

**BIOCOMPÓSITOS P3HB/NANO-HAP PARA USO NA ÁREA MÉDICO-
ODONTOLÓGICA**

LEILA CORRÊA BARRETO SIQUEIRA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO DE 2016**

BIOCOMPÓSITOS P3HB/NANO-HAP PARA USO NA ÁREA MÉDICO- ODONTOLÓGICA

LEILA CORRÊA BARRETO SIQUEIRA

“Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais do Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção de título de Doutor em Engenharia e Ciência dos Materiais”.

Orientador: Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
OUTUBRO DE 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCT / UENF**

61/2017

Siqueira, Leila Corrêa Barreto

Biocompósitos P3HB/NANO-HAP para uso na área médico-odontológica / Leila Corrêa Barreto Siqueira. – Campos dos Goytacazes, 2017.

x, 124 f. : il.

Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) --
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de
Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados. Campos
dos Goytacazes, 2017.

Orientador: Rubén Jesus Sánchez Rodríguez.

Área de concentração: Polímeros e Compósitos.

Bibliografia: f. 105-113.

1. BIOCMPÓSITOS 2. NANOHIROXIAPATITA 3. POLI (3-
HIROXIPIRATO) 4. TESTES *IN VIVO* 5. BIOMATERIAIS I.
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de
Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados II. Título

CDD 572.33

BIOCOMPÓSITOS P3HB/NANO-HAP PARA USO NA ÁREA MÉDICO-ODONTOLÓGICA

LEILA CORRÊA BARRETO SIQUEIRA

“Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais do Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção de título de Doutor em Engenharia e Ciência dos Materiais”.

Aprovada em 18 de Outubro de 2016

Comissão examinadora:

Prof. Raúl Ernesto López Palacio (Doutor, Engenharia Mecânica) – UENF/CCT-LAMAV

Prof. André Lacerda de Abreu Oliveira (Doutor, Ciência Animal) – UENF/CCTA-LCCA

Prof. Marco Antonio Gallito (Doutor, Dentística) – UFF/LABA

Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez (Ciências e Tecnologia de Polímeros) UENF/CCT - LAMAV – Orientado

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABELA	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	X
1.1 – OBJETIVOS	13
1.1.1 – OBJETIVO GERAL	13
1.1.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
1.2 – JUSTIFICATIVA	13
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 – O TECIDO ÓSSEO	15
2.1.1 – CONCEITO.....	15
2.1.2 – ESTRUTURA	15
2.1.3 – FASE MINERAL	15
2.1.4 – COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES MECÂNICAS	16
2.2 – A ENGENHARIA E OS MATERIAIS BIOLÓGICOS	19
2.2.3.1 – POLÍMERO/CERÂMICA.....	27
2.2.3.2 – COMPÓSITOS.....	30
2.2.3.3 – ENXERTO TRIDIMENSIONAL.....	31
2.2.3.4 – INFLUÊNCIA DA POROSIDADE.....	33
2.3 – NANOMATERIAIS	35
2.3.1 – MORFOLOGIA DOS NANOMATERIAIS	35
2.3.2 – NANOTECNOLOGIA E A MEDICINA REGENERATIVA	38
2.3.3 – BIONANOCOMPÓSITOS EM APLICAÇÕES MÉDICAS.....	40
2.3.4 – NANOCARACTERÍSTICAS DAS SUPERFÍCIES DOS MATERIAIS	41
2.3.5 – TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS	42

2.4 – FATORES QUE INTERFEREM NO DESEMPENHO MECÂNICO DO COMPÓSITO	43
2.5. – AVALIAÇÕES DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	44
2.5.1 – INTEGRAÇÃO DO BIOMATERIAL AO SÍTIO ÓSSEO DO HOSPEDEIRO	48
CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.1 – ESPECIFICAÇÕES DAS CERÂMICAS UTILIZADAS	50
3.1.1 – NANO-HIDROXIAPATITA (nHAP).....	50
3.1.2 – HIDROXIAPATITA NATURAL	50
3.2 – ESPECIFICAÇÃO DO POLÍMERO UTILIZADO	50
3.2.1 – POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (PHB)	50
3.3 – NANOCOMPÓSITO PHB/nHAP	50
3.3.1 – METODOLOGIA DE FORMULAÇÃO DO NANOCOMPÓSITO PHB/nHAP E CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA.....	51
3.3.1.1 – METODOLOGIA DE PRODUÇÃO DE POROS.....	51
3.4 – PREPARO DOS CORPOS DE PROVA PARA O TESTE DE NANOINDENTAÇÃO	52
3.5 – TESTES BIOLÓGICOS IN VITRO.....	53
3.5.1 – PREPARO DOS COMPÓSITOS PARA OS TESTES IN VITRO	54
3.5.2 – CULTURA CELULAR PARA O TESTE IN VITRO.....	54
3.6 – TESTES IN VIVO	54
3.6.1 – POPULAÇÃO DE ESTUDO	54
3.6.2 – TAMANHO AMOSTRAL.....	55
3.6.3 – DESENHO EXPERIMENTAL	56
3.6.4 – PROCEDIMENTO PRÉ-CIRÚRGICO E ANESTESIA	56
3.6.5 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	57
3.6.7 – PROCEDIMENTO PÓS-OPERATÓRIO.....	59
3.6.8 – SACRIFÍCIO.....	60
3.7 – CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS	61
3.7.1 – AVALIAÇÃO MECÂNICA, TÉRMICA E ESTRUTURAL.....	61
3.7.1.1 – ENSAIOS MECÂNICOS.....	61
3.7.1.2 – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA).....	64
3.7.1.3 – CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).....	64
3.7.1.4 – MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV).....	64

3.7.2 – AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DOS NANOCOMPÓSITOS	65
3.7.2.1 – TESTE DE INDUÇÃO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA	65
3.7.2.2 – QUANTIFICAÇÃO DO MEDIADOR INFLAMATÓRIO: NO	65
3.7.3 – AVALIAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DOS BIOMATERIAIS IN VIVO	66
3.7.3.1 – PREPARO DOS ESPÉCIMES PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA	66
3.7.3.2 – PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DAS AMOSTRAS DO GEBD....	68
3.7.3.3 – TÉCNICA DE COLORAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA	68
3.7.4. – ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1 – AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS BIOCOMPÓSITOS ENCAPSULADOS .	70
4.2 – AVALIAÇÃO DA POROSIDADE DOS ENCAPSULADOS	71
4.3 – COMPORTAMENTO MECÂNICO DO BIOCOMPÓSITO	73
4.4 – COMPORTAMENTO TÉRMICO	81
4.5 – TESTES BIOLÓGICOS – BIOCOMPATIBILIDADE E TOXICIDADE	84
4.6 – AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS – TESTES IN VIVO	87
4.6.1 – AVALIAÇÕES CLÍNICAS	87
4.6.2 – AVALIAÇÕES MACROSCÓPICAS E ANÁLISES EM MEV	87
4.6.3 – ANÁLISES MICROSCÓPICAS.....	89
4.6.3.1 – MICROSCOPIA ÓTICA (MO)	89
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
ANEXOS.....	113
ANEXO I – APROVAÇÃO DO CEUA-UEA/UENF: PROTOCOLO Nº 267.	114

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – ORGANIZAÇÃO HIERÁRQUICA DO OSSO (MEYERS ET AL., 2008).	17
FIGURA 2 – MICROGRAFIA ÓTICA REFLETIDA DAS ESTRUTURAS ÓSSEAS: (A) HUMANA, (B) COELHO (WANG, MABREY, AGRAWAL, 1998).	21
FIGURA 3 – COMPARAÇÃO DO MÓDULO ELÁSTICO E Σ MÁXIMA DE TECIDOS NATURAIS (CARTILAGEM E OSSO CORTICAL) E BIOMATERIAIS (LIEBSCHINER, 2004).	24
FIGURA 4 – MICROSCOPIA MOSTRANDO A MICROESTRUTURA DO TECIDO ÓSSEO OSTEONAL E INTERSTICIAL COM A INDENTAÇÃO CORRESPONDENTE DE 30 μ M, DESTACADA NO QUADRADO (SETA PRETA). TÍPICA IMPRESSÃO DE INDENTAÇÃO PIRAMIDAL (HOFFLER ET AL., 2005).	26
FIGURA 5 – MÓDULO ELÁSTICO X FORÇA COMPRESSIVA DE POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS, CERÂMICAS BIOATIVAS E COMPÓSITOS. POROSIDADES DOS SCAFFOLDS SÃO > 75% E NORMALMENTE INTERCONECTADOS (REZWAN ET AL., 2006).	34
FIGURA 6 – MICROGRAFIA MOSTRANDO FIBROBLASTOS L929 (A) EM EXPANSÃO - ESCALA DE 10 μ M, (B) FORMANDO MONOCAMADA – ESCALA DE 200 μ M; SOBRE O COMPÓSITO PHB/HAP (74/26 %M/M) (SIQUEIRA, 2009).	45
FIGURA 7 – A- CORPOS DE PROVA DENTRO DO CILINDRO METÁLICO; B- PRESSÃO DA AUTOCLAVE REGULADA PARA 800 PSI DE CO ₂	52
FIGURA 8 – SEQUENCIA DO PROCEDIMENTO OPERATÓRIO. (A) INCISÃO EXTRAORAL RETILÍNEA A FRENTE DO ÂNGULO NO BORDO INFERIOR DA MANDÍBULA, (B) DIVULSÃO DOS TECIDOS COM EXPOSIÇÃO DO OSSO MANDIBULAR.	58
FIGURA 9 – PREPARO DO DEFEITO ÓSSEO. (A) BROCA TREFINA UTILIZADA EM CONTRA ÂNGULO REDUTOR, (B) OSSO DA MANDÍBULA OSTEOTOMIZADO, (C) DEFEITO ÓSSEO – 6 MM.	58
FIGURA 10 – DEMONSTRAÇÃO DOS DEFEITOS ÓSSEOS PREPARADOS E OS BIOMATERIAIS UTILIZADOS. (A) PHB/NHAP EM FORMA DE GRÂNULOS, (B) PHB/NHAP EM FORMA DE DISCO, (C) BIOMATERIAL COMERCIAL – CONTROLE POSITIVO, (D) DEFEITO SEM PREENCHIMENTO – CONTROLE NEGATIVO.	59
FIGURA 11 – DIAGONAIS IMPRESSAS PELO IDENTADOR USADAS PARA O CÁLCULO DE VALORES DE MICRODUREZA	63
FIGURA 12 – FOTOMICROGRAFIAS DAS MICROPARTÍCULAS DOS ENCAPSULADOS PHB/NHAP – ESCALA DE 10 μ M.	70
FIGURA 13 – FOTOMICROGRAFIA DAS PARTÍCULAS (A) – ESCALA DE 10 μ M E GRÁFICO (B) DE TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DOS ENCAPSULADOS PHB/NHAP	71

FIGURA 14 – FOTOMICROGRAFIAS DA SUPERFÍCIE DE DISCO ESFÉRICO DE PHB/NHAP EVIDENCIANDO PRESENÇA DE POROS.....	72
FIGURA 15 – CURVAS DE TENSÃO- DEFORMAÇÃO PARA O NANOCOMPÓSITO E O P3HB.	74
FIGURA 16 – CURVA DE DMA DO NANOCOMPÓSITO E DA MATRIZ POLIMÉRICA VERSUS TEMPERATURA.	75
FIGURA 17 – FOTOMICROGRAFIAS DAS REGIÕES DAS FRATURAS DOS CORPOS DE PROVA – (A) E (B) CORPOS DE PROVA DO P3HB; (C), (D), (E) E (F) P3HB/18%NHAP	76
FIGURA 18 – GRÁFICO DE COMPRESSÃO POR DMA DO NANOCOMPÓSITO P3HB-18%NHAP E DO P3HB.	77
FIGURA 19 – GRÁFICO DA PERDA DE MASSA (TGA) E DERIVADA DA PERDA DE MASSA (DTG) DO P3HB E DO BIOCIMPÓSITO P3HB/X%NHAP	82
FIGURA 20 – TERMOGRAMAS DE DSC DO P3HB E BIOCIMPÓSITO P3HB/18%NHAP	83
FIGURA 21 – FOTOMICROGRAFIAS ÓTICAS MOSTRANDO O CRESCIMENTO CELULAR DAS CÉLULAS EM PRESENÇA DO P3HB/NHAP NO PRIMEIRO E NO QUINTO DIA DO EXPERIMENTO.....	86
FIGURA 22 – IMAGEM MACROSCÓPICA DO FRAGMENTO ÓSSEO APÓS DISSECAÇÃO	88
FIGURA 23 – FOTOMICROGRAFIAS GRUPO EXPERIMENTAL – GEBG – 45 D..	90
FIGURA 24 – FOTOMICROGRAFIAS GRUPO CONTROLE POSITIVO – GCP – 45D.	92
FIGURA 25 – FOTOMICROGRAFIAS GRUPO EXPERIMENTAL – GEBD – 45 D..	94
FIGURA 26 – FOTOMICROGRAFIAS CONTROLE NEGATIVO – GCN – 45 D.	94
FIGURA 27 – FOTOMICROGRAFIAS GRUPO EXPERIMENTAL – GEBD – 90 D..	95
FIGURA 28 – FOTOMICROGRAFIAS GRUPO CONTROLE POSITIVO – GCP – 90 D.....	96
FIGURA 29 – ESCORES DAS PRINCIPAIS RESPOSTAS BIOLÓGICAS DOS COELHOS PARA OS: GEBD, GEBG, GCP E GCN, AVALIADOS AOS 45 E 90 DIAS APÓS O ENXERTO ÓSSEO (MÉDIA ± IC, P≤ 0,05, N= 10).....	99

