos); dispositivos de fixação ortopédica (pinos, hastes, parafusos, ligamentos); aplicações odontológicas (regeneração guiada de tecido); aplicações cardiovasculares (enxertos); e, aplicações intestinais.

#### *PGA, PLA e seus copolímeros*

Entre os dispositivos biodegradáveis os mais populares são ácido polilático (PLA) e ácido poliglicólico (PGA). Estes materiais têm sido estudados por mais de 40 anos. De Groot *et al* descreveram que nos anos 60 foi reportado o uso desses polímeros como suturas biodegradáveis e também como hastes para reparação de fraturas em mandíbulas de cachorros, dessa forma gerando interesse na aplicação desses materiais em medicina [DE GROOT, 1997]. Os dispositivos de fixação feitos de PLA e PGA, ou seus copolímeros tendem a degradar (perder massa devido à reabsorção ou dissolução do biomaterial) lentamente com o tempo *in vivo*. A degradação então, resulta na redução do peso molecular, mudanças estruturais e redução na resistência e rigidez [DE GROOT, 1997]. Devido a este último efeito, tais biomateriais são obviamente apropriados para fixação de fratura óssea onde uma gradual transferência de carga para reparar o tecido pode virtualmente eliminar a tensão de cisalhamento e a osteopenia. Em outras palavras, como o dispositivo degrada suas propriedades mecânicas deterioram-se e assim pode suportar somente um nível decrescente de carga, o que resulta em carregamento gradual do osso suportado ou reparado. Provavelmente a vantagem mais significativa de se usar materiais biodegradáveis é a propriedade que estes apresentam de serem absorvidos *in situ*, o que torna desnecessário um segundo procedimento cirúrgico para remoção do

aparelho. PLA, PGA e seus copolímeros têm sido usados para fabricar substitutos de enxerto ósseo e sistemas de liberação de proteínas osteogênicas ou drogas.

O PGA é altamente cristalino, portanto apresenta alto ponto de fusão, e sua solubilidade em solventes orgânicos é baixa. O PGA foi usado no desenvolvimento da primeira sutura sintética absorvível. A cristalinidade do PGA em suturas cirúrgicas é tipicamente na faixa de 46-52%. Devido à sua natureza hidrofílica, as suturas cirúrgicas feitas de PGA tendem a perder suas propriedades mecânicas rapidamente, isso ocorre durante um período que varia de 2 a 4 semanas pós-implantação.

Devido à presença de um grupo metil extra, compondo a cadeia orgânica, no ácido láctico, o PLA é mais hidrofóbico que o PGA. A hidrofobicidade do PLA limita a taxa de absorção de água de filmes finos em aproximadamente 2%. Além disso, o PLA é mais solúvel em solventes orgânicos que o PGA.

As diferenças na cristalinidade de D,L-PLA e L-PLA têm consequências de importância prática: como o D,L-PLA é um polímero amorfo, este é usualmente considerado para aplicações tais como liberação controlada, onde é importante haver uma dispersão homogênea de espécies ativas dentro de uma matriz monofásica. Por outro lado, o polímero L-PLA semicristalino é preferido em aplicações em que alta resistência mecânica e tenacidade são requisitos básicos—por exemplo, suturas e dispositivos ortopédicos [ATHANASIOU, 1997].

### *Metais*

Os metais têm sido usados de várias formas como implantes. O primeiro metal desenvolvido especificamente para uso humano foi o “Sherman Vanadium Steel”, que foi utilizado para fabricar chapas e parafusos. A maioria dos metais tais como Fe, Cr, Co, Ni, Ti, Ta, Mo e W usados para fabricação de implantes podem ser tolerados pelo organismo em quantidades diminutas. Algumas vezes esses elementos metálicos, em sua forma natural, são essenciais nas funções celulares (ex: Fe) ou na síntese da vitamina B<sub>12</sub> (Co), mas em grandes quantidades podem se tornar tóxicos. A

biocompatibilidade de implantes metálicos é assunto que causa preocupação considerável por causa da corrosão provocada pelo ambiente hostil do organismo. A consequência da corrosão é a perda de material, o que enfraquece o implante, e provavelmente mais importante, os produtos da corrosão se espalham para dentro dos tecidos resultando em efeitos indesejáveis. Alguns materiais como o aço inoxidável 316 e 316L são mais resistentes à corrosão e, portanto, são mais amplamente utilizados como material de implante. O cromo é o principal responsável pela resistência à corrosão desses aços.

Do ponto de vista da estabilidade química, alguns metais usados em implantes, apresentam baixa resistência à corrosão em ambientes como o do organismo humano. O resultado disso é a degradação desses metais em óxidos e hidróxidos ou outros compostos que podem ser tóxicos para os tecidos/células do corpo. A resistência à corrosão é então um importante aspecto da biocompatibilidade. Outra desvantagem é que os metais em geral não apresentam boa adesão ao tecido ósseo vizinho ao transplante.

Tentativas de se usar Ti para fabricação de implantes datam do final dos anos 30. Descobriu-se que o titânio podia ser tolerado em fêmur de gatos tanto quanto o aço inoxidável ou uma liga CoCrMo. Sua densidade relativamente baixa ( $4,5\text{g/cm}^3$  comparado com  $7,9\text{g/cm}^3$  do aço inoxidável,  $8,3\text{g/cm}^3$  de CoCrMo fundido e  $9,2\text{g/cm}^3$  de CoNiCrMo trabalhado), boas propriedades químicas (resistência à corrosão), mecânicas e boa biocompatibilidade são características importantes para sua aplicação em implantes. Diversos estudos apresentam o uso de Ti e ligas de Ti com recobrimento de HA porosa para implantes ortopédicos ou dentários [DEKKER, 1998; HENCH, 1998b].

Desde quando se iniciou pesquisa sobre o uso de metais como biomateriais, existiam questões que exigiam investigação adicional: a interação do metal com o ambiente biológico e os mecanismos de degradação não-eletroquímicos incluindo as interações metal-proteína. Alguns estudos foram então realizados a fim de se estabelecer as interações de alguns metais com o ambiente biológico. Gardella e De Gatica

observaram que quando alguns implantes são inseridos no corpo humano, há uma resposta inflamatória na qual o peróxido de hidrogênio é liberado [GARDELLA, 1996]. A consequência desta interação entre o material do implante e o  $H_2O_2$  é muito importante porque radicais livres, agentes potenciais para a deterioração celular, são formados nesse estágio e o destino do implante pode depender da sua habilidade em sustentar ou interromper a formação destes radicais livres. Foi proposto que a resposta inflamatória para um implante metálico pode mudar drasticamente a estrutura e reatividade desta supostamente inerte e certamente biocompatível classe de materiais metálicos para implantes. Esses fatores podem justificar o uso dos recobrimentos de material cerâmico em substratos metálicos.

### *Biocerâmicas*

A década de 70 marcou o início do uso mais intenso de materiais cerâmicos com propriedades que possibilitam a sua classificação como biocerâmicas. A primeira biocerâmica de uso muito difundido neste período foi a alumina densa ( $\alpha-Al_2O_3$ ), que se apresenta como bioinerte. Este material, devido a sua boa biocompatibilidade e elevada resistência mecânica, vem sendo usado com frequência em próteses ortopédicas que substituem ossos ou parte deles que são submetidos, na sua atividade funcional, à esforços elevados [KAWACHI, 2000].

Durante os últimos quarenta anos tem ocorrido uma revolução no uso de cerâmicas para aumentar a qualidade de vida do homem: o desenvolvimento de cerâmicas especialmente projetadas e fabricadas para o reparo e reconstrução de partes do corpo doentes, danificadas ou deterioradas (devido à idade). As cerâmicas usadas para esse propósito são chamadas *biocerâmicas*. A maioria das aplicações de biocerâmicas está relacionada ao reparo do sistema de sustentação do corpo, composto de ossos, articulações e dentes, seus tecidos duros e moles. O osso é especialmente vulnerável à fraturas devido à perda de densidade óssea e resistência com a idade. Este efeito é observado principalmente nas mulheres por causa das mudanças hormonais associadas com a menopausa. A densidade óssea decresce porque as células do crescimento ósseo (osteoblastos) tornam-se progressivamente menos produtivas na formação de tecido

novo e reparação de microfraturas. A densidade mais baixa deteriora gravemente a resistência do osso poroso chamado trabecular ou osso esponjoso, localizado nas extremidades de ossos longos e em vértebras. E a infeliz consequência é que muitas pessoas idosas fraturam seus quadris ou têm uma vértebra arruinada e problemas de coluna.

As cerâmicas são também usadas para substituir partes do sistema cardiovascular, especialmente válvulas cardíacas, onde se aplica carbono pirolítico puro ou como recobrimento. Formulações especiais de vidros são também usadas de forma terapêutica para o tratamento de tumores.

As biocerâmicas são produzidas em uma variedade de formas e fases e fornece muitas funções diferentes em reparos do organismo. Em muitas aplicações as cerâmicas são usadas como materiais de volume em uma forma específica: implantes, próteses ou dispositivos protéticos. As biocerâmicas também são usadas para preencher uma função enquanto o processo natural de reparo restaura essa função. Em outras situações a cerâmica é usada como recobrimento sobre um substrato ou como segunda fase em um compósito, combinando as características de ambos dentro de um novo material com propriedades bioquímicas e mecânicas realçadas.

As biocerâmicas são produzidas em muitas fases distintas. Estas podem ser simples cristais (safira), policristalinas (alumina ou hidroxiapatita), vidro (Bioglass<sup>®</sup>), vitro-cerâmica (vitro-cerâmica A/W) ou compósitos (polietileno-hidroxiapatita). A fase ou fases usadas depende das propriedades e funções requeridas. Por exemplo o monocristal de safira é usado como implante dentário devido à sua alta resistência. A vitro-cerâmica A/W é usada para substituir vértebras porque tem alta resistência e se liga ao osso. Os vidros bioativos têm baixa resistência mas ligam-se rapidamente ao osso, portanto são usados para aumentar o reparo de defeitos ósseos [HENCH, 1998].

O grande desafio frente ao uso de biocerâmicas é substituir um tecido ósseo deteriorado, por exemplo, por um material que possa funcionar por toda a vida do paciente. O tempo médio de vida das pessoas é em torno de 80 anos ou mais e a necessidade de

tratamentos como os descritos aqui começa aproximadamente aos 60 anos. As biocerâmicas devem funcionar, então por 20 anos ou mais. Esta exigência quanto à durabilidade deve ser considerada em condições de uso que são especialmente severas para materiais cerâmicos: soluções salinas corrosivas a 37°C e ainda sob cargas mecânicas cíclicas, multiaxiais e variáveis.

Muitas composições de cerâmicas são testadas para uso no corpo humano, entretanto somente algumas têm apresentado aplicação clínica. O sucesso clínico dessas biocerâmicas requer a realização simultânea de uma interface estável com o tecido e uma combinação de comportamento mecânico do implante com o tecido a ser substituído. Estudos comparativos de várias composições de vidro bioativo, cerâmicas e vidro-cerâmicas mostraram que existe uma faixa considerável de níveis de bioatividade, medida pelas taxas de ligação do tecido ósseo com implantes densos ou taxa de proliferação de células ósseas em presença de partículas bioativas [HENCH, 2000].

O mecanismo de adesão tecidual está diretamente relacionado ao tipo de resposta tecidual na interface do implante ou dispositivo. Ou seja, a interação superfície do material/célula é a questão-chave para efetivação da ligação óssea, as mudanças físico-químicas na superfície dos materiais e o comportamento biológico do tecido ósseo devem ser coordenados [OHGUSHI, 1994]. A Tabela 3.1 resume alguns mecanismos de resposta do tecido e cita exemplos.

Outros fatores como: a composição química de biocerâmicas e vidros bioativos, estrutura porosa, composição de fase, sítio de implantação e espécies animais podem afetar a resposta do tecido [YANG, 1996].

A limitação associada às estruturas porosas é que para o tecido se manter viável e saudável, os poros devem ser maiores que 100-150µm em diâmetro. A grande área superficial, consequência da porosidade elevada, é requerida devido à necessidade de se fornecer um suprimento sanguíneo para o crescimento do tecido. Tecido vascularizado não surge em poros que medem menos que 100µm [FREYMAN, 2001; BAKSH, 2000, MUELLER, 2000; CHEN, 2001; BURG, 2000; SEPÚLVEDA, 2001]. É claro que essas

estruturas terão resistência mecânica mais baixa. A vantagem potencial oferecida pela cerâmica porosa é a estabilidade mecânica da interface, com muitas curvas e dobras, que é desenvolvida quando o tecido ósseo cresce para o interior dos poros desta cerâmica.

Tabela 3.1 - Tipos de adesão tecidual em biocerâmicas e classificação da biocerâmica.

<b>Tipo de adesão</b>	<b>Tipo de biocerâmica</b>
Densa, não porosa, cerâmicas quase inertes se fixam morfológicamente.	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ZrO <sub>2</sub>
Para implantes porosos ocorre o crescimento ósseo, e mecanicamente se fixa ao osso (fixação biológica).	Hidroxiapatita porosa Recobrimento de hidroxiapatita em metais porosos
Cerâmicas de superfície reativa, vidros, vidro-cerâmicas ligam-se diretamente por interação química com o osso (fixação bioativa).	Vidros bioativos Vidro-cerâmicas bioativos Hidroxiapatita densa
Cerâmicas e vidros reabsorvíveis em volume ou pó projetadas para serem lentamente substituídos pelo osso.	Sulfato de cálcio (gesso de Paris) Trifosfato de cálcio Sais de fosfato de cálcio Vidros bioativos

Biomateriais reabsorvíveis são projetados para degradarem gradualmente com o tempo e serem substituídos pelo tecido natural do hospedeiro. As complicações no desenvolvimento desses materiais podem ser:

- Manter a resistência e estabilidade da interface ou da estrutura durante o período de degradação e substituição pelo tecido natural;
- Combinar taxas de reabsorção com taxas de reparação dos tecidos, os quais variam amplamente, dependendo do tipo de tecido e sua idade e estado de saúde.

Alguns materiais reabsorvíveis dissolvem muito rapidamente e outros muito lentamente. Por causa da grande quantidade de material que pode ser substituída, é essencial também que um biomaterial reabsorvível consista somente de substâncias metabolicamente aceitáveis. De outro modo, pode ocorrer inflamação crônica e muita dor.

Diferentes fases de cerâmicas de fosfato de cálcio são usadas dependendo da aplicação desejada: ser reabsorvível ou bioativo. As fases estáveis das cerâmicas de fosfato de cálcio dependem consideravelmente da temperatura e da presença de água, durante o processamento ou do ambiente de uso. Sob a temperatura do corpo humano, somente dois tipos de fosfatos de cálcio são estáveis em contato com o meio aquoso, como fluidos corporais: em  $\text{pH} < 4,2$  a fase estável é  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (difosfato de cálcio, brushita,  $\text{C}_2\text{P}$ ), enquanto que, em  $\text{pH} > 4,2$  a fase estável é  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (hidroxiapatita, HA). Em temperaturas maiores, outras fases, tais como  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ( $\beta$ -trifosfato de cálcio,  $\text{C}_3\text{P}$ , TCP) e  $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$  (tetrafosfato de cálcio,  $\text{C}_4\text{P}$ ) estão presentes. As fases de fosfatos de cálcio não-hidratados e de alta temperatura interagem com água, ou fluidos corporais para formar a  $37^\circ\text{C}$  a hidroxiapatita. Assim, a solubilidade da superfície do TCP se aproxima da solubilidade da HA e diminui o pH da solução, que mais adiante aumenta a solubilidade do TCP e eleva a reabsorção. É de grande importância a razão Ca:P na determinação da solubilidade e tendência da reabsorção no organismo. A presença de microporos no material sinterizado pode aumentar a solubilidade dessas fases.

A sinterização das cerâmicas de fosfato de cálcio usualmente ocorre a  $1.000\text{-}1.500^\circ\text{C}$ , após a compactação do pó na forma desejada. As fases formadas em alta temperatura dependem da temperatura e da pressão parcial de água ( $p_{\text{H}_2\text{O}}$ ) na atmosfera de sinterização. Quando a água está presente, a HA pode ser formada e é uma fase estável até  $1360^\circ\text{C}$ . Quando não há água,  $\text{C}_4\text{P}$  e  $\text{C}_3\text{P}$  são as fases estáveis.

A resistência à tração e compressão e resistência à fadiga dependem do volume total de porosidade. A porosidade pode ser na forma de microporos (diâmetro  $< 1\mu\text{m}$ , devido à sinterização incompleta) ou macroporos (diâmetros  $> 100\mu\text{m}$ , criados para permitir o

crescimento ósseo). LU *et al* demonstraram que a densidade de interconexões entre poros também representa um papel importante para a formação óssea. Foi provado que *in vitro*, osteoblastos humanos podem atravessar as interconexões e proliferar dentro dos macroporos, desde que o tamanho mínimo necessário da interconexão seja 20 $\mu\text{m}$ , e o tamanho mais favorável de aproximadamente 40 $\mu\text{m}$  [LU, 1999].

Certas composições de vidros e vitro-cerâmicas podem formar uma ligação mecanicamente forte com o osso. Uma característica comum entre vidros bioativos e cerâmicas bioativas é a modificação cinética da superfície, dependente do tempo, que ocorre após implantação. A superfície forma uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HCA) biologicamente ativa que fornece a interface de ligação com os tecidos. A fase HCA formada é equivalente quimicamente e estruturalmente à fase mineral do osso. No caso dos vidros bioativos, as reações que ocorrem até a formação da camada de HCA podem ser resumidas em:

1. Lixiviação e formação de grupos silanol (Si-OH).
2. Perda de sílica solúvel (Si(OH)<sub>4</sub>) e formação de silanol.
3. Policondensação de silanols para formar um gel de sílica hidratada.
4. Formação de uma camada de fosfato de cálcio amorfa.
5. Cristalização de uma camada de hidroxiapatita carbonatada.

É importante que uma camada de sílica-gel se forme na superfície para que ocorra a nucleação e cristalização da hidroxiapatita [PEREIRA, 1996]. Esses cinco estágios de reação que ocorrem na interface implante-tecido, no lado do material, não dependem da presença de tecidos. Essas reações podem ocorrer em água destilada, soluções Tris-tampão (tris-(hidroximetil) aminometano/HCl), soro fisiológico simulado (*simulated body fluid*-SBF) ou meio de cultura de células.

Além dessas reações outros eventos celulares acontecem após a formação da camada de HCA [HENCH, 1993]:

6. Adsorção de fatores de crescimento na camada de HCA formada.

7. Ação de macrófagos.
8. Adesão das células-tronco.
9. Diferenciação de células-tronco.
10. Geração da matriz óssea.
11. Cristalização da matriz.
12. Proliferação e crescimento do osso

A superfície de dispositivos de vidros bioativos fornece um substrato favorável para a rápida nucleação e crescimento de uma camada biologicamente equivalente de HCA. As diferenças no comportamento *in vivo* de várias composições de vidros são devido às diferenças na taxa de formação dessa camada.

Os componentes básicos na maioria dos vidros bioativos são  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$  e  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Muitos vidros de  $\text{SiO}_2$  bioativos são baseados na fórmula chamada Bioglass<sup>®</sup> 45S5, significando 45% de  $\text{SiO}_2$ . Vidros com quantidades substancialmente grandes de  $\text{P}_2\text{O}_5$  não formam adesão com o tecido ósseo. Hench e colaboradores estudaram uma série de vidros em um sistema de quatro componentes com uma quantidade fixa de  $\text{P}_2\text{O}_5$  de 6% em peso. Os resultados foram apresentados em diagrama ternário mostrado na Figura 3.1 [HENCH, 1998].

Composições na porção central do diagrama (região A) formam uma ligação com o osso. Conseqüentemente, a região é denominada limite de ligação bioativa com o osso. Vidros silicatos dentro da região B (tais vidros utilizados em janelas ou em garrafas) se comportam como materiais quase inertes e induzem à formação de uma cápsula fibrosa na interface implante-tecido. Vidros dentro da região C são reabsorvíveis e desaparecem no espaço de 10 a 30 dias após implantação. Os vidros da região D não são tecnicamente práticos e portanto, não foram testados como implantes.

Composições como as do centro do campo de ligações bioativas ( $I_B > 8$ , Figura 3.1) apresentam taxas de reação (estágios 1-12 listados acima) muito elevadas. Quando a concentração de  $\text{SiO}_2$  na rede do vidro excede 55% em mol aproximadamente, as taxas de reação caem muito e a ligação com o osso é muito lenta. Em uma concentração

acima de ~60% em mol não se observa a formação de uma camada de HCA cristalina, se esse vidro é produzido pelo modo convencional (fusão).

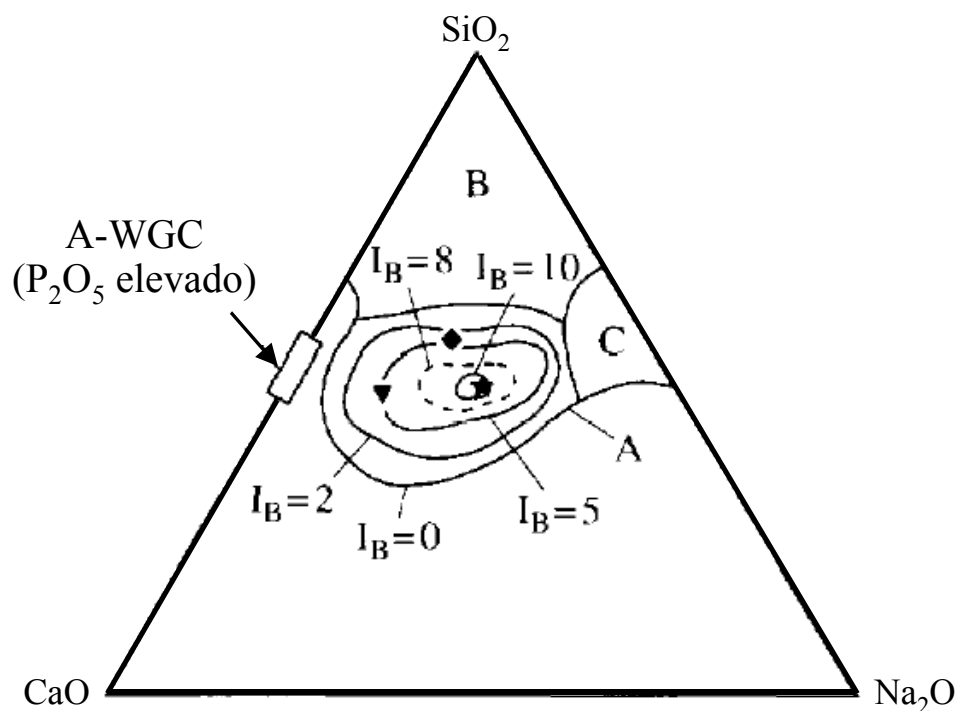


Figura 3.1 - Dependência da composição (% em peso) para as ligações ósseas e tecido mole com os vidros bioativos e vidro-cerâmicas. Todas as composições na região A têm 6% em peso de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. IB=índice de bioatividade, quanto maior mais bioativo é o material [HENCH, 1993].

Já os vidros produzidos pelo processo sol-gel apresentaram bioatividade para até 90% de SiO<sub>2</sub> [LI, 1991a]. Essa elevada bioatividade está relacionada com a ampla faixa de área superficial (textura produzida pelo processamento sol-gel) e grande concentração de grupos silanol sobre a superfície do material microporoso, o que aumenta a nucleação e cristalização heterogêneas de hidroxiapatita carbonatada (HCA) sobre o material, uma exigência para bioatividade [PEREIRA, 1994a]. Vidros de sílica pura, que não têm porosidade, não nucleam HCA em fluido fisiológico simulado [PEREIRA, 1994b; PEREIRA, 1995].

A presença de cálcio e fósforo nos vidros bioativos é considerada responsável pelo desenvolvimento da camada de HCA, principal componente mineral do osso. Em pH alcalino, na interface solução/vidro, o CaO e o P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> são liberados para a solução durante a dissolução da estrutura e reprecipitam formando cristais de HCA. O desenvolvimento e o crescimento dessa camada dependem tanto da composição do vidro bioativo quanto da microestrutura obtida no processamento. Li *et al* verificaram que pós de vidro bioativo com menor concentração de SiO<sub>2</sub> e maior concentração de CaO e P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, exibiram maiores taxas de formação de HCA [LI, 1991b]. Essa observação é de fundamental importância nos primeiros momentos de implantação das estruturas de vidro bioativo *in vivo*, já que é desejável uma rápida integração entre o material do dispositivo e o tecido vivo.

Anderson *et al* [ANDERSON, 1998] estudaram o efeito da sílica sobre o crescimento e diferenciação de osteoblastos. Os resultados mostraram que a superfície do gel de sílica é bioativa, e a resposta de osteoblastos humanos foi totalmente favorável.

As vitro-cerâmicas consistem de pelo menos uma fase vítrea e uma fase cristalina. O processamento para desenvolver uma vitro-cerâmica é caracterizado pela formação de um vidro base e um tratamento térmico adicional. Durante esse processo de tratamento térmico, a nucleação e crescimento devem ser controlados para formar os cristais no vidro base.

A vitro-cerâmica bioativa mais importante clinicamente é o material trifásico de fosfato de sílica composto de apatita (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OHF<sub>2</sub>)) e cristais de wolastonita (CaO-SiO<sub>2</sub>) e uma matriz vítrea rica em CaO-SiO<sub>2</sub>, denominada vitro-cerâmica A/W. As vitro-cerâmicas A/W têm excelentes propriedades mecânicas

Outra série de vitro-cerâmicas bioativas foi desenvolvida por pesquisadores alemães e são denominadas Ceravital<sup>®</sup>. As composições das Ceravital são variações do sistema SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Na<sub>2</sub>O-K<sub>2</sub>O-MgO-CaO, as fases presentes são apatita e matriz vítrea.

Muitos estudos *in vivo* de vidro bioativo já foram relatados usando-se esse material como pó ou gel. Em um destes estudos Furusawa *et al* investigaram a relação entre o tamanho de partícula e a taxa de reabsorção de pó de vidro bioativo reabsorvível implantado em mandíbulas de ratos. Este estudo confirmou as propriedades osteocondutivas do vidro bioativo reabsorvível e mostrou que os primeiros indícios de formação óssea se deram em aproximadamente quatro semanas após a implantação [FURUSAWA, 1998]. Um outro estudo feito por García *et al* relata o papel da adsorção de proteína (fibronecitina, Fn), relacionada com a formação de tecido ósseo *in vivo*, na adesão celular em superfícies de substratos de vidro bioativo modificadas por tratamento prévio em fluido fisiológico simulado. Para a mesma quantidade de proteína adsorvida, a adesão celular foi maior para as superfícies de vidro bioativo com uma camada de fosfato de cálcio amorfo e hidroxiapatita carbonatada, em comparação a um vidro não bioativo e hidroxiapatita sintética [GARCÍA, 1998]. Lai *et al* observaram que o Si presente nos grânulos de vidro bioativo, dos implantes intramusculares realizados em coelhos, difundia para o interior do tecido local ao redor do implante, penetrava na circulação sanguínea e era excretada na urina. As concentrações de Si encontradas na urina estavam bem abaixo do valor de saturação e nenhum acúmulo de Si foi encontrado na maioria dos órgãos. Estes dados sugerem que o aumento da taxa de excreção de Si estava dentro da faixa fisiológica animal. Nos estágios iniciais, o gel de sílica reabsorvido é inofensivamente excretado na forma solúvel através da urina. Há ainda nesse relato a confirmação de que o Si é um elemento essencial para a formação do tecido ósseo e o fato observado de que o osso se forma nas cavidades dos grânulos e não sobre o exterior destes levanta a questão que a diferenciação das células osteoprogenitoras pode estar relacionada à exposição do gel de sílica interno durante o processo de reabsorção [LAI, 1998].

Pode-se citar ainda, pesquisas realizadas para HA e outros fosfatos de cálcio relacionadas à diversos aspectos do estudo desses materiais aplicados à engenharia de tecido. Yuan *et al* por exemplo investigaram a adsorção, *in vitro* e *in vivo*, de uma proteína em substrato de cerâmica de fosfato de cálcio a fim de observar o processo de osteoindução nesse material. Esse trabalho demonstrou que a adsorção da proteína aconteceu, mas também verificou que o processo de osteoindução nestas cerâmicas é

complexo e depende de muitos fatores [YUAN, 1998a]. A função da superfície dos biomateriais no controle da resposta das células óssea e cartilaginosa também já foi objeto de estudo. Os osteoblastos e condrócitos parecem ser sensíveis a diferenças sutis na aspereza e química superficial. A resposta celular também depende do ambiente local e do estado de maturação destas células. Manipulando a superfície de um material, pode-se conseguir melhorar o uso deste em ambas aplicações de engenharia de tecido, *in vitro* e *in vivo* [BOYAN, 1996; HEALY, 1996].

Esses são apenas alguns exemplos dos resultados relacionados ao estudo da aplicação dos fosfatos de cálcio e vidros bioativos em engenharia de tecido. Pode-se notar que são inúmeros os aspectos passíveis de investigação. O meio biológico é extremamente complexo e nem todos os mecanismos que ocorrem simultaneamente durante a regeneração de um tecido estão bem estabelecidos. De qualquer forma, os exemplos apresentados acima e outros tantos que se tem conhecimento na literatura [KAUFMANN, 2000; LU, 1999; DI SILVIO, 1998; TAN, 2003; XYNOS, 2000; DE AZA, 2003] são suficientes para comprovar que os fosfatos de cálcio e os vidros bioativos têm potencial para aplicação em engenharia de tecido ósseo.

### 3.2 Engenharia de Tecido

Engenharia de tecido é uma arte e uma ciência pela qual compostos sintéticos são manipulados dentro de arquiteturas anatomicamente e/ou funcionalmente específicas e, quando exigidos, podem ser integrados com agentes biologicamente ativos e/ou células vivas tais que as propriedades resultantes do conjunto são precisamente adaptadas para suportar a vida celular específica prescrita pelos tecidos receptores [BREKKE, 1998a]. E do ponto de vista de engenharia de materiais, os tecidos são compósitos caracterizados por sistemas multifásicos. Os compósitos celulares são então vistos como consistindo de três principais componentes estruturais: i) células organizadas em unidades funcionais; ii) a matriz extracelular e, iii) arquitetura tridimensional de suporte. [WINTERMANTEL, 1996]

Outras definições para esse campo das ciências relativamente novo são dadas por vários pesquisadores, tais como: *engenharia de tecido é a combinação dos princípios e métodos das ciências da vida com aqueles de engenharia para elucidar a compreensão fundamental das relações estrutura-função em tecidos normais e doentes, com o objetivo de desenvolver materiais e métodos para reparar o tecido danificado ou enfermo, e para criar substitutos completos desses tecidos* [PUTNAM, 1996].

Todas as definições demonstram que esse campo é multidisciplinar já que integra as ciências da vida (biologia celular, bioquímica da matriz extracelular, imunologia, cultura de células e fisiologia) com engenharia (bioquímica, ciência de biomateriais, engenharia biomédica e química). Isso porque os dispositivos de engenharia de tecido podem ser vistos como um sistema de cultura de células (*in vitro* ou *in vivo*) tridimensional desenhado ou projetado para executar uma abundância de funções vitais obrigatórias para produzir uma resposta direcionada ao hospedeiro. A engenharia de tecido envolve o uso de células vivas. E é o uso dos princípios e técnicas de engenharia para elaborar células vivas para uso terapêutico que distingue a engenharia de tecido de estudos mais convencionais de biomateriais e de outros campos da física e ciência biológica e medicina [BLACK, 1997].

As funções vitais citadas acima podem ser divididas em duas categorias principais: questões de engenharia e questões biológicas. O primeiro grupo de funções do dispositivo preocupa-se com questões de engenharia relacionadas ao suporte de um substrato de cultura de célula *in vitro*. Isso inclui as propriedades mecânicas gerais, qualidades estruturais e a geometria tridimensional do dispositivo. A conservação das características mecânicas e da geometria 3-D após implantação permite a esses dispositivos manter espaço geométrico ou espaço tecidual de tamanho e forma prescritos para futura ocupação do tecido vivo. Tem-se conhecimento, há mais de cinco décadas, que o tecido ósseo crescerá em um espaço tecidual vazio adjacente ao tecido saudável, se este espaço pode ser mantido e protegido da invasão de tecido não-ósseo e outros tipos de células concorrentes. Isto só é possível porque pode-se incorporar esta ocorrência natural no projeto e engenharia dos dispositivos cujo objetivo é formação ou regeneração óssea programada. Para tanto, estabelece-se e mantém-se circunstâncias de lesão que irão operar em harmonia com proteínas osteoindutivas e ajudarão a alcançar níveis de dosagem mínimos efetivos para esta morfogênese.

Um dispositivo de geometria 3-D liga suas propriedades de engenharia às qualidades embutidas na resposta do hospedeiro. A arquitetura define uma unidade interna de arranjos espaciais que, por sua vez, contribuem substancialmente para limitar sua característica mecânica. Conhecendo os arranjos espaciais internos do implante, o projeto estrutural também determina a quantidade e forma das superfícies do substrato disponíveis para colonização pela semeadura de células *in vitro* ou povoamento de células endógenas. A densidade aparente, o número e tamanho das câmaras internas e o volume total de vazio da estrutura 3-D determinam, por meios mecânicos, o tamanho de células individuais e as densidades populacionais de células que a unidade pode acomodar.

A segunda categoria de ações do dispositivo lida com as funções biológicas. Estas incluem:

1. migração celular dentro dos dispositivos;

2. adesão celular (para superfícies sintéticas, proteínas exógenas glicosaminoglicanos e da matriz extracelular);
3. suporte a adequada circulação colateral;
4. desenvolvimento e manutenção do fenótipo celular apropriado (conjunto das características de um ser vivo que são expressadas externamente), e;
5. fornecimento de proteínas morfogenéticas e regulatórias.

### **3.2.1 Tecido Ósseo**

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano. Como tecido especializado em suportar pressões, sucede à cartilagem, tanto na ontogênese como na filogênese. O tecido ósseo é formado por células e um material intercelular calcificado, a matriz óssea. As células são: 1) osteócitos: situados em cavidades ou lacunas no interior da matriz; 2) osteoblastos: produtores da parte orgânica da matriz; 3) osteoclastos: células gigantes multinucleadas, relacionadas com a reabsorção do tecido ósseo e que participam dos processos de remodelação dos ossos.

Como não existe difusão de substâncias através da matriz calcificada do osso, a nutrição dos osteócitos depende de canalículos que existem na matriz. Esses canalículos permitem a comunicação dos osteócitos com seus vizinhos, com as superfícies externa e interna do osso e com os canais vasculares da matriz.

Os osteócitos são as células existentes no interior da matriz óssea, ocupando lacunas das quais partem canalículos (Figura 3.2). Essas células são achatadas com forma de amêndoa e prolongamentos citoplasmáticos que, ao menos nos ossos recém-formados ocupam toda a extensão dos canalículos. Os osteócitos são essenciais para a manutenção da matriz mineralizada do osso e sua morte é seguida por reabsorção na matriz. Estudos histoquímicos demonstraram que os osteócitos e os osteoblastos contêm fosfato de cálcio unido à proteína ou glicoproteína. As células do osso são, portanto, capazes de concentrar cálcio no seu citoplasma.

Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica (colágeno e glicoproteínas) da matriz óssea. Dispõem-se sempre nas superfícies ósseas, lado a lado (Figura 3.3). Quando em intensa atividade sintética, são cubóides, com citoplasma muito basófilo; porém em estado pouco ativo tornam-se achatados e a basofilia citoplasmática diminui. Uma vez aprisionado pela matriz recém-sintetizada, o osteoblasto passa a ser chamado osteócito. A matriz se deposita ao redor do corpo da célula e de seus prolongamentos formando assim as lacunas e canalículos. A matriz óssea adjacente aos osteoblastos ativos e que não está ainda calcificada recebe o nome de osteóide ou pré-osso.

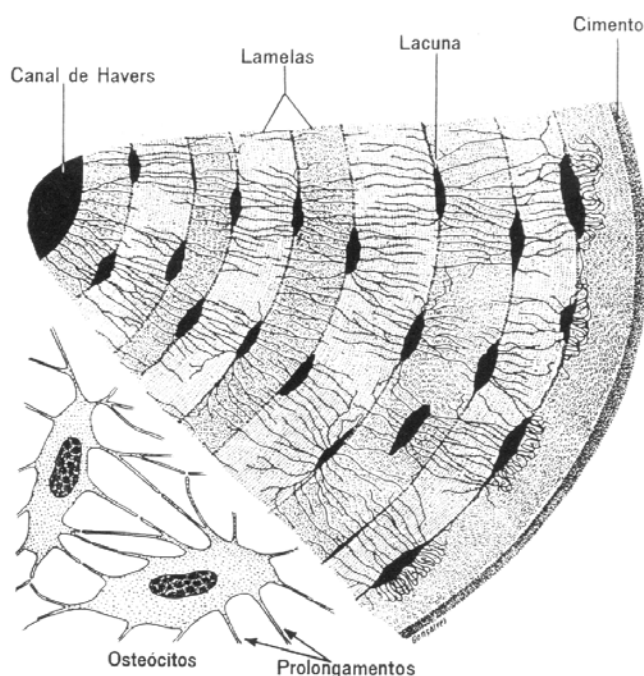


Figura 3.2 - Esquemas mostrando parte de um sistema de Havers e dois osteócitos (esquerda) [JUNQUEIRA, 1973].