ÍNDICE DE TABELA

TABELA 1 – REPRESENTAÇÃO DE DADOS EXPERIMENTAIS, OBTIDOS DA ESPÉCIE HUMANA E DE ALGUNS ANIMAIS (WANG; MABREY; AGRAWAL, 1998).	21
TABELA 2 – PROPRIEDADES MECÂNICAS DO TECIDO ÓSSEO CORTICAL E TRABECULAR – MÓDULO DE YOUNG (E), RESISTÊNCIA (MPA) DE VÁRIAS ESPÉCIES (LIEBSCHINER, 2004)	23
TABELA 3 – RELAÇÃO DOS POLÍMEROS USADOS EM COMPÓSITOS COM CERÂMICAS ATÉ O MOMENTO (REZWAN ET AL., 2006; HABRAKEN ET AL., 2007)	29
TABELA 4 – CRITÉRIOS E CONDIÇÕES FUNCIONAIS PARA A CONSTRUÇÃO DE SCAFFOLDS USADO EM APLICAÇÕES DA ENGENHARIA DE TECIDO ÓSSEO (LIU, LIM E TEOH, 2012).....	33
TABELA 5 – NANOPARTÍCULAS E APLICAÇÕES BIOMÉDICAS (ENGEL ET AL., 2007).....	36
TABELA 6 – NANOFIBRAS COMO SCAFFOLDS PARA APLICAÇÕES NA ET (ENGEL ET AL., 2007).....	36
TABELA 7 – CRITÉRIOS PARA PROJETO DE SCAFFOLD (SAIZ ET AL., 2013) ..	40
TABELA 8 – ESTUDOS PRÉVIOS PRÉ-CLÍNICOS DESENVOLVIDOS EM COELHOS, ONDE FOI AVALIADA A EVOLUÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS, ATRAVÉS DE DIVERSAS ANÁLISES EM INTERVALOS VARIADOS DE TEMPO.....	47
TABELA 9 – DESENHO DO EXPERIMENTO COM A DISTRIBUIÇÃO DO MATERIAL EXPERIMENTAL E OS CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO.....	56
TABELA 10 – RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DE TESTE MECÂNICO DE FLEXÃO.....	74
TABELA 11 – PROPRIEDADES DE FLEXÃO E COMPRESSÃO DOS BIOMATERIAIS ESTUDADOS COMPARADAS AS DO OSSO HUMANO PRESENTE NA LITERATURA.....	79
TABELA 12 – MICRODUREZA VICKERS DO P3HB E DO COMPÓSITO P3HB/18%NHAP	80
TABELA 13 – RESULTADOS DSC PARA P3HB E P3HB/NHAP	84
TABELA 14 – CONCENTRAÇÃO DE NO PRODUZIDO PELOS MACRÓFAGOS RAW 264.7 EM CONTATO COM O NANOCOMPÓSITO, O CONTROLE (CÉLULAS SEM O MATERIAL) E COM LPS (LIPOPOLISSACARÍDIO – INDUTOR DE INFLAMAÇÃO).	85

TABELA 15 - DADOS DAS ANÁLISES HISTOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS DOS ESTUDOS REALIZADOS	97
EM COELHOS, DA LINHAGEM NOVA ZELÂNDIA	97

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

ddH₂O = Água Bidestilada

EG – Espuma de Gás

ET = Engenharia Tecidual

EVA = Poli (etileno)-co-(acetato de vinila)

GCN = Grupo Controle Negativo

GCP = Grupo Controle Positivo

GEBD = Grupo Experimento Biomaterial Disco

GEBG = Grupo Experimento Biomaterial Grânulo

HAP = Hidroxiapatita

H.E. = Hematoxilina e Eosina

LP = Lixiviação de Partículas

MEV = Micrografia Eletrônica de Varredura

MO = Microscopia Ótica

mm = Milímetros

µm = Micrômetro

NaCl = Cloreto de Sódio

nHAP = Nanohidroxiapatita

nm = Nanômetro (s)

n = Número amostral

PCL = Poli (ϵ -Caprolactona)

PEO = Poli (Óxido de Etileno)

PHB = Polihidroxibutirato

PLLA = Poli (l-Ácido Lático)

PLGA = Copolímero de Ácido Polilático e Poliglicólico

psi = libra-força por polegada quadrada

PVA = Álcool Polivinílico

ρ = Probabilidade de erro

NO = Óxido Nítrico

σ = Tensão

ϵ = Deformação

RESUMO

A alta incidência de trauma ósseo na população humana vem sendo observada tanto na infância quanto à medida que a população envelhece. A habilidade humana para reparação é influenciada pela idade, pelo tamanho da lesão, entre outros fatores, sendo necessário muitas vezes fazer preenchimento dos defeitos com algum biomaterial. O objetivo desse estudo foi formular um bionanocompósito que fosse substituído gradativamente por osso, impedisse a migração da HAP e obtivesse propriedades mecânicas compatíveis com as do osso. Desse modo, visando ainda corresponder à complexidade do tecido ósseo foi formulado um biocompósito composto por um polímero biodegradável, o polihidroxibutirato (P3HB) e uma cerâmica bioativa, a nanohidroxiapatita (nHAP). Através de um procedimento de encapsulamento as partículas de nHAP foram incorporadas por P3HB resultando em partículas micrométricas do biomaterial com morfologia casca-núcleo, alcançando uma proporção de 18 % em massa de nanohidroxiapatita. As propriedades mecânicas e biológicas do biocomposito foram avaliadas através de testes de indentação, flexão, compressão, *in vitro* e *in vivo* respectivamente. Foram utilizados para os testes de biocompatibilidade vinte e quatro coelhos, fêmeas, adultos da linhagem Nova Zelândia. Foram produzidos defeitos ósseos na mandíbula dos coelhos e preenchidos com bionanocompósito. Uma metade dos defeitos foi preenchida com o nanobiomaterial em grânulos e a outra metade em forma de disco, enquanto o lado contrário ao experimental nos mesmos animais foi utilizado como controle positivo ou negativo. Os resultados dos testes biológicos mostraram a não citotoxicidade do nanomaterial e ausência de migração da nHAP do defeito ósseo. Nas análises histológicas foi visto a interação do nanocompósito com o sítio receptor, sendo evidenciada uma atividade intensa de células em um processo de reabsorção, incorporação e remodelação óssea. O desempenho mecânico do nanocompósito foi semelhante ao do osso trabeculado. Os resultados evidenciaram, dessa forma, que o material apresenta potencial para ser utilizado como preenchimento de pequenas cavidades ósseas.

ABSTRACT

The high incidence of bone trauma in the human population has been observed both during the childhood and as the population ages. The ability of the human bone to repair is influenced by age, size of the lesion, among other factors, and it is often required to fill the defects with a biomaterial. The purpose of this study was to formulate a bionanocomposite that is gradually replaced by the bone, prevents the migration of HAP and has mechanical properties compatible with those of the bone. Thus, in order to match the complexity of the bone tissue, a biocomposite composed of a biodegradable polymer, polyhydroxybutyrate (P3HB) and a bioactive ceramic, nanohydroxyapatite (nHAP), was formulated. Through an encapsulation procedure the nHAP particles were encapsulated by P3HB resulting in micrometric particles of the biomaterial with shell-core morphology, with 18% (w/w) of nanohydroxyapatite. The mechanical and biological properties of the biocomposite were evaluated through nanoindentation, flexural and compression testing, in vitro and in vivo analyses. Twenty-four female adult rabbits of the New Zealand lineage were used for the biocompatibility tests. Bone defects were produced in the jaw of the rabbits and filled with bionanocomposite. One-half of the defects were filled with nanobiomaterials in form of granules and the other half disc-shaped, the opposite side of the tested defects were used as positive or negative control. The results of the biological tests showed the non-cytotoxicity of the nanomaterial and absence of nHAP migration of the bone defect. In the histological analyses, the interaction of the nanocomposite with the receptor site was observed, displaying an intense activity of cells in a process of reabsorption, incorporation and bone remodeling. The mechanical performance of the nanocomposite was similar to that of the trabecular bone. The results demonstrated that the material has potential to be used as a filling material of small bone cavities.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

A expectativa de vida do ser humano vem sendo aumentada a cada dia, ao mesmo tempo em que o indivíduo convive com a realidade de seus corpos deteriorarem-se muito antes do tempo requerido. O osso é o tecido humano mais transplantado em todo o mundo, chegando a atingir 2,2 milhões de implantes ósseos realizados anualmente (SAIZ et al., 2013). Uma das consequências do envelhecimento é a diminuição da resistência dos ossos, o aumento da probabilidade de fratura e doenças que levam a perda óssea parcial gerando defeitos ósseos diversificados. Diante desse problema o desenvolvimento de biomateriais como substitutos ósseos é uma necessidade que ocupa um lugar de destaque nas pesquisas de materiais (SAIZ et al., 2013).

O osso autólogo (autoenxerto) é, até o momento, a melhor opção clínica de tratamento de defeitos ósseos, em função do seu alto potencial osteogênico. Temos o processo de osteogênese quando células ósseas vivas são enxertadas em um leito receptor, permanecendo com a capacidade de formação de novo tecido ósseo. O osso autólogo pode ser coletado da própria cavidade oral (mento, túber ou do ramo da mandíbula) ou de uma região distante da boca, do corpo do próprio paciente como: crista ilíaca, parte anterior da tíbia, ou ainda da região posterior do fêmur. A coleta do autoenxerto requer uma cirurgia adicional no sítio doador que poderá resultar em complicações como inflamação, infecção e parestesia crônica, transtornos que estariam fora do trauma do procedimento cirúrgico principal necessário. A quantidade de tecido ósseo que pode ser coletada é também limitada, gerando ainda um problema de suprimento (CHEN et al., 2010).

Alternativas de substitutos para autoenxertos são aloenxertos, entretanto, existe um risco de rejeição, desenvolvida pelo sistema imune do receptor e, de transmissão de doença para o receptor. Os tratamentos usados como: congelamento do tecido, congelamento e secagem, radiação gama, radiação por raio eletrônico ou óxido etileno para tornar seguro o uso do tecido do doador também remove proteínas e fatores, reduzindo ou eliminando a osteoindutibilidade desse tecido, sendo, portanto, verificada uma pequena função osteoindutiva da maioria dos substitutos ósseos, alo gênicos e xenogênicos (LIU; LIM; TEOH, 2012).

Outra possibilidade para substituir o autoenxerto, é um biomaterial sintético, que tem sido bastante pesquisado, mas até o momento nenhum deles preencheu

adequadamente as necessidades mecânicas e biológicas ósseas. Visando superar as limitações de um biomaterial com propriedades individuais, pesquisadores vêm concentrando seus estudos em formulações de biomateriais compósitos, através da junção de dois ou mais biomateriais diferentes visando obter a melhora das propriedades (LIU; LIM; TEOH, 2012).

Os biomateriais, osteocondutores, mais comuns usados como implantes teciduais estão dentro de duas maiores categorias: sais inorgânicos e polímeros. Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), fosfato tricálcio e sulfato de cálcio são os sais inorgânicos mais usados em enxertos substitutos ósseos (POSER, 2001). Polímeros ainda continuam sendo os mais pesquisados, seguidos das cerâmicas e dos compósitos desses biomateriais (LIU; LIM; TEOH, 2012).

A morfologia dos biomateriais também pode influenciar suas propriedades biológicas. Tem sido demonstrado que materiais nanoestruturados que apresentam propriedades de superfície propícias às células podem promover maior interação proteica e, portanto, proporcionar um estímulo mais eficiente para o crescimento de um novo osso, se comparado aos materiais convencionais (ZHANG; WEBSTER, 2009).

O estudo de biocompositos PHB/HAP foi realizado preliminarmente pelo Grupo de Polímeros/LAMAV focalizando sua atenção na síntese da HAP obtendo-se resultados que justificam a continuidade do tema.

Assim, observando a tendência contemporânea, estudamos agora a formulação do biocompósito a partir do PHB e nHAP em forma de partícula e também na forma de disco onde foi ainda observada a influência da porosidade (tamanho e quantidade). Também foi avaliado o comportamento biomecânico desses nanomateriais *in vivo*, em complementação a avaliação da citocompatibilidade *in vitro*.

A formulação de um material biocompósito contendo nHAP pretende impedir a migração da cerâmica, favorecer o desempenho biológico e modular as propriedades mecânicas na tentativa de mimetizar a estrutura complexa do tecido ósseo. Portanto, espera-se com a formulação do P3HB/nHAP obter-se um novo material que possa superar limitações dos já existentes no mercado até o momento.