Os osteoclastos são células gigantes, móveis, contendo de 6 a 50 núcleos ou mais, que aparecem nas superfícies ósseas quando ocorre reabsorção do tecido. Nos cortes histológicos as áreas de reabsorção podem ser identificadas pela presença de osteoclastos. Os osteoclastos contêm numerosos lisossomos, dando, portanto, reação histoquímica positiva para fosfatase ácida.

A parte inorgânica do tecido ósseo representa cerca de 50% do peso da matriz óssea. Os íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio. Há também bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades. O cálcio e o fósforo formam cristais que estudos de difração de raio-X mostraram ter a estrutura da hidroxiapatita, com a seguinte composição:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  [KAWACHI, 2000]. Nas micrografias eletrônicas os cristais de HA aparecem sob a forma de agulhas ou tabletes alongados, medindo  $40 \times 25 \times 3 \text{nm}$ . Esses cristais arranjam-se ao longo das fibrilas colágenas e são envolvidos por substância fundamental amorfa. Os íons da superfície do cristal de HA são hidratados, existindo, portanto, uma camada de água e íons em volta do cristal. Essa camada é denominada *capa de hidratação*, e sua função é facilitar a troca de íons entre o cristal e o fluido intersticial.

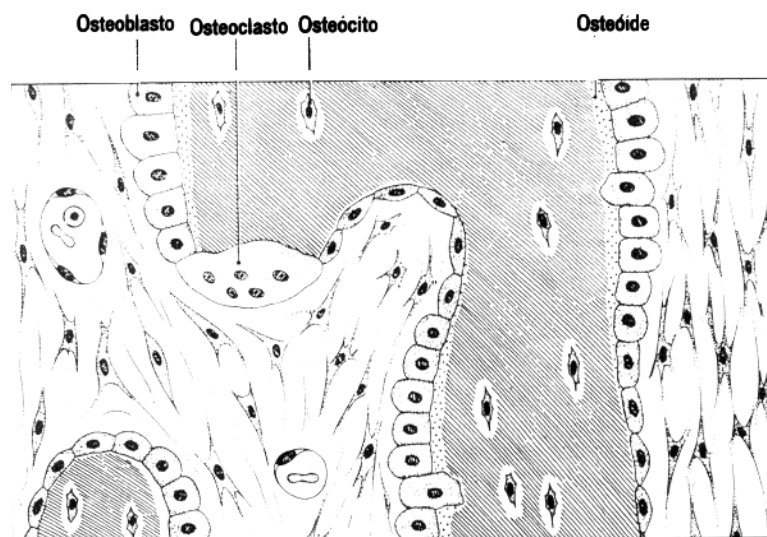


Figura 3.3 - Fase adiantada da ossificação intramembranosa. Na parte inferior da figura vê-se um osteoblasto sendo aprisionado pela matriz óssea [JUNQUEIRA, 1973].

A parte orgânica da matriz é formada por fibras colágenas (95%) e por pequena quantidade de substância fundamental amorfa que contém mucopolissacarídeos ácidos e neutros associados a proteínas, uma das quais é conhecida como osteomicóide. A associação de hidroxiapatita com fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência características do tecido ósseo.

As superfícies internas e externas dos ossos são recobertas por membranas conjuntivas, que formam o endóstio e o perióstio, respectivamente. O revestimento das superfícies ósseas é essencial para a manutenção do tecido, pois áreas de reabsorção óssea aparecem nos locais que perderam o revestimento conjuntivo ou a camada de osteoblastos. O perióstio é formado por tecido conjuntivo denso, muito fibroso em sua parte externa e mais celular e vascular na porção interna, junto ao tecido ósseo. As células do perióstio que morfologicamente são fibroblastos, transformam-se muito facilmente em osteoblastos e têm importante papel no crescimento dos ossos e na reparação das fraturas.

O endóstio é semelhante ao perióstio, sendo muito mais delgado. Nele não se distinguem as duas camadas que geralmente são identificáveis no perióstio. No tecido conjuntivo do perióstio e endóstio existem vasos sanguíneos, que se ramificam e penetram nos ossos, através de canais encontrados na matriz óssea. As principais funções do perióstio e endóstio são nutrir o tecido ósseo, pois dos seus vasos partem ramos que penetram nos ossos pelos canais de Volkamann, e servir como fonte de osteoblastos para o crescimento e reparação dos ossos.

O tecido ósseo é formado ou por um processo chamado de *ossificação intramembranosa*, que ocorre no seio de uma membrana conjuntiva, ou pelo processo de *ossificação endocondral*. Este último se inicia sobre um modelo cartilaginoso, o qual é destruído gradualmente e substituído por tecido ósseo que se forma a partir de células vindas do conjuntivo adjacente. Qualquer que seja o processo de formação, o primeiro tecido ósseo formado é do tipo primário. Este é pouco a pouco removido e substituído por tecido secundário ou lamelar. Logo após o início da ossificação, começa também a haver reabsorção. Portanto, durante o crescimento dos ossos pode-se ver, lado a lado, áreas de tecido primário, áreas de reabsorção e áreas de tecido secundário.

O local da membrana conjuntiva onde a ossificação intramembranosa começa, chama-se centro de ossificação primária. O processo tem início pela diferenciação de células semelhantes a fibroblastos jovens que se transformam em grupos de osteoblastos. Estes sintetizam os osteóides, que logo se calcificam, englobando alguns osteoblastos que se

transformam em osteócitos (Figura 3.4). Como vários desses grupos surgem quase simultaneamente no centro da ossificação, há confluência das traves ósseas formadas, dando ao osso um aspecto esponjoso. Entre as traves formam-se cavidades que são penetradas desde cedo por vasos sanguíneos. Com estes vasos penetram células mesenquimais indiferenciadas, que irão dar origem à medula óssea. Por mitose e diferenciação, as células do conjuntivo formam novos osteoblastos que se colocam sobre as traves ósseas, continuando o processo de ossificação. A parte da membrana conjuntiva que não sofre ossificação e que recobre o tecido ósseo formado passa a constituir o perióstio.

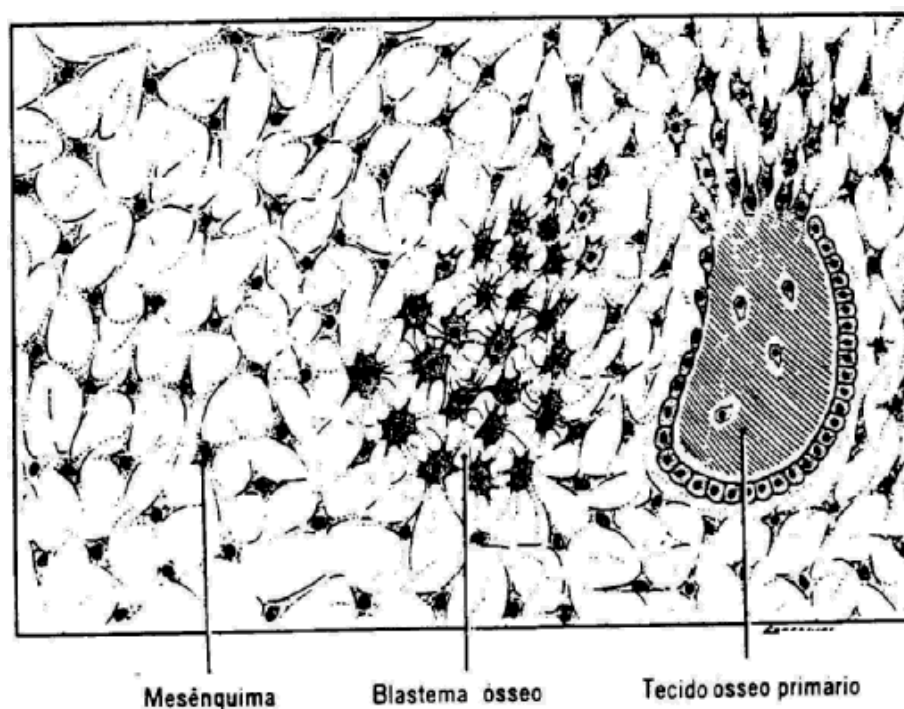


Figura 3.4 - Início da ossificação intramembranosa. Surge um blastema ósseo no mesênquima, do qual se originam os osteoblastos [JUNQUEIRA, 1973].

A ossificação endocondral consiste essencialmente em dois processos. Primeiro: a cartilagem hialina sofre modificações, havendo hipertrofia dos condrócitos, que acabam morrendo e deixando cavidades separadas por finos tabiques de matriz cartilaginosa que se calcifica ao morrerem os condrócitos. Segundo: as cavidades da cartilagem calcificada são invadidas por capilares sanguíneos e células mesenquimais

indiferenciadas vindas do conjuntivo adjacente. Essas células vão se diferenciar em osteoblastos que irão depositar matriz óssea sobre os restos de cartilagem calcificada. Desse modo, aparece tecido ósseo onde antes havia tecido cartilaginoso sem que ocorra a transformação deste tecido naquele; os tabiques de matriz calcificada da cartilagem servem apenas como ponto de apoio à ossificação.

Apesar da sua resistência às pressões e da sua dureza o tecido ósseo é muito plástico, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações nas forças a que está submetido normalmente. Assim é que a posição dos dentes na arcada dentária pode ser modificada por pressões laterais exercidas por aparelhos ortodônticos sobre os mesmos. Ocorre reabsorção óssea no lado em que a pressão atua e deposição no lado oposto, que está sujeito a uma tração [JUNQUEIRA, 1973].

### 3.2.2 Engenharia de tecido ósseo

A Tabela 3.2 lista os requisitos para sistemas projetados para fornecer proteínas osteoindutivas que foram levantadas de uma revisão da literatura (1991-1996) e pode servir como um guia para incorporação dos princípios gerais de engenharia de tecido dentro de um projeto para um substituto de enxerto ósseo sintético e manufaturado.

Tabela 3.2 - Características, propriedades e capacidade de atuação exigidas de substituto para enxerto ósseo osteoindutivo manufaturado [BREKKE, 1998b].

<b>Categoria geral da característica do dispositivo</b>	<b>Característica específica do dispositivo</b>
I. Biocompatibilidade	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deve ser biocompatível (H)</li> <li>• Reatividade tecidual baixa e resistir à rejeição do hospedeiro (H)</li> <li>• Não deve produzir uma reação crônica de célula gigante a corpo estranho (H)</li> <li>• Atóxico (H)</li> <li>• Deve ser não-imunogênico e não-antigênico (H)</li> </ul>

Continuação da Tabela 3.2.

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deve ser livre de doença transmissível (D)</li> <li>• Não deve conter colágeno (D)</li> <li>• Deve ser biodegradável, bioerodível, bioabsorvível (D)</li> <li>• Deve ser degenerado pelo sistema vivo (H)</li> <li>• Biodegradação assintomática em produtos biocompatíveis (D &amp; H)</li> <li>• Produtos da degradação devem ser removidos via metabolismo (H)</li> <li>• Deve ser completamente degradado e substituído pelo novo tecido ósseo (H)</li> <li>• Deve reabsorver paralelamente à nova formação óssea (D &amp; H)</li> </ul>
II. Propriedades físicas da arquitetura	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deve ser fácil de cortar ou talhar para fornecer contornos precisos (não deve ser frágil)</li> <li>• Não deve ser friável durante a implantação</li> <li>• Deve ser rígido o suficiente para fornecer o imediato suporte ao tecido mole e prevenir o imediato deslocamento desse tecido (deve possuir certas características mecânicas mínimas)</li> <li>• Flexibilidade de formulação para diferentes graus de consistência (suporte)</li> <li>• Deve ser poroso, permitindo crescimento do tecido e estabilização</li> <li>• Tamanho médio de poro de 200-400 <math>\mu\text{m}</math></li> <li>• Máxima densidade de poro para otimizar o crescimento celular e a formação óssea (porosidade mínima de 75%)</li> <li>• Deve possuir dimensões espaciais apropriadas (geometria)</li> <li>• Os poros devem ter interconectividade</li> <li>• Padrão arquitetural grosseiro deveria ser similar ao do osso esponjoso (estrutura de poros randômica, estruturalmente específico para o tecido que está sendo tratado)</li> <li>• Deve possuir uma grande área superficial (substrato para adesão celular)</li> </ul>
III. Osteocondução	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deve ser osteocondutivo</li> <li>• Promover crescimento ósseo a partir da margem do tecido do hospedeiro</li> <li>• Possuir características superficiais que otimizam o crescimento ósseo</li> <li>• Fornecer uma estrutura 3-D que permita crescimento ósseo</li> </ul>

Continuação da Tabela 3.2.

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamanho de poro otimizado para osteocondução</li> </ul>
IV. Quimiotaxia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permitir quimiotaxia para células mesenquimais</li> <li>• Fornecer meios para adesão celular</li> <li>• Fornecer carga superficial que encoraje a adesão celular e um ambiente elétrico geral atrativo para células mesenquimais</li> <li>• Se ligar à substâncias endógenas de base quimiotática</li> </ul>
V. Angiogênese e vascularização	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promover a rápida angiogênese e vascularização do dispositivo</li> <li>• Fornecer de forma consistente, osso sólido vascularizado para o osso hospedeiro</li> <li>• Deve ser hidrofílico, absorver fluido sanguíneo rapidamente e reforçar a coagulação sanguínea inicial</li> </ul>
VI. Liberação e controle de proteína osteoindutiva	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimular a proliferação de células osteoprogenitoras</li> <li>• Promover diferenciação de osso e medula (osteogênese)</li> <li>• Liberar agente osteoindutivo em dose terapêutica no tempo adequado</li> <li>• Cinética de liberação do agente osteoindutivo apropriada para as exigências locais</li> <li>• Preservar a configuração 3-D de morfogene e orientar a proteína para interação do receptor da superfície celular</li> <li>• Ter afinidade com proteínas osteoindutivas</li> <li>• Possuir geometria definida capaz de fornecer proteínas osteoindutivas</li> <li>• Controlar a atividade da proteína osteoindutiva (limitar a atividade de morfogene nos contornos do implante)</li> <li>• Controlar a osteogênese espacial (possuir uma geometria adequada para controle da expressão funcional de proteína osteoindutiva)</li> <li>• Induzir células invasoras, vulneráveis ao efeito osteoindutivo de agentes osteoindutivos, ao contato íntimo com o morfogene (relaciona-se a quimiotaxia)</li> <li>• Deveria ser bioquimicamente inerte com relação à proteína osteoindutiva</li> <li>• Não deveria interferir com a reconstituição de mitogene</li> <li>• Não deveria interferir na sinalização bioquímica de proteína osteoindutiva</li> <li>• Iniciar a atividade osteogênica ótima com baixas doses de morfogene</li> </ul>

Continuação da Tabela 3.2.

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ter morfogene absorvido sobre o transportador</li> <li>• Limitar a dispersão e diluição da proteína osteoindutiva</li> <li>• Proteger o morfogene de uma proteólise não específica</li> <li>• Resistir à dispersão da combinação dispositivo e morfogene durante a inserção (implantação)</li> </ul>
VII. Questões administrativas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Devem ser usados materiais já aprovados para uso humano</li> <li>• Deve ter custo menor que o autoenxerto</li> <li>• Os materiais constituintes devem ser fornecidos em abundância</li> <li>• Esterilização verificável do dispositivo final (pronto para inserção)</li> </ul>

H- resposta do hospedeiro ao dispositivo; D- resposta do dispositivo para o hospedeiro.

Embora o desempenho biológico seja a consideração central do projeto dessas estruturas, outros fatores são igualmente importantes, tais como: i) característica mecânica necessária para suporte de tecidos induzidos assim como a anatomia adjacente do hospedeiro; ii) ótima arquitetura tridimensional, iii) quantidade, qualidade e fontes de sobrevivência da circulação colateral; iv) provisões para a matriz extracelular inicial; v) reação inicial do tecido hospedeiro ao implante; e, vi) para dispositivos biodegradáveis, taxas ótimas de biodegradação e capacidade dos tecidos hospedeiros em lidar com os produtos da degradação.

Os dispositivos projetados para gerar osteogênese programável podem ser vistos como um sistema de cultura de células 3-D, como dito anteriormente, cujos componentes derivam de três classes de materiais distintas. O primeiro componente, a macroestrutura, incorpora os três primeiros princípios ou categorias que governam a osteogênese, listados na Tabela 3.2, e é responsável pelo estabelecimento do tamanho e forma grosseiros da unidade, sua arquitetura anatomicamente específica e características mecânicas. A macroestrutura é o material-base -o substrato- do sistema tridimensional de cultura de células. As categorias IV e V são evidenciadas no segundo componente, a microestrutura, que é responsável pelo estabelecimento da matriz extracelular inicial dentro do dispositivo e pela inauguração da quimiotaxia e da angiogênese. Adicionalmente, a microestrutura é o meio responsável pela execução da categoria VI; liberação, controle e transporte de morfogenes solúveis e fatores de crescimento, a

terceira classe de materiais crítica para a atividade osteoindutiva dos sistemas de cultura de células *in vivo*. Finalmente, o dispositivo de cultura de células é responsável pelo confinamento de toda a atividade biológica dentro dos limites da unidade e pela restrição da capacidade plieotrópica de morfogene e natureza pleuripotente das células mesenquimais, em contraposição à única tarefa de geração de osso permanente saudável de: i) tamanho e forma prescritos; ii) em localizações anatômicas prescritas e iii) com sítios de características mecânicas específicas.

Diversos exemplos de materiais utilizados para a construção da macroestrutura 3-D (substrato) descrita acima podem ser encontrados na literatura, tais como: biocerâmicas de fosfatos de cálcio, alguns metais de estrutura porosa como tântalo e titânio, polímeros bioreabsorvíveis (poly( $\alpha$ -hidroxiesters) e poly(anidridos)) e materiais naturais como colágeno [BREKKE; 1998a; CRANE, 1995].

A restauração da função de um órgão ou membro utilizando as tecnologias da engenharia de tecido, freqüentemente necessita do uso de uma macroestrutura 3-D porosa temporária (devido à bioreabsorção). Além disso, essa macroestrutura deve possuir outras características importantes tais como elevada área superficial, resistência estrutural e formas tridimensionais específicas. Essas características são determinadas pela técnica de fabricação que deve ser desenvolvida de maneira tal que não afete contrariamente a biocompatibilidade do material da estrutura. A elevada porosidade é desejável por permitir semeadura ou migração celular através do material e uma maior taxa de biodegradação. O tamanho do poro afeta igualmente o crescimento do tecido e a área superficial interna disponível para adesão celular. Uma grande área superficial é necessária para que um elevado número de células (suficiente para repor ou restaurar a função do órgão) possa ser cultivado. Além disso os poros devem estar interconectados para permitir a penetração vascular e celular, que irá assegurar o crescimento do tecido ósseo para o interior dos poros [LU, 1999]. As propriedades mecânicas da estrutura 3-D são geralmente de importância crucial especialmente quando se fala em regeneração de tecidos duros como cartilagem e osso. A forma do tecido duro é importante para sua função e em tais casos a técnica de processamento deve permitir a preparação de macroestruturas com geometrias tridimensionais irregulares [THOMSON, 1997].

A engenharia de tecido de cartilagem e osso mais eficiente necessita da sinergia ou ação simultânea de ambas estratégias indutiva e condutiva sujeitas ao controle pela biomecânica e movimento. Os biomateriais imitam a matriz extracelular e representam um papel crucial no fornecimento de fatores morfogenéticos e de crescimento, além de permitir a adesão de células osteogênicas [REDDI, 1998].

Alguns exemplos de problemas médicos relacionados à perda de massa óssea podem ser citados: i) um adolescente com um tumor no fêmur, um grande segmento de osso é cortado; ii) um bebê nasce com uma mutação pontual no gene para colágeno tipo I, esse defeito congênito é chamado Osteogênese Imperfeita (doença em que o osso é frágil) e, iii) casos de osteoporose principalmente devido à idade. Através de terapias baseadas em células, o tecido esquelético desses pacientes pode ser projetado para curá-los pela execução do que eles não podem fazer normalmente. A chave para qualquer intervenção médica é mobilizar e induzir o corpo a executar façanhas que o mesmo normalmente não tem capacidade de fazer por si mesmo. No primeiro caso dos problemas médicos apresentados acima, a solução é o crescimento de células osteoprogenitoras em número grande o suficiente para preencher a lacuna da amputação. Hoje já é possível cultivar células progenitoras mesenquimais fora do organismo e então implantá-las de tal modo que o osso será regenerado em quantidade que normalmente não seria possível. No segundo caso, o gene colágeno tipo I normal seria molecularmente inserido dentro das células osteoprogenitoras as quais continuamente se renovariam até que, quando eventuais gerações dessas células naturalmente substituíssem os osteoblastos, o osso seria fabricado com uma matriz colágeno tipo I normal. E, no terceiro caso, a perda óssea relacionada à idade e o reduzido potencial de reparação poderiam ser prevenidos pela administração periódica de células osteoprogenitoras autólogas.

As questões principais que controlam as intervenções médicas bem sucedidas descritas acima, envolvem definição de regras que governam a regeneração natural e modificação do osso e desenvolver tecnologias para fazer uso de tais diretrizes. A suposição preliminar é que os princípios que governam a regeneração e a modificação natural são

recapitulações dos eventos embriônicos-formativos e que estratégias reparativas devem ser estruturadas de modo seguir essas diretrizes de recapitulação.

Diversas generalizações originam-se observando as dinâmicas do desenvolvimento embriônico ou regeneração dos membros [CAPLAN, 1997]:

1. Os contornos naturais da estrutura desenvolvida ou regenerada devem ser re-estabelecidos.
2. O espaço mesenquimal deve ser povoado por células mesenquimais progenitoras multipotentes mitoticamente expansíveis capazes de responder às *sinalizações locais*.
3. As células regenerativas devem ser empacotadas para preencher o espaço de regeneração até que outras células/tecidos adjacentes sejam excluídas da interferência com as dinâmicas de regeneração.
4. Os *fatores de sinalização* devem incluir aqueles fornecidos pela vascularização, agentes difusores, forças mecânicas (ambas dinâmica e estática) e contornos geométricos.
5. O tecido jovem, recentemente formado facilmente integra-se com tecido adulto adjacente porque este é flexível e tem amplos limites de matéria; conforme amadurece esse tecido se torna mais limitado, tanto espacialmente quanto em seu potencial desenvolvido.
6. Embora os componentes dos tecidos sejam geralmente os mesmos em pernas e braços, esses membros são morfologicamente e funcionalmente únicos porque eles se formam de maneira distinta devido à *sinalização local* especializada. Igualmente, a modificação dos tecidos destes membros é a mesma (isto é a seqüência de linhagem da célula progenitora para a célula diferenciada é a mesma), mas o arranjo dos fenótipos finais é lugar-específico como designado pela *sinalização local* [CAPLAN, 1997].

O desafio da regeneração do tecido mesenquimal é levar grandes quantidades de progenitores multipotentes para o sítio de regeneração tão rapidamente quanto possível; a rápida formação de um blastema mesenquimal de tamanho crítico é o passo principal,

já que as ondas de sinalização dos sítios de ferimento estão sempre mudando e devem coordenar com a seqüência mesenquimal. Existem diversos repositores de tais progenitores mesenquimais em adultos, sendo a medula óssea e o periósteo os mais acessíveis. A medula óssea tem sido estudada em ambos animais e humanos e tem-se mostrado que esse local hospeda células osteocondrais progenitoras isoláveis as quais denomina-se Células-Tronco Mesenquimais (CTM). Em princípio, essas CTMs podem diferenciar-se em um número de fenótipos mesenquimais pela admissão de caminhos de linhagem distintos como os mostrados na Figura 3.5. Já foi desenvolvida uma tecnologia para isolar essas células da medula óssea de pacientes recém-nascidos até indivíduos de 80 a 90 anos.

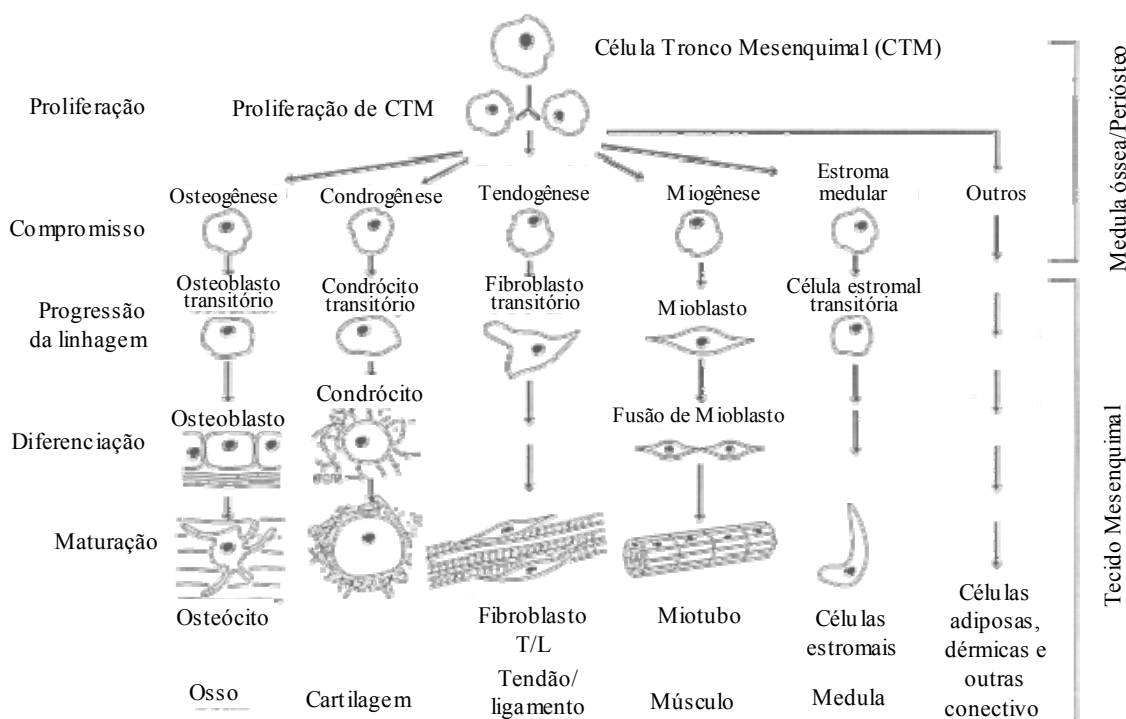


Figura 3.5 - O processo mesengênico. As CTMs têm potencial para diferenciar em uma variedade de tecidos mesenquimais, tais como osso, cartilagem, tendão, músculo, medula, gordura, derme, etc. (reproduzida da ref. [CAPLAN, 1997]).

É possível isolar as CTMs da medula óssea e expandí-las em cultura isoladas de todas as células hematopoiéticas e vasculares. Essas células podem prosperar em cultura e

quando reintroduzidas em sítios de teste *in vivo*, podem diferenciar em uma variedade de fenótipos de sítio especificado, incluindo células de formação do osso.

Está claro que há uma relação coordenada entre formação do osso e vascularização. Parece que a vascularização fornece a orientação para a atividade de secreção dos osteoblastos, portanto, é importante se construir um sistema de distribuição que tenha potencial para situar lâminas de células osteoprogenitoras em uma configuração onde a vascularização do hospedeiro possa rapidamente se posicionar e fornecer a sinalização apropriada. Da mesma forma, o aspecto da adesão celular do veículo de distribuição deveria ser uma substância parecida com o osso baseado em que tal ambiente poderia ajudar na orientação dos produtos da secreção dos osteoblastos. O uso de cerâmicas porosas de fosfato de cálcio junto com a medula completa, como um veículo de distribuição para células osteogênicas, tem-se mostrado eficiente [CAPLAN, 1997].

### 3.3 Processamento sol-gel

Os vidros bioativos têm sido amplamente estudados principalmente por apresentarem aplicações clínicas específicas. Isso se deve ao fato de que esse material possui a capacidade de promover a formação de uma interface de ligação entre sua superfície e tecidos vivos vizinhos ao material.

A formação, *in vitro*, sobre a superfície do material de uma camada rica em hidroxiapatita carbonatada semi-cristalina é uma indicação da bioatividade dos vidros bioativos *in vivo*. O processo começa com a formação de uma camada superficial rica em sílica-gel, que se forma após uma rápida liberação para a solução (fluido corporal simulado-SBF, por exemplo) de espécies contendo P juntamente com íons  $\text{Ca}^{2+}$  [PEREIRA, 1996; LI, 1991a]. Já foi relatado que a área de composições bioativas do sistema  $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$  pode ser expandida através da preparação desses materiais por processamento sol-gel. Nesse estudo foi sugerido que em vidros obtidos por sol-gel a bioatividade pode ser observada em composições até 90% em mol de  $\text{SiO}_2$ . Ao contrário, em vidros obtidos por fusão ou método convencional o limite de  $\text{SiO}_2$  para o qual se observa bioatividade é somente 60% [LI, 1991b]. Uma possível explicação para o limite da extensão da composição para bioatividade é a presença de poros muito pequenos, grande área superficial específica e uma alta concentração de grupos silanol ( $\text{SiOH}$ ) sobre a superfície do material microporoso, características que são conseguidas com o processo sol-gel. Esses aspectos estruturais são responsáveis pelo aumento da densidade de sítios potenciais para nucleação que resulta na formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada sobre o vidro bioativo [LI, 1991a; PEREIRA, 1994a].

O processo sol-gel é uma técnica de síntese química usada para o preparo de vidros e cerâmicas. Na década de 80, principalmente houve um interesse extensivo sobre o processo sol-gel como um meio de se produzir não somente filmes amorfos, mas também monolitos e fibras de vidro. Uma vantagem importante do processo sol-gel é a habilidade para se controlar as propriedades químicas da superfície do material através de tratamentos térmicos. O vidro bioativo 58S (obtido por sol-gel) mostrou taxas de degradação de sílica e formação da camada de HCA *in vitro* mais rápidas quando

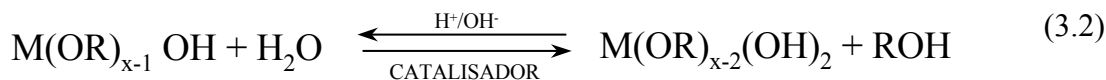
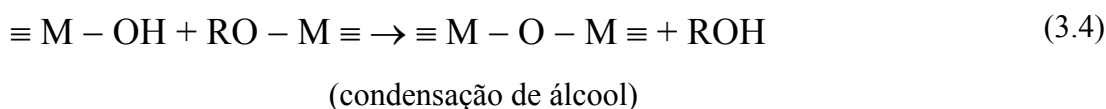
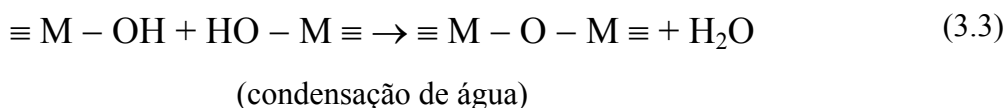
comparado com o Bioglass<sup>®</sup> 45S5 (obtido por fusão) [GREENSPAN, 1998]. A química envolvida no processo é baseada em reações de polimerização inorgânica de precursores ou alcóxidos metálicos  $M(OR)_n$ , onde M representa o elemento formador de rede tal como o Si e R é um grupo alquil  $C_xH_{2x+1}$ . Esses precursores sofrem reações de hidrólise e condensação, geralmente quando dissolvidos em um solvente, para formar hidróxidos metálicos solúveis, os quais por fim levam a formação de uma ligação contínua metal-oxigênio-metal como em uma rede inorgânica que se estende por todo o solvente [SARAVANAPAVAN, 2002].

Os aspectos principais do processo sol-gel de multicomponentes são a formação de uma solução homogênea antes da polimerização e o processamento ocorre em temperaturas mais baixas do que em métodos convencionais (fusão) [BRINKER, 1990]. Conseqüentemente não só a melhoria da homogeneidade química pode ser conseguida [PEREIRA, 1994b] com bom controle sobre a composição final e confecção das características superficiais do produto como também a separação de fases, a cristalização e a decomposição química podem ser evitadas [SARAVANAPAVAN, 2002].

Em termos de mecanismos químicos, o processamento sol-gel pode ser dividido em dois tipos: rota alcóxido (ou polimérica) e rota coloidal. O primeiro geralmente requer o uso de um solvente orgânico, normalmente um álcool, que age como solvente para o precursor metálico e a água de hidrólise [PAUL, 1990]. Por outro lado, o segundo tipo emprega o princípio da química coloidal para gerar partículas de tamanho coloidal a partir de espécies iônicas em um meio aquoso. Nessa revisão apresenta-se de forma mais detalhada a rota alcóxido que foi a utilizada na síntese das estruturas macroporosas para engenharia de tecido ósseo.

### ***Rota Alcóxido:***

As equações seguintes descrevem as reações fundamentais, hidrólise e condensação, que permitem a conversão de precursores organometálicos em géis e posteriormente em vidros ou cerâmicas.

**Hidrólise:****Condensação:**

M é o metal e pode ser Si, Al, Ti, Zr, Cr etc. R representa o grupo alquil. As reações de condensação também facilitam a reação de compostos de diferentes elementos levando à síntese de sistemas multicomponentes. Todas as reações podem ser consideradas como reações de equilíbrio com o grau da reação sendo determinado pelas espécies envolvidas e as condições sob as quais as reações ocorrem. O catalisador representado nas reações de hidrólise pode ser uma base ou um ácido, que irão catalisar também as reações de condensação. Visto que a hidrólise e a condensação são reações químicas, as taxas relativas dessas reações são funções de diversos parâmetros, tais como pH, temperatura, natureza e concentração do precursor do íon metálico, e a concentração de água. A hidrólise inicial progride rapidamente em condições de pH ácido enquanto a condensação é mais acelerada em pH alcalino.

Um fator que também deve ser considerado na produção de géis multicomponentes é a taxa de reação relativa de alcóxidos dos diferentes metais. A ordem de adição desses alcóxidos será importante na obtenção de géis homogêneos, e o primeiro componente a ser hidrolisado deverá ser aquele de taxa de reação mais lenta, geralmente o precursor de silício.

As etapas do processo sol-gel podem ser divididas em sete:

- Dissolução e mistura dos precursores

- Moldagem (vazão em molde, formação de filme, produção de fibra)
- Transição sol-gel ou gelação
- Envelhecimento
- Secagem
- Estabilização
- Transição de gel para vidro ou sinterização

#### *Dissolução e mistura dos precursores*

Os reagentes mais comumente utilizados são os alcóxidos metálicos, que podem ser encontrados em uma ampla variedade de elementos metálicos. A solubilidade e a reatividade desses reagentes varia muito. Se um componente hidrolisa muito mais rápido que os outros, grupos polimerizados daquele componente podem se formar e, a homogeneidade que seria uma vantagem do processo sol-gel, seria perdida.

Além dos alcóxidos, outros compostos podem ser usados para introduzir alguns cátions em sistemas multicomponentes, tais como sais inorgânicos: nitrato de cálcio por exemplo. Se os alcóxidos são usados como fontes daqueles elementos que são formadores de rede de gel, outros sais metálicos solúveis podem ser usados para introduzir íons modificadores de rede [PEREIRA, 1994a].

Os precursores de silício mais amplamente usados para preparar materiais por sol-gel têm sido o tetrametil ortosilicato (TMOS) ou tetraetil ortosilicato (TEOS).

#### *Moldagem (vazão em molde, formação de filme, produção de fibra)*

O sol é um líquido de baixa viscosidade, portanto pode ser vertido em moldes de formas variadas. A forma do gel será determinada pela forma do molde de vazão. Essa é uma vantagem que se destaca na aplicação de biomateriais obtidos por sol-gel na engenharia de tecido ósseo. O sítio de defeito ósseo que irá receber a estrutura projetada pode ter formas complicadas.

### *Transição sol-gel ou gelação*

Durante a transição sol-gel, a viscosidade da solução gradualmente aumenta à medida que o sol (suspensão coloidal de partículas muito pequenas, 1-100nm) torna-se uma rede tridimensional interconectada rígida e porosa, denominada gel. O tamanho e o grau de ramificação do polímero inorgânico, e a extensão das ligações cruzadas exercem uma forte influência sobre a porosidade do gel, e mais tarde, sobre a área superficial, o volume de poros, a distribuição de tamanho de poros e a estabilidade térmica do óxido final, após sinterização. Em geral, se o gel contém cadeias poliméricas com ramificação significativa e ligações cruzadas, o gel possui grandes regiões de vazios, é estruturalmente rígido e o óxido resultante, após sinterização é principalmente formado de macroporos e mesoporos. Se o gel contém cadeias poliméricas com poucas ramificações e ligações cruzadas, o gel possui menos regiões de vazios, é estruturalmente fraco e nesse caso se desintegra durante a sinterização. O óxido resultante possui principalmente microporos e baixo valor de área superficial específica.

As taxas relativas das reações de hidrólise e condensação determinam a extensão da ramificação do polímero inorgânico. Em geral, em presença de uma alta concentração do monômero cátion metálico, se a hidrólise é lenta em relação à condensação são formadas cadeias poliméricas longas, altamente ramificadas e com ligações cruzadas e o óxido resultante é macroporoso. Se, por outro lado, a hidrólise e a condensação ocorrem em taxas comparáveis são formadas cadeias curtas com menos ramificações e ligações cruzadas, e o óxido resultante é microporoso. No caso em que a condensação é muito mais rápida do que a hidrólise, os cátions metálicos são aglutinados e formam-se precipitados oxi-hidróxido [KUNG, 1996]. Apesar do gel formado ter a aparência de um sólido, seus poros contêm uma mistura de água e álcool, e a hidrólise e a condensação continuam a ocorrer até que o sólido é completamente seco.