1.1 – OBJETIVOS

1.1.1 – OBJETIVO GERAL

Formular e avaliar in vitro e in vivo biocompósitos P3HB/nanohidroxiapatita, a citotoxicidade, a resposta celular dos tecidos do leito receptor, além do desempenho mecânico, visando obter um nanomaterial que preencha as necessidades mecânicas e biológicas, para o uso seguro na área médico-odontológica, como material de preenchimento de pequenas cavidades.

1.1.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reduzir a taxa de migração da biocerâmica no processo de preenchimento ósseo em relação aos materiais utilizados atualmente.
- Desenvolver uma formulação com a homogeneidade e carga da cerâmica que favoreça a bioincorporação aos tecidos almejados.
- Avaliar a citotoxicidade do biocompósito desenvolvido.
- Avaliar comparativamente a bioincorporação do nanocompósito particulado e em bloco.
- Analisar a distribuição de poros no biocompósito formulado e a influência no comportamento mecânico.

1.2 – JUSTIFICATIVA

Desenvolver um biocompósito que em relação aos materiais de preenchimento existentes no mercado se fundamenta na semelhança de composição e morfologia da nanohidroxiapatita com o tecido ósseo, na possibilidade de conformação da matriz polimérica e na capacidade de reabsorção do PHB pelo corpo humano, a taxas controladas, durante o processo de incorporação da nanohidroxiapatita ao tecido ósseo. Assim o biocompósito formulado visa preencher lacunas deixadas por biomateriais já comercializados, como migração do local preenchido e pobre desempenho mecânico, tornando vantajoso o seu uso por comprovação de sua compatibilidade, capacidade de integração aos tecidos e adequadas propriedades mecânicas. Ainda com esse biocompósito busca-se alcançar melhores resultados

clínicos e, se possível, custos reduzidos, contribuindo para uma melhor qualidade de vida do ser humano.

Também o presente trabalho pretende fortalecer um vínculo profissional já existente entre o Curso de Odontologia do Centro Universitário Fluminense (UNIFLU) e a UENF na área de biomateriais ao desenvolver um material de interesse na área odontológica e realizar sua caracterização biológica aproveitando o perfil dos profissionais da área, principalmente nos testes in vivo relativos à resposta celular, taxa de biodegradação e influência da porosidade na bioincorporação destes compostos, nova formação tecidual, etc.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – O TECIDO ÓSSEO

2.1.1 – CONCEITO

O osso é um compósito natural formado por um material cerâmico (fosfato de cálcio ou hidroxiapatita) e um material polimérico (colágeno). Ele compõe a estrutura do corpo humano, desempenhando uma importante função mecânica (MEYERS et al., 2008).

2.1.2 – ESTRUTURA

A estrutura óssea é bastante complexa e, apesar de estar sendo pesquisada há mais de 320 anos ainda tem muito a ser compreendido. No final do século XVII, aproximadamente 200 anos dos estudos iniciais, as descobertas eram feitas utilizando o microscópio de luz, revelando o que sabemos ainda hoje do osso compacto, como a presença de cavidades de reabsorção, lacunas, ósteons (sistema haversiano) e as lamelas. O surgimento do microscópio de luz polarizada na segunda metade do século XIX permitiu que os pesquisadores distinguissem vários tipos de componentes funcionais presentes no osso. Esse microscópio permitiu a Gebhardt uma descrição detalhada do ósteon como um componente do osso compacto. Ainda nessa mesma época Weidenreich descreveu os diferentes tipos de osso que conhecemos hoje, como o trançado, lamelar, fibrolamelar, etc (REZNIKOV; SHAHAR; WEINER, 2014).

2.1.3 – FASE MINERAL

Essa fase vem sendo estudada há muitos anos, o que permitiu que os pesquisadores relacionassem os principais componentes minerais do tecido ósseo, dentre eles o cálcio, fosfato e carbonato, em 1799. Posteriormente, em 1858, foi determinada a proporção de cada um desses íons minerais. O uso da difração de Rx, em 1926, mostrou a forma de apresentação desses íons dispostos num arranjo mineral denominado hidroxiapatita (REZNIKOV; SHAHAR; WEINER, 2014).

A fase mineral do osso maduro apresenta um arranjo químico de hidroxiapatita carbonatada, cujos cristais estão dispostos em forma de placas finas. Análise em nível

atômico revela uma estrutura desordenada dos cristais maduros de hidroxiapatita carbonatada, isso em parte é em consequência dos cristais se formarem a partir de uma estrutura desordenada, com vários aditivos presentes (como carbonatos), além dos cristais maduros serem muito finos, o que proporciona uma grande superfície em razão de massa. Sendo assim, pode-se observar que esse cristal tem uma superfície levemente desordenada quando comparada com a maior parte das estruturas cristalinas (REZNIKOV; SHAHAR; WEINER, 2014).

2.1.4 – COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES MECÂNICAS

Os principais tipos de osso são: o osso compacto/cortical (material denso encontrado em todos os ossos) e o esponjoso/canceloso/trabecular (material semelhante à esponja com suportes em torno de 100 µm de espessura). O osso compacto é encontrado em ossos longos como tibia, fêmur, fíbula, etc. e o esponjoso encontrado na região central dos ossos e em ossos chatos (MEYERS et al., 2008; SAIZ et al., 2013).

O osso é multifuncional, como a maioria dos sistemas biológicos. Os ósteons circulares do osso compacto têm função estrutural e também a função de proteger os vasos sanguíneos, formando o sistema de Havers que é responsável pela chegada de nutrientes além de possibilitar a formação, remodelação e cicatrização do tecido ósseo. A estrutura lamelar dos ósteons é composta por fibras arranjadas em padrões geométricos, sendo cada fibra formada por uma união de fibrilas colágenas, cada fibra através de uma fase orgânica forma um arranjo de fibras. Portanto as unidades básicas de construção do osso são formadas por fibrilas colágenas mineralizadas, constituídas por moléculas de proteína colágena (tropocolágeno), com uma tripla hélice de aminoácidos, unidas por uma fase inorgânica dos nanocristais de hidroxiapatita (MEYERS et al., 2008; SAIZ et al., 2013). Na Figura 1 pode ser observada a distribuição organizada de uma estrutura óssea composta por material orgânico e inorgânico.

O tecido ósseo tem em sua estrutura uma variedade de componentes, unidos de forma precisa com propriedades mecânicas harmonicamente combinadas. Os componentes orgânicos e inorgânicos formam estruturas complexas que estão hierarquicamente organizados por níveis que variam de nano, micro e mesoescala, sendo o orgânico responsável pela ductilidade enquanto o mineral fornece a dureza.

No osso, portanto, é observada uma elevada absorção de energia antes da fratura, que pode ser interpretado como uma resposta ao desequilíbrio entre a ductilidade e a dureza (MEYERS et al., 2008; SAIZ et al., 2013).

A resistência à fratura natural do osso vem da associação da ductilidade dada pelas maiores escalas de comprimento, dos componentes orgânicos, com a dureza fornecida pelas menores escalas, de componentes inorgânicos. Os sistemas biológicos conseguem apresentar propriedades mecânicas muito melhores que as de materiais sintéticos formulados com os mesmos materiais biológicos, fato que surpreende, pois os polímeros básicos e os minerais presentes nos sistemas naturais são, quando isolados, considerados fracos. Essa força então pode ser atribuída ao processamento aquoso e temperatura do meio ambiente e, ainda a presença limitada, porém balanceada de determinados elementos químicos, principalmente C, N, Ca, H, O, Si, P (MEYERS et al., 2008; SAIZ et al., 2013).

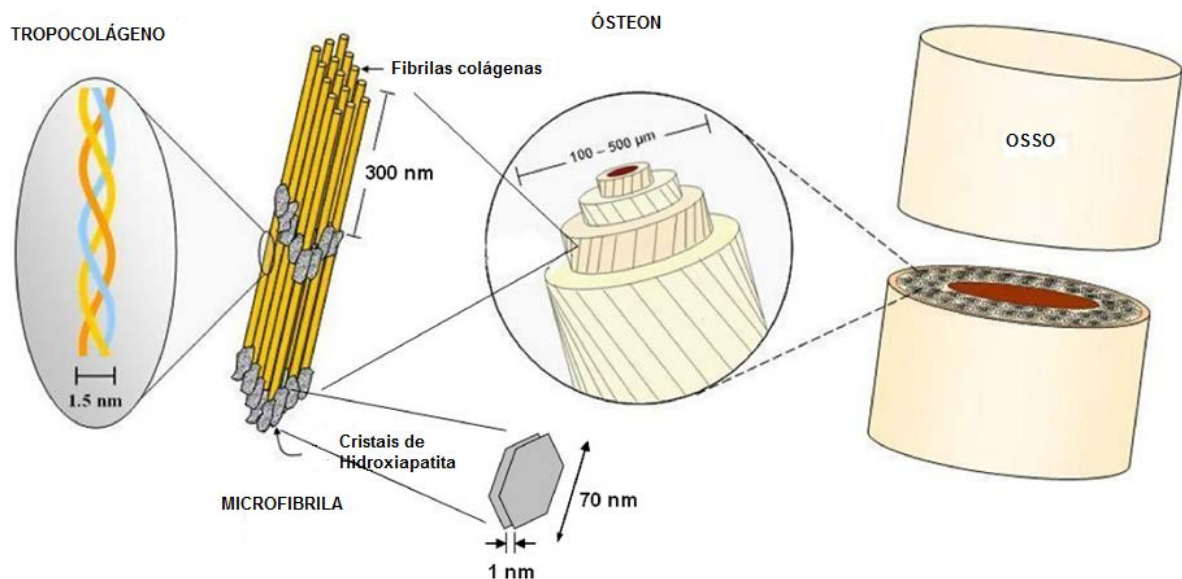


Figura 1 – Organização hierárquica do osso (MEYERS et al., 2008).

Essa diversidade da escala do osso com suas interfaces minuciosamente projetadas fazem com que esse tecido tenha propriedades únicas e bastante complexas para serem imitadas. Dois fatos tornam o osso um complexo biológico hierarquicamente estruturado, um deles é a distribuição da fração de volume da fase orgânica e mineral na proporção de 60/40, como na formulação de um compósito sintético. O outro nível de complexidade está associado aos cristais de hidroxiapatita

que possuem forma de plaquetas de diâmetro de 70-100 nm e espessura de ~1 nm, sofrendo nucleação nos vazios entre as fibrilas colágenas (MEYERS et al., 2008).

Maior resistência é atribuída ao osso cortical denso, apresentando, portanto uma maior capacidade de suportar cargas impostas, quando comparado ao osso trabeculado, que é mais poroso. O módulo de elasticidade do osso cortical e do osso trabeculado tomados como uma média de vários valores citados na literatura são de 7,5 e 0,5 GPa respectivamente, a resistência à compressão foram referidos como 137,8 MPa para o osso cortical e 41,4 MPa para o osso trabeculado, enquanto o coeficiente de *Poison* foi 2,7 no cortical e 0,3 no trabeculado (GALEGO et al., 2000; PATRA et al., 2000). Esses valores foram obtidos para o osso considerado isotrópico, linear, elástico, homogêneo e seco.

2.1.5 – CICATRIZAÇÃO ÓSSEA

O processo de cicatrização óssea acontece em três fases. A inicial caracteriza-se pela migração das células mesenquimais e seguidas condrogêneses culminando com a formação do calo ósseo amolecido, possibilitando assim a imobilização da fratura e formação do osso endocondral. Na segunda fase ocorre a deposição de colágeno com subsequente mineralização resultando na formação do tecido ósseo. Na fase final acontece a remodelação óssea, restabelecendo então a força e a estrutura original do osso. Portanto, no processo de cicatrização teremos os seguintes estágios: formação do hematoma, inflamação, revascularização, fibrocartilagem, cartilagem hialina, mineralização da cartilagem, formação do tecido ósseo e remodelamento. O processo de cicatrização da fratura óssea acontece em intervalo de tempo variável entre as espécies experimentais (MEHTA et al., 2012; PERIC et al., 2015).

O processo de cicatrização óssea é muito sensível tanto aos estímulos mecânicos quanto aos estímulos biológicos, eles influenciam não só o caminho como também o resultado. As falhas na cicatrização do osso podem ser devido à exigência mecânica excessiva relacionada ao tipo de fratura, que se for corrigida, a cicatrização acontecerá. Entretanto outras falhas são referentes a limitações biológicas que normalmente, na maioria das vezes, falta melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo que levam ao atraso na cicatrização ou a não união. A cicatrização do osso ocorre através de uma hierarquia complexa de

processos que envolvem caminhos complexos e uma dosagem dinâmica de múltiplos fatores bem coordenados. Provavelmente por isso os tratamentos usando terapias individuais com fatores de crescimento, com dose fixa e duração limitada, têm um sucesso terapêutico limitado (MEHTA et al., 2012).