A gelação pode ocorrer em um intervalo de tempo que pode variar desde alguns segundos, minutos, horas até meses dependendo das condições de processamento. O ponto de gelação de qualquer sistema, incluindo a sílica sol-gel é fácil de se observar

qualitativamente e fácil de definir em termos qualitativos, mas é extremamente difícil de determinar analiticamente.

Experimentalmente o aparecimento do gel está associado a uma drástica mudança nas propriedades viscoelásticas do sistema. O sol se torna um gel quando este pode suportar tensão do tipo elástica. Abaixo do ponto de gelação, na fase sol, o sistema é uma solução de ramificações de polímeros com uma viscosidade finita, que portanto flui; acima do ponto de gelação o sistema apresenta um módulo de cisalhamento finito e não flui, o módulo de cisalhamento cresce de um valor zero na transição e em geral permanece da ordem de  $10^{-6}$  vezes o valor de sólidos convencionais [JOANNY, 1989].

### *Envelhecimento*

O envelhecimento é definido como as evoluções estruturais que ocorrem com o tempo após a gelação antes da evaporação do solvente e envolvem a manutenção do objeto vazado por um período de tempo completamente imerso em líquido. Durante este período, a hidrólise e a condensação continuam a ocorrer. E, simultaneamente, outros três processos são observados: (a) a sinérese, que é uma contração espontânea do gel com expulsão de solvente dos poros; (b) coalescimento, que pode ser definido como um processo de dissolução e reprecipitação que ocorre devido à diferenças de solubilidade entre superfícies com raios de curvaturas distintos; e (c) segregação ou transformação de fase e cristalização [LI, 1991a]. O efeito do envelhecimento sobre as propriedades do óxido final depende das variáveis de operação, pH, temperatura, precursor e concentração de água. Em muitos casos, o envelhecimento promove as ligações cruzadas e aumenta a rigidez do gel, aumentando a sua resistência [KUNG, 1996]. Foi observado que se o pH e a concentração de água são elevados, são desenvolvidos aglomerados ramificados, enquanto sob condições de pH baixo e baixa concentração de água formam-se ramificações lineares ou aleatórias [BRINKER, 1994].

### *Secagem*

Um gel está seco quando o solvente adsorvido é completamente eliminado dos poros. Para tal o aquecimento é realizado geralmente a taxas controladas em temperaturas de 120-180°C. Durante a secagem, o solvente aprisionado nos poros do gel é removido. A tensão surge não só a partir das diferenças de coeficiente de expansão devido ao volume de água variável, mas também da ação de forças capilares que se tornam efetivas quando os poros começam a se esvaziar e a interface líquido-ar está presente na forma de meniscos distribuídos nos poros do gel que passa pela secagem. O gel resultante é um sólido visco-elástico que é progressivamente transformado em um sólido poroso puramente elástico ou xerogel. Junto com a pressão capilar diferencial que age sobre poros de tamanhos diferentes, a estrutura de poros se desintegra durante a secagem. Entretanto, com o propósito de se manter o volume e o tamanho de poros, várias técnicas que têm sido empregadas para preparar géis com poros uniformes, reduzem a tensão superficial do líquido ou removem completamente a interface líquido-vapor com a secagem hipercrítica (acima da temperatura crítica,  $T_c$  e pressão crítica,  $P_c$ ). O produto desse tipo de secagem é chamado aerogel.

### *Estabilização*

A conversão do gel poroso seco para vidro denso pode ser conseguida com tratamentos à temperaturas elevadas, mas ainda menor do que a temperatura empregada na fusão convencional. Para os géis preparados a partir de alcóxidos metálicos com taxas de hidrólise e condensação relativamente baixas, um número considerável de grupos hidroxil e orgânicos podem permanecer no gel mesmo após a secagem. Estabilização consiste num tratamento térmico, com temperaturas geralmente entre 200-900°C. Faixas de temperaturas relevantes no tratamento térmico de estabilização/sinterização são por exemplo: (a) 100-200°C, dessorção de água fisicamente adsorvida nas paredes dos poros em geral; (b) 300-500°C, decomposição de compostos orgânicos em  $\text{CO}_2$ ; (c) 400-500°C, colapso de poros pequenos; (d) 700-900°C, colapso de poros maiores; (e) 100-700°C, polimerização (desidratação). No último caso, completando-se a polimerização

antes do colapso dos poros, consegue-se produzir grandes monolitos de  $\text{SiO}_2$  [ZELINSKI, 1984].

A região de tratamento térmico de baixa temperatura até  $600^\circ\text{C}$  é predominantemente relacionada com a remoção de grupos silanol e alcóxi orgânicos o que levaria a alguma densificação em uma escala molecular em virtude das reações de condensação. Entretanto, dependendo da porção de voláteis residuais e da taxa de aquecimento, alguns grupos não-reagidos podem permanecer aprisionados à medida que poros maiores começam a se fechar em temperaturas mais altas. O gel de sílica permanece altamente poroso em temperaturas significativamente mais altas do que aquelas necessárias para produzir um gel rígido. Os poros são interconectados e abertos. Em um processo sol-gel rota alcóxido, o diâmetro dos poros pode variar de 1,2 a 10nm e a porosidade pode ser maior que 70%. A área superficial específica pode exceder  $900\text{m}^2/\text{g}$  [SMARSLY, 2001a; GOLTNER, 2001].

#### *Transição de gel para vidro ou sinterização*

Aquecendo-se os géis em temperaturas cada vez mais elevadas produz-se a densificação generalizada da estrutura. O principal processo envolvido na densificação é a sinterização que visa aumentar a densidade volumétrica através da diminuição da fração volumétrica de poros. A força motriz para este processo se estabelece a partir do excesso de energia livre de superfície do gel. Pelo menos quatro mecanismos contribuem para esse processo: (1) contração capilar; (2) condensação; (3) relaxação estrutural e; (4) sinterização viscosa [BRINKER, 1990]. Os mecanismos (1) e (2) são considerados processo químicos e são dominantes em temperaturas baixas e intermediárias e os mecanismos (3) e (4) são processos físicos e dominantes em temperaturas altas. A faixa de temperatura em que cada um desses mecanismos é considerado dominante depende igualmente da natureza química e microestrutural do gel e da taxa de aquecimento. Um importante estágio é a redução ou eliminação de grupos hidroxil residuais, desidratação, nos poros durante o processo de densificação. Apesar do grupo OH poder ser removido através de reações de condensação, a

sinterização viscosa frequentemente começa antes da desidratação ser completada, levando ao inchaço ou espumação do gel no estágio final da sinterização.

### 3.4 Matriz Cerâmica Porosa

Materiais bioativos, como as cerâmicas de fosfato de cálcio e vidros, quando implantados em um ambiente como os ossos reagem com o fluido fisiológico, favorecendo a formação do tecido ósseo e a ligação com o osso, promovendo uma interface funcional. Essas propriedades têm conduzido à aplicação destes substratos como enxertos ósseos artificiais e recobrimentos de implantes. Este comportamento bioativo consiste de reações físico-químicas superficiais e eventos celulares que resultam na formação de uma camada de hidroxiapatita biológica, deposição de uma matriz orgânica e mineralização do tecido [GARCÍA, 1998].

Uma série de fatores influencia o comportamento biológico de cerâmicas e vidros bioativos. Além da composição química destes materiais, a microporosidade e a macroporosidade têm influência direta sobre a formação do tecido ósseo [LU, 1999]. Muitos estudos *in vivo* têm revelado que o tamanho de poro de um material implantado governa o comportamento de crescimento interno do tecido. O macroporo deve ter tamanho suficiente para abrigar o desenvolvimento de ambos tecidos orgânico e inorgânico e com isso permitir o crescimento do tecido. A fabricação de biocerâmicas porosas com tamanho de poro maior que um valor crítico, por exemplo 150 $\mu\text{m}$ , é considerado essencial do ponto de vista da resposta histológica. Mas, o aumento na dimensão do poro pode ser acompanhado por uma significativa redução na resistência mecânica. Recentemente, Liu preparou amostras de HA porosa com diferentes tamanhos de macroporos (~100 $\mu\text{m}$  até ~400 $\mu\text{m}$ ) para avaliar a correlação resistência-tamanho de poro, e encontrou que a resistência à compressão diminui linearmente com o aumento do tamanho de macroporo em uma dada fração volumétrica de poros. A influência do tamanho de macroporo sobre a resistência mecânica se mostrou desprezível quando a densidade de poros é maior que aproximadamente 70-75%, isto é, além de um certo nível de porosidade a resistência mecânica é praticamente constante e seu valor para vidros bioativos com porosidade acima de 70% está na faixa de 1-3MPa [LIU, 1997b; JONES, 2003].

Para a aplicação, já discutida, a qual se destinam as estruturas que serão elaboradas nesse trabalho, é necessário que estas possuam uma elevada porosidade. Algumas rotas de fabricação de cerâmicas porosas podem ser citadas:

**Incorporação de substâncias voláteis ou eliminadas por queima:** a fração, o tamanho e a distribuição de volume de poros produzidos são determinados pela quantidade da fase perdida na queima [VAZ, 1999].

**Sistemas sol-gel que desenvolvem a porosidade durante as transformações de fase ou reações químicas.**

**Aerogéis obtidos da secagem hiper-crítica de géis inorgânicos com alta densidade de ligações cruzadas:** O solvente originalmente residindo entre essas estruturas de ligações cruzadas é removido por uma secagem rápida deixando interstícios pequenos e uniformemente distribuídos.

**Reticulado de cerâmicas célula-aberta produzidas via cópia de uma estrutura polimérica porosa:** Esta é o processo mais comum de obtenção de estrutura porosa [BAKSH, 1998]. O processo envolve a impregnação de uma espuma de poliuretano flexível pela imersão desta em suspensão cerâmica. O excesso é expelido e a queima subsequente da estrutura resultante decompõe o substrato e sinteriza o pó cerâmico, deixando uma réplica da espuma original. A principal desvantagem deste método é o número de defeitos e paredes ocas que resultam da eliminação do polímero. Propriedades mecânicas inferiores são uma característica desta rota. Outra complicação é a quantidade e toxicidade dos gases liberados durante a queima do polímero.

**Colagem de barbotina:** Processo que utiliza uma suspensão coloidal, barbotina, onde a água é retirada por meio de um molde poroso. Após a formação de uma camada com a espessura desejada, a barbotina restante é drenada, o molde é retirado e a peça crua é secada e sinterizada.

**Foaming de barbotinas cerâmicas.** Envolve a incorporação de uma fase gasosa (*foaming*) dispersa em uma suspensão (barbotina) cerâmica-tipicamente contendo o material cerâmico, água, ligante polimérico e um surfactante, e agentes de gelação. Essas suspensões podem ser produzidas mecanicamente, através da injeção de um vapor; um gás produzido em uma reação exotérmica ou pela vaporização de um solvente de baixo ponto de fusão dissolvido, como o freon. Existe um intervalo entre a

formação da bolha e a estabilização final da espuma. Algumas bolhas podem contrair e desaparecer, enquanto que outras podem coalescer e formar grandes bolhas. Os filmes que envolvem as bolhas podem permanecer intactos até a estabilização, levando à formação de uma espuma “célula-fechada”. Estes também podem se romper produzindo espumas parciais ou completamente “célula-aberta”. Quando bolhas excessivamente grandes estão presentes a ruptura do filme leva a um colapso da espuma. A estabilização da estrutura das bolhas pelo ajuste do sistema deve ocorrer durante toda a vida útil da espuma [SANTOS, 2002].

Todos esses métodos resultam em morfologia de poro e distribuição de tamanhos distintos. Os três primeiros métodos resultam principalmente em microporosidade controlada em uma faixa nanométrica. Os produtos obtidos são tipicamente usados como membranas e sensores. Os outros métodos podem ser controlados para produzir porosidade variada na faixa de uma a duas ordens de grandeza em microns[SEPÚLVEDA, 1997].

As propriedades de cerâmicas porosas dependem fortemente da morfologia, do tamanho e da distribuição dos poros [LIU, 1996b]. Essas estruturas podem ser categorizadas em dois níveis – a estrutura celular (macroporosa, intencionalmente introduzida durante o processo de espumação) que existe em escala maior e a estrutura de poros e grãos dentro da matriz sólida (microporosidade). Rotas modernas de produção de cerâmicas porosas, com baixo custo, combinam espumação de suspensões e a polimerização *in situ* para composição da espuma líquida. A solidificação pela polimerização *in situ* forma uma rede de ligações cruzadas que solidifica a espuma gerando um corpo coagulado (*gelled*) resistente. A elevada resistência do corpo poroso conseguida por essa rota é a característica mais atrativa e é o resultado de um alto nível de densificação matriz-cerâmica obtida por processamento [SEPÚLVEDA, 1997].

O uso de hidrogéis em forma de espuma é útil, por exemplo, para projetar alumina porosa, aproveitando o comportamento de gelação natural dos óxidos de alumina hidratados. Este efeito também tem sido usado com ligantes—tais como cimento *portland*, cimento de magnésia, gesso e outros—na produção de espumas refratárias.

O método *gelcasting* [OMATETE, 1991] é uma rota de fabricação de componentes cerâmicos densos na qual uma suspensão de pó cerâmico em uma solução de monômeros orgânicos é vazada em um molde. Essa mistura polimeriza *in situ* formando um gel. Através desse método de processamento é possível produzir corpos cerâmicos de formas complexas. O método *gelcasting* supera algumas das maiores desvantagens da moldagem por injeção porque as operações de vazão do fluido, necessárias para preencher o molde, são separadas do mecanismo de solidificação requerido para converter a suspensão cerâmica em um corpo verde consolidado. Além disso, diferentemente do método de colagem convencional, os corpos verdes obtidos por *gelcasting* são mais resistentes e trabalháveis. Esse método utiliza alto carregamento de sólidos, pó cerâmico, em géis orgânicos e distingue-se do processo sol-gel que produz pó cerâmico a partir de um gel inorgânico com baixa concentração de sólidos.

A composição de espumas líquidas de cerâmicas pode ser conseguida por diversas rotas: i) introdução de bolhas de ar; ii) adição de surfactante [BINNER, 1996]; iii) liberação de um gás durante a reação de síntese [ARITA, 1995]; iv) adição de agentes espumantes [INNOCENTINI, 1998; SEPÚLVEDA, 1997]; e, v) adição de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [YUAN, 1998a]. Essas rotas derivaram de técnicas originalmente desenvolvidas para a produção de cerâmicas densas. Devido ao aumento na demanda por resistência para sustentar uma estrutura porosa comparada à estrutura densa, exigências especiais devem ser satisfeitas quando se compõem espumas. Para prevenir a drenagem e o colapso da espuma líquida, um rápido endurecimento da suspensão deve ser promovido. Uma vez solidificado, os corpos resultantes apresentam alta resistência a verde.

A tecnologia de sol-gel também pode ser citada para a produção de espumas. A rápida elevação da viscosidade durante a transição sol para gel estabiliza as bolhas da espuma previamente criadas.

O vidro bioativo quando utilizado na forma de pó apresenta boas propriedades de bioatividade. No entanto, já foi verificado e concluído que o desenvolvimento de um novo tecido só é possível em materiais que além de bioativos são utilizados na

construção de estruturas tridimensionais com arquitetura favorável à migração celular intraestrutura, adesão e proliferação de células. Para tanto descreve-se o procedimento que foi desenvolvido no presente trabalho com o objetivo de ampliar a aplicação do vidro bioativo do sistema  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$  em engenharia de tecido ósseo, aplicando esse biomaterial na construção de estruturas tridimensionais porosas de arquitetura bem definida.

## 4 METODOLOGIA

Descreve-se a seguir o procedimento desenvolvido para obtenção das estruturas macroporosas, visando a aplicação proposta. Foram usadas três composições químicas do material-base dessas estruturas, vidro bioativo. A partir da solução sol-gel, adiciona-se um surfactante e agita-se a mistura formando uma espuma que será vertida em recipiente de Teflon onde a gelação irá ocorrer *congelando* a estrutura celular introduzida pela estrutura de bolhas ou espuma. Nesse item descreve-se ainda um estudo da espuma formada em solução sol-gel e água deionizada que foi realizado.

### 4.1 Síntese das Estruturas Macroporosas de Vidro Bioativo

Foram escolhidas três composições químicas de vidro bioativo do sistema  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  como material base para a obtenção das estruturas macroporosas, conforme mostradas na Tabela 4.1. Os materiais foram preparados através do processo sol-gel, rota alcóxido com hidrólise catalisada por uma solução ácida. Os reagentes TEOS (Tetraetil ortosilicato - Merck), TEP (Trietil fosfato - Aldrich) e  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (nitrato de cálcio tetra hidratado) foram utilizados como precursores de silício, fósforo e cálcio respectivamente. O ácido nítrico (solução 2N) foi usado como catalisador da hidrólise dos alcóxidos metálicos TEOS e TEP. A razão de água necessária para a reação de hidrólise ou moles de  $\text{H}_2\text{O}/(\text{moles de TEOS} + \text{moles de TEP})$ , R, foi igual a 12. Li reportou que para R igual a 8 tem-se o menor tempo de gelação [LI, 1991a]. No entanto, para essa razão de água não foi observada formação de espuma, então foi utilizado um valor 50% maior do volume de água na solução. Após uma hora de hidrólise adiciona-se o nitrato de cálcio e a solução é agitada por mais 30 minutos.

Nesse ponto tem-se a solução que vai ser utilizada para produção de espuma e posterior estrutura macroporosa. Em alíquotas que variavam entre 25 e 30ml de solução foram adicionados um surfactante, para estabilizar a espuma introduzida através de agitação mecânica e o ácido fluorídrico, com o objetivo de se acelerar a gelação.

Tabela 4.1 - Composições nominais (mol%) das amostras de vidro preparadas por sol-gel.

<b>Amostra</b>	<b>SiO<sub>2</sub></b>	<b>CaO</b>	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>
50S	50	46	4
60S	60	36	4
70S	70	26	4

As concentrações de ácido fluorídrico são apresentadas na Tabela 4.2 em relação à concentração de TEOS. O agente espumante (LESS - lauril éter sulfato de sódio, Praid ou Tergitol<sup>®</sup> - polietileno glicol trimetilnoniléter, Fluka) foi adicionado em uma concentração que foi definida após o estudo de formação e estabilidade de espuma, item descrito a seguir. O tempo de gelação foi controlado, com o auxílio de um cronômetro digital, a partir da adição de HF.

Após cada uma das últimas adições mencionadas, retirou-se pequenas alíquotas, que foram usadas na observação visual de mudança na viscosidade da solução com o tempo e, conseqüentemente, da gelação [AGREN, 1998], utilizando-se para tanto recipientes de polietileno transparentes. Com essas alíquotas determinou-se o ponto de gelação da: i) solução sem surfactante e ii) solução mais surfactante. A partir desse ponto, aguardou-se 5 minutos antes de se iniciar a agitação da solução com surfactante e então agitou-se por dois minutos. Com esse tempo de agitação conseguiu-se o volume máximo de espuma para a concentração de surfactante adicionada.

Na Figura 4.1 apresenta-se o fluxograma que resume o método que foi desenvolvido nesse trabalho para a produção das amostras tridimensionais macroporosas de vidro bioativo. Além do fluxograma outras questões relacionadas ao procedimento foram determinadas, tais como: i) o agitador (*design*, material) para produção da espuma; ii) um recipiente que pudesse ser utilizado desde a vazão até a secagem completa (170°C), evitando transferência da amostra entre recipientes, que é mais frágil antes do tratamento térmico de estabilização; iii) tempo de agitação; iv) razão R, água/(TEOS+TEP); e v) a observação visual da gelação descrito na metodologia. Nesse

último caso a observação do aumento da viscosidade com o tempo foi considerada eficiente já que de outra maneira, a realização da medida de viscosidade usando um viscosímetro, demonstrou ser pouco eficiente devido ao tempo limitado entre o início da gelação e a vazão da espuma e a determinação da viscosidade. A Figura 4.2 apresenta os recipientes citados e o aspecto da espuma sendo vertida. O tempo de agitação determinado foi aquele em que se observou o máximo de espumação. Tempo excessivo de agitação poderia provocar o colapso das bolhas.

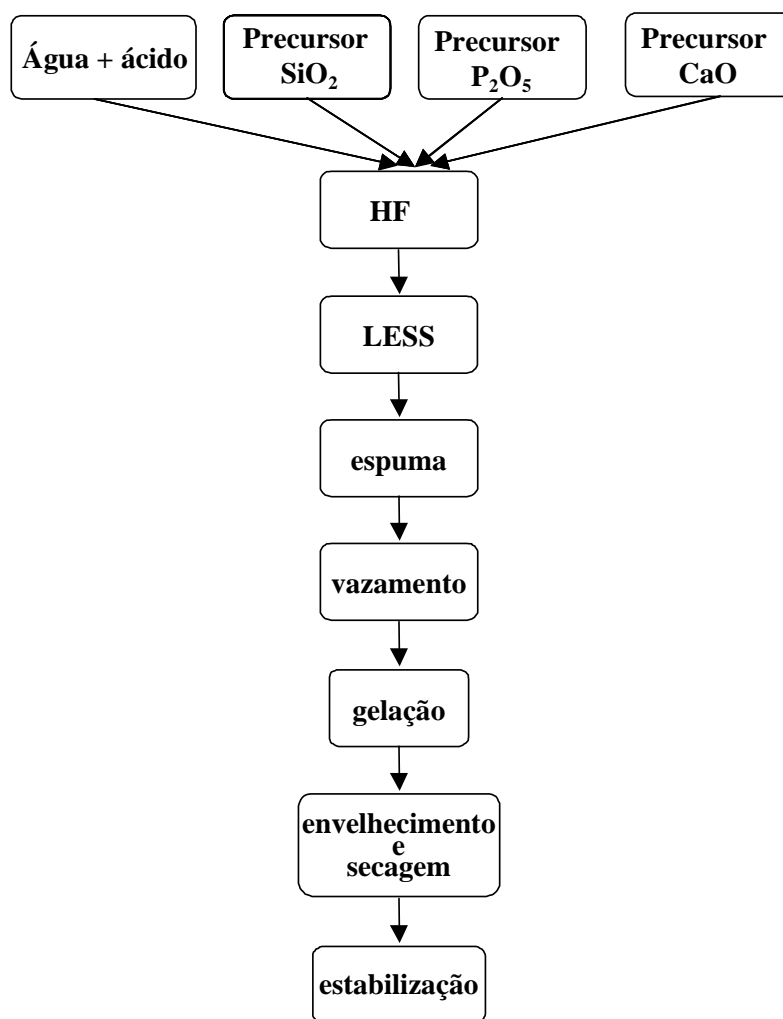


Figura 4.1 - Fluxograma do procedimento elaborado para a produção de estruturas macroporosas de vidro bioativo.



(a)

(b)

Figura 4.2 - (a) Espuma sendo vertida em recipiente transparente e (b) recipiente de Teflon projetado para tornar mais eficiente a vazão da espuma.

Tabela 4.2 - Concentração dos reagentes discriminada por amostra.

<b>Amostra</b>	<b><math>R=H_2O/(TEOS+TEP)</math></b>	<b><math>n_{TEOS}/n_{HF}</math></b>
50S	12	31,3
60S	12	43,7
70S	12	40,9

Nesse ponto, retirou-se uma terceira alíquota, da espuma ou da solução agitada, para observação visual de aumento da viscosidade da espuma com o tempo, gelação. Enquanto a observação era feita continuava-se agitando até o momento da vazão, que ocorria logo que virando o recipiente transparente mencionado, observava-se um grande aumento da viscosidade. Determinou-se então, o tempo de gelação da espuma. Um agitador confeccionado em material plástico, inerte, foi usado para evitar possível contaminação devido à corrosão. A Figura 4.3 ilustra a montagem e o agitador adaptado para essa aplicação. A haste do agitador foi acoplada a um motor elétrico e a rotação utilizada para formação de espuma foi 1400-1600rpm.

Após a gelação as amostras foram secas de acordo com o esquema da Figura 4.4, taxa de aquecimento igual a 1°C/min. O tratamento térmico de estabilização foi realizado a 700°C, por um período de 4h e a uma taxa de aquecimento de 1°C/min, de acordo com o

esquema apresentado na Figura 4.5. Somente as amostras 60S foram tratadas a 800°C ou 900°C.



Figura 4.3 - Agitador e recipiente de Teflon usados na preparação das espumas.

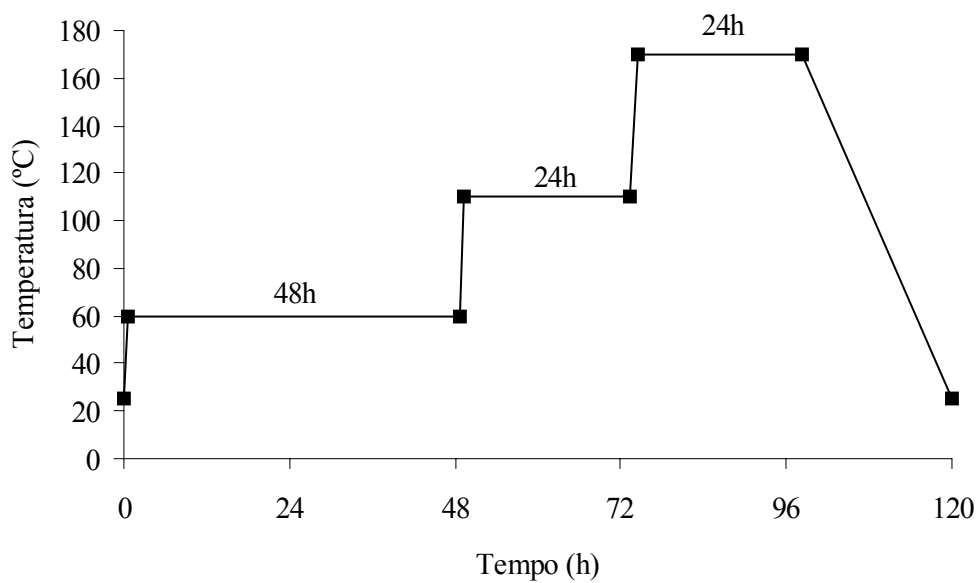


Figura 4.4 - Rota de secagem das amostras de vidro bioativo obtidas por sol-gel.

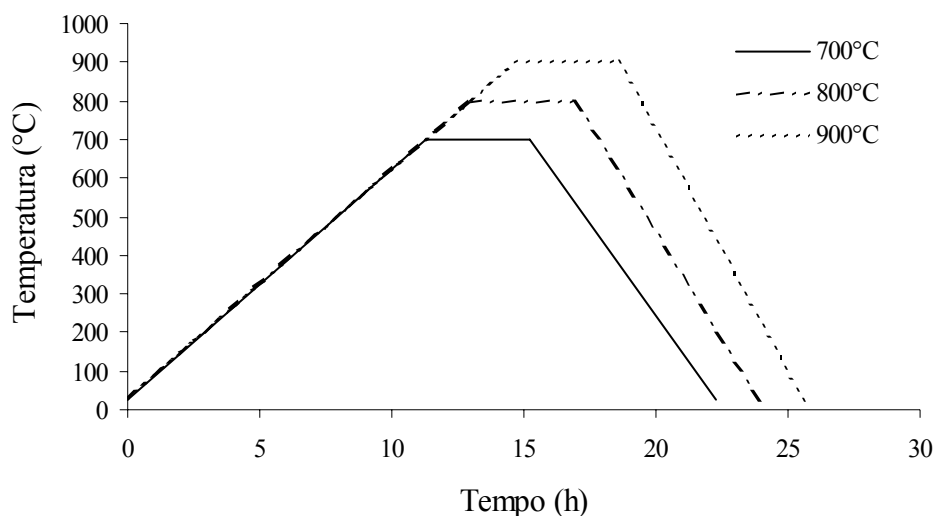


Figura 4.5 - Representação esquemática do tratamento térmico de estabilização das amostras de vidro bioativo.

## 4.2 Avaliação da formação e estabilidade das espumas

A concentração de surfactante ideal, ou seja, que formou um volume de espuma que resultou na estrutura macroporosa desejada, bem como aquela que apresentou a melhor estabilidade da espuma formada foi determinada em um procedimento simples, descrito a seguir.

As propriedades da espuma são normalmente caracterizadas pelo volume inicial (capacidade de espumação) e decaimento do volume com o tempo (estabilidade da espuma). Quando o propósito é desenvolver produtos a partir de uma espuma é útil quantificar estas duas propriedades usando uma quantidade simples. A capacidade de espumação de um surfactante é determinada pelo aumento do volume, logo após a introdução da fase gasosa na solução. A estabilidade da espuma está relacionada ao decréscimo do volume de espuma com o tempo. Os métodos mais comuns para medir estas propriedades são os que relacionam a variação de volume de espuma com tempo. A maneira como esta medida é avaliada é importante quando se comparam resultados [RAYMUNDO, 1998].

A composição 60S foi utilizada nesse estudo e soluções água deionizada mais surfactante e sol-gel mais surfactante foram agitadas a fim de se produzir uma espuma. O objetivo foi determinar a menor concentração de surfactante que formaria o volume de espuma desejado e fosse mais eficiente na estabilização desta até a gelação. Em alíquotas de 15ml de água deionizada ou solução sol-gel foram adicionados volumes variáveis dos surfactantes polietileno glicol trimetilnonil éter (Tergitol<sup>®</sup> TMN 10-Fluka, não-iônico) e Lauril Éter Sulfato de Sódio (LESS-Praid, aniônico), e a mistura destes de acordo com a Tabela 4.3 e Tabela 4.4. Agitaram-se as soluções em um béquer por 2 minutos a fim de se obter o volume máximo de espuma para cada concentração.

A espuma obtida foi, imediatamente após agitação, vertida em uma coluna graduada de capacidade (50±1)ml e diâmetro igual a 2,5cm. Com a ajuda de um cronômetro observou-se o decaimento de volume de espuma com o tempo e os dados foram utilizados para a construção de curvas de Volume de Espuma versus Tempo [RAYMUNDO, 1998] que são apresentadas nos resultados.

Tabela 4.3 - Soluções usadas na espumação de água deionizada mais surfactante.

Surfactante	Solução	Vágua (ml)	Vsurfactante (ml)
LESS	1	15	1,0
	2	15	2,0
	3	15	3,5
Tergitol <sup>®</sup>	4	15	1,0
	5	15	2,0
	6	15	3,5
LESS + Tergitol <sup>®</sup>	7	15	1,0+1,0
	8	15	2,0+2,0
	9	15	3,0+1,0
	10	15	1,0+3,0

Tabela 4.4 - Soluções usadas na espumação de solução sol-gel mais surfactante.

Surfactante	Solução	Vsol-gel (ml)	Vsurfactante (ml)
LESS	1	15	1,0
	2	15	2,0
	3	15	3,5
Tergitol <sup>®</sup>	--	15	1,0
	--	15	2,0
	--	15	3,5
LESS + Tergitol <sup>®</sup>	4	15	1,0+1,0
	5	15	2,0+1,0
	6	15	1,0+2,0

### 4.3 Caracterização estrutural das matrizes

Já é bem aceito que a estrutura tridimensional para engenharia de tecido deve ser necessariamente porosa. A estrutura porosa de um substrato tem uma influência decisiva sobre as propriedades dessas estruturas e sobre os resultados biológicos. Devido ao aspecto complicado da estrutura porosa, atualmente não há um padrão ou mesmo um método bem aceito para uma descrição e caracterização geométrica correta. A porosidade e o diâmetro médio de poros são dois parâmetros frequentemente usados, mas estes não são uma representação real de uma estrutura de poros e não são capazes de refletir a natureza dos poros. Como o processo de cicatrização óssea é dependente do sítio e do tamanho deste, a área superficial específica é importante por quantificar a estrutura quanto a esses fatores. Existem diversos métodos e técnicas disponíveis para caracterizar uma estrutura tridimensional, mas cada um deles tem limitações. Por exemplo, a porosimetria é eficiente para os poros menores, não sendo conveniente para macroporos maiores que 300 $\mu$ m. Há pouca informação em nível tridimensional que pode ser obtida de imagens bidimensionais. Entretanto, dados obtidos de diversos métodos de análise são apresentados e discutidos incluindo porosimetria de mercúrio, adsorção de nitrogênio, técnica de Arquimedes, difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, imagens de MEV e análise de imagem.

A análise por porosimetria de mercúrio foi realizada no equipamento Autopore III, modelo 9420. A amostra foi inicialmente purgada a uma pressão de 50µm Hg por 5 min, com o objetivo de se remover água fisicamente adsorvida do interior dos poros. O valor do ângulo de contato utilizado foi 140°.

Essa técnica é baseada no princípio físico básico de que o mercúrio, um fluido não-molhante ( $90^\circ < \text{ângulo de contato} < 180^\circ$ ) para a maioria dos materiais, tende a recuar dos capilares, e devido a isso deve ser forçado, aplicando uma pressão externa, para dentro dos poros de um meio poroso. Uma pressão crescente é necessária para forçar o mercúrio para o interior de poros de tamanhos decrescentes.

Um experimento básico de porosimetria de mercúrio consiste no aumento da pressão imposta, em pequenos incrementos, e medida do volume penetrante desse metal na amostra durante cada incremento de pressão [LEON, 1998; RIGBY, 2002]. A pressão imposta ( $p$ , MPa) é geralmente relacionada ao tamanho de poro ( $r$ , nm) através da equação de Washburn, equação 4.1:

$$p = - \frac{2\gamma \cos\theta}{r} \quad (4.1)$$

Nessa equação  $\gamma$  é a tensão superficial e  $\theta$  o ângulo de contato. Esses parâmetros são usualmente considerados constantes.

A área superficial específica, volume total e a distribuição de tamanho de microporos foram levantados usando-se equipamento de adsorção de gás nitrogênio, Quantachrome Nova 1000 e o método BET. A degaseificação foi realizada a 120°C por 13 horas.

A densidade dos materiais foi analisada por picnometria de gás hélio (equipamento Stereopycnometer, Quantachrome, modelo SPY-3, série 467) e a técnica de Arquimedes foi usada para determinação da porosidade através da densidade aparente. As amostras porosas foram colocadas em estufa a 100°C por 12h para eliminação de água ou outra impureza adsorvida na superfície dos poros. Após esse tempo as amostras foram pesadas e obteve-se a massa seca ( $m_{seca}$ ). Em seguida realizou-se a impregnação de água

deionizada nos poros, mantendo-se as amostras em água sob pressão constante de 10kPa à temperatura ambiente por 5 minutos, usando-se bomba de vácuo e dessecador. Então cada amostra foi retirada do dessecador e a massa suspensa ( $m_{\text{suspensa}}$ ) foi obtida. Retirando-se o excesso de água da superfície externa das amostras mediu-se a massa saturada ( $m_{\text{saturada}}$ ). Esses valores foram usados nas equações 4.2 a 4.4 para os cálculos de densidade aparente,  $\rho_{\text{ap}}$ , volume aparente,  $V_{\text{ap}}$  e porosidade aparente,  $P_{\text{ap}}$ :

$$\rho_{\text{ap}} = \frac{m_{\text{seca}}}{V_{\text{ap}}} \quad (4.2)$$

$$V_{\text{ap}} = \frac{m_{\text{seca}} - m_{\text{suspensa}}}{\rho_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (4.3)$$

$$P_{\text{ap}} = \frac{m_{\text{saturada}} - m_{\text{seca}}}{m_{\text{saturada}} - m_{\text{suspensa}}} \times 100 \quad (4.4)$$

As estruturas obtidas foram analisadas utilizando difração de raios-X (pó fino, radiação Cu K $\alpha$ ,  $\lambda=1,54\text{\AA}$ , passo= $0,02^\circ\text{s}^{-1}$ , PW1710, Philips) para detecção de fases cristalinas e técnica de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Spectrum1000, Perkin-Elmer), espectro entre os números de onda  $1400\text{cm}^{-1}$  e  $400\text{cm}^{-1}$  e 128 *scans* para detecção de bandas características dos materiais apresentados (vidro bioativo). Através da técnica de difração de elétrons retroespalhados e recobrimento com ouro, conseguiram-se as imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV, equipamento Jeol, modelo JSM 35C) que caracterizam as amostras porosas quanto à morfologia de poros e visualização de poros maiores, incluindo poros maiores que  $200\mu\text{m}$ .

#### 4.4 Testes *in vitro*

Diversos fatores devem ser examinados antes que um material possa ser utilizado como implante. Uma das primeiras etapas de avaliação do biomaterial é a avaliação biológica *in vitro* e os primeiros testes são bioatividade e citotoxicidade, onde o material é colocado em contato com células de mamíferos. A seguir, testes *in vivo* se fazem

necessários, para a avaliação do material em termos de biocompatibilidade, definida como resposta do meio fisiológico ao corpo implantado. Uma etapa posterior verifica a adequação do material para exercer a função pré-estabelecida à qual o implante foi destinado, determinando sua biofuncionalidade. Testes mais prolongados podem ainda, revelar se há chances de respostas carcinogênicas ao longo dos anos [SEPÚLVEDA, 2001]. Neste trabalho foram realizados testes de bioatividade, ou seja, avaliação da formação de uma camada superficial de hidroxiapatita quando o material é embebido em solução que imita o plasma humano. Alguns resultados de cultura de células são mostrados também, com o objetivo de ilustrar testes preliminares *in vitro* que estão sendo realizados para se avaliar a viabilidade das amostras quando em contato com células [HANNAS, 2003].

As amostras foram expostas às soluções SBF (*simulated body fluid*) e Tris buffer (tri(hidroximetil) aminometano/HCl)). A solução SBF foi preparada com a composição iônica como mostrada na Tabela 4.5, pH=7,25, seguindo o procedimento descrito por Kokubo *et al* [KOKUBO, 1990], com o objetivo de se avaliar o potencial de bioatividade do material. As amostras, estruturas tridimensionais porosas, foram imersas nessas soluções por 24h e temperatura igual a 37°C. Utilizou-se duas padronizações diferentes para a imersão: (i) área geométrica (SA) por volume de solução SBF (V) igual a  $0,1\text{cm}^{-1}$ , (ii) massa da amostra (m) por volume de solução SBF ou Tris (V) igual a 0,01g/ml. Após reação, as superfícies foram analisadas por Espectroscopia de Infra-Vermelho (FTIR), a fim de se detectar a presença de HCA (hidroxiapatita carbonatada) em fase cristalina ou amorfa. Os resultados foram comparados aos espectros de vidro bioativo obtidos antes da imersão.

De forma a avaliar o comportamento da dissolução das amostras, estas foram imersas em SBF por 1h e 24h a uma razão massa da estrutura porosa (m) por volume de solução SBF (V) igual a 0,01g/ml, valor que levou em consideração a elevada porosidade esperada para as amostras e, portanto, massa muito pequena para amostras de pequenas dimensões. A concentração iônica do SBF ([Si], [Ca] e [P]) após imersão foi determinada usando-se espectrômetro de emissão por plasma (Perkin Elmer, modelo ICP Optima 3000).

Tabela 4.5 - Concentração iônica (mM) de SBF e plasma sanguíneo humano.

	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Cl}^-$	$\text{HCO}_3^-$	$\text{HPO}_4^{2-}$	$\text{SO}_4^{2-}$
<b>SBF</b>	142	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
<b>Plasma sanguíneo</b>	142	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Formação e Estabilidade das Espumas

Durante o período inicial da agitação a fase gasosa é introduzida na solução sol-gel e a fase líquida é carregada para o filme formado ao redor de cada bolha até que um filme fino seja formado. Em um primeiro momento, a habilidade do agente espumante ou surfactante produzir um grande volume de espuma depende da eficiência do mesmo em reduzir a tensão superficial da solução. Posteriormente, as moléculas do surfactante se movem para o interior da solução direto para as novas interfaces líquido-gás criadas, estabelecendo forças que irão prevenir o afinamento da espessura dos filmes líquidos formados. Quando a maior parte das moléculas do surfactante estiver adsorvida a essas interfaces, não será mais possível a formação de novos filmes e o volume de espuma não aumenta além desse ponto mesmo que a agitação continue. Portanto, o volume máximo de espuma está associado com a espessura mínima do filme líquido formado que é capaz de manter a bolha estável. Acima deste nível, a agitação continuaria a gerar bolhas, mas estas se desintegrariam instantaneamente sem levar a um aumento do volume [SEPULVEDA, 1999, BENEVENTI, 2001].

Os surfactantes são, em boa parte, responsáveis pela existência de espumas. E, ampliando o tratamento, o conjunto de formulação físico-química relacionado às propriedades da espuma inclui a natureza do solvente; substâncias dissolvidas, tais como eletrólitos e polímeros [ROSEN, 1988; IGLESIAS, 1995; LAHEJA, 1998]; temperatura e pressão e adsorção na interface gás-líquido [LANGEVIN, 2000].

Outro aspecto que contribui para a estabilidade e reologia da espuma é a distribuição de tamanho das bolhas e a fração gás-líquido. A taxa de drenagem do filme líquido pode ser relacionada à distribuição de tamanho das bolhas. O aumento da estabilidade de espumas quando as bolhas são menores pode ser explicada pelo decréscimo da drenagem, causada por forças gravitacionais e pressão capilar. Espumas mais estáveis podem ser conseguidas com melhor distribuição de tamanho das bolhas e uma fração inicial de fase gasosa elevada [SARMA, 1988].

O componente químico Lauril Éter Sulfato de Sódio (LESS) pertence à classe dos surfactantes aniônicos, álcoois éter sulfato. Sua fórmula química é  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{OSO}_3^- \text{Na}^+$  e a 25°C apresenta-se como um líquido transparente. Os principais campos de aplicação são: detergentes líquidos lava-louças, lava-roupas, detergentes multi-uso, sabonetes líquidos, etc. Este agente tensoativo possui grupos funcionais que ionizam em solução aquosa formando íons orgânicos carregados negativamente, responsáveis pela atividade de superfície. No caso do LESS em solução aquosa a parte hidrofílica de sua molécula é aniônica, ou seja, tem carga negativa e o cátion é o íon sódio. Os álcoois éter são excelentes agentes espumantes, particularmente na presença de eletrólitos, sua espuma é muito estável comparada à dos alquil sulfatos. O peso molecular do lauril éter sulfato de sódio é 328 g/mol e densidade à temperatura ambiente igual a 1,03g/ml. O LESS, assim como a maioria dos surfactantes aniônicos apresenta baixa toxicidade. O contato dermal não é considerado tóxico. O outro surfactante utilizado nesse trabalho, o Tergitol<sup>®</sup> TMN10, um poli(óxido) etileno ou PEO, possui peso molecular 683g/mol, densidade igual a 1,03g/ml e ponto de fusão igual a 250°C. Sua fórmula química é  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}$  solúvel em água e na maioria dos solventes polares, não-polares e óleos. Esse surfactante é também quimicamente estável na presença de ácidos diluídos, bases e sais.

Os resultados do estudo relativo a volume e estabilidade de espuma para os dois surfactantes usados são mostrados na Tabela 5.1, Tabela 5.2, Figura 5.1 e Figura 5.2. O decaimento do volume de espuma com o tempo, para as soluções propostas na Tabela 5.1 (água + surfactante), apresentou padrões diferentes, de acordo com a concentração de surfactante, como pode ser visto na Figura 5.1. Analisando as Figura 5.1(a) e (b), tempo em minutos, pode-se dizer que as espumas preparadas com LESS são mais estáveis, o decaimento é mais suave. As espumas preparadas com Tergitol<sup>®</sup> são menos estáveis, o decaimento é mais rápido. A solução 6, maior concentração de Tergitol<sup>®</sup> usada, apresentou um decaimento mais suave. Quando se misturam os dois surfactantes, Figura 5.1(c), um padrão de decaimento do volume semelhante ao das soluções com Tergitol<sup>®</sup> pode ser observado, mas o decaimento é um pouco mais lento. As observações feitas nesse estudo não levaram em consideração a taxa de drenagem da

fase líquida. Praticamente não há diferença de estabilidade, isto é, o aspecto das curvas não muda quando se combinam algumas concentrações dos dois surfactantes.

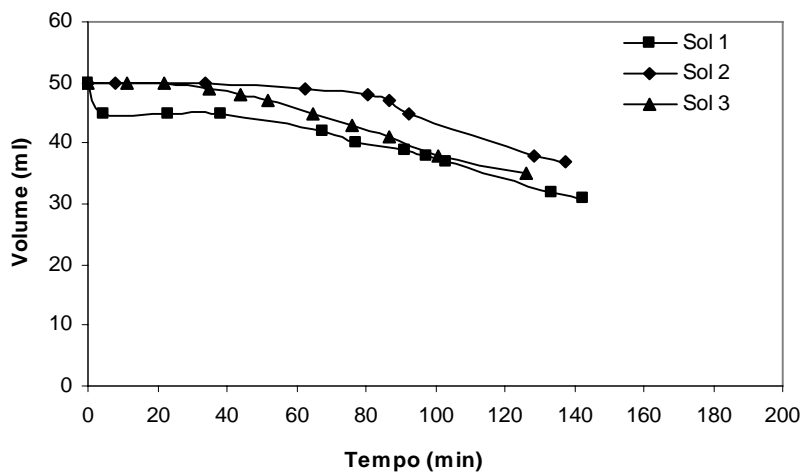
Foram utilizadas concentrações de surfactante mais baixas do que aquelas apresentadas nas tabelas 5.1 e 5.2 e o volume de espuma conseguido foi baixo e considerado insuficiente para gerar a estrutura de poros desejada.

Tabela 5.1 - Soluções usadas na espumação de água deionizada mais surfactante.

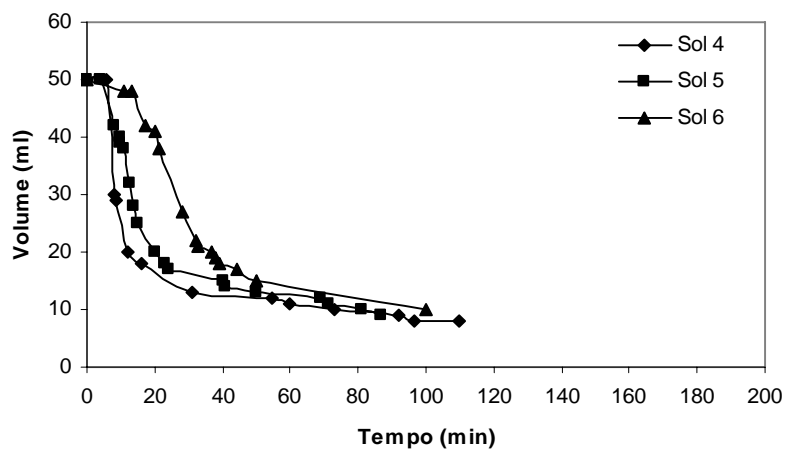
Surfactante	Solução	Vágua (ml)	Vsurfactante (ml)	Vespuma (ml)
LESS	1	15	1,0	600
	2	15	2,0	600
	3	15	3,5	500
Tergitol <sup>®</sup>	4	15	1,0	500
	5	15	2,0	500
	6	15	3,5	600
LESS + Tergitol <sup>®</sup>	7	15	1,0+1,0	500
	8	15	2,0+2,0	600
	9	15	3,0+1,0	500
	10	15	1,0+3,0	650

Tabela 5.2 - Soluções usadas na espumação de solução sol-gel mais surfactante.

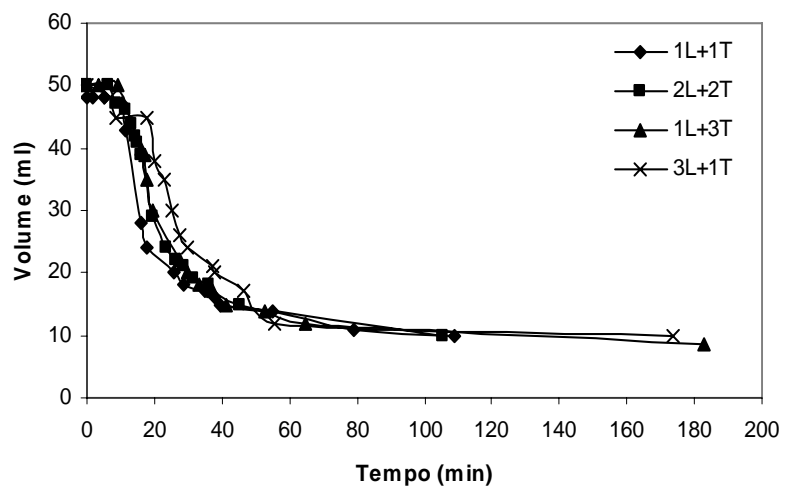
Surfactante	Solução	Vsol-gel (ml)	Vsurfactante (ml)	Vespuma (ml)
LESS	1	15	1,0	125
	2	15	2,0	175
	3	15	3,5	200
Tergitol <sup>®</sup>	-	15	1,0	-
	-	15	2,0	-
	-	15	3,5	-
LESS + Tergitol <sup>®</sup>	4	15	1,0+1,0	50
	5	15	2,0+1,0	40
	6	15	1,0+2,0	50



(a)



(b)



(c)

Figura 5.1 - Decaimento do volume de espuma versus tempo para a mistura: água deionizada e diversas concentrações de surfactante (a) LESS, (b) Tergitol, (c) LESS + Tergitol (L: LESS e T: Tergitol®).

Constatou-se que quando adicionamos o surfactante não-iônico, Tergitol<sup>®</sup>, à solução sol-gel, o volume de espuma formado é pequeno e assim que a agitação é interrompida ocorre o completo colapso das bolhas, não sendo possível medir tal volume, Tabela 5.2. Por isso não há resultados de volume de espuma formado para esse surfactante. Por outro lado observou-se que aumentando a concentração de LESS na solução sol-gel o volume de espuma aumentava.

A não ser pela solução 5, ver Figura 5.2 (tempo em segundos), todas as curvas apresentaram o mesmo perfil de decaimento. De modo geral, pode-se dizer que o decaimento é rápido, ou seja, as espumas formadas a partir da solução sol-gel são bem menos estáveis do que as espumas formadas em água apenas. As bolhas da espuma formada nas soluções 4, 5 e 6 são menores. A drenagem nesse caso é mais lenta e esse é um dos aspectos que pode explicar uma maior estabilidade destas espumas.

Espumas são estabilizadas por um agente espumante em geral em uma concentração próxima da concentração micelar crítica (cmc), onde a espumação é máxima. O surfactante adsorvido é capaz de estabilizar a espuma através da redução da taxa de drenagem do filme formado entre as bolhas de acordo com diversos mecanismos e fenômenos. Um destes é a repulsão elétrica entre superfícies próximas [GRACIAA, 2000]. Esta repulsão depende da carga superficial da interface ar-água e, também, no caso da solução sol-gel, da interface água-partículas coloidais presentes no sol.

Boissiere *et al* [BOISSIERE, 2001] realizaram um estudo onde um modelo foi desenvolvido para descrever a formação de uma entidade micelar orgânica-inorgânica construída através de um mecanismo de agrupamento específico em dois estágios. Usando diversas técnicas de análise (NMR <sup>29</sup>Si líquido, espalhamento de raio-X de pequeno ângulo-SAXS e espalhamento de luz dinâmico-DLS) verificaram o comportamento geral da hidrólise e condensação do TEOS, em presença de surfactantes não-iônicos. Em pH 2-4, a hidrólise do TEOS é rápida enquanto a condensação da sílica é lenta.

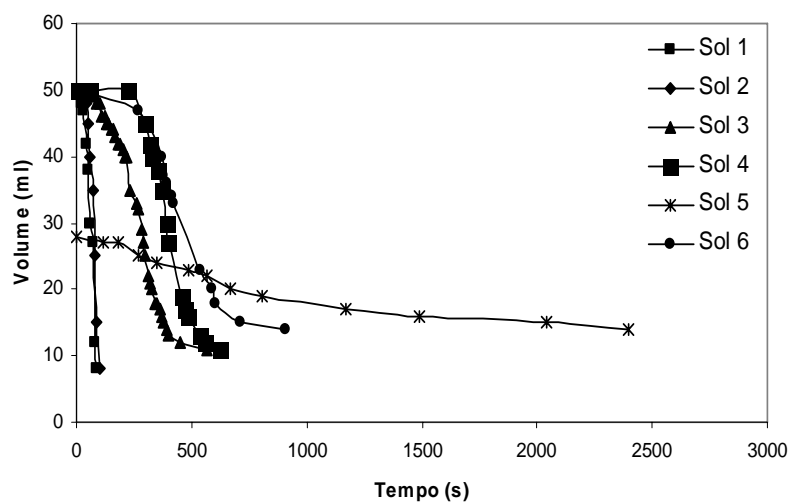


Figura 5.2 - Decaimento do volume de espuma versus tempo, para a mistura: solução sol-gel e diversas concentrações de surfactante.

Entretanto a rápida hidrólise resulta em pequenos oligômeros estáveis que são somente reticulados pequenos. A tendência desses oligômeros, quando se adiciona um catalisador da reação de polimerização tal como ácido fluorídrico, é a formação de um gel de baixa densidade. Tais oligômeros se polimerizam em uma rede aberta caracterizada por uma baixa dimensão fractal ao invés de uma estrutura densa de sílica. Por outro lado, quando o TEOS é adicionado à solução do surfactante, em pH 2-4, os resultados mostraram que a interação entre os oligômeros de sílica e as micelas do surfactante ocorria nesse estágio. Ficou claro nesse estudo que a sílica interage com as micelas. O surfactante usado nesse trabalho foi o Tergitol, que é um surfactante não-iônico do tipo poli(óxido etileno) (PEO). Os oligômeros silicatos da hidrólise do TEOS interagem com as cadeias do surfactante não-iônico poli(óxido etileno) (PEO) ao invés de permanecer na solução ou ir para o núcleo hidrofóbico da micela. O primeiro estágio do processo de agrupamento foi descrito como a inserção de oligômeros de sílica dentro da concha hidrofílica das micelas de PEO. A Figura 5.3 reproduzida desse trabalho representa o mecanismo proposto para o crescimento dos objetos micelares híbridos descritos. Tais objetos evoluem de micelas puras ( $[TEOS]=0$ ) para aqueles onde oligômeros de sílica pequenos polimerizam na camada formada pela cadeia hidrofílica de PEO ( $Si/Surfactante=4$ ) e, finalmente, quando  $Si/Surfactante > 4$  os oligômeros de baixo-reticulado se estendem para fora da camada hidrofílica. Boissiere *et al* mostraram ainda que a concentração local relativa de oligômeros de sílica confinada nas conchas

de PEO é consideravelmente maior do que aquela em água. O estágio subsequente é a condensação desses híbridos de micelas e sílica catalisada pelo íon fluoreto.

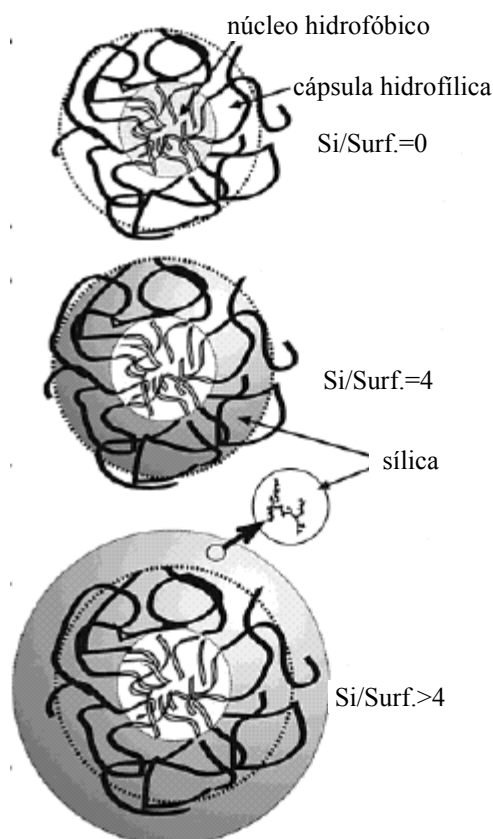


Figura 5.3 - Desenho esquemático da forma e evolução de objetos micelares híbridos descritos por Boissiere et al [BOISSIERE, 2001].

Essa discussão pode ser usada na tentativa de se explicar porque o surfactante não-iônico, um agente espumante tal como o surfactante iônico, que possui a propriedade de diminuir a tensão superficial da água e com isso possibilitar a formação de uma interface líquido-ar estável; não foi capaz de estabilizar a espuma na solução sol-gel. Acredita-se que não havia então, uma quantidade significativa de moléculas de surfactante livres na solução, e sim interagidas com a sílica coloidal, para estabilizar as bolhas formadas pela agitação. A Figura 5.4, no entanto, mostra uma estrutura em que se observa poros esféricos em amostras preparadas com Tergitol. Nesse caso só foi possível a obtenção de um pequeno volume de espuma porque a agitação foi levada até o momento próximo da gelação, ou seja, a viscosidade aumentada devido ao aumento da polimerização foi responsável pela estabilidade de algumas bolhas. Nota-se nessa figura poros esféricos variando de 50-500 $\mu$ m, mas sem interconexão.

Além disso, foi observado que em todas as soluções (catalisadas por HF) inicialmente preparadas usando-se como surfactante o Tergitol, a gelação era mais lenta. Isto indica que hidroxilas do polietileno glicol (Tergitol) poderiam estar retardando a evolução das reações de condensação devido à barreiras estéricas [AGREN, 1998]. O impedimento estérico causado pelos híbridos formados limita a condensação adicional dos aglomerados (*clusters*) durante a gelação do sol. Pode-se dizer então que um reduzido número de ligações Si-O-Si entre os clusters levaria à formação de sóis estáveis e géis com conexões intercluster fracas [AYRAL, 1995]. Essa suposição está de acordo com a observação qualitativa das estruturas após secagem e estabilização que se apresentaram muito mais frágeis do que as estruturas obtidas com a adição de LESS (surfactante iônico). Considerando também o peso molecular dos aditivos ( $PM_{LESS}=376\text{g/mol}$  e  $PM_{Tergitol}=683\text{g/mol}$ ), ou seja,  $PM_{Tergitol}\sim 2\times PM_{LESS}$ , infere-se ainda sobre a influência da diferença de tamanho dessas moléculas na resistência mecânica da estrutura macroporosa, que serão eliminadas em uma etapa crítica para a estabilidade estrutural das amostras, a etapa de estabilização. Moléculas maiores produzem maior quantidade de  $\text{CO}_2$  durante o tratamento térmico, levando a uma maior pressão capilar.

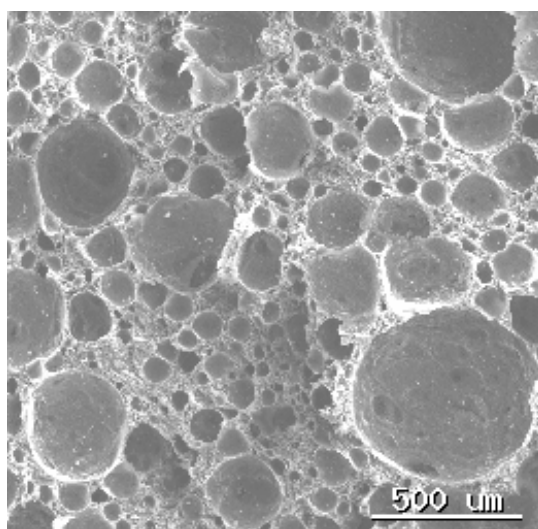


Figura 5.4 - Estrutura macroporosa observada em MEV resultante da espuma formada pela solução 60S e o surfactante Tergitol.

A estabilidade cinética e termodinâmica de filmes líquidos é baseada na compreensão de que o mero fato da existência de um estado termodinâmico estável de um filme líquido fino não garante que o filme possa atingir seguramente este estado. Realmente, o afinamento do filme é acompanhado de fluxos e difusão convectivos, vórtices e instabilidades, adsorção não-uniforme do surfactante, etc. Cada um desses fatores, ou a combinação deles, podem conduzir à ruptura do filme antes que este atinja o estado de equilíbrio.

A noção de estabilidade cinética de filmes líquidos finos, como discute Angarska *et al* [ANGARSKA, 1998], é usada para denotar a resistência do filme versus a ruptura durante o afinamento. A estabilidade cinética pode ser caracterizada pela duração do filme drenado, que pode ser dividida em decréscimo no volume da espuma e/ou variação da distribuição do tamanho das bolhas [SZEKRÉNYESY, 1992]. O primeiro fator é determinado pela inibição da coalescência entre as bolhas e a fase gasosa homogênea, e a segunda pela inibição da coalescência entre os pares de bolhas.

Algumas espumas se desintegram (como foi o caso da espuma produzida com a mistura água mais surfactante LESS) sem qualquer mudança considerável no tamanho das bolhas. Há colapso das bolhas sem haver difusão entre as mesmas e conseqüentemente, o coalescimento e crescimento destas. Em outras espumas (água mais Tergitol) enormes cavidades, as bolhas crescem muito rapidamente, se formam antes de ocorrer um decréscimo significativo no volume de espuma.

Os fatores determinantes da estabilidade cinética dos filmes de espuma são as propriedades reológicas das monocamadas de adsorção de surfactante e especialmente a elasticidade (superficial) de Gibbs dessas monocamadas, EG, a viscosidade superficial e o tempo de relaxação da difusão (adsorção). Pode-se dizer que todos os fatores e aditivos que levam ao aumento de EG prolongam a duração dos filmes drenados e aumentam a chance destes atingirem o estado de equilíbrio. A interação eletrostática, que é a razão entre as forças de longo alcance da dupla camada e a repulsão de curto alcance, exerce um importante papel na estabilidade das espumas. Os efeitos eletrostáticos são estudados experimentalmente pela variação da concentração de

eletrólitos que pode ser 1:1 [KARAKASHEV, 2001; SZEKRÉNYESY, 1992] ou 2:2 [ANGARSKA, 1998]. Iglesias verificou que a presença do eletrólito NaCl até 1% em peso afetou consideravelmente a estabilidade da espuma, produzindo um decréscimo pronunciado no volume de espuma quando em presença do surfactante aniônico, como poderia ser esperado pela teoria DLVO [IGLESIAS, 1995]. Angarska concluiu que os íons bivalentes  $Mg^{2+}$ , adicionado à solução de surfactante aniônico, na camada de Stern (ao contrário do íon monovalente  $Na^+$ ) são capazes de interagir com pares de extremidades polares circunvizinhas do surfactante, aumentando a elasticidade e a viscosidade do filme líquido formado e, portanto, a cinética de estabilidade da espuma. A presença de contraíons bivalentes realça fortemente a atração de correlação iônica. Para concentrações do eletrólito acima de um certo valor crítico a atração de correlação iônica se torna maior do que a repulsão da dupla camada, o que levaria à desestabilização de filmes e espumas.

De acordo com essas colocações pode-se supor que as espumas obtidas com a mistura solução sol-gel mais LESS estudadas e mostradas na Figura 5.1(a) são mais estáveis do que aquelas obtidas com Tergitol, devido à presença dos contraíons de  $Ca^{2+}$  que são adicionados para serem incorporados ao vidro bioativo. E, de um modo geral, espumas preparadas com adição de surfactante (não-iônico ou iônico) em água deionizada não são estáveis pois a gravidade e a pressão capilar nas bordas de Plateau produzem a drenagem do filme líquido [LANGEVIN, 2000].

Diante do exposto até aqui, o desafio maior do procedimento desenvolvido para a produção de estruturas macroporosas de vidro bioativo é aumentar a estabilidade da espuma feita a partir da solução sol-gel e surfactante até a gelação. Propõe-se então, o estudo de outros aditivos que poderiam aumentar essa estabilidade de acordo com o discutido acima (viscosidade, tensão superficial, cinética de estabilidade, etc). Deve-se, no entanto, levar em consideração que tais aditivos deverão ser eliminados da estrutura sem causar dano à mesma.

Com os resultados do estudo acima pôde-se estabelecer um procedimento para obtenção de espumas a partir da solução sol-gel, em que a concentração de LESS, surfactante que

apresentou maior estabilidade da espuma, foi definida e é apresentada na Tabela 5.3. Com a observação visual da gelação, como descrito na Metodologia, determinou-se o tempo médio de gelação da espuma para cada tipo de amostra. Esse tempo, como pode ser verificado na Tabela 5.3 é menor quando se adiciona o surfactante iônico (LESS) na solução sol-gel e algumas vezes essa variável apresentou valor menor ainda quando a espuma ou a solução agitada foi observada.

Tabela 5.3 - Concentração de LESS e tempo médio de gelação para cada composição química de vidro bioativo.

Amostra	R ( $n_{H_2O}/n_{TEOS}$ )	Tempo de gelação (min)			C ( $mol/l_{sol}$ )
		S/ LESS	C/ LESS	Espuma	
50S	12	14,5	12,3	12,0	0,25
60S	12	15,6	13,5	12,3	0,34
70S	12	19,0	15,9	15,3	0,36

## 5.2 Caracterização Estrutural das Matrizes Obtidas

### 5.2.1 Difração de raios-X

A Figura 5.5 mostra os espectros de difração de raios-X das amostras 50S, 60S e 70S todas tratadas a 700°C por 4h. Nessa temperatura observa-se que os espectros do material são característicos de material predominantemente amorfo, ou com uma pequena fração de fase cristalina. Somente dois picos principais aparecem na mesma posição para as três amostras ( $2\theta=25,4^\circ$  e  $2\theta=31,4^\circ$ ) que podem ser atribuídos às fases silicato de cálcio ortorrômbico ou Bredigita ( $\alpha$ - $Ca_2SiO_4$  – JCPDS 11-0585) e Wolastonita ( $CaO.SiO_2$  – JCPDS 27-1064) respectivamente. Comparando-se os espectros da Figura 5.6 para a amostra 60S tratada em diferentes temperaturas, nota-se um aumento substancial de cristalinidade. A amostra tratada em temperatura igual a 800°C por 4h apresenta picos predominantes da fase silicato de cálcio hexagonal ( $Ca_2SiO_4$ ) e na posição  $2\theta=26^\circ$  identificou-se a fase Nagelschmidita (silicato e fosfato de cálcio,  $Ca_7(PO_4)_2(SiO_4)_2$  – JCPDS 05-0646). A propósito, essa fase diminui bastante de intensidade quando se analisa o espectro do pó tratado a 900°C. Nesse mesmo

espectro observa-se o aparecimento de diversos picos da fase silicato de cálcio ortorrômbico ou Bredigita ( $\alpha$ -Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>) e Wolastonita.

A solubilidade e, conseqüente, taxa de degradação dos vidros obtidos pode depender tanto da distribuição das fases presentes quanto da estrutura de poros. Estudo realizado por Laczka *et al* [LACZKA, 1997] em pó de vidro bioativo de composições químicas diferentes imerso em SBF, mostrou que o cálcio é mais facilmente liberado desses materiais quando obtidos através do método sol-gel e tratados a temperaturas menores que 1000°C do que aqueles obtidos através do método de fusão. Uma possível explicação reside no fato de que vidros obtidos por sol-gel permitem um rápido aumento da concentração de íons Ca<sup>2+</sup> e HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> em solução devido à textura, típica dos materiais obtidos por este método, em que a elevada microporosidade leva a uma elevada área superficial [PEREIRA, 1994b]. A presença de fases cristalinas que contêm cálcio, por outro lado, quando a temperatura de sinterização é maior do que 1000°C, poderiam impedir ou retardar a liberação deste elemento na solução [LACZKA, 1997].

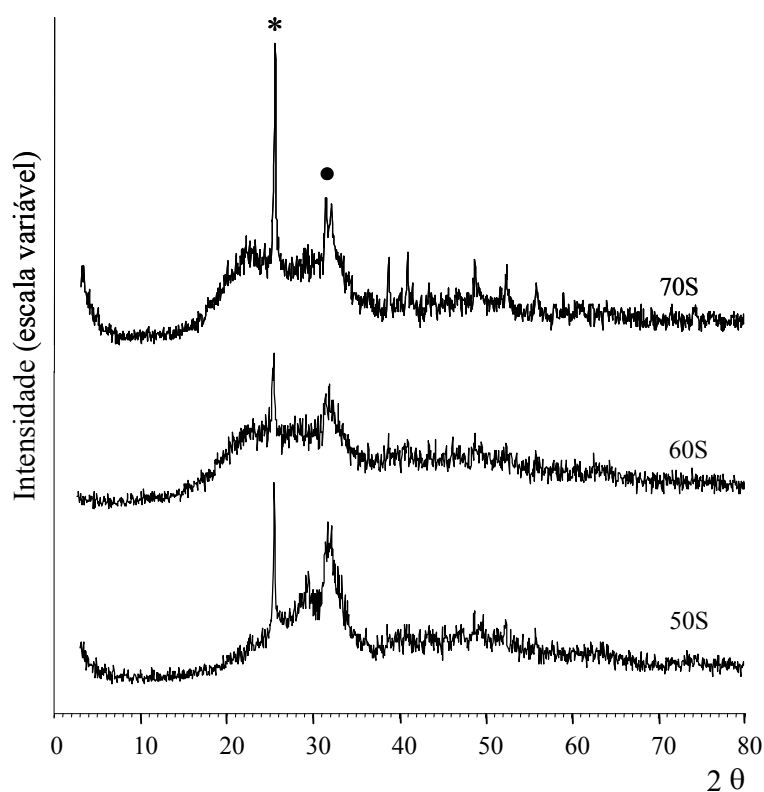


Figura 5.5 - Espectro de difração de raios-X, amostras tratadas a 700°C, 4h (\* Bredigita, ●Wolastonita).

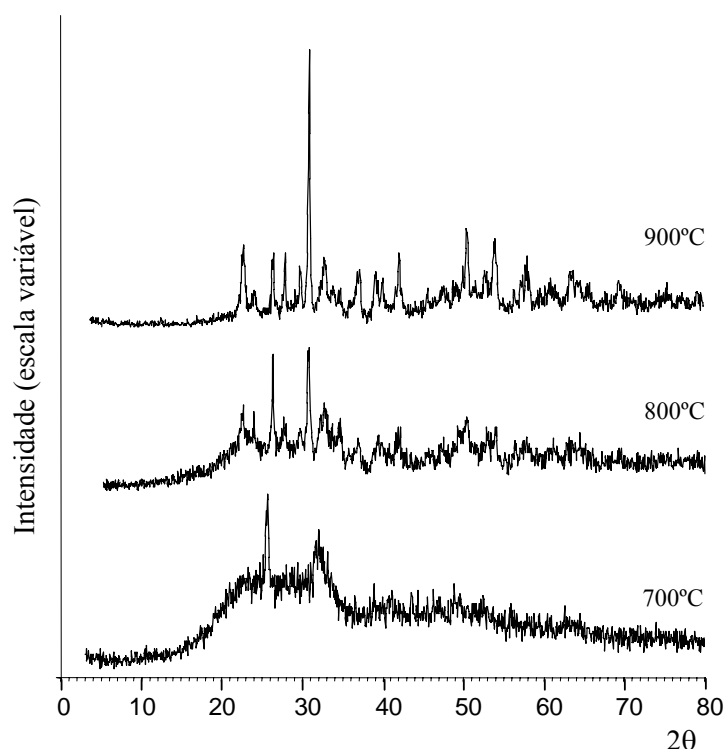


Figura 5.6 - Difratoograma da amostra 60S tratada 4h nas temperaturas indicadas.

### 5.2.2 Aspecto macroscópico e avaliação qualitativa dos macroporos

A imagem mostrada na Figura 5.7, digitalizada usando máquina fotográfica acoplada a uma lupa, ilustra o aspecto das matrizes porosas desenvolvidas neste trabalho. Nota-se que a amostra tem aparência esponjosa, não trincou durante o tratamento térmico e tem cor branca. Nesse caso a amostra possui forma cilíndrica pois foi vertida em recipiente com essa forma. Produzir amostras com formas mais complicadas é possível dependendo da matriz onde esta será vertida. A espuma é fluida o suficiente antes da gelificação, permitindo o completo preenchimento da matriz de vazão.

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para visualização da estrutura de poros dos materiais obtidos e análise qualitativa da distribuição de macroporos. A técnica de difração de elétrons retroespalhados no MEV foi usada na obtenção das imagens de melhor contraste como as mostradas na Figura 5.8. Verifica-se nessa figura poros esféricos com observação qualitativa do tamanho médio variando entre 100 e

500 $\mu$ m, interconectados e elevada porosidade. As diferenças notadas nessas imagens se referem principalmente a uma variação no tempo de gelação que foi observado nesse procedimento e ao recipiente utilizado para verter a espuma. A Figura 5.8 representa as estruturas em que notou-se uma sensível dependência desta com o tipo de recipiente devido principalmente à eficiência na etapa do vazamento. Na Figura 5.8(a) a vazão foi realizada em recipiente transparente de polietileno e transferida para um cadinho aberto onde a secagem acima de 80°C foi concluída. No caso da amostra da Figura 5.8(b) a espuma foi vertida em recipientes individuais de Teflon, mas havia a dificuldade de preenchimento devido ao ar contido nesses recipientes não possibilitar a entrada da espuma. A Figura 5.8(c) ilustra um amostra na qual utilizou-se um recipiente que foi projetado para essa aplicação, mostrado na Figura 4.2(b). O tempo de vazão diminuiu consideravelmente com o uso desses recipientes, a tampa rosqueada possibilitou melhor vedação e pode-se controlar a secagem de maneira mais eficiente.