Como estratégia da engenharia de tecido ósseo, têm sido utilizados enxertos ósseos ou ossos desmineralizados ou desvitalizados, com células na matriz ou moléculas bioativas, para liberar sinais osteoindutivos e induzir resposta em células tronco adultas e células osteogênicas. Diversos fatores de crescimento (FC), que são proteínas com um importante papel no processo indutivo, têm sido avaliados com relação ao seu potencial terapêutico em regeneração de defeitos em segmentos ósseos. Dentre os fatores de crescimento temos: proteínas morfogenéticas ósseas (PMOs), fator de crescimento transformante beta (FCT- β), fator de crescimento de fibroblastos (FCF), fator de crescimento semelhante à insulina (FCI), fator de crescimento vascular (FCV), fator de crescimento derivado de plaquetas (FCDP) e fator de crescimento de células estromais (FCCE) (MEHTA et al., 2012).

Os osteoblastos são as células diretamente relacionadas com a formação e reparo ósseo, são de origem mesenquimal, derivados da parte da medula óssea não hematopoiética que contém células tronco mesenquimais. A diferenciação dos osteoblastos é controlada por vários fatores de crescimento, hormônios e fatores de transcrição. As PMOs pertencem à superfamília do FCT- β , esses fatores podem ter uma influência direta na atividade dos osteoblastos ou um efeito em outros reguladores do crescimento ósseo (MEHTA et al., 2012).

2.2 – A ENGENHARIA E OS MATERIAIS BIOLÓGICOS

A Engenharia e Ciência dos Materiais é uma disciplina ainda considerada nova, que teve seu início em 1950 e, desde então, os seus estudos têm sido focados nos metais, polímeros, cerâmicas e a mistura desses materiais, formando os compósitos. Os materiais biológicos desde 1990 tem se tornado o foco de atenção dessa disciplina e, a partir dessa data as pesquisas na área estão em constante crescimento. Os estudos da Ciencia dos Materiais estão baseados na confluência dos conhecimentos adquiridos através da química, bilogia e física possibilitando aos cientistas dos materiais resolverem, ou pelo menos se aproximarem das soluções, de problemas

científicos multidisciplinares complexos dos sistemas biológicos (MEYERS et al., 2008).

Os sistemas biológicos possuem determinadas características como a capacidade de evolução e a multifuncionalidade que estimula os cientistas a buscarem formas de imitar nos materiais sintéticos essas características dos naturais. Pode ser dado destaque a algumas áreas das pesquisas e atividades no campo da Ciência dos Materiais:

- Materiais biológicos – que são materiais e sistemas encontrados na natureza.
- Materiais bioinspirados (ou imitação biológica) – materiais sintetizados inspirados em materiais biológicos.
- Biomateriais – são materiais projetados especialmente para melhor compatibilidade com sistemas biológicos.
- Biomateriais e dispositivos funcionais – são materiais utilizados para exercer funções biológicas no organismo (MEYERS et al., 2008).

2.2.1- CARACTERÍSTICAS DE OSSOS HUMANOS E OUTRAS ESPÉCIES

A microestrutura dos ossos apresenta diferenças significantes entre as espécies. Esse compósito natural varia de um animal para outro e sofre forte influência de fatores tais como idade, doença e atividades. Como pode ser visto na Figura 2 enquanto a estrutura do osso humano maduro foi confirmada ser osteonal secundária, a osteonal primária foi observado na do coelho. Os ósteons do coelho possuem em média um diâmetro máximo de $223,79 \pm 47,69 \mu\text{m}$ e mínimo de $50,79 \pm 9,71 \mu\text{m}$ (WANG, MABREY, AGRAWAL, 1998; MARTINIAKOVÁ et al., 2005).

Outra diferença importante encontrada em coelhos é a presença de um polimorfonuclear eosinofílico com grânulos alongados chamados heterófilos, que substituem os polimorfonucleares com grânulos redondos denominados neutrófilos, representando uma exceção entre os mamíferos (PEREIRA et al., 1985).

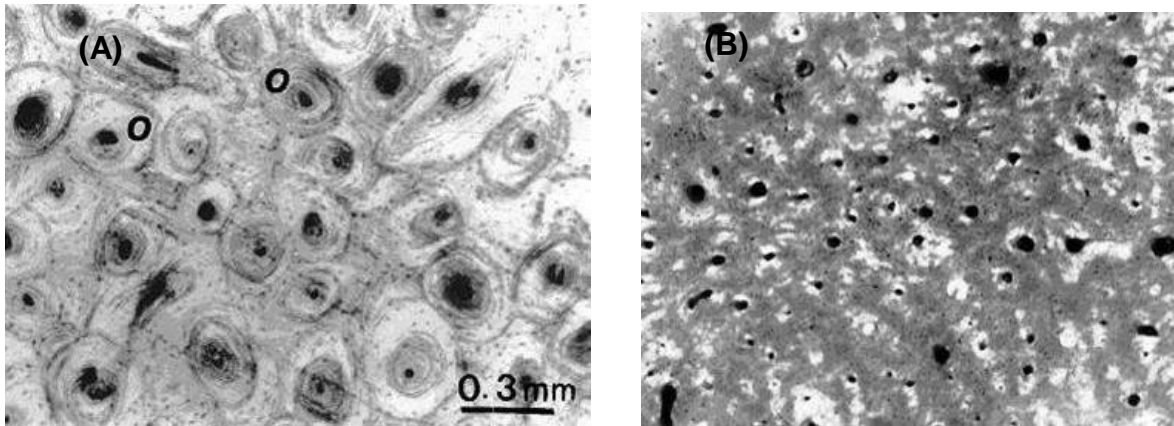


Figura 2 – Micrografia ótica refletida das estruturas ósseas: (A) Humana, (B) Coelho (WANG, MABREY, AGRAWAL, 1998).

Também pode ser visto na Tabela 1 que propriedades mecânicas, como resistência à fratura, variam entre as espécies, podendo a diferença ser atribuída à microestrutura dos ossos, além de propriedades físicas e de composição (colágena e mineral). Resultados de estudos mostraram que a deformação de ossos longos é relativamente constante entre as espécies e que o peso do animal junto com as propriedades do material do tecido ósseo determina o nível de tensão presente em um determinado osso. Tanto no envelhecimento quanto na doença o osso sofrerá alterações importantes na sua geometria, composição e arquitetura, que exercem influência nas propriedades mecânicas e consequente mudança na resposta do osso ao carregamento (WANG, MABREY, AGRAWAL, 1998; LIEBSCHINER, 2004).

Tabela 1 – Representação de dados experimentais, obtidos da espécie humana e de alguns animais (WANG; MABREY; AGRAWAL, 1998).

Espécie	K_c (MPa m)	d_m (g/cm ³)	d_c (g/cm ³)	VF _m (%)	VF _c (%)
Humana	2,05±0,24	2,49±0,14	1,24±0,07	46,9±4,8	42,2±4,4
Bovina	1,81±0,18	2,69±0,04*	1,28±0,03	59,0±2,4*	33,3±2,5*
Canina	2,29±0,24*	2,71±0,09*	1,33±0,08	48,9±2,4	41,4±2,1
Babuína	2,17±0,27	2,48±0,05	1,28±0,03	51,6±6,1	39,2±6,3
Coelho	1,89±0,21	2,51±0,10	62,8±6,3*	62,8±6,3*	28,4±3,3*

O asterisco * destaca diferença estatística comparada a valores correspondentes ao humano ($p < 0,05$). K_c é a resistência à fratura longitudinal, d_m é a densidade mineral do osso, d_c é a densidade da fase orgânica, VF_m é a fração do volume da fase mineral e VF_c é a fração de volume da fase orgânica do osso.

Os dados mostram que o osso canino é o que possui maior resistência à fratura, seguido pelo osso humano, do babuíno, do coelho e o bovino. As superfícies de fratura do osso do coelho quando analisadas ao MEV por Wang (1998), apresentou numerosos canais vasculares orientados longitudinalmente, com pequenas fibrilas na superfície, foi verificado assim diferença morfológica comparada às outras espécies e ao osso humano que contém feixes longos de colágeno com minerais em sua superfície.

Associando os conhecimentos da morfologia com as propriedades mecânicas também destacadas Na Tabela 2, como valores de tração, compressão e de torção do osso cortical e trabecular, permite concluir que existe uma notada semelhança na resistência entre as várias espécies, mesmo com as diferenças de tamanho e função óssea dos animais. Propriedades mecânicas do osso trabecular de pequenos roedores não foram quantificadas devido ao reduzido tamanho da amostra, apesar dos pequenos roedores serem os animais mais utilizados na engenharia dos tecidos ósseos (LIEBSCHINER, 2004).

Tabela 2 – Propriedades mecânicas do tecido ósseo cortical e trabecular – Módulo de Young (E), Resistência (MPa) de várias espécies (LIEBSCHINER, 2004).

Tecido ósseo cortical					
Espécie	Osso	Teste	E (GPa)	Resistência (MPa)	Referências
Humana	Fêmur	Tração	16,7	166	Currey, 1998
	Tíbia	Tração	18,9–29,2	145–170	Burstein, 1976
	Fêmur	Compressão	14,7–19,7	167–215	Reilly, 1974
	Fêmur	Flexão	9,82–15,7	103–238	Keller, 1990
	Tíbia	Flexão	6,75±1,00	150–180	Choi, 1990
Bovina	Fêmur	Tração	24,1–27,6	133	McElhaney, 1964
	Tíbia	Tração	21,9–31,4	240–295	Reilly, 1974
	Fêmur	Compressão	20,5	92	McElhaney, 1964
	Fêmur	Torção	-	76±6	Cezayirlioglu, 1985
Coelho	Fêmur	Flexão	13,6±4	137±6	An, 1996
	Tíbia	Flexão	23,7±7	192±47	Ayers, 1996
Tecido ósseo trabecular					
Espécie	Sítio anatômico	Densidade aparente	E (MPa)	Resistência (MPa)	Referências
Humana	Fêmur distal	0,24±0,09	50–500	1,5–45	Carter, 1977
	Tíbia proximal	0,29±0,10	445±257	5,2±2,9	Linde, 1989
	Corpo vertebral	0,17±0,04	291±113	2,23±0,95	Kopperdahl, 1998
Ovelha	Corpo vertebral	0,60	1510±784	22,3±7,1	Mitton, 1997
Canina	Fêmur distal	0,44±0,16	209±140	7,1±4,6	Kuhn, 1989
	Tíbia proximal	0,41-0,83	106–426	2–24	Kang, 1998

Na Figura 3 está representado o módulo de elasticidade e a tensão máxima de diferentes biomateriais utilizados em ortopedia e odontologia em comparação com o osso humano, com o de alguns animais e a cartilagem humana. A estrutura fibrosa do

osso, representada pelo colágeno, atua como matriz, exibindo um comportamento tanto microscópico quanto macroscópico dos seus componentes, tornando-o diferente dos materiais compósitos da engenharia. A composição do osso é: mineral (hidroxiapatita, $\approx 1/3$ do peso seco, $\approx 1/2$ do volume) e orgânica (colágeno, $\approx 1/3$ do peso seco, $\approx 1/2$ do volume) e água (LIEBSCHINER, 2004).