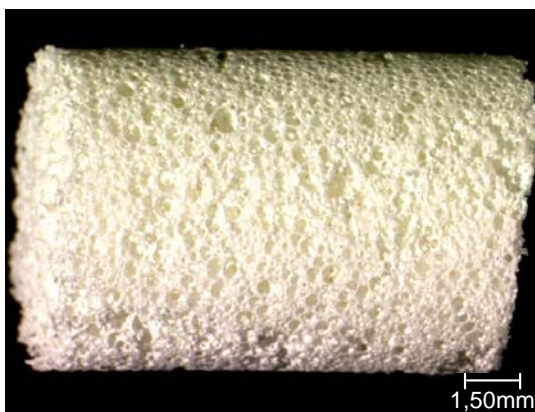
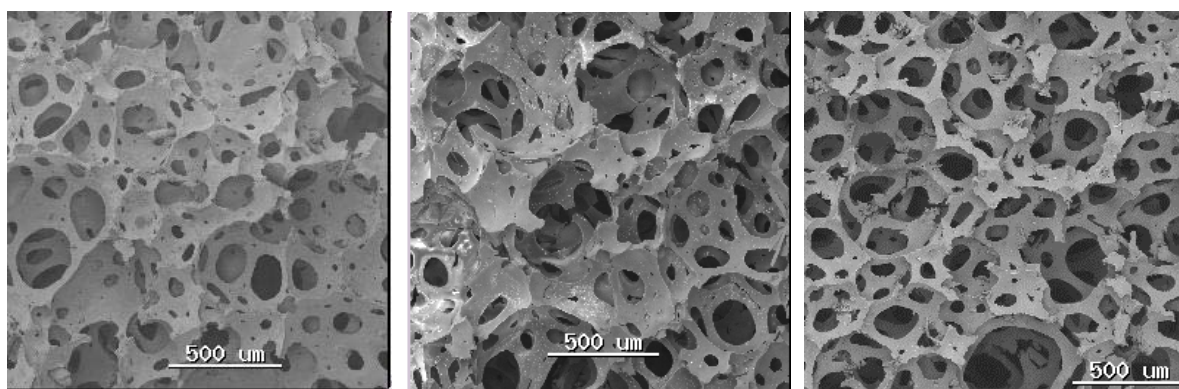


Figura 5.7 - Vidro bioativo macroporoso 60S após tratamento a 700°C, 4h.

Comparando-se a Figura 5.9 com a Figura 5.10 observam-se as diferenças atribuídas ao tipo de recipiente de vazão, recipientes individuais de Teflon<sup>®</sup> e recipientes como o da Figura 4.2(b), respectivamente e, também, o efeito do tratamento térmico. Sendo que o segundo foi considerado como o mais eficiente por facilitar a vazão, reduzir a perda de espuma, possibilitar amostras mais homogêneas e de maior qualidade (distribuição de poros mais homogênea, maior porosidade e poros de diâmetro maior).

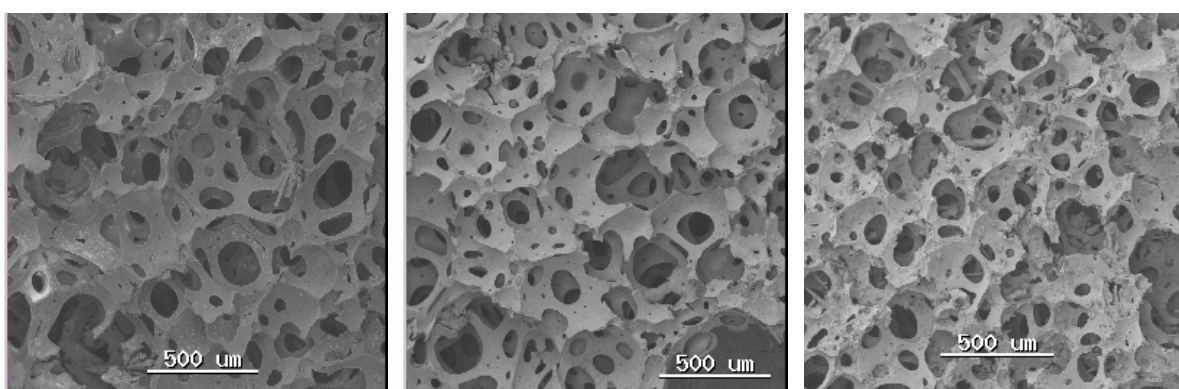


(a)

(b)

(c)

Figura 5.8 - Imagens obtidas em MEV do vidro bioativo 60S tratado a 700°C por 4h. Amostra vertida em recipiente (a) transparente de poliestireno, (b) individual de Teflon e (c) de Teflon especialmente projetado para essa aplicação.



(a)

(b)

(c)

Figura 5.9 - Amostras 60S tratadas em diferentes temperaturas por 4h e que foram vertidas em recipientes **individuais** de Teflon, (a) 700°C, (b) 800°C e (c) 900°C.

Analisando-se o efeito da temperatura de tratamento térmico, nota-se que a estrutura tratada a 700°C, Figura 5.9(a), é mais fechada do que a estrutura apresentada tratada a 800°C e 900°C, Figura 5.9(b) e (c), respectivamente. Pode-se dizer que a porosidade é qualitativamente menor, e que esta se fecha um pouco mais, ou seja, há maior contração quando a temperatura de tratamento aumenta.

As fotos apresentadas na Figura 5.11 ilustram o aspecto estrutural das amostras de diferentes composições. O aspecto é similar podendo-se dizer que espumas de volumes e tamanho de bolhas semelhantes podem ser feitas em soluções sol-gel de diferentes composições químicas. As fotos da Figura 5.12 com aumento maior foram apresentadas para se mostrar o aspecto da parede da estrutura porosa.

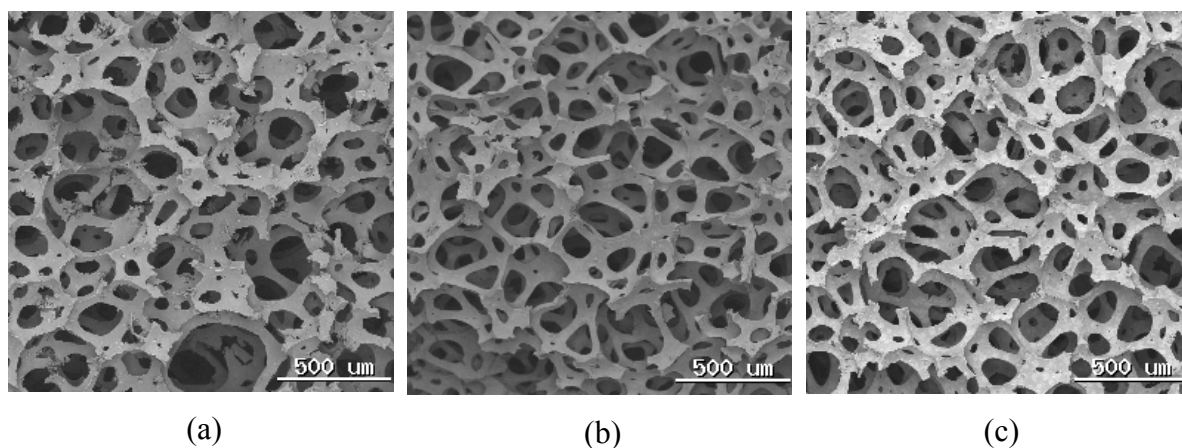


Figura 5.10 - Amostras 60S tratadas em diferentes temperaturas por 4h e que foram vertidas em recipiente de Teflon (Figura 4.2(b)), (a) 700°C, (b) 800°C e (c) 900°C.

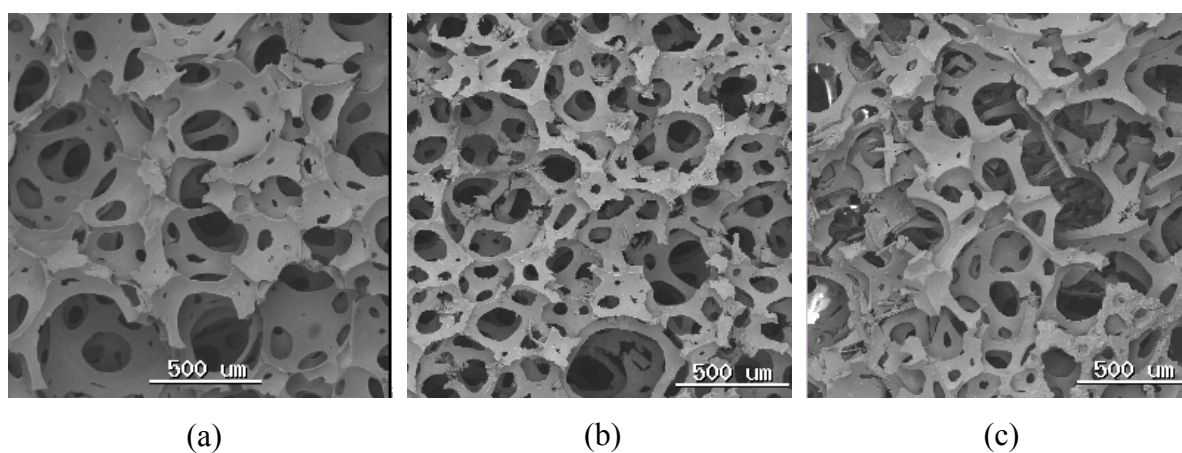


Figura 5.11 - Amostra 50S (a), 60S (b) e 70S (c), tratadas a 700°C por 4h.

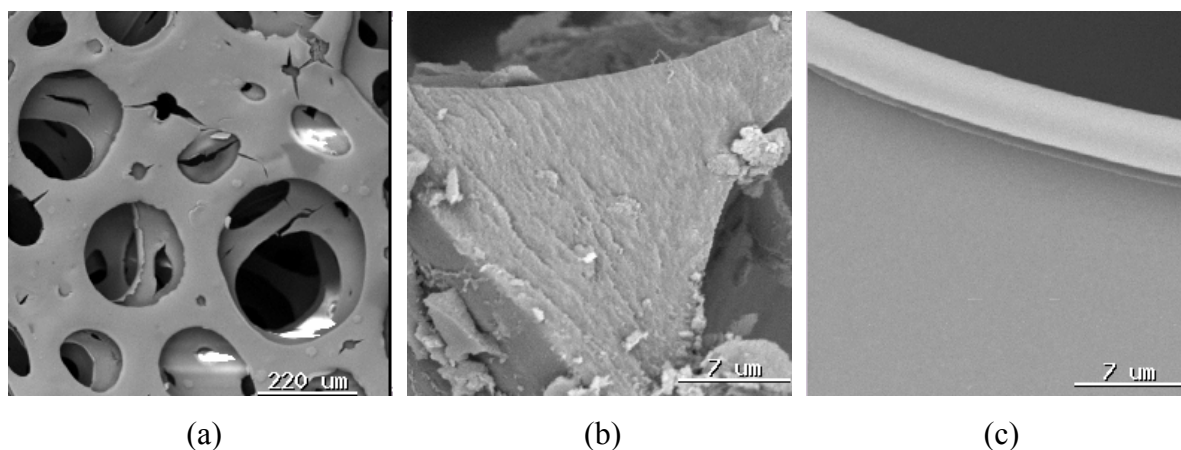


Figura 5.12 - Aspecto microestrutural da parede da estrutura porosa. Amostra 50S (a), 60S (b) e 70S (c), tratadas a 700°C por 4h.

### 5.2.3 Porosimetria de mercúrio

A estrutura de poros das amostras obtidas pode ser essencialmente considerada como o conjunto de macroporosidade (com poros na faixa de 50nm a 500μm) e mesoporosidade (na faixa de 2-50nm). A porosimetria de mercúrio foi a técnica utilizada para avaliação da distribuição de macroporos, apesar da limitação de análise de diâmetro de macroporo ser de 360μm.

Os resultados dessa análise são mostrados na Figura 5.13 e na Figura 5.14, para a amostra 60S tratada a 700°C. A intrusão de mercúrio nesta amostra se iniciou pelos poros maiores da superfície e, devido à morfologia altamente conectada do material, aproximadamente todo o volume da amostra foi penetrado por mercúrio através do maior tamanho de conexão. Portanto, como os macroporos observados nas imagens de MEV, as conexões podem ter uma variada faixa de tamanhos, mesmo que não seja possível observá-las nos testes de porosimetria de mercúrio. A porosidade calculada foi 96% e está de acordo com aquela obtida pela técnica de Arquimedes, 95%, ver Tabela 5.5. Observa-se distribuição estreita de poros em torno de 70μm, Figura 5.14. Observando as imagens de MEV, Figura 5.10 e Figura 5.11, vê-se que esse valor é menor do que o observado qualitativamente nessas figuras. Poros menores que 0,1μm

foram também caracterizados nas amostras, como pode ser visto na segunda inflexão da curva de intrusão (Figura 5.13) com distribuição em torno de  $0,015\mu\text{m}$ , Figura 5.14.

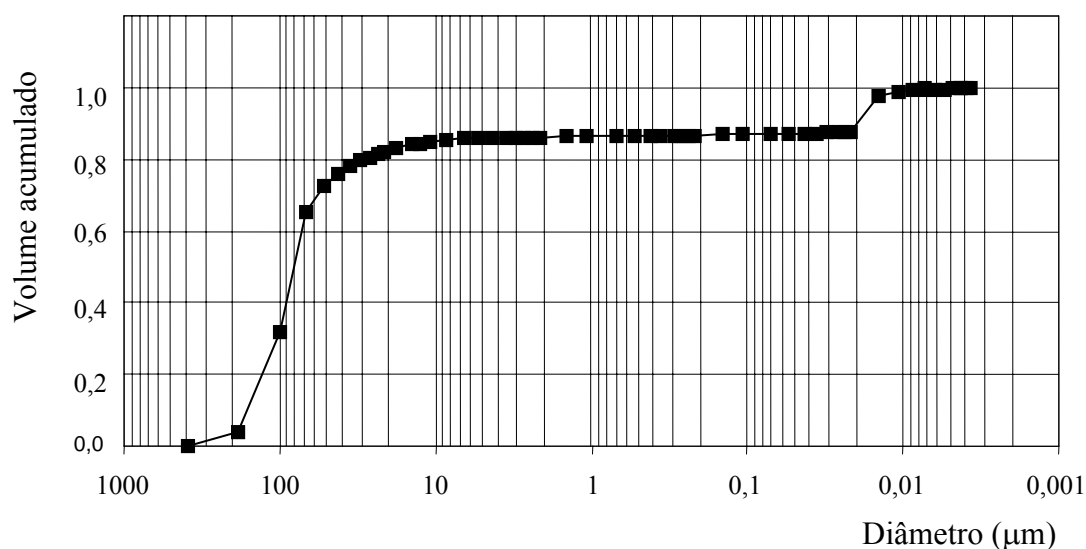


Figura 5.13 - Curva de intrusão de mercúrio, volume acumulado normalizado.

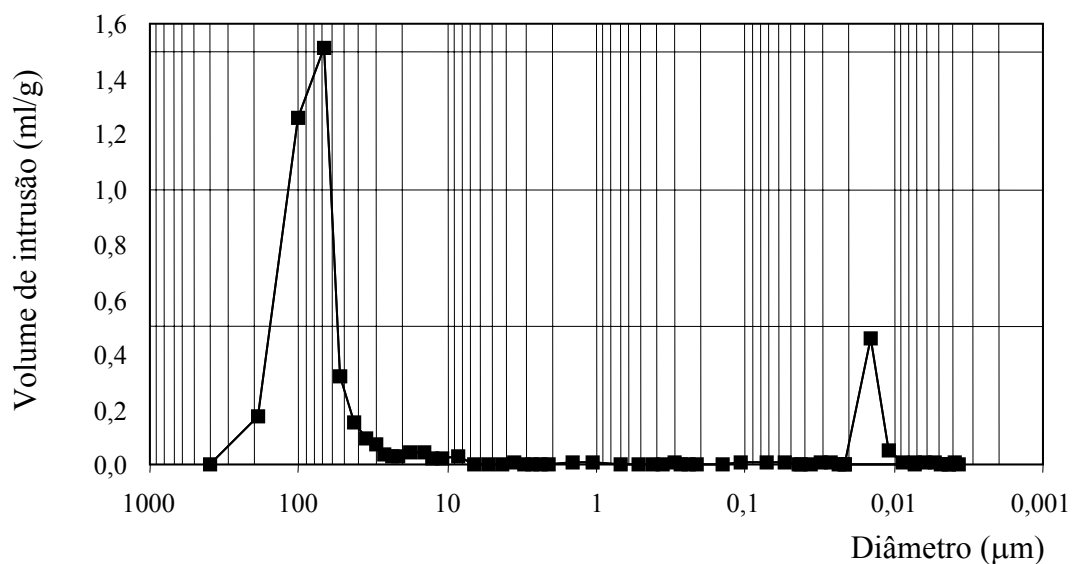


Figura 5.14 - Distribuição de tamanho de macroporos obtido por porosimetria de mercúrio, amostra 60S tratada a  $700^{\circ}\text{C}$  por 4h.

Para as estruturas apresentadas nesse trabalho pode-se dizer que a porosimetria de mercúrio não é uma técnica que possa ser usada para se determinar a distribuição real dos diâmetros dos macroporos. Essa observação é comprovada pelas imagens obtidas

em MEV onde se observam qualitativamente poros com diâmetro, 500 $\mu\text{m}$  por exemplo, maior do que o maior diâmetro analisado por porosimetria de mercúrio, 360 $\mu\text{m}$ .

#### 5.2.4 *Análise de imagem – Quantikov Image Analyzer*

A determinação da distribuição volumétrica de tamanho de poros é uma das caracterizações necessárias ao controle da qualidade de materiais cerâmicos empregados na área biológica [LI, 2003]. Nesses materiais, a distribuição volumétrica de tamanho de poros, por exemplo, fornece informações sobre o seu desempenho em cultura de célula ou *in vivo*. Mesmo em materiais para usos mais convencionais, a determinação das distribuições de tamanho de elementos microestruturais vem se tornando cada vez mais importante, uma vez que a forma e a evolução temporal destas distribuições têm mostrado uma estreita correlação com várias de suas propriedades. A análise de imagem apresenta-se como um método não destrutivo para a caracterização da textura de espumas de vidro bioativo.

Usando definições diferentes para faixa de tamanhos de poros, 10 $\mu\text{m}$ <macroporos<100 $\mu\text{m}$  e ultramacroporos>100 $\mu\text{m}$ , Blacher *et al* usaram a técnica de análise de imagem em seções transversais de polímeros ultramacroporosos obtidas em MEV, alternativamente à porosimetria de mercúrio. A justificativa foi com relação às limitações da técnica de porosimetria de mercúrio como a faixa de análise de tamanho de poros e a possível contração da amostra devido à penetração de mercúrio sob alta pressão, levando a uma incorreta distribuição de tamanho de poros [BLACHER, 2002].

Normalmente é muito difícil ou mesmo impossível cortar seções paralelas de materiais duros ou frágeis porosos para serem analisadas por métodos estereológicos. E, um dos problemas básicos da determinação da distribuição de tamanhos de elementos microestruturais, consiste na obtenção de informações do espaço tridimensional a partir de informações do espaço bidimensional, o que pode ser feito por meio de correções estereométricas. Para realizar esta tarefa, relativamente complexa, o método de Saltykov

supõe um sistema composto por esferas distribuídas de forma aleatória e uniformemente no espaço. As esferas são cortadas por um plano aleatório, sendo que cada interseção, ou seja, cada círculo, é contado e classificado em classes de tamanho de diâmetro conforme uma série geométrica. As probabilidades de ocorrência das seções de corte, correspondentes a cada classe de tamanho, são calculadas considerando-se vários planos de corte aleatórios numa esfera de raio unitário. Estes valores de probabilidade são utilizados para a determinação das distribuições de tamanho das microestruturas reais, com a hipótese básica de que os elementos microestruturais de interesse têm formas que podem ser aproximadas pela forma esférica. Recomenda-se o método de Saltykov por ser menos sensível a propagação de erros de contagem. Em muitos casos esse método pode ser acoplado a um programa de análise de imagens automatizado [DAVTIAN, 2000].

O objetivo principal do sistema *Quantikov Image Analyzer* (analisador microestrutural para o ambiente Windows) [PINTO, 1996] é a determinação de parâmetros geométricos de microestruturas, em especial aquelas contendo grãos e poros. Isso significa não apenas a obtenção de áreas e perímetros dos elementos microestruturais mas também parâmetros estereológicos que podem ser obtidos com técnicas bem estabelecidas da microscopia quantitativa. Todavia muitas das aplicações atuais do sistema Quantikov extrapolaram aquelas previstas na sua concepção inicial, de tal forma que ele vem sendo utilizado por inúmeros pesquisadores de outras áreas do conhecimento.

Impregnaram-se amostras da composição 50S com resina de embutimento a frio da mesma maneira como foram descritos os ensaios de Arquimedes, usando vácuo para forçar a entrada da resina nos poros maiores. Esse procedimento foi necessário devido à limitada resistência mecânica das estruturas que não permitiria a obtenção de uma seção de corte plana. As superfícies foram então preparadas através de lixamento e polimento com alumina. A digitalização, em microscópio ótico, das imagens foi realizada em seções quaisquer, considerando a natureza das espumas formadas na solução sol-gel, com distribuição de bolhas que não demonstrou nenhuma orientação de textura. As imagens obtidas são mostradas na Figura 5.15 que foram adquiridas sob as mesmas condições de brilho e contraste. Isso quer dizer que na etapa de binarização não foi

necessário nenhum tratamento adicional das imagens. Mas o pouco contraste observado levou a outro procedimento que facilitou a segmentação da imagem. De posse das imagens impressas coloriu-se a região ao redor dos poros destacando-se estes como pode ser visto na Figura 5.16, em que dois exemplos são apresentados.

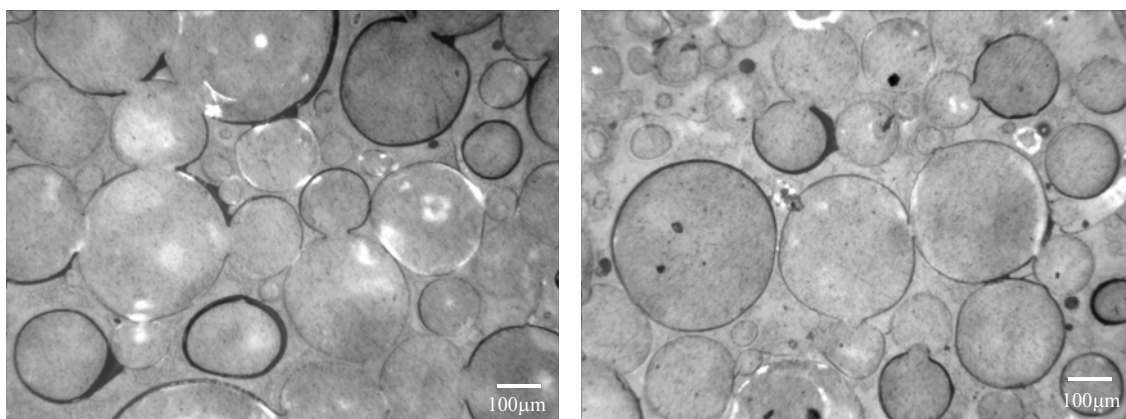


Figura 5.15 - Representação de duas entre as sete áreas analisadas da amostra 50S impregnada com resina de embutimento. Observa-se o pouco contraste entre os elementos analisados e a matriz sólida.

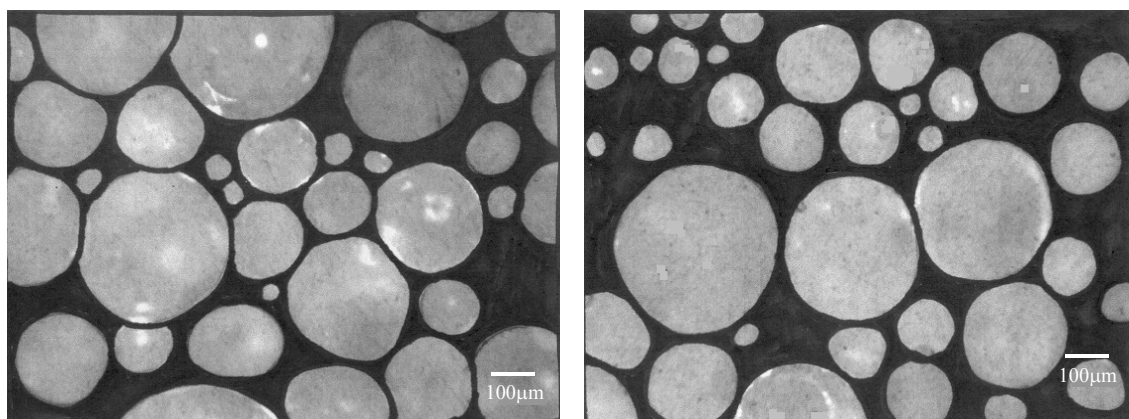


Figura 5.16 - Mesmas imagens da Figura 5.15 com os macroporos destacados para facilitar a binarização.

O gráfico Frequência (%) versus Diâmetro de poros ( $\mu\text{m}$ ) mostrado na Figura 5.17, é o resultado da análise de 258 elementos obtidos de 7 áreas analisadas e representa uma distribuição de poros mais ampla do que a apresentada no resultado de porosimetria, Figura 5.14. A distribuição dos diâmetros dos poros descreve uma curva

aproximadamente gaussiana, Figura 5.18, com pequeno desvio. Para um total de 258 elementos (poros) analisados, o fator de forma foi igual a 1, poros esféricos, para 207 elementos para o restante entre 0,7-0,9. O tamanho médio de poro obtido da distribuição foi  $139 \pm 92 \mu\text{m}$ . O elevado desvio padrão está relacionado à ampla faixa de poros que pôde ser analisada pelo Quantikov.

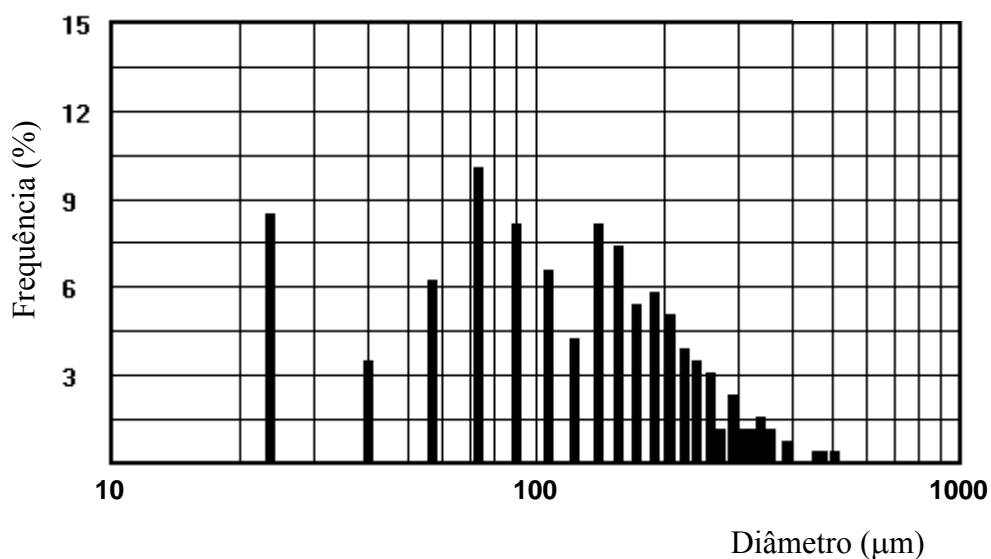


Figura 5.17 - Distribuição de tamanho de poros de seções polidas da amostra macroporosa 50S, resultado da análise de imagem.

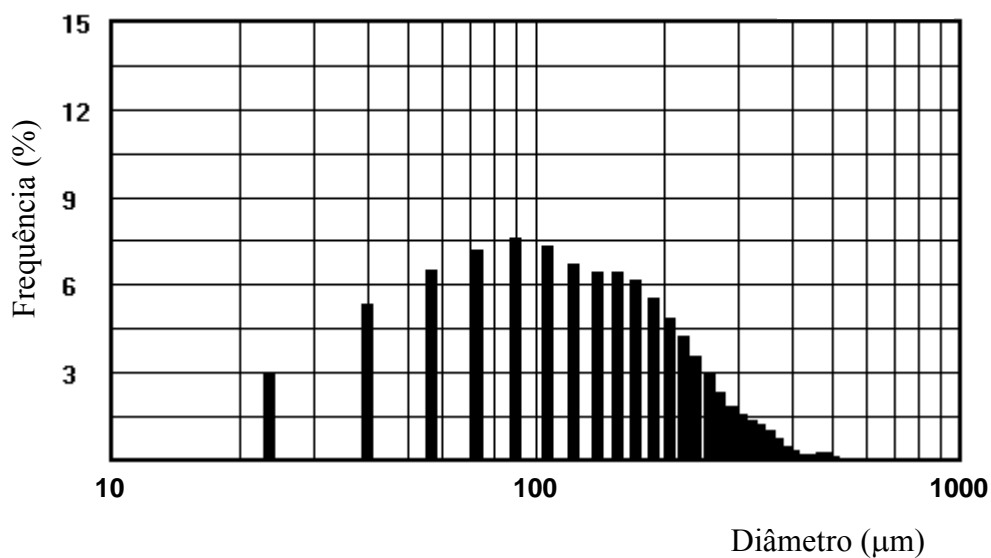


Figura 5.18 - Frequência de distribuição de tamanho de poros aproximada.

A técnica mostrou-se mais adequada para representar a distribuição de macroporos, mas as diversas etapas; impregnação das amostras com resina, preparo metalográfico, digitalização das seções polidas, tratamento das imagens e, finalmente, análise das mesmas; além disso, um número elevado de elementos a ser processado, dispenderam bastante tempo e trabalho, o que pode ser uma desvantagem considerável do método.

### **5.2.5 Adsorção de Nitrogênio**

As estruturas mesoporosas de materiais bioativos obtidos pelo método sol-gel, com poros na faixa de 2-50nm, são bem mais favoráveis do que aquelas completamente densas, porque estes materiais possuem alta área superficial o que resulta em alta bioatividade e uma elevada tendência à biorreabsorção. Os poros interconectados agem como uma organização de canais vasculares, que pode assegurar o suprimento de sangue e nutrientes para o tecido.

Para a determinação da estrutura mesoporosa foi utilizada a análise por adsorção de nitrogênio. Valores médios de área superficial específica, tamanho médio de mesoporos e volume de poros são apresentados na Tabela 5.4. As isotermas de adsorção-dessorção correspondem ao Tipo IV, Figura 5.19, indicando material mesoporoso (2-50nm). O loop de histerese entre as curvas de adsorção e dessorção, tipo H1 de acordo com Sing é típico de poros cilíndricos [SING, 1998]. A maior inclinação em pressões relativamente altas é associada com condensação capilar nos poros e uma estreita distribuição de poros. A Figura 5.20 mostra a distribuição de tamanho de mesoporos para diferentes composições do vidro bioativo. Nota-se que poros na faixa de 1-150nm foram analisados e que o valor médio e a textura varia com a composição do material. A composição 60S apresentou uma distribuição de poros mais estreita em torno de 15nm e as composições 50S e 70S apresentaram uma distribuição mais ampla e menor volume de poros. Observando os resultados da Tabela 5.4, pode-se dizer que há uma grande contração da estrutura quando a temperatura de estabilização aumenta (amostra 60S tratada a 700, 800 e 900°C). Além disso, o volume e o diâmetro de mesoporos diminui à medida que a temperatura aumenta como resultado do processo de densificação.

Quando se compara o teor de sílica o que se observa é um aumento de Sp com o aumento de SiO<sub>2</sub> e diminuição do tamanho médio de mesoporo.

Estruturas de composição 70 e 100% em mol de SiO<sub>2</sub> e 58S (composição nominal idêntica à amostra 60S), tratadas a 600°C, semelhantes às aqui apresentadas foram desenvolvidas por Sepúlveda [SEPÚLVEDA, 2001]. Nesse trabalho a amostra 58S apresentou área superficial, volume e tamanho médio de poros igual a 233,9m<sup>2</sup>/g, 0,576cm<sup>3</sup>/g e 15,21nm respectivamente. O maior valor de área superficial pode estar relacionado à temperatura de tratamento de estabilização nesse caso menor do que as realizadas no presente trabalho.

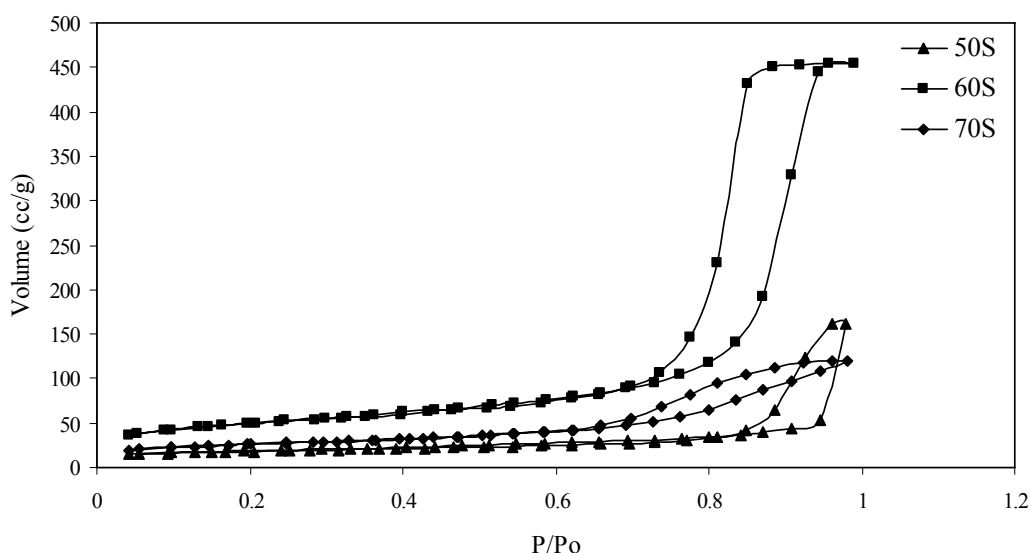


Figura 5.19 - Isotermas de adsorção-desorção de nitrogênio de várias composições químicas do vidro bioativo.

A estrutura mesoporosa e a elevada área superficial de espumas bioativas são aspectos típicos de materiais obtidos por sol-gel. Essas características intensificam a taxa das reações na superfície, conduzindo para uma liberação mais acelerada de espécies iônicas durante a dissolução do material. A área superficial específica tem um papel importante na bioatividade de biomateriais. A habilidade do substrato de induzir a formação de uma camada biologicamente ativa de HCA não depende somente da composição química do vidro bioativo mas também da textura produzida pelo processamento sol-gel, como foi

demonstrado por Li *et al* [LI, 1991b], Saravanapavan *et al* [SARAVANAPAVAN, 2001] e Pereira *et al* [PEREIRA, 1994b]. Tais estudos foram realizados em pós de vidro bioativo que apresentavam área superficial específica entre 300-700m<sup>2</sup>/g e volume de poros maior que 0,4cm<sup>3</sup>/g. Este aspecto subestrutural poderia ser relacionado a uma maior densidade de sítios potenciais de nucleação na formação da camada de hidroxiapatita sobre a superfície de vidros bioativos do sistema SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO com até 90% em mol de SiO<sub>2</sub> [LI, 1991b; PEREIRA, 1994b].

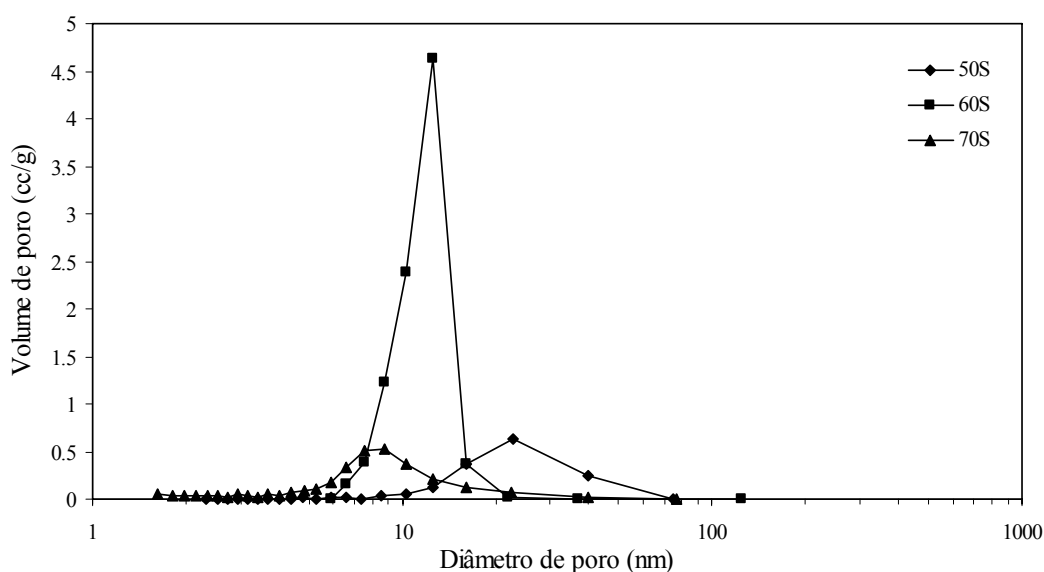


Figura 5.20 - Distribuição de mesoporos da adsorção de nitrogênio de várias composições químicas do vidro bioativo.

Tabela 5.4 - Resultados da adsorção de nitrogênio por tipo de amostra e temperatura de estabilização.

<b>Amostra</b>	<b>Área superficial específica, Sp (m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>Volume de poro (cm<sup>3</sup>/g)</b>	<b>Diâmetro de poro (nm)</b>
50S (700°C)	64,1	0,249	15,6
60S (700°C)	173,2	0,700	16,2
60S (800°C)	6,7	0,031	18,6
60S (900°C)	3,2	0,024	29,6
70S (700°C)	91,2	0,186	8,2

Além disso, a mesoporosidade oferece um meio de adsorção-dessorção de um número variado de substâncias biologicamente ativas, como proteínas, fatores de crescimento, sem perda de conformação e função biológica. A textura dos materiais obtidos por sol-gel pode ser variada através de diferentes condições de processamento, dessa forma, as taxas de dissolução e os sítios para interação química na superfície podem ser controlados. Esses aspectos estimulam aplicações como dispositivos de liberação controlada ou como dispositivos para extração de comportamentos específicos em cultura de células *in vitro* [SEPÚLVEDA, 2002].

Na Tabela 5.5 apresentam-se os resultados obtidos com a técnica de Arquimedes como descrito no capítulo Metodologia. Para diferentes temperaturas de estabilização (amostra 60S) há diferenças apreciáveis de densidade aparente e o valor quando  $T=700^{\circ}\text{C}$  é comparável ao de densidade verdadeira ou real obtida por picnometria de gás hélio ( $\rho=2,4\text{g/cm}^3$ ).

Tabela 5.5 - Densidade aparente obtida pela técnica de Arquimedes e verdadeira por picnometria de hélio.

<b>Amostra</b>	<b><math>\rho_{\text{ap}}</math> (g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b><math>\rho_{\text{vol}}</math> (g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b><math>\rho_{\text{real}}</math> (g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Porosidade aparente (%)</b>
50S (700°C)	2,64±0,04	0,25±0,02	2,7	90,6±0,9
60S (700°C)	2,56±0,14	0,14±0,04	2,4	94,5±1,6
60S (800°C)	2,27±0,03	0,15±0,02	--	93,5±0,9
60S (900°C)	2,23±0,11	0,14±0,01	--	94,0±0,3
70S (700°C)	2,29±0,02	0,16±0,01	2,6	93,1±0,4

$\rho_{\text{ap}}$  – Densidade aparente obtida por técnica de Arquimedes.

$\rho_{\text{vol}}$  – Densidade volumétrica obtida por técnica de Arquimedes.

$\rho_{\text{real}}$  – Densidade real medida por picnometria de hélio.

A densidade aparente diminuiu com a temperatura de tratamento, indicando aumento da densificação da estrutura com o aumento da temperatura. Uma das limitações dessa técnica é quanto à impregnação eficiente de água nos poros menores. O uso do vácuo, como descrito, facilitou tal operação e apesar do desvio padrão ser baixo para todas as medidas, se a água não entra nos poros acessíveis calcula-se um valor de densidade

aparente maior do que o real. A densidade do pó analisada por picnometria de hélio,  $\rho_{\text{real}}$ , deveria ser estreitamente maior do que a obtida por Arquimedes já que a molécula de He por ser menor do que a de água entraria em poros acessíveis, mesmo aqueles muito pequenos. O pó para essa análise foi obtido moendo-se as estruturas porosas e como as partículas resultantes da moagem podem apresentar uma quantidade de poros não acessíveis o valor de densidade real medido é menor do que o verdadeiro.

### **5.2.6 Resistência Mecânica**

A caracterização estrutural apresentada pode ser usada também para se concluir que as amostras de elevada porosidade possuem resistência mecânica substancialmente reduzida, da ordem de 1-3MPa [JONES, 2003]. Realizando ensaios de compressão em amostras porosas cilíndricas do vidro bioativo; composição 58S (60% em mol  $\text{SiO}_2$ , 36%CaO, 4% $\text{P}_2\text{O}_5$ ) tratadas a 600°C e densidade volumétrica variando de 0,18 a 0,43g/cm<sup>3</sup>; Jones e Hench observaram que as curvas Tensão de Compressão-Deformação para tais espumas são típicas de estruturas semelhantes a favos cerâmicos elástico-frágeis [JONES, 2003]. Em relação ao aspecto da curva, inicialmente parece haver uma relação linear de tensão como uma função da deformação (dobramento das paredes dos poros), até que a tensão sobre a superfície das paredes dos poros excede o módulo de ruptura e ocorre a fratura. A tensão na qual ocorre a ruptura da parede do poro é a máxima tensão de compressão ( $\sigma_{\text{máx}}$ ). À medida que a carga aplicada é aumentada mais as paredes dos poros sucumbem, o que foi mostrado através de um patamar formado na curva tensão-deformação. Eventualmente, em deformações maiores os macroporos se desintegram em tal grau que as paredes opostas dos poros se tocam. A parte final da curva cai acentuadamente já que deformação adicional comprime o material da parede do poro (densificação). Ao final restaria um pó fino compacto. Foi verificado também que para estruturas em que as paredes dos poros têm espessura maior ou menor porosidade e maior densidade geométrica, a resistência ao dobramento da parede é maior e a resistência à compressão também é maior. O módulo de Young apresentou uma tendência similar. Concluiu-se que a estabilidade estrutural de substratos porosos depende fortemente da rede interconectada de poros obtida através

das espumas feitas a partir do processo sol-gel. Durante a etapa de secagem do processo, o líquido dos poros evapora e isso provoca o aparecimento das pressões capilares. As tensões capilares aumentam se o diâmetro dos poros e a conectividade diminuem e as fraturas no material podem iniciar.

Liu preparou estruturas porosas de hidroxiapatita, sinterizadas a 1200°C, com tamanho de macroporos na faixa de 100 a 400µm e encontrou uma relação inversamente proporcional entre a tensão de compressão e o tamanho dos poros para uma determinada porosidade [LIU, 1996]. Liu verificou que a resistência tende a se tornar insensível ao diâmetro do macroporo quando o nível de porosidade é elevado, >70% e que o valor tende a aproximadamente 5MPa.

As estruturas obtidas nesse trabalho foram consideradas de resistência suficiente para manipulação, quer dizer que em todas as análises foi possível cortar, manipular com pinça, fazer o preparo para MEV, transportar e as mesmas não se desintegraram. De forma qualitativa pode-se dizer também que a resistência da amostra 60S tratada em temperaturas diferentes era maior quanto maior a temperatura de tratamento.

### ***5.2.7 Espectroscopia de Infra-vermelho***

A espectroscopia de Infra-vermelho por Transformada de Fourier (FTIR) fornece informações sobre a estrutura molecular a partir de espectros vibracionais pela absorção de energia para o estiramento e alargamento das ligações entre átomos de diferentes grupos funcionais e é também uma técnica analítica para a determinação da composição da superfície devido à profundidade de penetração, menor que 1µm. Esta técnica é rápida e não-destrutiva, não necessita de vácuo e amostras de dimensões variadas (dependendo do tamanho do porta-amostra) e mesmo pós podem ser analisados. Com esta técnica pôde-se verificar mudanças em composição, bem como modificações estruturais que ocorrem na superfície do material decorrentes das variações em composição. O FTIR foi utilizado para analisar o pó e as estruturas porosas antes e depois da imersão em SBF.

A Figura 5.21 mostra os espectros de reflexão difusa dos pós de vidro bioativo de composições 50S, 60S e 70S tratadas a 700°C por 4h antes do teste de reatividade *in vitro*. Identificam-se principalmente as bandas 1095 e 482cm<sup>-1</sup> características dos modos de vibração de distensão e dobramento das ligações Si-O-Si, respectivamente. Algumas vezes é possível a identificação de outras bandas. O “ombro” em torno de 938cm<sup>-1</sup> pode ser atribuído ao modo de vibração de distensão Si-O-Ca em uma unidade [SiO<sub>4</sub>] com dois oxigênios não ligados.

Foi proposto que a estrutura básica de pós de vidro obtidos por sol-gel é composta de moléculas SiO<sub>4</sub> tetraédricas e simétricas. Tetraedros adjacentes são conectados por átomos comuns de oxigênio ou pontes. A posição relativa de duas unidades adjacentes pode variar consideravelmente devido a dois mecanismos de desordem: primeiro o ângulo Si-O-Si pode tomar valores entre 120° e 180°; segundo, cada unidade tetraédrica pode tomar uma faixa de posições possíveis formadas por uma rotação sobre a ligação Si-O.

Quando o CaO é adicionado e o seu conteúdo é aumentado, a rede estrutural se torna mais complicada. O íon Ca<sup>2+</sup> é um modificador de rede. Quando adicionado à composição, o CaO quebra a rede do vidro silicato e cria mais oxigênios não ligados. Como resultado, quando a concentração de CaO atinge um certo valor, por exemplo 36% em mol na amostra 60S, o pico em torno de 938cm<sup>-1</sup> resultante da vibração de distensão Si-O com dois oxigênios livres começam a aparecer. A intensidade dessa banda aumenta um pouco com o aumento de CaO como mostrado na Figura 5.21, indicando que um aumento de íon cálcio diminui a conectividade da rede e gradualmente “afrouxa” a estrutura de gel.

Os espectros obtidos para a amostra 60S tratada em temperaturas diferentes, Figura 5.22, não mostraram diferença considerável em relação à posição das bandas características desse material mas sim uma melhor definição das bandas, ou seja, estas se apresentaram mais estreitas.

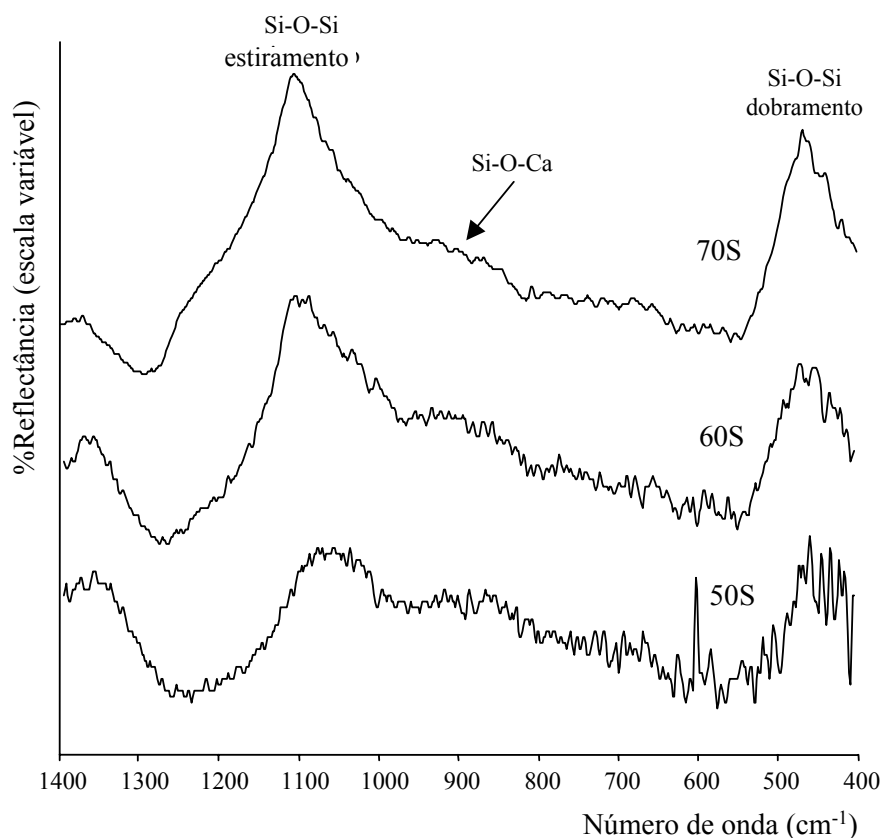


Figura 5.21 - Espectros de infra-vermelho (FTIR), reflexão difusa, das amostras de diferentes composições tratadas a 700°C por 4h.

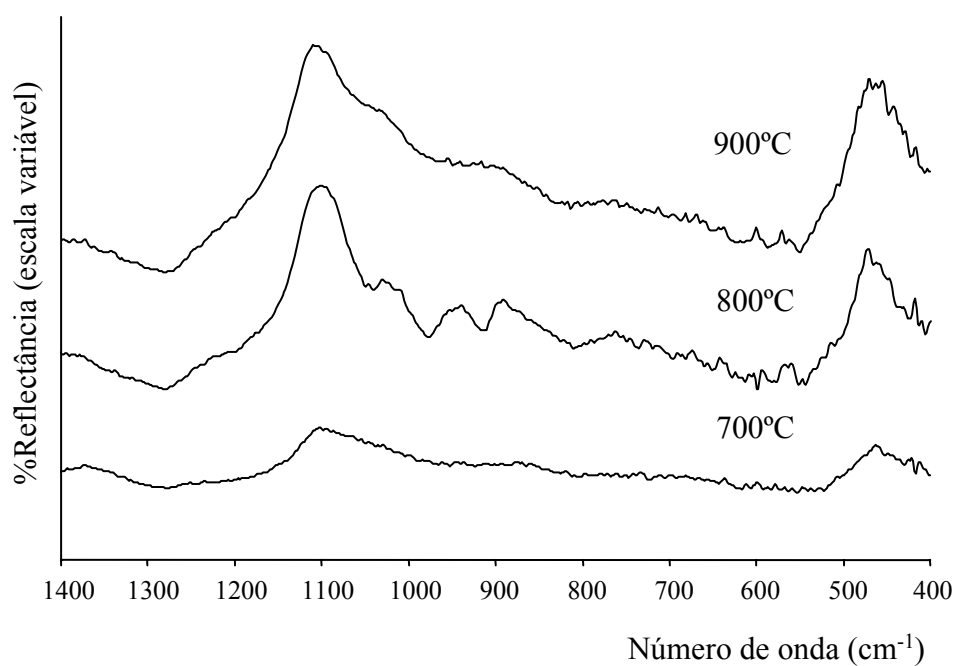


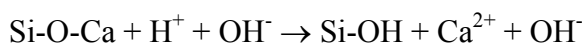
Figura 5.22 - Espectros de infra-vermelho (FTIR), antes da imersão, da amostra 60S tratada em diferentes temperaturas por 4h.

### 5.2.8 *Estudo da bioatividade e dissolução*

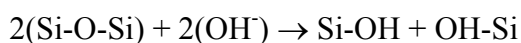
Uma condição essencial para um material criar uma interface de ligação com o tecido ósseo é a formação de uma camada superficial de hidroxiapatita (constituente mineral do osso) quando implantado. Define-se assim a bioatividade do material. A bioatividade é relacionada à capacidade de ligação do material com o tecido ósseo ou de induzir a formação do osso *in vivo* [IZQUIERDO-BARBA, 2000]. Uma camada de hidroxiapatita é formada quando o vidro bioativo é embebido em soluções que imitam o plasma humano. Algumas soluções incluem Tris buffer (tri(hidroximetil) aminometano/HCl), *simulated body fluid* (SBF), soro bovino e alguns meios de cultura como Dulbeco's.

A formação de uma camada de hidroxiapatita sobre a superfície de vidros obtidos por sol-gel é um fenômeno de cinética dependente do tempo. Li em seu trabalho de tese [LI, 1991a] definiu cinco estágios de reações interfaciais para descrever a bioatividade dos vidros bioativos obtidos por sol-gel:

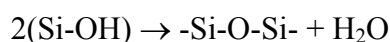
Estágio 1: Uma troca iônica muito rápida dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  com  $\text{H}^+$  da solução:



Estágio 2: Troca catiônica a qual aumenta a concentração de hidroxila da solução e causa uma perda muito rápida de sílica solúvel na forma de  $\text{Si}(\text{OH})_4$  para a solução e formação adicional de grupos silanol ( $\text{Si-OH}$ ) sobre a superfície do material acompanhada pela migração de íons P para a solução que também ocorre rapidamente:



Estágio 3: Policondensação extremamente rápida de grupos silanol também presentes inicialmente na superfície ou criados no estágio 2 formando uma camada superficial rica em  $\text{SiO}_2$  e deficiente em íons Ca:



Estágio 4: Nucleação e cristalização heterogênea de cristais de hidroxiapatita que ocorrem simultaneamente sobre a superfície do vidro bioativo;

Estágio 5: Aglomeração e ligação química de porções biológicas dentro da camada crescente de hidroxiapatita conduzindo à incorporação de fibras colágeno produzidas pelos osteoblastos.

Em geral, as taxas de todos os estágios são tão rápidas que os cristais de hidroxiapatita sobre a superfície de pós ou estruturas macroporosas podem ser detectadas pela espectroscopia de infra-vermelho (FTIR) durante os primeiros estágios de reação em soluções SBF. A elevada área superficial e a natureza dos microporos de materiais obtidos por sol-gel facilitam o estágio 1, troca iônica, resultando em uma liberação muito rápida de íons cálcio na solução bem como um rápido aumento do pH, que mais alcalino favorece a repolimerização dos grupos silanol e a cristalização de HCA na superfície [LI, 1991a]. Os poros presentes na estrutura do vidro agem como sítios de nucleação. A superposição de potenciais de superfície dentro dos poros aumenta a concentração iônica e o grau de supersaturação dos íons Ca e P. Portanto, a precipitação de HCA é mais provável de ocorrer dentro dos poros. A taxa de nucleação é então controlada pelo número de sítios disponíveis, isto é, volume de poros, e pela difusão de íons dentro dos poros, ambos fatores dependem da textura do material [PEREIRA, 1996].

A Figura 5.23 representa o espectro de FTIR obtido da amostra 60S em diferentes condições de imersão, segundo o que foi descrito no capítulo Metodologia. Pela análise da Figura 5.23 supõe-se que a imersão depende fortemente da padronização utilizada (SA/V ou m/V). A dependência que poderia haver pela presença (SBF) ou não (Tris) de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na solução de imersão pode estar relacionada à rápida liberação, para uma determinada solução, de íons cálcio e fósforo e a acelerada precipitação de HCA sobre a superfície das amostras. Os resultados de análise da dissolução, Tabela 5.6, mostram que após uma hora de imersão em SBF a quantidade de fósforo diminuiu consideravelmente para as amostras 50S e 60S e após 24h de imersão há somente traços desse elemento na solução. Isso quer dizer que a precipitação rápida de cristais de HCA consome todo o fósforo livre e quantidade adicional desse elemento só seria possível pela continuação da dissolução da estrutura. Para se conseguir uma camada de hidroxiapatita que pudesse cobrir a superfície do substrato poroso deveria ser fornecido

à solução mais íons fósforo. Os espectros de infra-vermelho apresentaram sinal baixo na detecção de HCA, Figura 5.24 e Figura 5.25, após 24h de imersão.

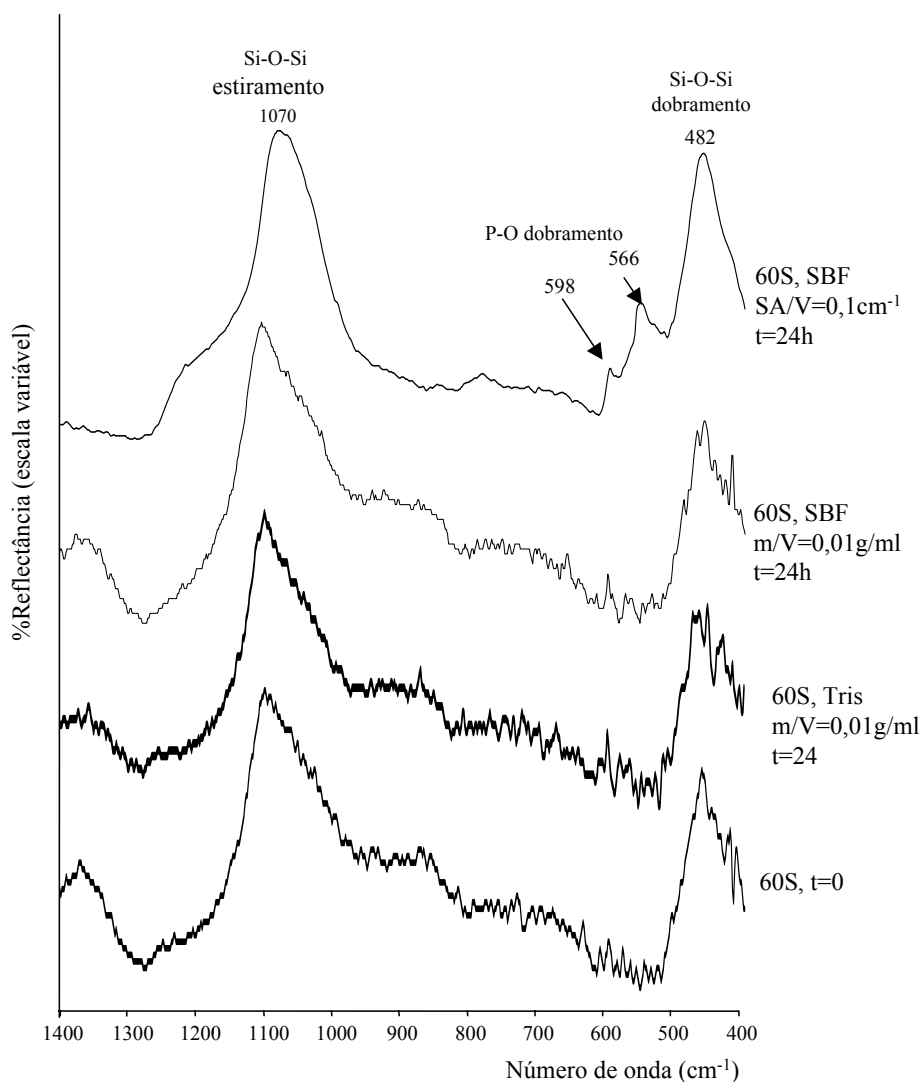


Figura 5.23 - Espectro de FTIR da amostra 60S tratada a 700°C em diferentes condições de imersão.

Quando as estruturas foram imersas em solução Tris por 24h não se observou a formação da camada de HCA, Figura 5.25. Considerando a baixa taxa de hidrólise do alcóxido de fósforo, a aceleração na gelação e a discussão acima, pode-se supor que nem todo o fósforo que deveria ser proveniente do reagente adicionado no preparo da solução sol-gel, foi incorporado ao material. Parece não haver uma quantidade razoável de fósforo que deveria ser solubilizado das amostras. Portanto, é possível que mesmo que se efetuasse a imersão por tempos muito longos não se observaria a formação dessa camada de hidroxiapatita. Essa colocação pode ser confirmada pela análise da Figura

5.23 em que mudando-se o padrão de procedimento da imersão de  $m/V=0,01\text{g/ml}$  para  $SA/V=0,1\text{cm}^{-1}$ , observou-se bandas características da vibração de dobramento de P-O como indicado na figura.

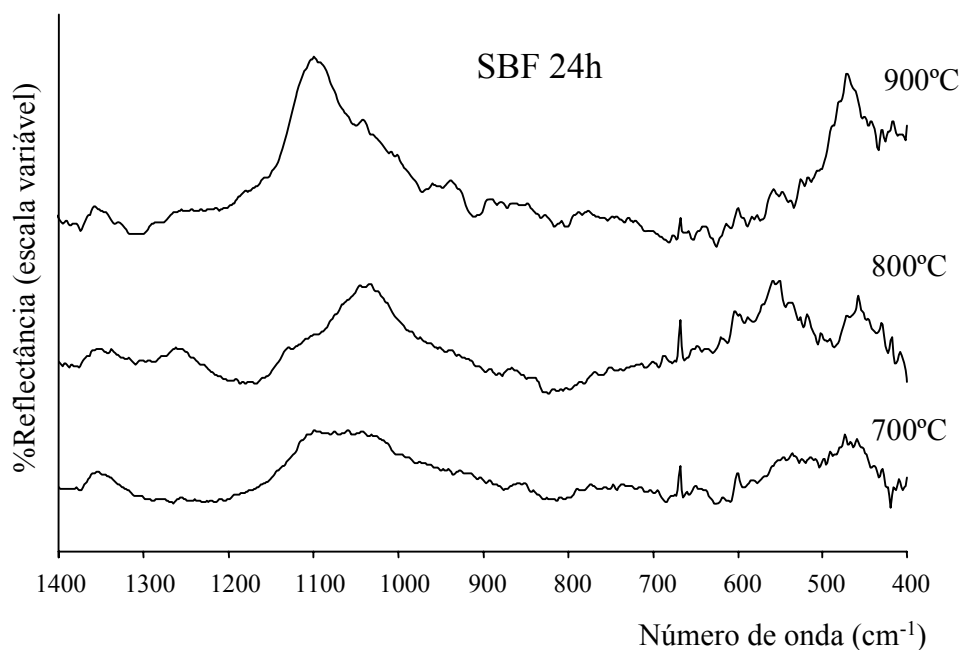


Figura 5.24 - Espectro de FTIR da amostra 60S tratada em diferentes temperaturas após 24h de imersão em SBF.

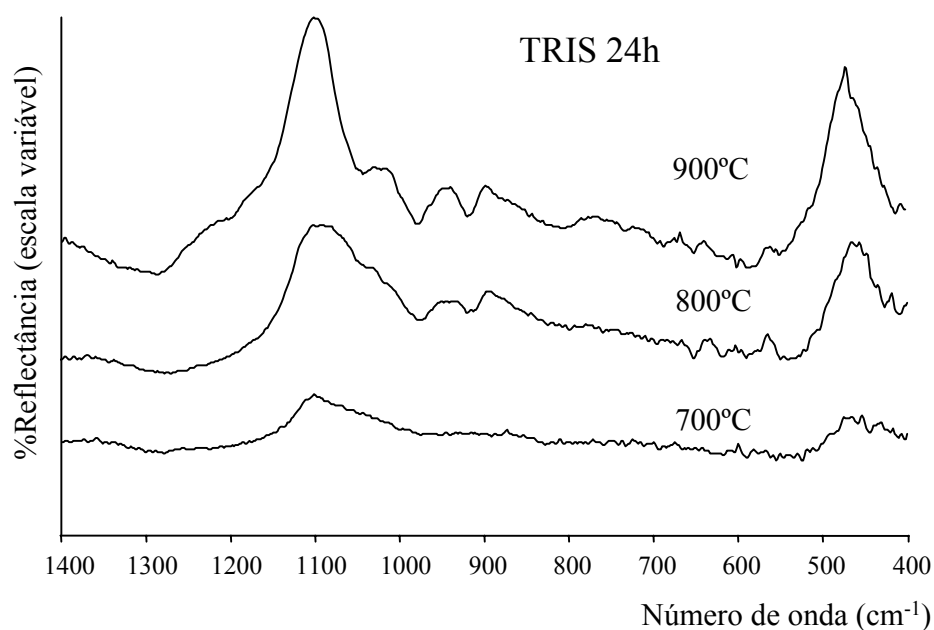


Figura 5.25 - Espectro de FTIR da amostra 60S tratada em diferentes temperaturas após 24h de imersão em Tris buffer.

Um estudo importante no caso de matrizes para engenharia de tecidos é a avaliação da degradabilidade ou dissolução dos materiais. Este estudo, no entanto, é de longo prazo e deveria idealmente ser realizado *in vivo*, onde as condições reais de aplicação do material são reproduzidas. Porém, a degradabilidade está relacionada à solubilidade dos materiais e estudos *in vitro* podem então ser indicativos do potencial de degradação dos mesmos.

Na tabela 11, e Figura 5.26 a Figura 5.29 são apresentados os resultados da dissolução das estruturas obtidos pela análise da solução SBF antes e após a imersão por 1h e 24h. Os ensaios foram realizados em duplicata. Observa-se que a concentração iônica de Si em SBF aumenta rapidamente em uma hora de abaixo de 0,03 (SBF antes da imersão) para aproximadamente 20mg/l e ao final do período de 24h essa concentração sobe para aproximadamente 60mg/l, tanto para as estruturas de diferentes composições químicas quanto para a estrutura 60S tratada em temperaturas diferentes. A quantificação da concentração de silício na solução SBF após 24h de imersão estática é um meio indireto de se determinar a solubilidade do vidro bioativo porque o SBF não contém esse elemento em sua composição inicial.

A concentração do íon P nas soluções cai consideravelmente nas amostras 50S e 60S 700°C, mas a concentração de P para a amostra 70S, por ter apresentado um desvio padrão muito elevado, não reflete a mesma tendência. Mesmo nas outras amostras esse valor é bem baixo com 24h de imersão. A explicação para essa rápida diminuição de P na solução é a precipitação da hidroxiapatita sobre a superfície da estrutura de onde o íon está sendo liberado. Taxas mais rápidas de liberação do fósforo podem diminuir o tempo de formação da camada de HCA. A área superficial pode ter um importante papel nesse processo. A taxa de dissolução muito elevada pode também estar relacionada ao fato de haver maior contato do material com a solução e maior número de sítios para a nucleação e precipitação da hidroxiapatita. Paralelamente a essas observações nota-se que a concentração do íon  $\text{Ca}^{2+}$  aumentou aproximadamente três vezes em relação ao valor inicial, exceto para as amostras 60S 800°C e 900°C e 70S.

Nessas temperaturas, como pode ser visto nos espectros de raios-X, já aparecem picos de fases cristalinas ricas em Ca e Si, o que poderia explicar uma menor taxa de dissolução de cálcio durante a primeira.

Tabela 5.6 - Concentrações de elementos em SBF após 1h e 24h de imersão, medidas por análise de emissão por plasma (ICP).

<b>Amostra</b>		<b>Ca (mg/l)</b>	<b>P (mg/l)</b>	<b>Si (mg/l)</b>
SBF	Média	88,80	30,20	<0,03
50S	1h	264,35±4,65	1,11±0,15	27,60±0,00
	24h	676,55±19,55	0,21±0,00	57,70±1,10
70S	1h	202,10±28,50	12,52±9,28	23,85±7,35
	24h	567,80±13,50	0,25±0,05	56,05±3,75
60S 700°C	1h	223,15±18,15	2,24±0,69	24,35±1,15
	24h	720,50±6,30	0,47±0,07	60,10±0,50
60S 800°C	1h	166,30±3,10	21,00±9,10	14,10±2,60
	24h	688,80±109,70	0,43±0,23	68,50±7,80
60S 900°C	1h	152,00±8,50	20,05±0,35	22,55±1,35
	24h	506,20±48,50	0,65±0,29	83,35±0,85

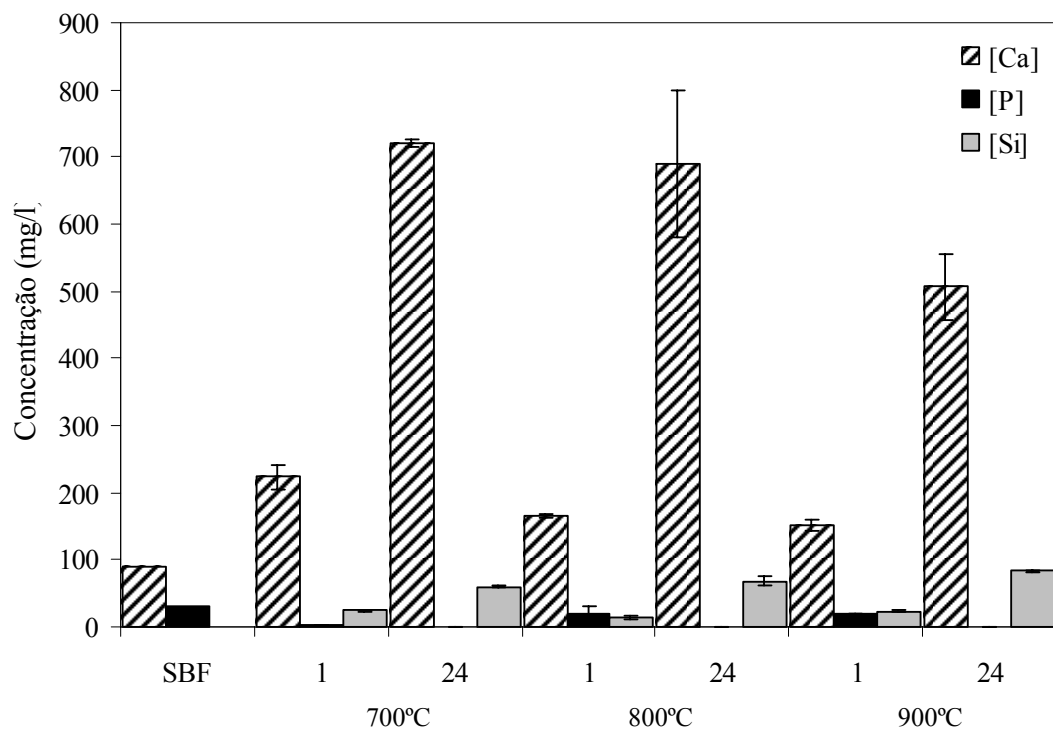


Figura 5.26 - Representação gráfica das concentrações de Ca, P e Si na solução SBF após imersão em tempos variáveis. Estruturas 60S tratadas em temperaturas diferentes.

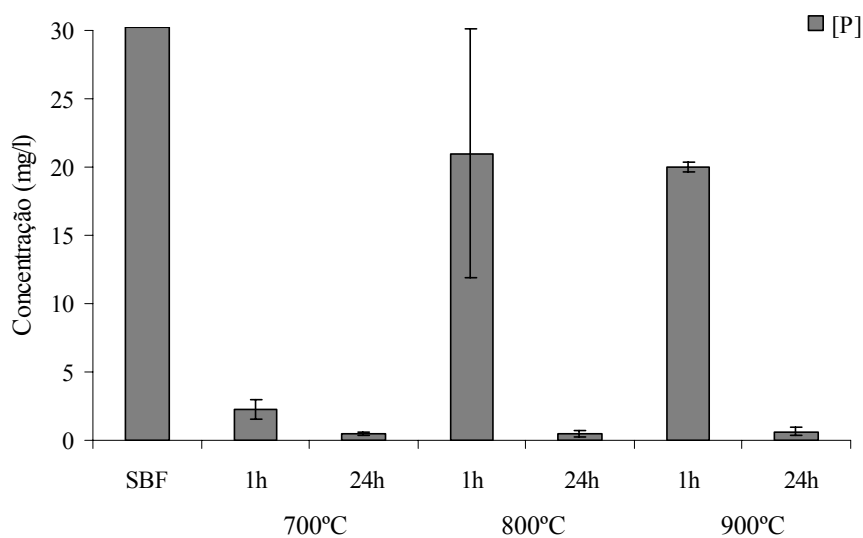


Figura 5.27 - Representação gráfica da concentração de P na solução SBF após imersão em tempos variáveis. Estruturas 60S tratadas em temperaturas diferentes.

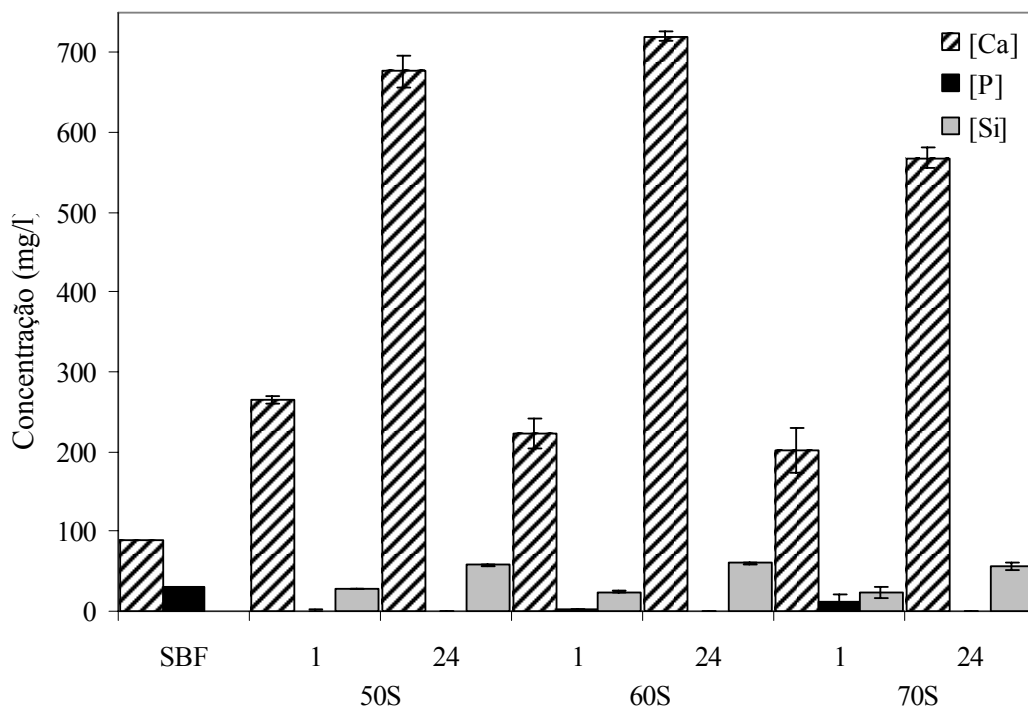


Figura 5.28 - Representação gráfica das concentrações de Ca, P e Si na solução SBF após imersão em tempos variáveis para as diferentes composições das estruturas de vidro bioativo.

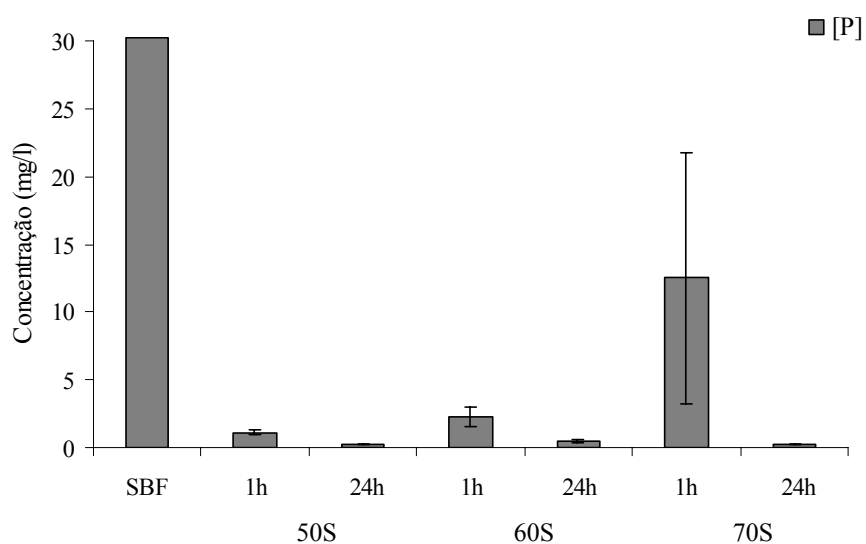


Figura 5.29 - Representação gráfica das concentração de P na solução SBF após imersão em tempos variáveis para as diferentes composições das estruturas de vidro bioativo.