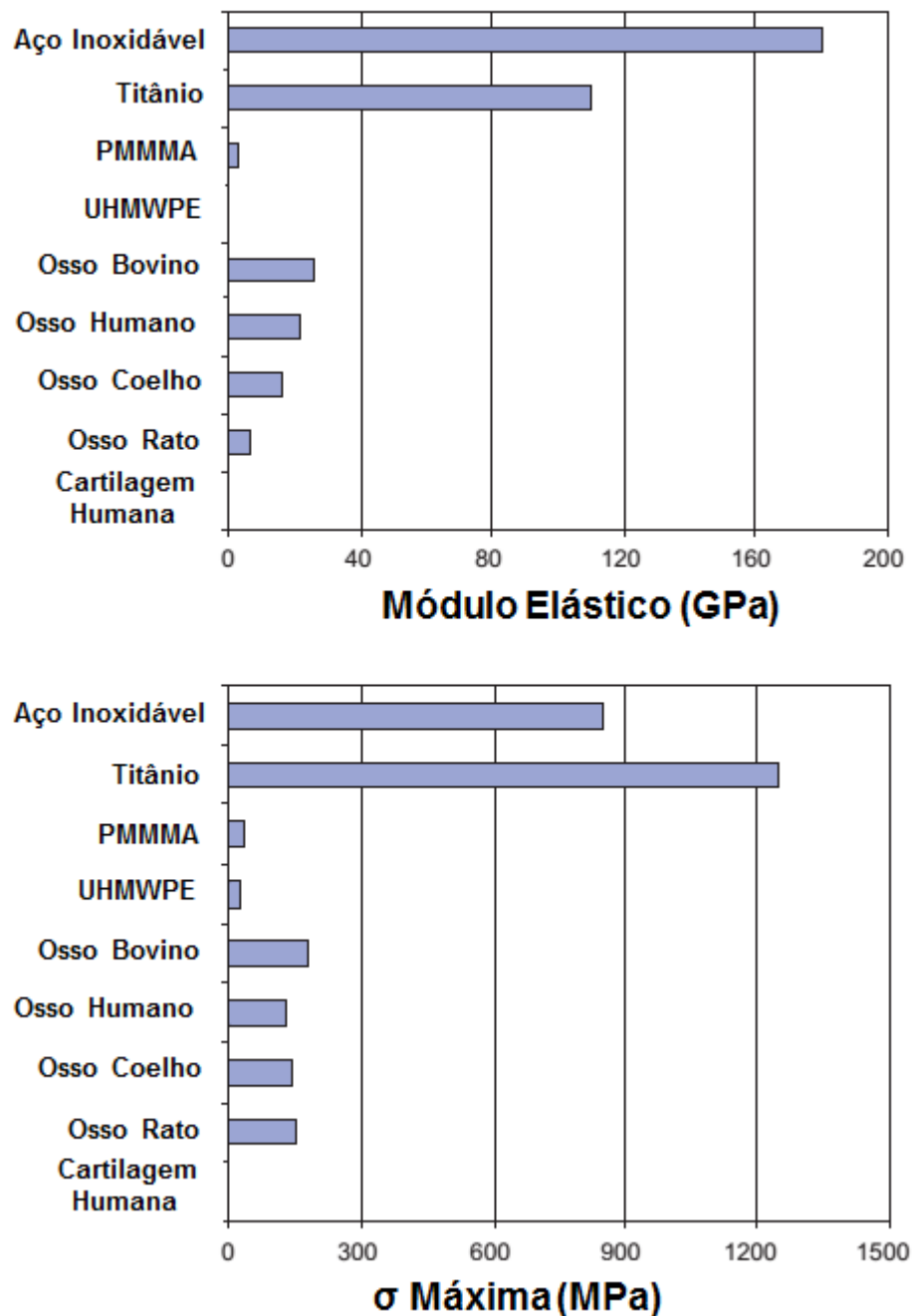


Figura 3 – Comparação do Módulo Elástico e σ Máxima de tecidos naturais (cartilagem e osso cortical) e biomateriais (LIEBSCHINER, 2004).

Para determinar as propriedades mecânicas do osso são utilizados os mesmos testes mecânicos utilizados para determinar as propriedades de biomateriais compósitos e materiais da engenharia. De acordo com o objetivo do estudo serão determinados os testes mecânicos necessários.

2.2.2 – ENSAIOS MECÂNICOS

Existem três testes básicos mecânicos estáticos que são utilizados rotineiramente para caracterizar biomateriais e ossos, são eles: tração, compressão e torção. Outro teste que também é utilizado frequentemente é o teste de flexão que associa tração com compressão. Devido o osso ser um material anisotrópico a direção principal do stress pode não ser a mesma direção principal da deformação, ou seja, o comportamento mecânico do osso é dependente da direção em que a carga é aplicada. Sendo assim, para uma caracterização completa das propriedades mecânicas de um material anisotrópico, os testes mecânicos deverão ser realizados em várias orientações diferentes (LIEBSCHINER, 2004).

O eixo longitudinal de um osso cortical coincide com o sentido da distribuição dos ósteons em uma matriz óssea. Um teste mecânico como o de flexão, de acordo com o sentido do carregamento poderá produzir diferentes tipos de fissuras. Será uma fissura longitudinal, quando a força aplicada estiver no mesmo sentido dos ósteons, quando no sentido perpendicular aos ósteons, produzirá uma fissura transversal, podendo ainda ser chamada fissura radial quando o carregamento for realizado na direção radial do osso. Também um teste mecânico uniaxial poderá ser realizado em um osso da mandíbula em duas direções específicas, de modo que se o carregamento estiver na direção súpero-inferior, determinará o sentido axial ou quando aplicado médio-lateralmente, o sentido será transversal (LI, ABDEL-WAHAB, SILBERSCHIMIDT, 2013; GIESEN et al., 2001).

Foi demonstrado por GIESEN (2001), através do teste mecânico de compressão uniaxial, que a densidade óssea e a direção do carregamento podem alterar os valores referentes ao módulo do osso, quando obteve o módulo na direção axial de 4,217 MPa e na transversal de 2,786 MPa, em ossos do côndilo de mandíbula humana.

Um teste que tem sido utilizado para caracterizar propriedades microscópicas do tecido ósseo é o teste de microindentação. Microindentação é utilizada

normalmente para avaliar propriedades elásticas em unidades estruturais ósseas tanto do osso cortical como do trabecular. A microdureza é determinada através da medida da impressão de um indentador de diamante que é introduzido na superfície de uma amostra, com uma determinada força. Microindentação permite identificar um tecido altamente danificado ou um tecido intacto, trabecular ou cortical, extraído de coluna vertebral de humanos *in vitro* (DALL'ARA et al., 2012).

Os nanoindentadores foram inicialmente utilizados para sondar propriedades de superfície de filmes finos e posteriormente utilizados em tecidos biológicos incluindo o tecido ósseo. Como pode ser visto na Figura 4 as medidas de indentação podem ser específicas da estrutura que se deseja analisar no ambiente biológico, após polimento progressivo com papel de carboneto de silício, terminando manualmente com um pano macio com pasta de diamante de 0,25 μm e limpeza em ultrassom com água destilada por 10 min (HOFFLER et al., 2005).

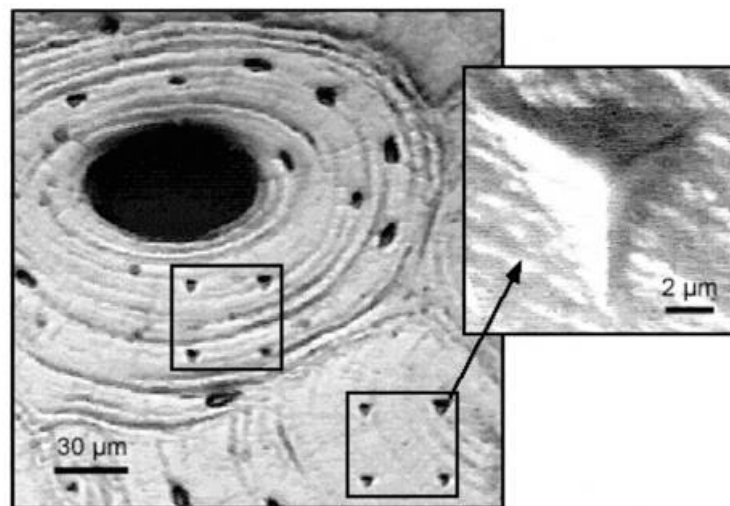


Figura 4 – Microscopia mostrando a microestrutura do tecido ósseo osteonal e intersticial com a indentação correspondente de 30 μm , destacada no quadrado (seta preta). Típica impressão de indentação piramidal (HOFFLER et al., 2005).

Nanoindentador é capaz de medir, por exemplo, uma carga de 0,3 μN com deslocamento em 0,16 nm. Com esse teste pode ser adquirido dados mecânicos a nível lamelar, como dureza e módulo de elasticidade, possibilitando a caracterização, por exemplo, do ambiente mecânico de um osteon. Microindentação tem sido desenvolvida para ser utilizada inclusive para avaliar propriedades mecânicas em tecido ósseo humano *in vivo* (DIEZ-PEREZ et al., 2010).

2.2.3 – BIOMATERIAIS

2.2.3.1 – POLÍMERO/CERÂMICA

Polímeros biodegradáveis são encontrados em duas categorias: uma cuja base é natural, como polissacarídios ou proteínas e outra de polímeros sintéticos. Os polímeros sintéticos tem a vantagem de serem produzidos de forma controlada e por isso podem ter propriedades mecânicas (resistência à tração, modulo de elasticidade, etc.), físicas e taxas de degradação previsíveis e reproduzíveis. Ainda tem a vantagem de ser possível controlar impurezas do material, bem como redução dos riscos de infecção, imunogenicidade e toxicidade, em função da unidade monomérica de um polímero sintético poder ser uma estrutura simples e bem conhecida (REZWAN et al., 2006).

Devido a sua biodegradabilidade, polímeros sintéticos e naturais, são ótimos candidatos para serem utilizados em substituição ao tecido ósseo e cartilagem. Matrizes poliméricas nanoporosas ou de nanofibras podem ser fabricadas por alguns processos como: eletro spinning, separação de fases, lixiviação de partículas, ataque químico e técnicas de impressão 3-D (ZHANG e WEBSTER, 2009).

Os polímeros sintéticos biodegradáveis, ao passarem pelo processo de erosão das partes mais volumosas podem apresentar falha prematura da estrutura e, também a liberação rápida desses produtos ácidos na degradação podem provocar uma resposta inflamatória, que poderá ser acentuada. Uma pesquisa realizada com o ácido poliglicólico, utilizado como matriz mostrou que a perda da integridade mecânica ocorreu de duas a quatro semanas após sua implantação (BERGSMA, et al., 1993). O tempo de degradação dos polímeros deverá ser observado e ajustado às necessidades de suporte mecânico do material implantado (REZWAN et al., 2006; ARMENTANO et al., 2010).

Dentre os polímeros sintéticos biodegradáveis utilizados pela engenharia de tecidos, estão os ésteres saturados poli- α -hidroxi, dentre eles o poli (ácido lático) (PLA) e o poli (ácido glicólico) (PGA). Esses polímeros têm propriedades químicas que possibilitam a sua degradação em solução aquosa ou *in vivo* através de esterificação. Após a degradação os componentes monoméricos de cada polímero são eliminados por vias naturais, pois o corpo possui mecanismos altamente regulados para remover por completo componentes monoméricos dos ácidos lático e glicólico. Por possuir tais propriedades esses ácidos são utilizados em diversos

dispositivos, produtos médicos e odontológicos, como por exemplo, suturas degradáveis (MANO et al., 2004).

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres alifáticos produzidos por microrganismos em condições de crescimento desequilibrado, que são geralmente biodegradáveis por via hidrolítica e termoprocessáveis. Um dos PHAs, o poli-3-hidroxi butirato (PHB), tem sido de grande interesse para aplicação em defeitos ósseos. Foi demonstrado, quando implantado por um período de um ano, não desencadear resposta inflamatória e ter uma boa adaptação ao osso. O tecido ósseo do sítio receptor foi formado, na superfície do material, em pelo menos 80% do PHB implantado, passando posteriormente por maturação e organização estrutural (DOYLE; TANNER; BONFIELD, 1991).

Uma desvantagem que é comum a alguns polímeros dentre os PHAs é a sua produção limitada. A limitação se deve a demora no tempo de extração, que acontece a partir de culturas bacterianas necessárias para a obtenção de quantidade suficiente ao processamento, podendo tornar a extração um desafio para a produção industrial (DOI, KITAMURA, ABE, 1995). A principal vantagem de alguns polímeros biodegradáveis na engenharia de tecido ósseo é a sua capacidade de suportar o crescimento e a remodelação do tecido, durante seu tempo de vida funcional, até ser reabsorvido pelo organismo (PLANELL et al., 2009; LIU, LIM e TEOH, 2012).

Com relação às cerâmicas, pode ser dado destaque a sua principal característica que é a notável biocompatibilidade. Entre as várias cerâmicas existentes as do grupo fosfato de cálcio como a hidroxiapatita e a fosfato tricálcio são as mais utilizadas. Entretanto a cerâmica apesar de possuir um módulo de elasticidade alto, é frágil e possui baixa resistência à fratura, sendo por isso mais utilizada em condições de carga de compressão. A cerâmica possui alta dureza e ainda uma propriedade importante referente à tribologia, ou seja, apresenta uma taxa de desgaste de superfície muito baixa (0,003mm/ano) quando comparada a metais e polímeros (SKINNER, 1999; LIU, LIM e TEOH, 2012).

Devido a grande semelhança química e cristalina das cerâmicas fosfatadas com a fase mineral do osso, uma vez que o osso é composto por aproximadamente 60%(m/m) de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$, pode ser verificada uma alta biocompatibilidade. Uma modificação cinética observada na superfície das cerâmicas que ocorre após um determinado tempo de implantação, dá origem a uma camada biologicamente ativa: a hidroxiapatita carbonatada (HCA) que é responsável pela

interface de ligação com os tecidos. Essa fase da camada de HCA formada sobre implantes bioativos possui semelhança química e estrutural à fase mineral do osso e proporciona a ligação interfacial (HENCH, 1991; REZWAN et al., 2006). Apesar de não apresentar osteoindutividade, a cerâmica fosfato possui apropriadas propriedades osteocondutivas e, permite também que células, como osteoclastos e mesenquimais, realizem seu desempenho básico biológico de fixação, crescimento e multiplicação (LIM e TEOH, 2012).

Na Tabela 3 estão relacionados alguns polímeros que podem ser utilizados junto com cerâmicas como biomateriais compósitos. A adição de polímero biodegradável tem como objetivo aumentar a degradabilidade do compósito e alterar suas propriedades físico/mecânica visando também reduzir a fragilidade da cerâmica (HABRAKEN et al., 2007; REDDY et al., 2013).

Tabela 3 – Relação dos polímeros usados em compósitos com cerâmicas até o momento (REZWAN et al., 2006; HABRAKEN et al., 2007).