### 5.2.9 *Cultura de células in vitro*

A adesão de células à superfície do biomaterial é um pré-requisito para a integração ao tecido. A formação de um novo tecido ósseo sobre a superfície do biomaterial depende da estrutura superficial que irá promover a proliferação celular e produção de matriz extracelular [WILKE, 1998]. Os modelos *in vitro* são, em geral, estáticos e não levam em consideração as dinâmicas do implante *in vivo*. Tais fatores como posição anatômica do material (por exemplo maxilar versus mandíbula ou tibia versus crânio), comprimento do dispositivo, carga (grandeza e direção), mudanças no material em resposta aos fluidos biológicos bem como mudanças no tecido adjacente e a idade do paciente são considerações importantes *in vivo*, as quais são também irrelevantes ou incontroláveis *in vitro*. Além disso, os modelos de cultura de células tendem a examinar a resposta de tipos simples de células, usualmente utilizando linhagens de células transformadas e portanto, deve ser interpretada com cuidado [BOYAN, 1996]. O sistema de cultura de células possui a grande vantagem de fornecer um método de exame rápido e de custo razoável para biomateriais. Paralelo a esta vantagem está a alta sensibilidade do método, o qual permite reconhecer materiais potencialmente citotóxicos e excluí-los em um estágio primário do procedimento de testes. Outra vantagem além destas é a avaliação de parâmetros que permitem múltiplas comparações entre vários biomateriais. E, a principal desvantagem do método *in vitro* é o problema fundamental de extrapolação para a situação *in vivo*. Portanto, o teste *in vitro* representa somente uma fase do estudo de biocompatibilidade e os biomateriais classificados como biocompatíveis no teste *in vitro* devem ser testados através de observação *in vivo* [KIRKPATRICK, 1990].

A seguir apresentam-se algumas figuras (Figura 5.30 a Figura 5.35) que ilustram a viabilidade das estruturas desenvolvidas nesse trabalho em relação à cultura de células *in vitro*. Nesse estudo foram utilizadas células de cultura primária de osteoblastos retirados da calota craniana de ratos da raça Wistar que foram colocadas em um meio de cultura (Dulbecco, pH=7) juntamente com a estrutura tridimensional. Após alguns dias de cultura a 37°C em atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub>, umidade relativa controlada e meio de cultura trocado a cada três dias, as células foram caracterizadas através de fosfatase

alcalina (ALP) e MTT. A adesão pôde ser observada em microscópio eletrônico de varredura (MEV). O crescimento das células e a atividade de fosfatase alcalina foram monitorados através de observação em microscópio ótico (Figura 5.30 e Figura 5.31). Células aderidas em poros no interior da estrutura podem ser vistas nas Figuras 5.35 a 5.37. A Figura 5.31 mostra que as células em cultura por um período de duas semanas com as estruturas 50S e 60S foram positivas para a atividade de fosfatase alcalina.

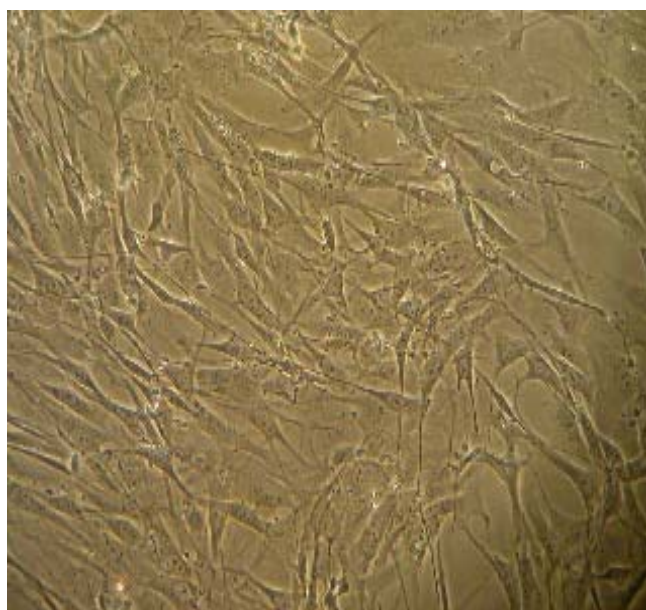


Figura 5.30 - Aspecto geral das células em cultura [HANNAS, 2003].

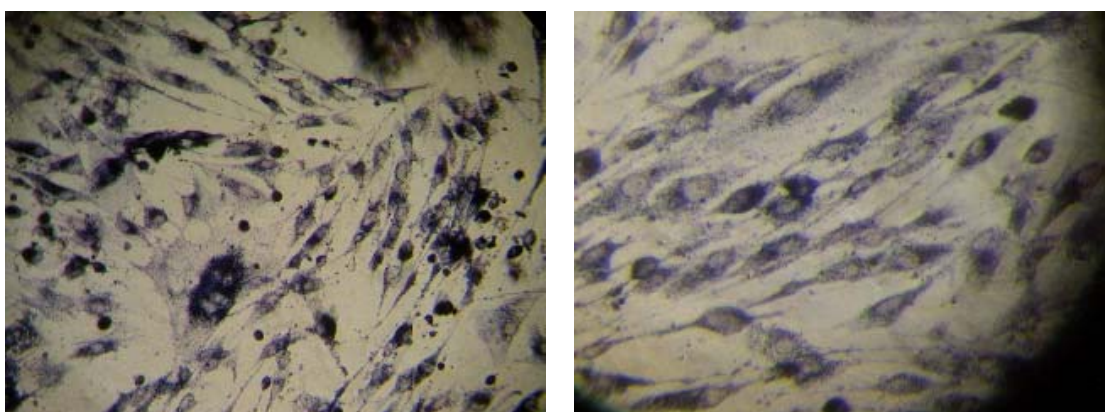


Figura 5.31 - Resultado do ensaio de fosfatase alcalina. Manchas que aparecem escuras nas fotos, denotam atividade celular. Duas semanas de cultura [HANNAS, 2003].



Figura 5.32 - Ensaio de MTT mostrando células em função e metabolizando, que pode ser visto pela presença de cristais de formazan [HANNAS, 2003].

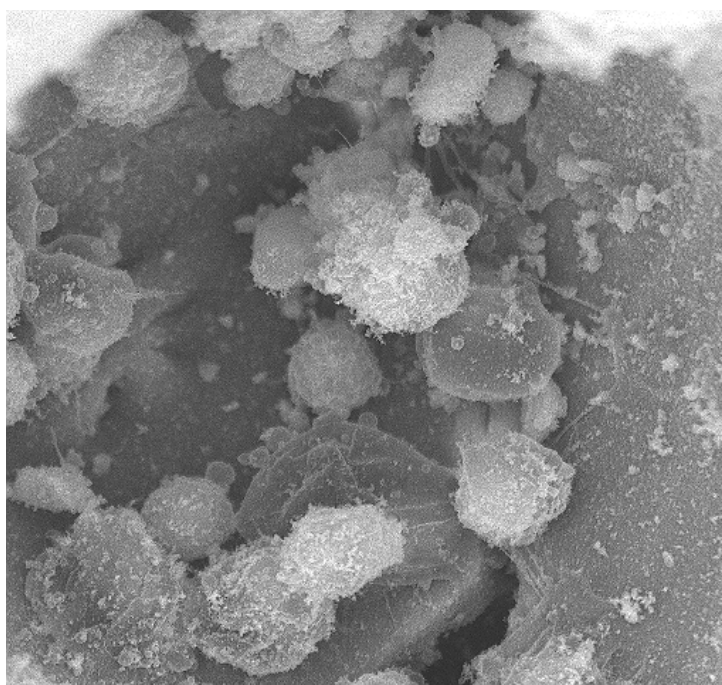


Figura 5.33 - Células osteoblastos dentro de um poro aderidas e secretando substâncias ainda não identificadas, 2000x [HANNAS, 2003].

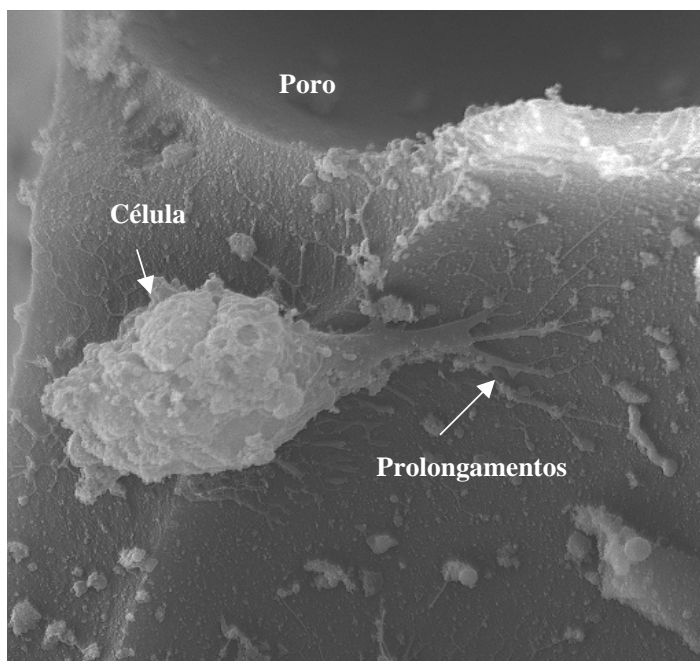


Figura 5.34 - Osteoblasto aderido a parede do vidro bioativo 60S, emitindo prolongamentos e acima vê-se um poro, 2000x [HANNAS, 2003].

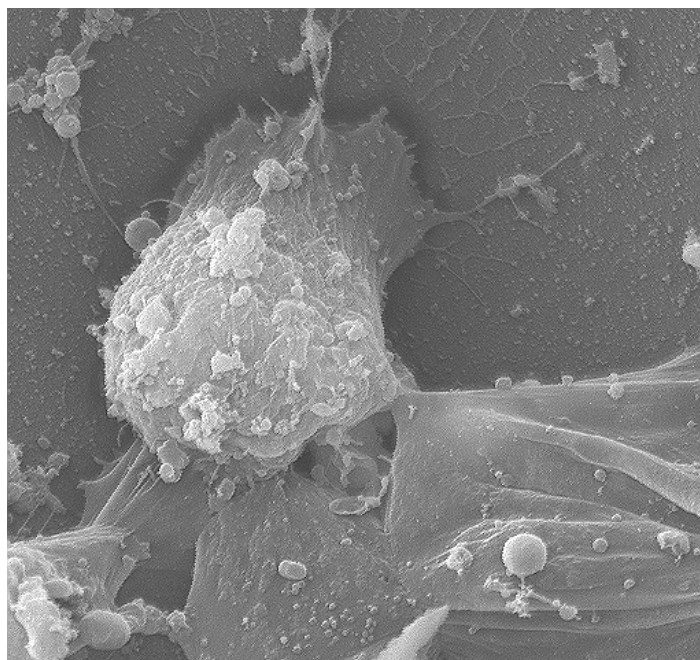


Figura 5.35 - Osteoblasto aderido a parede do vidro bioativo 60S. As vesículas acima do osteoblasto mostram que esta célula estava em atividade e os prolongamentos mostram a adesão ao material, 3000x [HANNAS, 2003].

## 6 CONCLUSÕES

Estruturas tridimensionais com diferentes níveis de distribuição de tamanho de poros foram desenvolvidas a partir da espumação de uma mistura sol-gel mais surfactante. O material-base das mesmas foi o vidro bioativo-sistema  $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ , com composição química variada. O surfactante foi utilizado com o objetivo de estabilizar a espuma formada por agitação até a etapa de gelação da solução sol-gel.

Dois tipos de surfactantes, não-iônico e aniônico, foram utilizados inicialmente na etapa de definição das concentrações de aditivos. Estudou-se o comportamento de espumas formadas e estabilizadas por tais surfactantes (polietileno glicol noniléter, não-iônico e lauril éter sulfato de sódio, LESS) em água deionizada e solução sol-gel. Verificou-se que ambos surfactantes foram eficientes em formar espuma em água, sendo que o LESS apresentou maior estabilidade. O comportamento do LESS em solução sol-gel foi semelhante, mas constatou-se que o surfactante não-iônico não forma espuma com essa solução. A hipótese discutida está relacionada à formação de uma mesofase híbrida entre a parte hidrofílica do polietileno glicol e oligômeros de sílica presentes no sol após hidrólise. O aprisionamento do surfactante dessa maneira impediria a adsorção desse aditivo na interface líquido-gás, necessária para a estabilidade do filme líquido entre bolhas introduzidas por agitação mecânica.

Outros aspectos como tempo de agitação, razão molar de água para hidrólise, e alcóxidos metálicos, maneira de se introduzir as bolhas na solução e recipiente para vazão da espuma foram definidos.

O gel macroporoso passou por etapas de secagem e tratamento térmico de estabilização onde a estrutura introduzida na espumação foi mantida e permaneceu íntegra ao final dessa etapa. As estruturas tridimensionais assim obtidas foram caracterizadas e os resultados, quando comparados com a literatura, mostraram que a distribuição de poros pode ser dividida em dois níveis: macroporos e mesoporos. O diâmetro médio dos macroporos esféricos variou na faixa de 50nm a 500 $\mu\text{m}$ , resultado obtido na análise de porosimetria de mercúrio, análise de imagem usando o *software* Quantikov e imagens

obtidas em MEV. Os mesoporos, cuja distribuição foi caracterizada por adsorção de nitrogênio, apresentaram distribuição de tamanho de poros em torno de 10-30nm, variando com a composição em mol do vidro bioativo. O valor de área superficial analisado foi de 60-170m<sup>2</sup>/g, sendo que as amostras tratadas à temperaturas acima de 700°C apresentaram uma diferença significativa de área superficial e volume de poros (Sp=3-7 m<sup>2</sup>/g e Vp=0,024-0,031cm<sup>3</sup>/g), indicando uma alta densificação da estrutura mesoporosa a partir dessa temperatura. Esse aspecto estrutural está de acordo com aquele definido até o presente para aplicação em engenharia de tecido ósseo.

Os espectros de FTIR das estruturas tratadas em diferentes temperaturas e de composição variada foram semelhantes àqueles apresentados na literatura para pó de vidro bioativo obtido por sol-gel. Foi observado também que, para temperaturas de tratamento acima de 700°C, alguns picos de fase cristalina puderam ser identificados na difração de raios-X. Tais fases, Wolastonita (CaO.SiO<sub>2</sub>), Bredigita ( $\alpha$ -Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>) e Nagelschmidtita (Ca<sub>7</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SiO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), presentes no material tratado a 800 e 900°C, influenciaram a taxa de dissolução do vidro bioativo, principalmente quanto à liberação de cálcio para a solução simulada de plasma humano (SBF). A bioatividade também pode ser influenciada pela presença de fases cristalinas.

A condição básica para que o material forme uma ligação com o tecido ósseo é a formação de uma camada de hidroxiapatita (HA) sobre sua superfície quando em contato com o plasma humano. A bioatividade do vidro pode ser definida como a capacidade deste material em formar uma camada de HA em contato com solução SBF. Bandas características de cristais de hidroxiapatita, detectadas após 24h de imersão, foram observadas quando utilizou-se como padronização da dissolução a área externa da estrutura/volume de solução igual a 0,1cm<sup>-1</sup>. Resultados da literatura mostram imersões padronizadas em pó de vidro bioativo, utilizando como padronização massa da estrutura/volume de solução igual a 0,01g/ml. Nesse trabalho, as estruturas porosas foram imersas em lugar do pó, porque dessa forma os resultados poderiam ser mais representativos da situação real. Considerando a padronização massa da estrutura/volume de solução igual a 0,01g/ml, após 24h de imersão em SBF, o sinal para detecção de presença de HA na análise de infra-vermelho foi baixo. A textura do

material juntamente com a composição química exerce um importante papel na formação da camada de HA. Amostras tratadas a 800°C ou 900°C apresentaram um sinal mais baixo de formação de HA em comparação ao que foi observado em amostras tratadas a 700°C.

Os resultados de dissolução das estruturas mostraram uma rápida diminuição de fósforo na solução sol-gel constatando a formação de uma camada de hidroxiapatita na superfície da estrutura. O aumento da concentração de silício na solução durante a imersão pode quantificar indiretamente a solubilidade do vidro bioativo porque o SBF não contém esse elemento na composição inicial.

Alguns resultados de cultura de células que já estão sendo realizados comprovaram até o presente momento que as estruturas tridimensionais obtidas através do método desenvolvido nesse trabalho são capazes de dar suporte a uma organização celular tridimensional, realçando a adesão e a proliferação celular.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilização de outros aditivos, inclusive outros surfactantes iônicos, na preparação das espumas analisando a influência dos mesmos na espumação e estabilidade das espumas.
- Síntese de outras composições de vidro bioativo como material base das estruturas, como por exemplo 100% em mol de SiO<sub>2</sub>. Ampliação da comparação das diferentes composições químicas em relação às características estruturais, bioatividade e dissolução.
- Ampliação do estudo da bioatividade para tempos diferentes de imersão, de alguns minutos até alguns dias. Verificação da influência da padronização da imersão nos resultados de bioatividade e dissolução. Estudo da bioatividade das estruturas porosas em condições dinâmicas. Ampliação do estudo da dissolução das estruturas em solução SBF e Tris e tempos variáveis de imersão, de alguns minutos até alguns dias.
- Incorporação de compostos químicos orgânicos ou inorgânicos - tais como fatores de crescimento, que induzem a diferenciação celular e o crescimento do tecido *in vitro*; proteínas morfogenéticas e/ou grupos químicos funcionais - na estrutura biodegradável que poderiam ser liberados de forma controlada durante a cultura de células acentuando eventos relacionados à adesão e proliferação celular.
- Determinação das propriedades mecânicas das estruturas tridimensionais porosas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÅGREN, 1998 ÅGREN, P., ROSENHOLM, J.B. Phase Behavior and Structural Changes in Tetraethylorthosilicate-Derived Gels in the Presence of Polyethylene Glycol, Studied by Rheological Techniques and Visual Observations. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.204, p45-52, 1998.
- ALARGOVA, 1998 ALARGOVA, R.G. *et al.* Growth of Rod-Like Micelles in Anionic Surfactant Solutions in the Presence of  $\text{Ca}^{2+}$  Counterions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.142, p201-218, 1998.
- ANDERSON, 1998 ANDERSON, S.I. *et al.* Evaluation of the Osteoblast Response to a Silica Gel *in vitro*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. v.9, p731-735, 1998.
- ANGARSKA, 1998 ANGARSKA, J.K. *et al.* Effects of Counterions and Co-ions on the Drainage and Stability of Liquid Films and Foams. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.200, p31-45, 1998.
- ARITA, 1995 ARITA, H.I., CASTAÑO, M.V. & WILKINSON, S.D. Synthesis and Processing of Hydroxyapatite Ceramic Tapes with Controlled Porosity. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.6, p.19-23, 1995.
- ARRIAGADA, 1999 ARRIAGADA, F.J., OSSEO-ASSARE, K. Synthesis of Nanosize Silica in a Nonionic Water-in-Oil Microemulsion: Effects of the Water/Surfactant Molar Ratio and Ammonia Concentration. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.211, p210-220, 1999.
- ASKVIK, 1999 ASKVIK, K.M., *et al.* Complexation Between Lignosulfonates and Cationic Surfactants and its Influence on Emulsion and Foam Stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.159, p89-101, 1999.
- ASNACIOS, 2000 ASNACIOS, A., KLITZING, R., LANGEVIN, D. Mixed Monolayers of Polyelectrolytes and Surfactants at the Air-

- Water Interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.167, p189-197, 2000.
- ATHANASIOU, 1998 ATHANASIOU, A.K. *et al* Orthopaedic Applications for PLA-PGA Biodegradable Polymers. *The Journal of Arthroscopy and Related Surgery*, v.14, n.7, p.726-737, 1998.
- AYRAL, 1995 AYRAL, A. *et al*. Sol-Gel Derived Silica Membranes With Tailored Microporous Structures. *Catalysis Today*. v.25, p219-224, 1995.
- BAKSH, 1998 BAKSH, D., DAVIES, E.J. & KIM, S. Three-Dimensional Matrices of Calcium Polyphosphates Support Bone Growth *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.9, p.743-748, 1998.
- BAKSH, 2000 BAKSH, D., DAVIES, J.E. Design Strategies for 3-Dimensional *In Vitro* Bone Growth in Tissue Engineering Scaffolds in *Bone Tissue Engineering* (ed J.E. Davies), 2000. Cap.45, p488-495.
- BAROUD, 1998 BAROUD, G., WILLMANN, G. & KREISSIG, R. The Effect of Hip Prostheses Coating on the Post-operative Biomechanical State of the Femur. In: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Symposium on Ceramics in Medicine, 11, 1998, New York. *Bioceramics*, USA (New York): World Scientific, 1998. p.611-615.
- BELL, 1997 BELL, E. Organotypic and Histiotypic Models. In: LANZA, P.R., LANGER, R., CHICK, L.W. *Principles of Tissue Engineering*. Texas: R.G. Landes and Academic Press, 1997. Cap.13, p.181-191.
- BENEVENTI, 2001 BENEVENTI, D., CARRE, B., GANDINI, A. Role of Surfactant Structure on Surface and Foaming Properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.189, p65-73, 2001.
- BEST, 1997 BEST, S. *et al* The Dependence of Osteoblastic Response on Variations in the Chemical Composition and Physical

- Properties of Hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.8, p.97-103, 1997.
- BINNER, 1996 BINNER, J.G.P., REICHERT, J. Processing of Hydroxyapatite Ceramic Foams. *Journal of Materials Science*. v.31, p5717-5723, 1996.
- BISPERINK, 1992 BISPERINK, C.G.J. *et al.* Bubble-Size Distributions in Foams. *Advances in Colloid and Interface Science*. v.38, p13-32, 1992.
- BITTMANN, 1996 BITTMANN, P. & MÜLLER, W. Tissue Engineering – Biological Joint Replacement. *Sulzer Technical Review*, v.1, p.25-27, 1996.
- BLACK, 1997 BLACK, J. Thinking Twice About Tissue Engineering. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, p.102-104, 1997.
- BLACHER, 2002 BLACHER, S. *et al.* Image Analysis Characterization of Highly Oriented Freeze-Drying Porous Materials. *Image Analysis Stereology*. v.21, p43-48, 2002.
- BODEN, 1999 BODEN, S.D. *Bioactive Factors for Bone Tissue Engineering*. Clinical Orthopaedics and Related Research. v.367S, 1999.
- BOISSIERE, 2001 BOISSIERE, C. *et al.* A Study of the assembly Mechanism of the Mesoporous MSU-X Silica Two-Step Synthesis. *Chemistry of Materials*. v.13, p3580-3586, 2001.
- BONFIELD, 1998 BONFIELD, W. Composite Biomaterials: Present and Future. In: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Symposium on Ceramics in Medicine, 11, 1998, New York. *Bioceramics*, USA (New York): World Scientific, 1998. p.37-40.
- BOYAN, 1996 BOYAN, B.D. *et al.* Role of Material Surfaces in Regulating Bone and Cartilage Cell Response. *Biomaterials*. v.17, p137-146, 1996.
- BREKKE, 1998a BREKKE, H.J. *et al* Principles of Tissue Engineering Governing Osteogenic Devices. In: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Symposium on Ceramics in Medicine, 11, 1998, New York. *Bioceramics*, USA (New York): World Scientific, 1998. p.57-62.

- BREKKE, 1998b BREKKE, H.J. & TOTH, M.J. Principles of Tissue Engineering Applied to Programmable Osteogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.43, p.380-398, 1998.
- BRINKER, 1990 BRINKER, C.J., SCHERER, G.W. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. San Diego: Academic Press, 1990, 908p.
- BRINKER, 1994 BRINKER, C.J. *et al.* Sol-Gel Strategies for Controlled Porosity Inorganic Materials. *Journal of Membrane Science*. v.94, p85-102, 1994.
- BURG, 2000 BURG, K.J.L., PORTER, S. & KELLAM, J.F. Biomaterial Developments for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials*, v. 21, p.2347-2359, 2000.
- CAPLAN, 1997 CAPLAN, A.I. & BRUDER, S.P. Cell and Molecular Engineering of Bone Regeneration. In: LANZA, P.R., LANGER, R., CHICK, L.W. *Principles of Tissue Engineering*. Texas: R.G. Landes and Academic Press, 1997. Cap.37, p.603-618.
- CATAURO, 1997 CATAURO, M. *et al* Low Temperature Synthesis, Structure and Bioactivity of 2CaO-3SiO<sub>2</sub> Glass. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v.10, p.231-237, 1997.
- CHEN, 1998 CHEN, X. *et al* Investigation on Phase Separation, Nucleation and Crystallization in Bioactive Glass-Ceramics Containing Fluorophlogopite and Fluorapatite. *Ceramics International*, v.24, p.401-410, 1998.
- CHEN, 2001 CHEN, G., USHIDA, T., TATEISHI, T. Development of Biodegradable Porous Scaffolds for Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering C*. v.17, p63-69, 2001.
- CHOW, 1998 CHOW, C.L. Calcium Phosphate Cements: Chemistry and Applications. In: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Symposium on Ceramics in Medicine, 11, 1998, New York. *Bioceramics*, USA (New York): World Scientific, 1998. p.45-49.

- ÇOLAK, 2000 ÇOLAK, A. Density and Strength Characteristics of Foamed Gypsum. *Cement & Concrete Composites*. v.22, p193-200, 2000.
- COLLINSON, 1999 COLLINSON, M.M., Sol-Gel Strategies for the Preparation of Selective Materials for Chemical Analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. v.29, n.4, p289-311, 1999.
- CRANE, 1995 CRANE, G.M., ISHAUG, S.L. & MIKOS, A.G. Bone Tissue Engineering. *Nature Medicine*, v.1, n.12, p.1322-1324, 1995.
- DABROWSKI, 2001 DABROWSKI, A. Adsorption – From Theory to Practice. *Advances in Colloid and Interface Science*. v.93, p135-224, 2001.
- DANUMAH, 2000 DANUMAH, C. *et al.* Siliceous Mesoporous Molecular Sieves Derived from Crown Ether Surfactants. *Microporous and Mesoporous Materials*. v.37, p21-32, 2000.
- DAVTIAN, 2000 DAVTIAN, A. *et al.* Estimating Number Density  $N_V$ -A Comparison of an Improved Saltykov Estimator and the Disector Method. *Image Analysis Stereology*. v.19, p209-214, 2000.
- DE AZA, 2003 DE AZA, P.N. *et al.* Mechanism of Bone-Like Formation on a Bioactive Implant *In Vivo*. *Biomaterials*. v.24, p1437-1445, 2003.
- DE GROOT, 1997 DE GROOT, H.J., KUIJPER, W.H. & PENNING, J.A. A Novel Method for Fabrication of Biodegradable Scaffolds with High Compression Moduli. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.8, p.707-712, 1997.
- DE GROOT, 1998 DE GROOT, K. Calcium Phosphate Coatings: Alternatives to Plasma Spray. In: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Symposium on Ceramics in Medicine, 11, 1998, New York. *Bioceramics*, USA (New York): World Scientific, 1998. p.41-43.
- DEE, 1996 DEE, C.K. & BIZIOS, R. Mini-Review: Proactive Biomaterials and Bone Tissue Engineering. *Biotechnology and*

- Bioengineering*, v.50, p.438-442, 1996.
- DEKKER, 1998 DEKKER, J.R. *et al* Bone Tissue Engineering on Calcium Phosphate-Coated Titanium Plates Utilizing Cultured Rat Bone Marrow Cells: A Preliminary Study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.9, p.859-863, 1998.
- DI SILVIO, 1998 DI SILVIO, L., DALBY, M. & BONFIELD, W. *In vitro* Response of Osteoblasts to Hydroxyapatite-Reinforced Polyethylene Composites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.9, p.845-848, 1998.
- DJUVE, 2001 DJUVE, J., PUGH, R.J., SJOBLUM, J. Foaming and Dynamic Surface Tension of Aqueous Polymer/Surfactants Solutions 1: Ethyl(hydroxiethyl) Cellulose and Sodium Dodecyl Sulphate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.186, p189-202, 2001.
- DOMB, 1996 DOMB, J.A., MANOR, N. & ELMALAK, O. Biodegradable Bone Cement Compositions Based on Acrylate and Epoxide Terminated PolyPropylene Fumarate Oligomers and Calcium Salt Compositions. *Biomaterials*, v.17, p.411-417, 1996.
- DU, 1999 DU, C., *et al*. Three-Dimensional Nano-Hap/Collagen Matrix Loading With Osteogenic Cells in Organ Culture. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.44, p407-415, 1999.
- ENGIN, 1999 ENGIN, N.O., TAS, A.C. Manufacture of Macroporous Calcium Hydroxyapatite Bioceramics. *Journal of the European Ceramic Society*. v.19, p2569-2572, 1999.
- ENGLAND, 1991 ENGLAND, B.M. Scanning Electron Microscopy. *The Mineralogical Record*. v.22, p123-132, 1991.
- ERIKSSON, 1994 ERIKSSON, S.A. *et al* Distribution of Cells in Soft Tissue and Fluid Space Around Hollow and Solid Implants in the Rat. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.5, p.269-278, 1994.
- FABBRI, 1995 FABBRI, M., CELOTTI, C.G. & RAVAGLIOLI, A. Hydroxyapatite-Based Porous Aggregates: Physico-Chemical

- Nature, Structure, Texture and Architecture. *Biomaterials*, v.16, p.225-228, 1995.
- FREYMAN, 2001 FREYMAN, T.M., *et al.* Cellular Materials as Porous Scaffolds for Tissue Engineering. *Progress in Materials Science*. v.46, p273-282, 2001.
- FRIEDMAN, 1998 FRIEDMAN, D.C. *et al.* BoneSource™ Hydroxyapatite Cement: A Novel Biomaterial for Craniofacial Skeletal Tissue Engineering and Reconstruction. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.43, p.428-432, 1998.
- FUJIBAYASHI, 2003 FUJIBAYASHI, S. *et al.* A Comparative Study Between *In Vivo* Bone Ingrowth and *In Vitro* Apatite Formation on Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub> Glasses. *Biomaterials*. v.24, p1349-1356, 2003
- FURUSAWA, 1998 FURUSAWA, T. *et al.* Investigation of Early Bone Formation Using Resorbable Bioactive Glass in the Rat Mandible. *International Journal of Oral Maxillofac Implants*. v.13, n.5, p672-676, 1998.
- GALARNEAU, 1998 GALARNEAU, A. *et al.* Kinetics of Formation of Micelle-Templated Silica Mesophases Monitored by Electron Paramagnetic Resonance. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.201, p105-117, 1998.
- GALLARDO, 2002 GALLARDO, J. *et al.* Structure of Inorganic and Hybrid SiO<sub>2</sub> Sol-Gel Coatings Studied by Variable Incidence Infrared Spectroscopy. *Journal of Non-Crystalline Solids*. v.298, p219-225, 2002.
- GALLARDO, 2002 GALLARDO, J., GALLIANO, P.G., LÓPEZ, J.M.P. Preparation and *in vitro* Evaluation of Porous Silica Gels. *Biomaterials*. v.23, p4277-4284, 2002.
- GANDOLFO, 1997 GANDOLFO, F.G., ROSANO, H.L. Interbubble Gas Diffusion and the Stability of Foams. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.194, p31-36, 1997.
- GARCÍA, 1998 GARCÍA, J.A., DUCHEYNE, P., BOETTIGER, D. Effect of Surface Reaction Stage on Fibronectin-Mediated Adhesion of

- Osteoblast-Like Cells to Bioactive Glass. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.40, p.48-56, 1998.
- GARDELLA, 1996 GARDELLA, A.J. & DE GATICA, L.H.N. The Determination of Structure and Reactivity at the Surfaces of Materials used in Biology: Needs and Requirements for Electron and Ion Spectroscopy for Surface Analysis. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, v.81, p.227-236, 1996.
- GÖLTNER, 2001 GÖLTNER, C. *et al.* On the Microporous Nature of Mesoporous Molecular Sieves. *Chemistry of Materials*. v.13, p1617-1624, 2001.
- GÖLTNER, 2002 GÖLTNER-SPICKERMANN, C. Non-Ionic Templating of Silica: Formation Mechanism and Structure. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. v.7, p-173-178, 2002.
- GRACIAA, 2000 GRACIAA, A. *et al.*  $\zeta$  Potential at an Air-Water Surface Related to the Critical Micelle Concentration of Aqueous Mixed Surfactant Systems. *Ind. Eng. Chem. Res.* v.39, p2677-2681, 2000.
- GRANDE, 1997 GRANDE, A.D. *et al* Evaluation of Matrix Scaffolds for Tissue Engineering of Articular Cartilage Grafts. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.34, p.211-220, 1997.
- GREENSPAN, 1998 GREENSPAN, D.C., ZHONG, J.P., WHELLER, D.L. Bioactivity and Biodegradability: Melt Vs. Sol-Gel Derived Bioglass<sup>®</sup> *in vitro* and *in vivo*. In: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Symposium on Ceramics in Medicine, 11, 1998, New York. *Bioceramics*, USA (New York): World Scientific, 1998. p.345-348.
- GUERRINI, 1999 GUERRINI, M.M., LOCHHEAD, R.Y., DALY, W.H. Interactions of Aminoalkylcarbamoyl Cellulose Derivatives and Sodium Dodecyl Sulfate. 2. Foam Stabilization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.147, p67-78, 1999.
- HADDOW, 1996 HADDOW, D.B. *et al.* Synthetic Implant Surfaces: 1.The

- Formation and Characterization of Sol-Gel Titania Films. *Biomaterials*. v.17, p501-507, 1996.
- HADDOW, 1999 HADDOW, B.D. *et al* Compositional and Structural Control in Bone Regenerative Coatings. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.10, p.219-222, 1999.
- HALLAB, 2001 HALLAB, N.J. *et al*. Evaluation of Metallic and Polymeric Biomaterial Surface Energy and Surface Roughness Characteristics for Directed Cell Adhesion. *Tissue Engineering*. v.7, n.1, p55-71, 2001.
- HAN, 1996 HAN, K.D. & HUBBELL, A.J. Lactide-Based PolyEthilene Glycol Polymer Networks for Scaffolds in Tissue Engineering. *Macromolecules*, v.29, p.5233-5235, 1996.
- HANNAS, 2003 Dissertação de Mestrado – UFMG/2003.
- HEALY, 1996 HEALY, K.E. *et al*. Kinetics of Bone Cell Organization and Mineralization on Materials With Patterned Surface Chemistry. *Biomaterials*. v.17, n.2, p195-208, 1996.
- HEATH, 1996 HEATH, A.C., MAGARI, R.S. Mini-Review: Mechanical Factors Affecting Cartilage Regeneration *in vitro*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.50, p.430-437, 1996.
- HÉDREUL, 2001 HÉDREUL, C., FRENS, G. Foam Stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.186, p73-82, 2001.
- HEIDARAN, 2000 HEIDARAN, M.A. Tissue Engineering: A Biological Solution for Tissue Damage, Loss or End Stage Organ Failure. *Iran. Biomed*. v.4, p1-5, 2000.
- HENCH, 1971 HENCH, L.L. *et al*. Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.2, n.1, p117-141, 1971.
- HENCH, 1980 HENCH, L.L. Biomaterials. *Science*, v.208, p.826-831, 1980.
- HENCH, 1989 HENCH, L.L. Bioceramics and the Origin of Life. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.23, p.685-703, 1989.
- HENCH, 1993 HENCH, L.L., WILSON, J. *An Introduction to Bioceramics*.