Grupo	Polímeros
Poliésteres alifáticos saturados	Ácido polilático (PLA, PLLA, PDLLA), ácido poliglicólico (PGA), poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA), poli-e-caprolactona (PCL).
Poliésteres alifáticos produzidos por microrganismos	Poli-3-hidroxi butirato (PHB), poli-4-hidroxi butirato (P4HB), poli-3-hidroxi octanoato (PHO), poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) (PHBHHx), poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBV).
Proteínas	Colágeno, gelatina, fibrina, caseína, peptídeos.
Carboidratos	Quitina, quitosana, celulose, hidroximetilpropilcelulose (HPMC), amilopectina.
Outros polímeros	Poli(propileno fumarato) (PPF), policarbonato, poli(1,8-octanodiol-citrato) (POC), poli(etileno glicol) (PEG), poli(etileno imina) (PEI), poli(óxido de etileno) (PEO), polipropileno (PP), nilon, aramida, poli(alilamine hidróclorido) (PAH).

2.2.3.2 – COMPÓSITOS

Nos materiais compósitos podemos combinar as propriedades que desejamos de diferentes materiais, para obtermos um efeito sinérgico nas propriedades dos novos materiais (WILLIAM e CALLISTER, 2007). Essa teoria é utilizada para materiais compósitos, na engenharia de tecido ósseo, visando contornar várias falhas possíveis de acontecer em função da deformação, da tenacidade à fratura e ausência de biocompatibilidade quando biomateriais como cerâmica, polímeros ou metais são utilizados isoladamente (LIU, LIM e TEOH, 2012).

Um compósito possui duas fases: uma fase matriz e uma fase dispersa. A fase dispersa é geralmente mais dura e mais rígida para impedir o movimento de fase da matriz, enquanto a fase matriz, que é contínua, exerce como principal função a transferência de tensão. Os compósitos podem ser classificados em reforçados com fibras, reforçados com partículas e estruturais (WILLIAM e CALLISTER, 2007). Geralmente um aumento na porcentagem em volume na fase dispersa irá resultar em uma maior rigidez devido à elasticidade combinada. Em engenharia de tecido ósseo, compósitos scaffolds geralmente possuem a matriz de polímero e a fase dispersa uma cerâmica, resultando em melhores suportes de carga em compressão, melhor bioatividade e interação da interface implante-hospedeiro melhorada (HUTMACHER, 2000; REZWAN et al.; 2006; LIU; LIM; TEOH, 2012).

Trabalhos do grupo de pesquisa “Polímeros a partir de Recursos Renováveis” têm formulado compósitos PHB/HAP utilizando uma metodologia de “aquecimento sob pressão” sendo a temperatura de pressão selecionada por caracterização térmica de 5°C acima do ponto de fusão (175°C) do PHB. A instabilidade térmica do PHB a temperaturas próximas à temperatura de fusão deve ser considerada como um fator importante na preservação das propriedades mecânicas da matriz, devendo ser evitado aquecimentos acima da temperatura final (T_f) ou períodos longos de aquecimento a temperaturas próximas (GALEGO et al., 1999).

A forma de distribuição das partículas de HAP na matriz polimérica do PHB nas variadas proporções foi verificada por Siqueira (2009), por avaliação da região da fratura dos corpos de prova após o teste de flexão, através da microscopia. Nessas avaliações pode ser verificado que na estrutura interna a proporção com maior homogeneidade aparente foi a PHB/HAP (54/46), o que poderá possibilitar melhora na integração com o leito receptor. Esse corpo de prova além de mostrar maior

homogeneidade tem em sua formulação maior proporção de HAP, que por ser bioativa deve também favorecer reforçando a integração com a estrutura óssea vizinha (SIQUEIRA, 2009).

A busca pela distribuição homogênea da HAP na matriz polimérica nos corpos de prova continuará nesse estudo atual, usando agora 18% de n-HAP distribuída em uma matriz polimérica modificada com um método de formulação diferente do utilizado no trabalho citado anteriormente, o Spray Dryer. Nesse método o polímero irá revestir os grânulos de nanohidroxiapatita.

2.2.3.3 – ENXERTO TRIDIMENSIONAL

Com o aumento dos tipos de lesões ósseas foi aumentando as expectativas com relação aos biomateriais, o que fez com que os pesquisadores analisando a complexidade do tecido ósseo percebessem que não seria possível preencher as necessidades utilizando as propriedades de um único material. A formulação de biomateriais compósitos torna-se possível por requisitos rigorosos, levando ao surgimento de novas manufaturas e métodos de fabricação de materiais. Desse modo, uma construção intercalada biomecanicamente, quando utilizada em algum membro de um animal, permite que ele continue exercendo os movimentos rotineiros necessários. Existem dois tipos principais de enxertos com construção intercalada: o *scaffold* e o enxerto ósseo (HARRIS et al., 2013).

Scaffold é uma matriz tridimensional que tem sido desenvolvida pela engenharia tecidual para substituição de tecidos, serve como um molde que orienta a formação do tecido. As matrizes têm como objetivo permitir e favorecer a proliferação de células coletadas e cultivadas, podendo promover a obtenção do aspecto tridimensional do tecido ou órgão que se deseja reconstituir, tanto podem ser de origem natural quanto sintética. As naturais podem simular o ambiente celular, as sintéticas, dentre elas os polímeros, apresentam também a vantagem de controlar melhor algumas propriedades intrínsecas dos materiais, como a absorção, taxa de degradação, dentre outras (GE et al., 2004).

Inicialmente os *scaffolds* feitos pela Engenharia de Tecidos eram preparados apenas com materiais cerâmicos, atualmente a maioria das pesquisas relaciona os *scaffolds* a compósitos polímero/cerâmica. *Scaffolds* de materiais cerâmicos constituem um apropriado material de implante para tecido ósseo de engenharia, pois

se pode introduzir micro e macro porosidade, formar uma matriz apropriado para células e até servir, por exemplo, como um veículo distribuidor de drogas osteoindutivas. Entretanto, existem alguns problemas difíceis de solucionar com o *scaffold* unicamente cerâmico, dentre eles a baixa degradabilidade do material e pobre propriedade mecânica, como baixa resistência à fratura (REZWAN et al., 2006). Na Tabela 4 estão as características funcionais desejáveis para a construção de *scaffolds*.

Enxertos ósseos, outro tipo de enxerto com construção intercalada, são muito utilizados como preenchimentos de cavidades ósseas. Quanto a sua origem animal são denominados: autoenxerto quando o osso é retirado e recolocado no mesmo animal, assim não será desvitalizado; como aloenxerto quando é retirado de um animal, cuja genética é diferente da genética do animal que será hospedeiro, porém que pertence a mesma espécie; por último temos o isoenxerto, que ainda não está disponível para a prática clínica, utilizado apenas em pesquisa animal especificamente em modelo de murino, onde um osso desvitalizado é apanhado de um animal e implantado em outro animal geneticamente idêntico (HARRIS et al., 2013).

Desvantagens são encontradas nos dois tipos de enxertos utilizados clinicamente podendo ser destacado para o autoenxerto a quantidade limitada de osso e a necessidade de entrada cirúrgica em dois locais. No caso do aloenxerto pode ser citada como desvantagem a possibilidade de transmissão de doenças, infecção subsequente, presença de micro fraturas e perda de integridade mecânica. Apesar dessas desvantagens, quando comparado ao implante metálico a taxa de sucesso dos enxertos ósseos continua a ser promissora e diante desse conhecimento cresce a busca por projetos alternativos de enxertos sintéticos (HARRIS et al., 2013).

Vários são os métodos de fabricação de *scaffolds* altamente porosos de compósitos n-HAP/polímero, dentre eles: (1) evaporação de solvente, (2) separação de fase induzida termicamente, (3) eletro spinning, (4) mineralização in situ de HAP em polímeros, (5) eletrodeposição e (6) métodos de microestrutura em 3-D. O desafio da nanotecnologia está na habilidade de controlar as propriedades dos materiais reunindo materiais semelhantes na nanoescala (ZHANG; WEBSTER, 2009).

Tabela 4 – Critérios e condições funcionais para a construção de *scaffolds* usado em aplicações da engenharia de tecido ósseo (LIU, LIM e TEOH, 2012).

Critérios	Funções
Biocompatibilidade	Capacidade de desempenhar sua função no tecido hospedeiro sem estimular resposta imune.
Biodegradabilidade	Taxa ajustável de degradação para coincidir com crescimento de novo tecido ósseo como suporte e ser substituído por osso novo.
Propriedades mecânicas	Resistência mecânica suficiente para fornecer apoio temporário para a região do defeito e suportar as forças de carga <i>in vivo</i> .
Microarquitetura	Estruturas de <i>scaffold</i> interligadas para distribuir uniformemente as tensões ao longo do <i>scaffold</i> .
Osteoindutividade	Propriedades osteoindutoras para recrutar e diferenciar osteoprogenitores à região do defeito.
Porosidade	Grande área de superfície: volume e tamanho dos poros para permitir tecido em crescimento, a neovascularização, transporte de massa e osteogênese.
Propriedades de superfície	Apropriadas propriedades topográficas e químicas para influenciar a adesão, proliferação e diferenciação celular.

As pesquisas seguem buscando aprimoramento de técnicas e materiais para aumentar a cicatrização, com foco na melhora da integração do enxerto-hospedeiro, aumento na incorporação do enxerto utilizado e por fim a substituição completa desse enxerto por um novo osso do hospedeiro. Outro fator importante é o enxerto possibilitar suporte de peso imediato, sem necessitar de um dispositivo de fixação externa, visando melhorar a qualidade de tratamento aos doentes e ainda possibilitar redução de custos adicionais. Conseguindo reunir essas qualidades o scaffold, como enxerto de construção intercalada, caminha em direção à substituição do aloenxerto (HARRIS et al., 2013).

2.2.3.4 – INFLUÊNCIA DA POROSIDADE

O tamanho de poros de um biomaterial influencia o comportamento celular. Em presença de osteoblastos foi observado que os poros menores, com dimensão aproximada de 40 μm , favorecem o aglomerado de células, enquanto poros maiores, com aproximadamente 100 μm , aceleram a migração celular. Assim, Thein-Han e Misra (2009) mostraram o bom desempenho do polímero quitosana e do scaffold

formado por quitosana/nHA, ambos com poros com dimensões variadas, possibilitando fixação, migração celular e formação de tecido em sua superfície.

Uma matriz porosa não é condição *sine qua non* para que ocorra a aderência celular e formação de novos vasos, entretanto pesquisas tornaram evidente que a porosidade melhora a fixação celular e aumenta a formação vascular, que são aspectos fundamentais para o bom desempenho de um implante utilizado como preenchimento (HARRIS et al., 2013).

Os biomateriais compósitos biodegradáveis usados até o momento não apresentam suporte mecânico suficiente para serem utilizados em defeitos ósseos localizados em áreas sujeitos à carga. Na Figura 5 pode ser visto o módulo de elasticidade e a resistência à compressão da cerâmica bioativa densa, polímeros biodegradáveis, osso esponjoso e cortical, comparados a suportes porosos de fase única e compósitos dos mesmos, que foram demonstrados em alguns estudos presentes na literatura (KIM, KNOWLES, KIM, 2004; BLAKER et al., 2005; JONES, EHRENFRIED, HENCH, 2006; REZWAN et al., 2006). As pesquisas mostraram ainda que alguns polímeros densos apresentam propriedades próximas às do osso esponjoso e aproximam-se também das propriedades do osso cortical. Quanto às cerâmicas, regiões das cerâmicas bioativas possuem propriedades com uma relação bem próxima das do osso cortical. Matrizes porosas apresentam diferença de uma ordem de grandeza para o osso esponjoso e de várias ordens para o osso cortical (REZWAN et al., 2006).

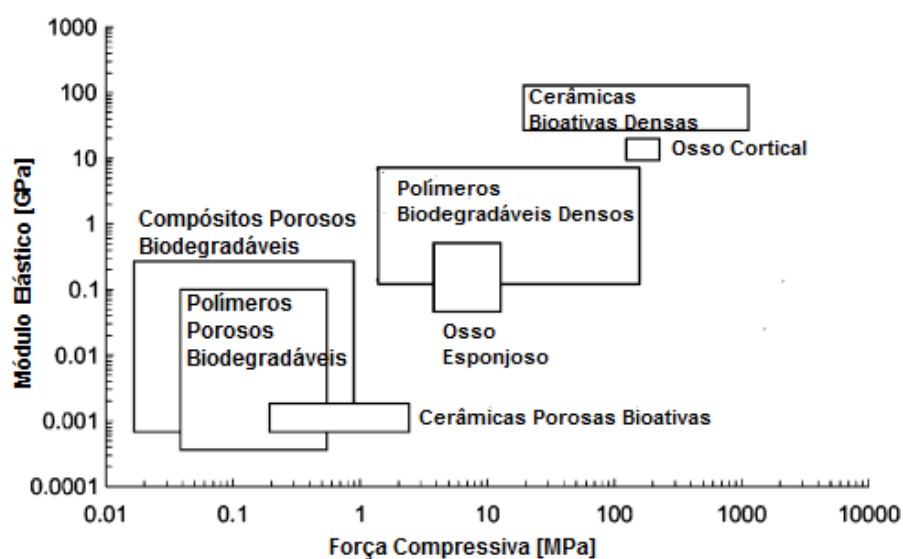


Figura 5 – Módulo elástico X força compressiva de polímeros biodegradáveis, cerâmicas bioativas e compósitos. Porosidades dos *scaffolds* são > 75% e normalmente interconectados (REZWAN et al., 2006).