- New Jersey: World Scientific Publishing, 1993. 386p. Advanced Series in Ceramics, vol.1.
- HENCH, 1998a HENCH, L.L., WILSON, J. Bioactive Glasses: Present and Future. In: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Symposium on Ceramics in Medicine, 11, 1998, New York. *Bioceramics*, USA (New York): World Scientific, 1998. p.31-36.
- HENCH, 1998b HENCH, L.L. Bioceramics. *Journal of American Ceramic Society*, v.81, n.7, p.1705-1728, 1998.
- HENCH, 2000 HENCH, L.L. (II) The Challenge of Orthopaedic Materials. *Current Orthopaedics*. v.14, p7-15, 2000.
- HOLY, 2000a HOLY, C.E. *et al.* Engineering Three-Dimensional Bone Tissue *in vitro* Using Biodegradable Scaffolds: Investigating Initial Cell-Seeding Density and Culture Period. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.51, p376-382, 2000.
- HOLY, 2000b HOLY, C.E. *et al.* *In Vivo* Models for Bone Tissue-Engineering Constructs in *Bone Tissue Engineering* (ed J.E. Davies), 2000. Cap.46, p496-504.
- HU, 1992 HU, L. *et al.* Effects of Solvent on Properties of Sol-Gel-Derived TiO<sub>2</sub> Coating Films. *Thin Solid Films*. v.219, p18-23, 1992.
- IGLESIAS, 1995 IGLESIAS, E. *et al.* A New Method to Estimate the Stability of Short-Life Foams. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.98, p167-174, 1995.
- ILER, 1981 ILER, R.K. Silanol Groups on Silica Gel. *Journal of Chromatography*. v.209, p341-342, 1981.
- INNOCENTINI, 1998 INNOCENTINI, D.M.M. *et al* Permeability and Structure of Cellular Ceramics: A Comparison Between Two Preparation Techniques. *Journal of American Ceramic Society*, v.81, n.12, p.3349-3352, 1998.
- IZQUIERDO-BARBA, 2000 IZQUIERDO-BARBA, I., SALINAS, A.J. & VALLET-REGÍ, M. Effect of the Continuous Solution Exchange on the *In Vivo* Reactivity of a CaO-SiO<sub>2</sub> sol-gel glasses. *Journal of*

- Biomedical Materials Research*, v.51, p191-199, 2000.
- JALLOT, 2001 JALLOT, E. *et al.* Dissolution Kinetics, Selective Leaching, and Interfacial Reactions of a Bioglass<sup>®</sup> Coating Enriched in Alumina. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.233, p83-90, 2001.
- JANCAR, 1994 JANCAR, J. *et al* Measurement of the Elastic Modulus of Fibre-Reinforced Composites Used as Orthodontic Wires. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.5, p.214-218, 1994.
- JOANNY, 1989 JOANNY, J.F. The Sol-Gel Transition. *Physica B*. v.156 & 157, p381-385, 1989.
- JOHANSSON, 2000 JOHANSSON, B., PUGH, R.J., ALEXANDROVA, L. Flotation De-Inking Studies Using Model Hydrophobic Particles and Non-Ionic Dispersants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.170, p217-229, 2000.
- JOHANSSON, 2001 JOHANSSON, I., SVENSSON, M. Surfactants Based on Fatty and Other Natural Hydrophobes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. v.6, p178-188, 2001.
- JONES, 2003 JONES, J.R. & HENCH, L.L. Effect of Porosity on the Mechanical Properties of Bioactive Foam Scaffolds. *Key Engineering Materials*. v.240-242, p209-212, 2003.
- JUNQUEIRA, 1973 JUNQUEIRA, C.L. & CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: JUNQUEIRA, C.L. & CARNEIRO. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A., 1973. Cap.8, p.132-155.
- JUUTILAINEN, 1998 JUUTILAINEN, T. Summary of Doctoral Thesis – Absorbable Self-Reinforced Poly-L-Lactide Wires, Screws and Rods in the Fixation of Fractures and Arthrooses and Mini Tacks in the Fixation of Ligament Ruptures. *Annales Chirurgiae et Gynaecologiae*, v.87, p.240-241, 1998.
- KARAKASHEV, 2001 KARAKASHEV, S.I., MANEV, E.D. Frothing Behavior of Nonionic Surfactant Solutions in the Presence of Organic and

- Inorganic Electrolytes. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.235, p194-196, 2001.
- KAUFMANN, 2000 KAUFMANN, E.A.B.E., DUCHEYNE, P., SHAPIRO, I.M. Effect of Varying Physical Properties of Porous, Surface Modified Bioactive Glass 45S5 on Osteoblast Proliferation and Maturation. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.52, p783-796, 2000.
- KAWACHI, 2000 KAWACHI, E.Y. *et al.* Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. *Química Nova*. v.23, n.4, p518-522, 2000.
- KHAIROUN, 1999 KHAIROUN, I. *et al* Incorporation of a Controlled-Release Glass into a Calcium Phosphate Cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.10, p.215-218, 1999.
- KINGERY, 1976 KINGERY, W.D., BOWEN, H.K. & UHLMANN, D.R. *Introduction to Ceramics*. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1976. 1034p.
- KIRKPATRICK, 1990 KIRKPATRICK, C.J., MITTERMAYER, C. Theoretical and Practical Aspects of Testing Potential Biomaterials *in vitro*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. v.1, p9-13, 1990
- KLEIN, 1994 KLEIN, C. *et al.* Osseous Substance Formation Induced in Porous Calcium Phosphate Ceramics in Soft Tissues. *Biomaterials*. v.15, n.1, p31-34, 1994.
- KOKUBO, 1990 KOKUBO *et al.* Solutions Able to Reproduce *in Vivo* Surface-Structure Changes in Bioactive Glasses-Ceramics A-W. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.24, p721-734, 1990.
- KOKUBO, 1998 KOKUBO, T. Biomimetics Applied to Bioceramics. In: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Symposium on Ceramics in Medicine, 11, 1998, New York. *Bioceramics*, USA (New York): World Scientific, 1998. p.51-56.
- KOKUBO, 2000 KOKUBO, T. *et al.* What Kinds of Materials Exhibit Bone-Bonding in *Bone Tissue Engineering* (ed J.E. Davies), 2000.

- Cap.16, p190-194.
- KOLTALO, 2001 PORTET-KOLTALO, F., DESBEÈNE, P.L., TREINER, C. Self-Desorption of Mixtures of Anionic and Nonionic Surfactants from a Silica/Water Interface. *Langmuir*. v.17, p3858-3862, 2001.
- KUIJER, 1998 KUIJER, R. *et al* The Polymer Polyactive™ as a Bone-Filling Substance: a Experimental Study in Rabbits. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.9, p.449-455, 1998.
- KUNG, 1996 KUNG, H.H., KO, E.I. Preparation of Oxide Catalysts and Catalyst Supports – A Review of Recent Advances. *The Chemical Engineering Journal*. v.64, p203-214, 1996.
- LACZKA, 1997 LACZKA, M., CHOLEWA, K., LACZKA-OSYCZKA, A. Gel-Derived Powders of CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> System as a Starting Material to Production of Bioactive Ceramics. *Journal of Alloys and Compounds*, v.248, p.42-51, 1997.
- LAHEJA, 1998 LAHEJA, A.P. *et al*. Experimental Observations on Drainage of Foams Generated Using Micellar Solutions of Anionic, Cationic and Nonionic Surfactantes. *Langmuir*. v.14, p560-564, 1998.
- LAI, 1998 LAI, W., DUCHEYENE, P. & GARINO, J. Removal Pathway of Silicon Released from Bioactive Glass Granules *in vivo*. *Bioceramics*, v.11, p.383-386, 1998.
- LAI, 2002 LAI, W., GARINO, J., DUCHEYNE, P. Silicon Excretion from Bioactive Glass Implanted in Rabbit Bone. *Biomaterials*. v.23, p213-217, 2002.
- LANGER, 1997 LANGER, R. Tissue Engineering: A New Field and Its Challenges. *Pharmaceutical Research*, v.14, n.7, p.840-841, 1997.
- LANGER, 1999 LANGER, R. Tissue Engineering. *Molecular Therapy*. v.1, n.1, p12-15, 2000
- LANGEVIN, 1999 LANGEVIN, D. Liquid Films, Foams and Emulsions. *Journal*

- Chem. Phys.* v.96, p968-974, 1999.
- LANGEVIN, 2000      LANGEVIN, D. Influence of Interfacial Rheology on Foam and Emulsion Properties. *Advances in Colloid and Interface Science.* v.88, p209-222, 2000.
- LANGEVIN, 2001      LANGEVIN, D. Polyelectrolyte and Surfactant Mixed Solutions. Behavior at Surfaces and in Thin Films. *Advances in Colloid and Interface Science.* v.89-90, p467-484, 2001.
- LANZA, 1997      LANZA, P.R., LANGER, R. & CHICK, L.W. *Principles of Tissue Engineering.* Texas: R.G. Landes and Academic Press, 1997. 810p.
- LEÓN, 1998      LEÓN, C.A.L. New Perspectives in Mercury Porosimetry. *Advances in Colloid and Interface Science.* v.76-77, p341-372, 1998.
- LEONELLI, 2003      LEONELLI, C. *et al.* Synthesis and Characterization of Cerium-Doped Glasses and *In Vitro* Evaluation of Bioactivity. *Journal of Non-Crystalline Solids.* v.316, p198-216, 2003.
- LI, 1994      LI, P. *et al* The Role of Hydrated Silica, Titania and Alumina in Inducing Apatite on Implants. *Journal of Biomedical Materials Research,* v.28, p.7-15, 1994.
- LI, 1991a      LI, R. *Sol-Gel Processing of Bioactive Glass Powders.* Florida: University of Florida, 1991. (Thesis, Degree of Doctor of Philosophy, Department of Materials Science and Engineering).
- LI, 1991b      LI, R., CLARK, A.E. & HENCH, L.L. An Investigation of Bioactive Glass Powders by Sol-Gel Processing. *Journal of Applied Biomaterials.* v.2, p231-239, 1991.
- LI, 2003      LI, S.H. *et al.* Accurate Geometric Characterization of Macroporous Scaffold of Tissue Engineering. *Key Engineering Materials.* v.240-242, p541-546, 2003.
- LICÍNIO, 1999      LICÍNIO, P., FIGUEIREDO, J.M.A. Structures of Foams Produced by Agitation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* v.149, p19-22, 1999.

- LIN, 1994 LIN, C., LIU, L.M. & JU, P.C. Structure and Properties of Hydroxyapatite-Bioactive Glass Composites Plasma Sprayed Ti6Al4V. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.5, p.279-283, 1994.
- LIU, 1996a LIU, D. Fabrication and Characterization of Porous Hydroxyapatite Granules. *Biomaterials*, v.17, p.1955-1957, 1996.
- LIU, 1996b LIU, D. Control of Pore Geometry on Influencing the Mechanical Property of Porous Hydroxyapatite Bioceramic. *Journal of Materials Science Letters*, v.15, p.419-421, 1996.
- LIU, 1997a LIU, D. Fabrication of Hydroxyapatite Ceramic with Controlled Porosity. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.8, p.227-232, 1997.
- LIU, 1997b LIU, D. Influence of Porosity and Pore Size on the Compressive Strength of Porous Hydroxyapatite Ceramic. *Ceramics International*, v.23, p.135-139, 1997.
- LO, 1996 LO, H. *et al* PolyL-Lactic Acid Foams with Cell Seeding and Controlled-Release Capacity. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.30, p.475-484, 1996.
- LU, 1999 LU, X.J. *et al* Role of Interconnections in Porous Bioceramics on Bone Recolonization *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.10, p.111-120, 1999.
- LU, 2000 LU, H.H. *et al*. Temporal Zeta Potential Variations of 45S5 Bioactive Glass Immersed in a Electrolyte Solution. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.51, p80-87, 2000.
- LUKLINSKA, 1997 LUKLINSKA, B.Z. & BONFIELD, W. Morphology and Ultrastructure of the Interface Between Hydroxyapatite-Polyhydroxybutyrate Composite Implant and Bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.8, p.379-383, 1997.
- MA, 2001 MA, P.X., CHOI, J.W. Biodegradable Polymer Scaffolds With

- Well-Defined Interconnected Spherical Pore Network. *Tissue Engineering*. v.7, n.1, p23-33, 2001.
- MADIHALLY, 1999 MADIHALLY, S.V., MATTHEW, H.W.T. Porous Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering. *Biomaterials*. v.20, p1133-1142, 1999.
- MAGRABI, 1999 MAGRABI, S.A., *et al.* Bubble Size Distribution and Coarsening of Aqueous Foams. *Chemical Engineering Science*. v.54, p4007-4022, 1999.
- MALEKZADEH, 1998 MALEKZADEH, R. *et al* Isolation of Human Osteoblast-Like Cells and *in vitro* Amplification for Tissue Engineering. *Journal of Periodontology*, v.69, p.1256-1262, 1998.
- MALYSA, 1992 MALYSA, K. Wet Foams: Formation, Properties and Mechanism of Stability. *Advances in Colloid and Interface Science*. v.40, p37-83, 1992.
- MANN, 1997 MANN, S. *et al.* Sol-Gel Synthesis of Organized Matter. *Chem. Mater*. v.9, p2300-2310, 1997.
- MANSUR, 2000 MANSUR, H.S. *et al.* Sol-Gel Silica Based Networks with Controlled Chemical Properties. *Journal of Non-Crystalline Solids*. v.273, p109-115, 2000.
- MARK, 1994 MARK, E.J. & CALVERT, D.P. Biomimetic, Hybrid and *in situ* Composites. *Materials Science and Engineering*, v.C1, p.159-173, 1994.
- MENDES, 1998 MENDES, C.S. *et al* *In vivo* Bone Formation by Human Bone Marrow Cells: Effect of Osteogenic Culture Supplements and Cell Densities. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.9, p.855-858, 1998.
- MILLER, 1995 MILLER, M.J. *et al.* Aging of Foamed Gel Used for Subsurface Permeability Reduction. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.175, p88-96, 1995.
- MORGAN, 1997 MORGAN, E.F. *et al.* Mechanical Properties of Carbonated Apatite Bone Mineral Substitute: Strength, Fracture and Fatigue Behaviour. *Journal of Materials Science: Materials in*

- Medicine*. v.8, p559-570, 1997.
- MUELLER, 2000 MUELLER, S.M., GLOWACKI, J. Construction and Regulation of 3-Dimensional Bone Tissue *In Vitro* in *Bone Tissue Engineering* (ed J.E. Davies), 2000. Cap.44, p473-487.
- NAGARAJAN, 2002 NAGARAJAN, R. Molecular Packing Parameter and Surfactant Self-Assembly: The Neglected Role of the Surfactant Tail. *Langmuir*. v.18, p31-38, 2002.
- NAIRE, 2001 NAIRE, S., BRAUN, R.J. & SNOW, S.A. An Insoluble Surfactant Model for a Vertical Draining Free Film with Variable Surface Viscosity. American Institute of Physics. p2492-2502, 2001.
- NEIMARK, 1998 NEIMARK, A.V. Proceedings of the Second International TRI/Princeton Workshop "Characterization of Porous Materials: from Angstroms to Milimeters". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.187-188, p1-2, 2001.
- NEO, 1993 NEO, M. *et al.* Apatite Formation on Three Kinds of Bioactive Material at an Early Stage *in vivo*: A Comparative Study by Transmission Electron Microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.27, p.999-1006, 1993.
- NETZ, 2001 NETZ, D.J.A. *et al.* Potential Use of Gelcasting Hydroxyapatite Porous Ceramic as an Implantable Drug Delivery System. *International Journal of Pharmaceutics*. v.213, p117-125, 2001.
- NIEDHART, 2001 NIEDHART, C. *et al.* *In Vivo* Testing of a New *In Situ* Setting  $\beta$ -tricalcium Phosphate Cement for Osseous Reconstruction. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.55, p530-537, 2001.
- NIERTRASZ, 1998 NIERTRASZ, V.A., FRENS, G. Marginal Regeneration in Thin Vertical Liquid Films. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.207, p209=217, 1998.
- NIERTRASZ, 1999 NIERTRASZ, V.A., FRENS, G. Marginal Regeneration and

- the Marangoni Effect. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.215, p28-35, 1999.
- NINHAM, 1997 NINHAM, B.W. *et al.* Hydrophobicity, Specific Ion Adsorption and Reactivity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.123-124, p7-12, 1997.
- O'KELLY, 1996 O'KELLY, K. *et al.* A Quantitative Technique for Comparing Synthetic Porous Hydroxyapatite Structures and Cancellous Bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.7, p.207-213, 1996.
- OHGUSHI, 1993 OHGUSHI, H. *et al.* Osteogenic Differentiation of Marrow Stromal Stem Cells in Porous Hydroxyapatite Ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.27, p.1401-1407, 1993.
- OHGUSHI, 1994 OHGUSHI, H. *et al.* Tissue Compatibility of Biomaterials: Assessment of Bioactivity Concerning the Osteogenic Response to the Materials. *Materials Science and Engineering*, p.139-142, 1994.
- OKA, 1997 OKA, H. *et al.* Effect of Foaming Power and Foam Stability on Continuous Concentration With Foam Counter-Current Chromatography. *Journal of Chromatography A*. v.791, p53-63, 1997.
- OMATETE, 1991 OMATETE, O.O., JANNEY, M.A. & STREHLOW, R.A. Gelcasting—A New Ceramic Forming Process. *Ceramic Bulletin*, v.70, n.10, p.1641-1649, 1991.
- ORTEGA, 2001 ORTEGA, F.S. *et al.* Surfactants: A necessity for Producing Porous Ceramics. *American Ceramic Society Bulletin*. v.80, n.4, p37-42, 2001.
- ORTONA, 2002 ORTONA, O. *et al.* Mixed Micellar Aggregates of Nonionic Surfactants With Short Hydrophobic Tails: A Microcalorimetric Study. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.249, p481-488, 2002.
- OTA, 1997 OTA, Y., KASUGA, T., ABE, Y. Preparation and Compressive

- Strength Behavior of Porous Ceramics with  $\beta$ -Ca(PO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> Fiber Skeletons. *Journal of American Ceramic Society*, v.80, n.1, p.225-231, 1997.
- PACHENCE, 1997 PACHENCE, J.M. & KOHN, J. Biodegradable Polymers for Tissue Engineering. In: LANZA, P.R., LANGER, R., CHICK, L.W. *Principles of Tissue Engineering*. Texas: R.G. Landes and Academic Press, 1997. Cap.19, p.273-293..
- PADILHA, 1999 PADILHA, A.F. Utilização da Técnica de Difração de Elétrons Retroespalhados na Caracterização Microestrutural dos Matérias. *Boletim Técnico da Escola Politécnica da USP*. n.BT/PMT/9903, 1999/2000.
- PARK, 1992 PARK, J.B. & LAKES, R.S. *Biomaterials: An Introduction*. 2.ed. New York: Plenum Press, 1992. 396p.
- PATEL, 1998 PATEL, N. *et al* Spatially Controlled Cell Engineering on Biodegradable Polymer Surfaces. *FASEB Journal*, v.12, p.1447-1454, 1998.
- PAUL, 1990 PAUL, A. *Chemistry of Glasses*. London: Chapman and Hall, 1990. 384p.
- PENG, 2000 PENG, H.X., FAN, Z., EVANS, J.R.G. Factors Affecting the Microstructure of a Fine Ceramic Foam. *Ceramics International*. v.26, p887-895, 2000.
- PEREIRA, 1994<sup>a</sup> PEREIRA, M.M., CLARK, E.A., HENCH, L.L. Homogeneity of Bioactive Sol-Gel-Derived Glasses in the System CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>. *Journal of Materials Synthesis and Processing*, v.2, n.3, p.189-195, 1994.
- PEREIRA, 1994b PEREIRA, M.M., CLARK, E.A., HENCH, L.L. Calcium Phosphate Formation on Sol-Gel-Derived Bioactive Glasses *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.28, p.693-698, 1994.
- PEREIRA, 1994c PEREIRA, M.M. *Bioactive Gel-Glasses: Processing and Reaction Mechanisms*. Florida: Graduate School of the University of Florida, 1994. (Dissertation, Degree of Doctor of

- Philosophy).
- PEREIRA, 1995 PEREIRA, M.M., CLARK, E.A., HENCH, L.L. Effect of Texture on the Rate of Hydroxyapatite Formation on Gel-Silica Surface. *Journal of the American Ceramic Society*, v.78, n.9, p.2463-2468, 1995.
- PEREIRA, 1996 PEREIRA, M.M., HENCH, L.L. Mechanisms of Hydroxyapatite Formation on Porous Gel-Silica Substrates. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v.7, p.59-68, 1996.
- PETER, 1998a PETER, J.S. *et al.* In vivo Degradation of a Poly(Propylene Fumarate)/ $\beta$ -Tricalcium Phosphate Injectable Composite Scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.41, p.1-7, 1998.
- PETER, 1998b PETER, J.S. *et al.* Polymer Concepts in Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.43, p.422-427, 1998.
- PINTO, 1996 PINTO, L.C.M. *Quantikov – Um Analisador Microestrutural para o Ambiente Windows*. São Paulo: USP/IPEN, 1994. (Tese de Doutorado).
- PRYCE, 2003 PRYCE, R.S. & HENCH, L.L. Dissolution Characteristics of Bioactive Glasses. *Key Engineering Materials*. v.240-242, p201-204, 2003.
- PUTNAM, 1996 PUTNAM, J.A. & MOONEY, J.D. Tissue Engineering Using Synthetic Extracellular Matrices. *Nature Medicine*, v.2, n.7, p.824-826, 1996.
- RÁMILA, 2001 RÁMILA, A., VALLET-REGÍ, M. Static and Dinamic *In Vitro* Study of a Sol-Gel Glass Bioactivity. *Biomaterials*. v.22, p2301-2306, 2001.
- RANGAVITTAL, 2000 RANGAVITTAL, N. *et al.* Structural Study and Stability of Hydroxiapatite and  $\beta$ -Tricalcium Phosphate: Two Important Bioceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.51, p660-668, 2000.
- RAYMUNDO, 1998 RAYMUNDO, A., EMPIS, J., SOUSA, I. Method to Evaluate

- Foaming Performance. *Journal of Food Engineering*. v.36, p445-452, 1998.
- REDDI, 1994 REDDI, H.A. Symbiosis of Biotechnology and Biomaterials: Applications in Tissue Engineering of Bone and Cartilage. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.56, p.192-195, 1994.
- REDDI, 1998 REDDI, H.A. Role of Morphogenetic Proteins in Skeletal Tissue Engineering and Regeneration. *Nature Biotechnology*, v.16, p.247-252, 1998.
- REGISMOND, 1998 REGISMOND, S.T.A., WINNIK, F.M., GODDARD, E.D. Stabilization of Aqueous Foams by Polymer/Surfactant Systems: Effect of Surfactant Chain Length. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.141, p165-171, 1998.
- RICHERSON, 1992 RICHERSON, W.D. *Modern Ceramic Engineering*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1992. 862p.
- RIGBY, 2002 RIGBY, S.P., EDLER, K.J. The Influence of Mercury Contact Angle, Surface Tension, and Retraction Mechanism on the Interpretation of Mercury Porosimetry Data. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.250, p175-190, 2002.
- ROSEN, 1988 ROSEN, M.J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. New York: John Wiley & Sons, 1988, 436p.
- ROTTER, 1998 ROTTER, N. *et al* Cartilage Reconstruction in Head and Neck Surgery: Comparison of Resorbable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering of Human Septal Cartilage. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.42, p.347-356, 1998.
- RUSANOV, 1997 RUSANOV, A.I., KROTOV, V.V., NEKRASOV, A.G. New Methods for Studying Foams: Foaminess and Foam Stability. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.206, p392-396, 1998.
- SAMPATH, 1997 SAMPATH, S. & MCSHANE, M. Student's Corner – Current Research in Cell and Tissue Engineering. *IEEE Engineering in Medicine and Biology*, p.16-18, 1997.

- SANTOS, 2000 SANTOS, A.M.M., VASCONCELOS, W.L. Properties of Porous Silica Glasses Prepared Via Sol-Gel Process. *Journal of Non-Crystalline Solids*. v.273, p145-149, 2000.
- SANTOS, 2002 SANTOS, E.P. *et al.* Formation of Zirconia Foams Using the Thermostimulated Sol-Gel Transition. *Journal of Non-Crystalline Solids*. v.304, p143-150, 2002.
- SARAVANAPAVAN, 2001 SARAVANAPAVAN, P., HENCH, L.L. Bioactive Sol-Gel Glasses in the CaO-SiO<sub>2</sub> System. *Key Engineering Materials*. v.192-195, p609-612, 2001.
- SARAVANAPAVAN, 2003 SARAVANAPAVAN, P., HENCH, L.L. Mesoporous Calcium Silicate Glasses. I. Synthesis. *Journal of Non-Crystalline Solids*. In press, 2003.
- SARAVANAPAVAN, 2003 SARAVANAPAVAN, P., HENCH, L.L. Dissolution of Bioactive Gel-Glasses Powders in the SiO<sub>2</sub>-CaO System. *Key Engineering Materials*. v.240-242, p213-216, 2003.
- SCOTT, 1980 SCOTT, R.P.W., TRAIMAN, S. Solute-Solvent Interactions on the Surface of Silica Gel III. Multilayer Adsorption of Water on the Surface of Silica Gel. *Journal of Chromatography*. v.196, p193-205, 1980.
- SEPÚLVEDA, 1997 SEPÚLVEDA, P. Gelcasting Foams for Porous Ceramics. *The American Ceramic Society Bulletin*, v.76, n.10, p.61-65, 1997.
- SEPÚLVEDA, 1999a SEPÚLVEDA, P., BINNER, J.G.P. Processing of Cellular Ceramics by Foaming and *in situ* Polymerisation of Organic Monomers. *Journal of the European Ceramic Society*. v.19, p2059-2066, 1999.
- SEPÚLVEDA, 1999b SEPÚLVEDA, P. *et al.* Hidroxiapatita Porosa Produzida Através do Gelcasting de Espumas Visando Aplicações Biomédicas. *Cerâmica*. v.45, n.296, p1-12, 1999.
- SEPÚLVEDA, 2001 SEPÚLVEDA, P., JONES, J.R., HENCH, L.L. Effect of Particle Size on Bioglass® Dissolution. *Key Engineering Materials*. v.192-195, p629-634, 2001.
- SEPULVEDA, 2002 SEPULVEDA, P., JONES, J.R., HENCH, L.L. Bioactive Sol-

- Gel Foams for Tissue Repair. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.59, p340-348, 2002.
- SHIAO, 1997 SHIAO, S.Y. *et al.* The Importance of Sub-Angstrom Distances in Mixed Surfactant Systems for Technological Processes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. v.128, p197-208, 1997.
- SIKAVITAS, 2001 SIKAVITAS, V.I., TEMENOFF, J.S., MIKOS, A.G. Biomaterials and Bone Mechanotransduction. *Biomaterials*. v.22, p2581-2593, 2001.
- SILVA, 1998 SILVA, R.F. *Utilização de Tetraetilortossilicato para Obtenção de Membranas Cerâmicas*. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 1998. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Metalúrgica).
- SARMA, 1988 SITA RAM SARMA, D.S.H., KHILAR, K.C. Effects of Initial Gas Volume Fraction on Stability of Aqueous Air Foams. *Ind. Eng. Chem. Res.* v.27, p892-894, 1988.
- SING, 1998 SING, K.S.W. Adsorption Methods for the Characterization of Porous Materials. *Advances in Colloid and Interface Science*. v.76-77, p3-11, 1998.
- SITTINGER, 1996a SITTINGER, M. *et al.* Tissue Engineering and Autologous Transplant Formation: Practical Approaches With Resorbable Biomaterials and New Cell Culture Techniques. *Biomaterials*. v.17, p237-242, 1996.
- SITTINGER, 1996b SITTINGER, M. *et al.* Resorbable Polyesters in Cartilage Engineering: Affinity and Biocompatibility of Polymer Fiber Structures to Chondrocytes. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.33, p.57-63, 1996.
- SIVAKUMAR, 1996 SIVAKUMAR, M. *et al.* Development of Hydroxyapatite Derived from Indian Coral. *Biomaterials*, v.17, p.1709-1714, 1996.
- SMARSLY, 2001a SMARSLY, B. *et al.* SANS Investigation of Nitrogen Sorption in Porous Silica. *Journal Phys. Chem. B*. v.105, p831-840,

- 2001.
- SMARSLY, 2001b SMARSLY, B., POLARZ, S., ANTONIETTI, M. Preparation of Porous Silica Materials Via Sol-Gel Nanocasting of Nonionic Surfactants: A Mechanistic Study on the Self-Aggregation of Amphiphiles for the Precise Prediction of the Mesopore Size. *Journal Phys. Chem. B.* v.105, p10473-10483, 2001.
- STOCUM, 1999 STOCUM, D.L. Regenerative Biology: A Millennial Revolution. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* v.10, p433-440, 1999.
- SUKAN, 1998 VARDAR-SUKAN, F. Foaming: Consequences, Prevention and Destruction. *Biotechnology Advances.* v.16, n.5-6, p913-948, 1998.
- SZEKRÉNYESY, 1992 SZEKRÉNYESY, T. *et al.* Characterization of Foam Stability by the Use of Foam Models 1. Models and Derived Lifetimes. *Colloids and Surfaces.* v.68, p267-273, 1992.
- TAGUCHI, 1998 TAGUCHI, T. *et al* Preparation of a Novel Functional Hydrogel Consisting of Sulfated Glucoside-Bearing Polymer: Activation of Basic Fibroblast Growth Factor. *Journal of Biomedical Materials Research,* v.41, p.386-391, 1998.
- TAN, 2003 TAN, A. *et al.* The Effect of 58S Bioactive Sol-Gel Derived Foams on the Growth of Murine Lung Epithelial Cells. *Key Engineering Materials.* v.240-242, p719-724, 2003.
- TANAHASHI, 1995 TANAHASHI, M. *et al* Apatite Coated on Organic Polymers by Biomimetic Process: Improvement in Its Adhesion to Substrate by Glow-Discharge Treatment. *Journal of Biomedical Materials Research,* v.29, p.349-357, 1995.
- TANCRED, 1998 TANCRED, C.D., CARR, J.A. & MCCORMACK, A.O.B. Development of a New Synthetic Bone Graft. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine,* v.9, p.819-823, 1998.
- TAS, 2000 TAS, A.C. Synthesis of Biomimetic Ca-Hydroxyapatite

- Powders at 37°C in Synthetic Body Fluids. *Biomaterials*. v.21, p1429-1438, 2000.
- THOMSON, 1997 THOMSON, R.C., YASZEMSKI, M.J. & MIKOS, A.G. Polymer Scaffold Processing. In: LANZA, P.R., LANGER, R., CHICK, L.W. *Principles of Tissue Engineering*. Texas: R.G. Landes and Academic Press, 1997. Cap.18, p.263-272.
- TJIA, 1998 TJIA, S.J., MOGHE, V.P. Analysis of 3-D Microstructure of Porous PolyLactide-Glycolide Matrices Using Confocal Microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.43, p.291-299, 1998.
- TOLEDANO, 1998 TOLEDANO, O., MAGDASI, S. Emulsification and Foaming Properties of Hydrofobically Modified Gelatin. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.200, p235-240, 1998.
- TSURU, 1998 TSURU, K. *et al* Ultrasonic Implantation of Calcium Metasilicate Glass Particles into PMMA. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.9, p.479-484, 1998.
- ELST, 1998 VAN DER ELST, M. *et al* Biodegradable Interlocking Nails for Fracture Fixation. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.357, p.192-204, 1998.
- VAN VLACK, 1973 VAN VLACK, L.H. *Propriedades dos Materiais Cerâmicos*. São Paulo: Edgard Blücher, 1973. 320p.
- VASCONCELOS, 2002 VASCONCELOS, D.C.L. *et al*. Influence of Process Parameters on the Morphological Evolution and Fractal Dimension of Sol-Gel Colloidal Silica Particles. *Materials Science and Engineering*. v.A334, p53-58, 2002.
- VAZ, 1999 VAZ, L., LOPES, B.A. & ALMEIDA, M. Porosity Control of Hydroxyapatite Implants. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.10, p.239-242, 1999.
- VÉLEZ, 1994 VÉLEZ, D. *et al* Synthesis and Characterization of a Hydroxyapatite-Zinc Oxide-Polyacrylic Acid Concrete. *Materials Letters*, v.19, p.309-315, 1994.
- VOGELSBERGER, VOGELSBERGER, W., SEIDEL, A., FUCHS, R. Contribution

- 2000 to the Determination of Kinetic Parameters of the Sol-Gel Transformation by Rheological Measurements. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.230, p268-271, 2000.
- VROUWENVELDER, 1993 VROUWENVELDER, W.C.A., GROOT, C.G. & DE GROOT, K. Histological and Biochemical Evaluation of Osteoblasts Cultured on Bioactive Glass, Hydroxylapatite, Titanium Alloy, and Stainless Steel. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.27, p.465-475, 1993.
- NOVAKOVIC, 1998 VUNJAK-NOVAKOVIC, G. *et al* Dynamic Cell Seeding of Polymer Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Biotechnology Prog.*, v.14, p.193-202, 1998.
- WAN, 1998 WAN, A.C.A., KHOR, E., HASTINGS, G.W. Preparation of a Chitin-Apatite Composite by *in situ* Precipitation onto Porous Chitin Scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.41, p541-548, 1998.
- WANG, 1998 WANG, M., HENCH, L.L. & BONFIELD, W. Bioglass<sup>®</sup>/High Density Polyethylene Composite for Soft Tissue Applications: Preparation and Evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.42, p.577-586, 1998.
- WANG, 1999a WANG, M., CILLIERS, J.J. Detecting Non-Uniform Foam Density Using Electrical Resistance Tomography. *Chemical Engineering Science*. v.54, p707-712, 1999.
- WANG, 1999b WANG, G. *et al*. On the Role of Hydrophobic Particles and Surfactants in Defoaming. *Langmuir*. v.15, p2202-2208, 1999.
- WATSON, 1999 WATSON, E.K., TENHUISEN, S.K. & BROWN, W.P. The Formation of Hydroxyapatite-Calcium Polyacrylate Composites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.10, p.205-213, 1999.
- WIGGERS, 2000 WIGGERS, F.N., DESHPANDE, N.S., BARIGOU, M. The Flow of Foam Films in Vertical Tubes. *Trans IchemE*. v.78, p773-778, 2000.
- WILKE, 1998 WILKE, A. *et al*. Biocompatibility Analysis of Different

- Biomaterials in Human Bone Marrow Cell Cultures. *Journal of Biomedical Materials Research*. v.40, p301-306, 1998.
- WILLIAMS, 1996 WILLIAMS, J.A.E.E., EVANS, R.G.J. Expanded Ceramic Foam. *Journal of Materials Science*, v.31, p.559-563, 1996.
- WILLIAMS, 2000 WILLIAMS, D.F. Perspectives on the Contributions of Biomaterials and Tissue Engineering to Bone Repair, Reconstruction, and Regeneration in *Bone Tissue Engineering* (ed J.E. Davies), 2000. Cap.54, p577-584.
- WINTERMANTEL, 1996 WINTERMANTEL, E. *et al* Tissue Engineering Scaffolds Using Superstructures. *Biomaterials*, v.17, p.83-91, 1996.
- WOLF, 2001 WOLF, R. *et al*. Soaps, Shampoos and Detergents. *Clinics in Dermatology*. v.19, p393-397, 2001.
- WU, 1990 WU, M., FUJIU, T., MESSING, G.L. Synthesis of Cellular Inorganic Materials by Foaming Sol-Gels. *Journal of Non-Crystalline Solids*. v.121, p407-412, 1990.
- XYNOS, 2000a XYNOS, I.D. *et al*. Ionic Products of Bioactive Glass Dissolution Increase Proliferation of Human Osteoblasts and Induce Insulin-Like Growth Factor II mRNA Expression and Protein Synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.276, p461-465, 2000.
- XYNOS, 2000b XYNOS, I.D. *et al*. Bioglass® 45S5 Stimulates Osteoblast Turnover and Enhances Bone Formation *In Vitro*: Implications and Applications for Bone Tissue Engineering. *Calcified Tissue International*. v.67, p321-329, 2000.
- YANG, 1996 YANG, Z. *et al* Osteogenesis in Extraskeletally Implanted Porous Calcium Phosphate Ceramics: Variability Among Different Kinds of Animals. *Biomaterials*, v.17, p.2131-2137, 1996.
- YANG, 1997 YANG, Z. *et al* Osteogenic Responses to Extraskeletally Implanted Synthetic Porous Calcium Phosphate Ceramics: An Early Stage Histomorphological Study in Dogs. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.8, p.697-701,

- 1997.
- YOUNG, 1991 YOUNG, A.C. *et al.* Gelcasting of Alumina. *Journal of American Ceramic Society*, v.74, n.3, p.612-618, 1991.
- YUAN, 1998a YUAN, H. *et al* Osteoinduction by Calcium Phosphate Biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.9, p.723-726, 1998.
- YUAN, 1998b YUAN, H. *et al* Bone Morphogenetic Protein and Ceramic-Induced Osteogenesis. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.9, p.717-721, 1998.
- ZELINSKI, 1984 ZELINSKI, B.J.J., UHLMANN, D.R. Gel Technology in Ceramics. *Journal Phys. Chem. Solids*. v.45, p1069-1090, 1984.
- ZHANG, 1999 ZHANG, R., MA, X.P. Poly( $\alpha$ -Hydroxyl Acids)/Hydroxyapatite Porous Composites for Bone-Tissue Engineering. I. Preparation and Morphology. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.44, p.446-455, 1999.
- ZHANG, 2000 ZHANG, Y., SANTOS, J.D. Crystallization and Microstructure Analysis of Calcium Phosphate-Based Glass Ceramics for Biomedical Applications. *Journal of Non-Crystalline Solids*. v.272, p14-21, 2000.
- ZOU, 1997 ZOU, L., BLOEBAUM, R.D., BACHUS, K.N. Reproducibility of Techniques Using Archimedes' Principle in Measuring Cancellous Bone Volume. *Med. Engineering Phys.* v.19, p63-68, 1997.
- ZWETSLOOT, 1995 ZWETSLOOT, J.P.H., LEYTE, J.C. The Determination of the Adsorption of an Ionic Surfactant on Latex from Conductivity Measurements. *Journal of Colloid and Interface Science*. v.175, p1-5, 1995.
- ZYMAN, 1998 ZYMAN, A. *et al* Inorganic Phase Composition of Remineralisation in Porous CaP Ceramics. *Biomaterials*, v.19, p.1269-1273, 1998.