A construção de um substituto ósseo que seja poroso e ao mesmo tempo forte continua sendo um grande desafio. Nas avaliações feitas em compósitos naturais e ou estruturas híbridas, como o osso e dentes, foi concluído que eles têm propriedades que são muito superiores às suas fases constituintes individuais. Essas propriedades são determinadas pela deformação e fratura da sua estrutura, de composição única, que possui desde moléculas até componentes de escalas de comprimentos macroscópicos. Não existe ainda biomaterial sintético com essa estrutura complexa, mas os sinais naturais apontam para a necessidade da combinação de mecanismos que atuem na múltipla escala de comprimentos, para serem alcançadas propriedades mecânicas melhores que consigam então suprir as necessidades naturais (SAIZ et al., 2013).

2.3 – NANOMATERIAIS

Em 1959 o vencedor do prêmio Nobel Richard Feynman, em uma conferência na Reunião da Sociedade Americana de Física fez germinar a idéia da nanotecnologia quando sugeriu a construção de novos materiais a partir do manuseio de átomos. Em 1964, Norio Tanaguchi, professor da Tokyo Science University, publicou um artigo utilizando pela primeira vez o termo “nanotecnologia” em uma publicação científica e, nas últimas décadas o avanço das pesquisas em torno desse assunto tem sido marcante.

Nanomateriais são materiais com unidades estruturais básicas como: grãos, partículas, fibras ou outros componentes constituintes menores que 100 nm em pelo menos uma dimensão (ZHANG e WEBSTER, 2009).

2.3.1 – MORFOLOGIA DOS NANOMATERIAIS

A distribuição da forma, tamanho e superfície específica das partículas dos materiais exercem grande influência não só na mudança das propriedades mecânicas como nas biológicas, sendo assim com base em parâmetros já conhecidos os estudos vem avançando na procura por materiais que possam suprir as deficiências dos já existentes. Nas últimas décadas, pode ser observada a evolução do foco da pesquisa passando pela escala micrométrica e chegando a nanométrica em busca de um

biomaterial que possa preencher as necessidades dos tecidos humanos (ENGEL et al., 2007).

Os nanomateriais podem ser formulados e apresentados como partículas, fibras, tubos ou dispositivos. As nanopartículas podem ser produzidas a partir de diferentes tipos de materiais, alguns exemplos e suas aplicações estão citados na Tabela 5. As nanopartículas podem ter variadas formas de apresentação: sólidas, porosas ou ocas (vazias). As aplicações das nanopartículas na engenharia de tecidos (ET) dependem normalmente das propriedades dos materiais (ENGEL et al., 2007).

Tabela 5 – Nanopartículas e aplicações biomédicas (ENGEL et al., 2007).

Nanopartículas	Aplicações
Nanopartículas de titânia	Fase reforço em materiais compósitos para <i>scaffold</i> na ET
Pontos quânticos	Amplificadores, marcadores, sensores biológicos para biorreatores e ET
Nanopartículas de hidroxiapatita	Reforço de fase em materiais compósitos para ET, carreadores de biomoléculas
Nanopartículas de polímeros biodegradáveis	Fase reforço em materiais compósitos para ET, sistema de liberação controlada de biomolécula para ET, imunoterapia
Nanopartículas poliméricas para estímulos sensitivos	Portadores de biomoléculas, ET

As nanofibras podem ser feitas de diversos tipos de materiais, tanto sintéticos como naturais, ou mesmo a combinação dos dois tipos. Existem diversos métodos usados pela ET para a produção de nanofibras dentre eles; eletrospinning, separação de fases e automontagem. A Tabela 6 apresenta alguns dos materiais usados e as respectivas fibras obtidas. Buscando imitar a estrutura dos tecidos que necessita de reparos, a engenharia de tecidos projetou e fabricou uma construção 3-D. As nanofibras apresentam uma grande área de superfície e proporcionam uma arquitetura altamente porosa, com poros interligados, o que facilita a colonização das células, além de uma eficiente troca de nutrientes e carreamento de metabólicos entre o scaffold e o ambiente (ENGEL et al., 2007).

Tabela 6 – Nanofibras como *scaffolds* para aplicações na ET (ENGEL et al., 2007).

Materiais	Aleatória/ Alinhada	Diâmetro Médio	Aplicações
Polímeros sintéticos			
PLLA	sim/sim	50–350 nm	Implante neural ET Tecidos moles
PLGA	sim/não	500–800 nm	Cartilagem ET
PCL	sim/?	500–900 nm	Músculo liso, céls. endoteliais,
PLLA-CL	sim/sim	0.4–1.2 mm	engenharia dos vasos sanguíneos
Polímeros naturais			
Pele (com HAP/BMP-2)	sim/não	-	Engenharia de tecido ósseo
Colágeno	sim/sim	250 nm	Fibroblastos
Quitosana+PVA	sim/não	170–700 nm	-
Quitosana+PEO	sim/não	38–62 nm	Condrócitos e osteoblastos
Fibrinogênio	sim/não	320–600 nm	Fibroblastos cardíacos

Nanotubos de carbono é outro tipo de nanomaterial que, desde a sua descoberta em 1991, tem sido indicado para diversas aplicações na ET, inclusive como scaffold, devido suas excelentes propriedades físicas. Carbono pode formar estrutura ordenada e estável. Esses nanomateriais consistem de grafite ou em uma camada simples ou em camadas concêntricas, normalmente variando o diâmetro externo de 3 a 30 nm. Os nanotubos podem ser preparados por diversos métodos, mas o método de deposição química a vapor é o mais utilizado. Os nanotubos são bem indicados como scaffold em implante neural porque eles são altamente condutores, sendo, portanto um modelo ideal para transmissão de sinais elétricos para os neurônios (ENGEL et al., 2007).

Os avanços na tecnologia da microfabricação que inicialmente foram desenvolvidos para aplicações na microeletrônica trouxeram influência para a nanotecnologia gerando o desenvolvimento de nanodispositivos que podem atuar ou detectar a nanoescala. O desenvolvimento mais recente do sistema biológico microeletromecânico (BioMEMs) possibilitou o uso de nanodispositivos em biomedicina. Alguns BioMEMs tem sido usado mais freqüentemente na medicina regenerativa como: biossensores, biorreatores e biocápsulas (ENGEL et al., 2007).

2.3.2 – NANOTECNOLOGIA E A MEDICINA REGENERATIVA

A utilização de nanomateriais em aplicações biomédicas é bastante ampla incluindo nanopartículas para distribuição de moléculas (drogas, fatores de crescimento, DNA), nanofibras para *scaffold* de tecido, modificação de superfícies de materiais implantáveis (como implantes dentários de titânio modificados com nanohidroxiapatita) ou nanodispositivos (como biossensores). A medicina regenerativa desfruta o grande potencial da nanotecnologia, fazendo a associação desses elementos com o tecido de engenharia, portanto como pode ser observada a medicina regenerativa surgiu em um campo de atuação multidisciplinar. A meta principal da medicina regenerativa é regenerar um tecido *in vivo* ou gerar um órgão funcional complexo *in vitro* utilizando um *scaffold* de tecido natural ou sintético contendo células vivas (ENGEL et al., 2007).

Baseado no melhor substituto ósseo até o momento, que é o osso autólogo, a engenharia óssea em sua construção segue a combinação de quatro fatores: a matriz (*scaffold*) para formar o novo tecido, a sinalização celular (composta por proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e outros fatores de crescimento) responsável pela diferenciação celular e a formação do tecido, além de uma adequada vascularização. Portanto um tecido de engenharia precisará de algumas propriedades físicas e biológicas como exigências para um substituto ósseo ideal: (i) fornecer uma matriz porosa; (ii) reabsorção/remodelação de forma adequada e controlada; (iii) proporcionar uma cascata de sinalização controlada, possibilitando a diferenciação celular e promovendo a regeneração de tecidos; (iv) combinar as propriedades mecânicas dos tecidos do hospedeiro, proporcionando uma interface estável material-tecido na fase de reabsorção do implante; (v) eliminar o risco de rejeição ou a reação de corpo estranho e (vi) realizar uma boa adaptação e cobertura pelo tecido mole adjacente. Atendendo a esses requisitos, o implante estará adequado para substituir, por um período de tempo, o tecido natural, proporcionando a resistência e rigidez necessárias para evitar a fratura sob cargas fisiológicas e fornecer uma estrutura para o corpo criar um novo tecido ósseo (SAIZ et al., 2013).

Os desafios clínicos são muitos quando os cirurgiões usam técnicas regenerativas para reconstituir defeitos ósseos em virtude da variedade de pontos anatômicos, tensões mecânicas, além da disponibilidade de tecido mole para cobertura do local danificado. Na Tabela 7 pode ser visto as exigências que precisam

ser atendidas por materiais utilizados como *scaffold* na engenharia de tecido em ossos. Baseados nas propriedades mecânicas dos ossos, como a força e o módulo, materiais são projetados para aplicações de carga, sendo necessário para situações de carga baixa e média combinar flexibilidade e força para sobreviver ao manuseio e colocação, mantendo assim a forma in vivo. A dureza inicial deve ser igual ou superior à cerâmica atualmente usada em situação de carga e semelhante ao início da resistência à fratura do osso ($> 5\text{MPam}^{1/2}$); o tempo de regeneração óssea e o retorno da função deve corresponder ou ser melhor que os tratamentos utilizados atualmente (SAIZ et al., 2013).

Em virtude do limitado potencial dos aloenxertos, xenoenxertos e substitutos sintéticos na regeneração óssea vem aumentando a busca por abordagens da engenharia de tecidos para a regeneração de tecido ósseo funcional.

Seguidos os critérios para a produção de biomateriais sintéticos alguns benefícios para os pacientes podem ser alcançados como: (a) eliminar risco cirúrgico adicional; (b) eliminar possibilidade de transmissão de doenças e reação inflamatória; (c) favorecer o manuseio; (d) reduzir o tempo cirúrgico; (e) possibilitar restabelecimento rápido da função (SAIZ et al., 2013).

Tabela 7 – Critérios para projeto de *scaffold* (SAIZ et al., 2013).

Exigência funcional	Aplicação clínica potencial	Formação óssea	Requisitos mecânicos		Candidatos	
			Força	Módulo de Young	Material	Forma
Carga baixa	Aumento do seio maxilar	4 meses	Mínima	0,05-1 GPa	Polímero	Injetável
	Local de extração				Polímero/cerâmica compósitos híbridos	Flexível
Carga média	Reparo de fenda alveolar	4-5 meses	> 50MPa	1GPa	Polímero	Alguma densidade apoiar tecido mole
	Aumento rebordo alveolar				Polímero/cerâmica compósitos híbridos	Matriz porosa
Carga alta	Reparo defeito segmento mandibular	> 6 meses	>150MPa	10-30 GPa	Inorgânicos	Matriz porosa
	Reparo defeito seguimento tíbia				Compósitos híbridos com alto conteúdo mineral	Matriz densa capaz de criar poros in vivo
	Disco cervical					

2.3.3 – BIONANOCOMPÓSITOS EM APLICAÇÕES MÉDICAS

Nanocompósito podem ser definidos como sendo a combinação heterogênea de dois ou mais materiais em que pelo menos um dos materiais deverá ter uma escala nanométrica (MURUGAN, 2005).

Os nanocompósitos produzidos a partir de uma matriz biopolimérica e a nanohidroxiapatita apresentam melhores propriedades mecânicas se comparados a outros nanocompósitos, além das características de nanotopografia que vão imitar as nanoestruturas ósseas favorecendo os processos biológicos (REDDY et al., 2013).

Para os bionanocompósitos serem utilizados nas aplicações biomédicas, além de biocompatibilidade, precisam de mais duas características que são a versatilidade e a adaptabilidade. Os bionanocompósitos são construídos a partir de polímeros bioderivados ou naturais enquanto as propriedades mecânicas são ajustadas as necessidades. Para preencher os parâmetros de uso na clínica médica os

bionanocompósitos devem combinar a compatibilidade dos polímeros naturais e bioderivados com as propriedades físicas e químicas de reforços nanométricos. Três áreas dispostas no uso de nanocompósitos em aplicações médicas são elas: distribuição de drogas, terapia de genes e engenharia de tecidos (REDDY et al., 2013).

O bionanocompósito como distribuidor de droga pode ser associado ao próprio uso como implante de regeneração e substituição tecidual, sendo assim, um nanocompósito implantado no osso poderá também carrear uma proteína morfogenética óssea passando a ter a função adicional de estimular o crescimento desse osso.

Bionanocompósitos formados por biopolímero natural, partículas nanohíbridas são promissores em terapia gênica podendo ser utilizados como vetores não virais em tratamentos para câncer e outras doenças, assim como várias outras aplicações como materiais funcionais e bioinspirados (REDDY et al., 2013).

Na engenharia de tecidos os bionanocompósitos tem destaque por promoverem a recuperação de estruturas nativas dos tecidos por terem a capacidade de imitar a matriz extracelular. A engenharia de tecidos tem a maior utilização de nanocompósitos em tecido ósseo, tanto na forma de construções intercaladas como em scaffolds. Na ortopedia clínica é indispensável que o nanocompósito seja biodegradável e bioabsorvível para ser estimulada a produção óssea com substituição concomitante do material implantado (REDDY et al., 2013).

2.3.4 – NANOCARACTERÍSTICAS DAS SUPERFÍCIES DOS MATERIAIS

A estrutura das superfícies dos materiais vai influenciar não só o comportamento biológico do organismo, como as propriedades mecânicas dos materiais. Características de superfície e intrínsecas dos materiais como tamanho do grão, tamanho e a forma dos poros na nanohidroxiapatita e na hidroxiapatita convencional podem ser controladas ainda na fase de processamento do material. Topografia é um dos sinais físicos mais importantes para as células. A microtopografia e a nanotopografia influenciam fortemente o comportamento celular de adesão, proliferação e diferenciação. Uma grande variedade de técnicas tem sido usada para produzir nanotopografia nas superfícies de biomateriais (ENGEL et al., 2007).

Alguns métodos desenvolvidos fornecem uma topografia ordenada com um padrão normal alinhado e, outros métodos geram uma topografia não ordenada com

padronização e orientação aleatórias. Os métodos mais usados para produzir padrões organizados aleatoriamente são litografia coloidal, ataque químico e decantação de polímero. Todas essas técnicas podem ser combinadas com automontagem para funcionalização da superfície. A automontagem é um processo em que moléculas e supramoléculas organizam-se em agregados e arranjos em uma estrutura ordenada através de ligações fracas e não covalentes (ENGEL et al., 2007).

Materiais de nanofase, ou seja, materiais com grãos em escala nanométrica, podem ser usados para produzir características nanométricas nas superfícies de biomateriais para guiar o comportamento das células buscando uma resposta biológica desejada. Nas aplicações para regeneração óssea, bons resultados nos processos biológicos básicos dos osteoblastos têm sido observados com materiais cerâmicos e metais em nanofase comparados com materiais convencionais, cujos grãos possuem escala micrométrica. Materiais de nanofase também podem ser depositados nas superfícies de biomateriais para aumentar bioatividade e/ou sua biocompatibilidade. Por exemplo, cobertura de apatita nanocristalina produzida pelos métodos de sol/gel ou pulso de eletrodeposição, é usada normalmente para promover a osteointegração de dispositivo ortopédico (ENGEL et al., 2007).

A escala nanométrica proporciona a alguns nanomateriais, como as nanocerâmicas, com propriedades de superfície favoráveis às células, o desempenho de processos biológicos, como interação protéica, superiores aos dos materiais em microescala. A nanohidroxiapatita proporciona a realização de processos celulares básicos, além da osteointegração e deposição de minerais, como cálcio na superfície, mais evidente que na hidroxiapatita convencional; dessa forma, estimula a formação de novo tecido ósseo em um menor período de tempo (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005; ZHANG, WEBSTER, 2009).

2.3.5 – TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS

Em um estudo de revisão Zhang e Webster (2009), descreveram análises *in vitro* que mostraram resultados positivos dos nanomateriais, como o aceleração na formação de novo osso, aumento da adesão celular, dentre outros. Citaram também que num estudo *in vivo* Colon, Ward, Webster (2006), mostraram que a adesão de osteoblastos aumentou para 146% e 200% nas nanofases de óxido de zinco (23 nm) e titânia (32 nm) respectivamente quando comparado as microfases de óxido de zinco

(4,9 μm) e titânia (4,1 μm). Em contrapartida, destacaram estudos *in vivo* que mostraram respostas tóxicas de nanopartículas geradas pela degradação de nanomateriais implantados, sendo observada a presença de detritos de desgaste de articulações artificiais com nanocaracterísticas, metais pesados remanescentes de nanotubos de carbono, absorção celular de nanopartículas nos pulmões, sistema imune e outros órgãos, absorção de nanopartículas pelas células endoteliais, por macrófagos alveolares, etc. Apesar disso, mostraram que a nanotecnologia trouxe um grande progresso em aplicações médicas, entretanto as pesquisas nesse campo ainda estão em um estágio considerado inicial e os riscos dos nanomateriais em relação à saúde humana e meio ambiente não está totalmente esclarecido (ZHANG; WEBSTER, 2009). Portanto, podemos ver uma necessidade clara de mais pesquisas *in vivo* visando tornar mais seguros os nanomateriais, antes que sejam produzidos em larga escala e rotineiramente aplicados.

2.4 – FATORES QUE INTERFEREM NO DESEMPENHO MECÂNICO DO COMPÓSITO

Uma série de fatores influencia as propriedades mecânicas dos biomateriais compósitos, abrangendo desde aspectos macroscópicos até o nível estrutural atômico. Por isso, pesquisas avaliando as alterações em parâmetros dos biomateriais compósitos, quanto ao tamanho, forma, distribuição, integração e proporção de variados materiais usados como reforço, são necessárias para alcançar o conhecimento do melhor desempenho dos mesmos (WANG et al, 2003; FU et al., 2008).

A formulação de biomateriais compósitos e a relação interfacial desses materiais tem influência diretamente na dureza apresentada, sendo observado que um polímero pode ter sua dureza aumentada através da inclusão de partículas inorgânicas em sua matriz. Foi demonstrado que o material usado como preenchimento deve estar na proporção adequada, não ultrapassando o ponto crítico, para ser conseguido o efeito de melhora da dureza, além de ser desenvolvida uma eficiente adesão interfacial entre os componentes, o que controlará o descolamento interfacial (WANG et al, 2003). A adesão interfacial da matriz com a partícula exerce um importante efeito na resistência do compósito de um polímero preenchido com micro ou nano-partículas, sendo a forte ligação interfacial entre partículas e matriz

polimérica a responsável pela transferência efetiva do stress da carga, aumentando a resistência do compósito (FU et al., 2008).

Estudos que avaliaram compósitos contendo n-HA/polímero natural ou sintético *in vitro* mostraram que propriedades mecânicas e biológicas eram sempre melhoradas em presença de partículas nanométricas comparadas às micrométricas (CHEN et al., 2006). Segundo Legeros (1993), a hidroxiapatita em escala nanométrica possui densidade aumentada e sinterização melhorada, devido ao aumento da área de superfície, o que poderá levar a melhora de propriedades mecânicas como o aumento de resistência à fratura (LEGEROS, 1993; SUN; ZHOU; LEE, 2011).

2.5. – AVALIAÇÕES DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Análises *IN VITRO*

Os testes de citotoxicidade dos materiais são de simples execução e causam menos complicação, que modelos animais, por não envolverem princípios éticos. Os testes de cultura são relacionados como o ponto de partida para estabelecer que os materiais não sejam citotóxicos (GE et al., 2004).

Estudos *in vitro* têm confirmado a biocompatibilidade da hidroxiapatita e, demonstrado a influência do fosfato de cálcio na adesão e função celular. Cheung e Haak (1991) fizeram testes de culturas com células ósseas, condrócitos e fibroblastos periosteais para avaliar a viabilidade celular. Ao exame no microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi demonstrado que superfícies de discos cerâmicos avaliados apresentavam células ligadas, multiplicadas e no interior dos poros da cerâmica (CHEUNG; HAAK, 1991).

Resultados semelhantes aos de Cheung e Haak (1991), foram encontrados num estudo *in vitro* realizado por Siqueira (2009) onde foi utilizado um microcompósito de PHB/HAP (74/26 %m/m) visando avaliar a citocompatibilidade e, também a capacidade de fixação e expansão das células na superfície do compósito. Foi utilizado um meio de cultura (Tampão fosfato-salino com células da linhagem permanente de fibroblastos L929) e analisado o crescimento celular na superfície do microcompósito por um período de 14 dias. Após esse período o microcompósito foi avaliado ao MEV e verificado que a superfície do microcompósito permitiu a fixação e a expansão dos fibroblastos, sendo demonstrado na fotomicrografia da Figura 6 A e B. Dessa forma foi demonstrada a citocompatibilidade do microcompósito e também

que o biomaterial permitiu que as células realizassem suas principais funções fisiológicas de aderência, expansão e multiplicação.

Quando um biomaterial permite que as células exerçam suas funções fisiológicas básicas possui a característica necessária, segundo GE et al. (2004), para tornar esse biomaterial adequado para ser utilizado como scaffolds pela engenharia dos tecidos em ossos.

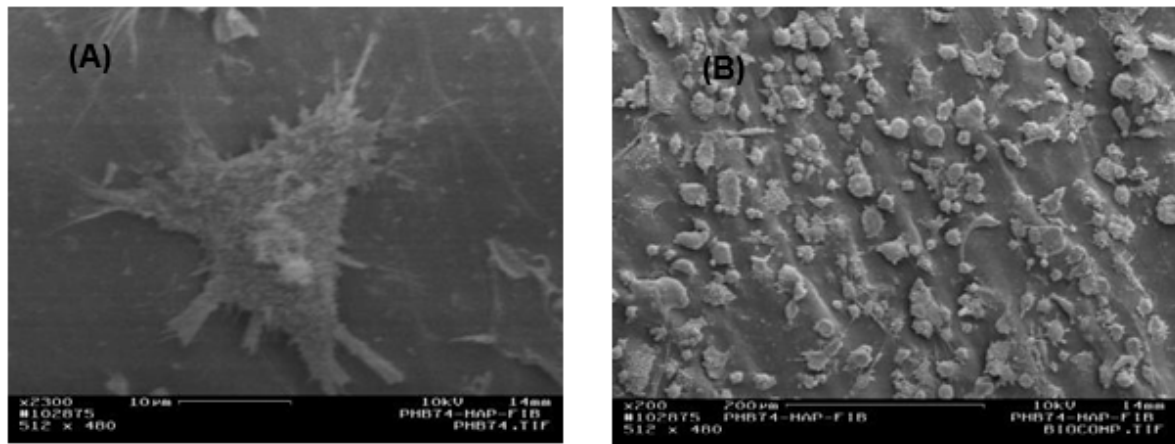


Figura 6 – Micrografia mostrando fibroblastos L929 (A) em expansão - Escala de 10 μm , (B) formando monocamada – Escala de 200 μm ; sobre o compósito PHB/HAP (74/26 %m/m) (SIQUEIRA, 2009).

Um estudo *in vitro* de Murugan e Ramakrishna (2004) avaliou um compósito formado por nanocristais de hidroxiapatita incorporados a um polissacarídeo, a quitosana, sob a forma de pasta para preenchimento ósseo. Os resultados mostraram que esse compósito pode modificar duas desvantagens da hidroxiapatita, que são aumentar a taxa de biorreabsorção e, devido à natureza viscoelástica do polímero, impedir a migração das partículas para os tecidos circundantes após o procedimento de implante. Baseado nessas observações, acreditamos que o compósito formulado no estudo anterior (SIQUEIRA, 2009), que tem a característica de ser um substituto ósseo biorreabsorvível, poderá apresentar um desempenho favorável *in vivo*, devendo ser realizadas avaliações subsequentes em animais, para ser analisado seu desempenho no sistema funcional biológico.

Análises *IN VIVO*

Os estudos com animais são de grande importância para a análise da integração de biomateriais com o tecido ósseo hospedeiro e, através destes estudos,

os pesquisadores buscam respostas para questões que não puderem ser avaliadas nos testes *in vitro* e simulações mecânicas. Os testes *in vitro* devem ser utilizados como ponto de partida, para avaliar toxicidade aguda e citocompatibilidade, evitando assim o uso desnecessário de animal. Entretanto, avaliações *in vitro* não permitem a avaliação de determinados processos biológicos, como respostas crônicas adversas dos tecidos, bem como informação do desempenho mecânico em longo prazo, por necessitarem de tempo experimental maior, só possível nos testes *in vivo* (PEARCE, et al., 2007). Dessa forma, estudos *in vivo* visam fornecer resultados que acelerem de forma segura à aplicabilidade de biomateriais necessários, possibilitando a avaliação de sua eficácia, redução de trauma cirúrgico e de custos para o paciente.

Respeitando os princípios legais, éticos e científicos para o uso experimental de animais, deve ser seguido o paradigma dos “3Rs” (*reducing, replacing, refining*) preconizados por Russel & Burch (1959), que significa redução, substituição e refinamento, em atenção ao bem estar animal, visando a diminuição do número de animais, de eutanásias e utilização de métodos mais adequados. Melhor planejamento dos ensaios experimentais se faz necessário, para que o uso de animais possibilite coleta de dados que forneçam resultados significativos e com qualidade de informação relevante (PERIC et al., 2015).

Os estudos pré-clínicos são beneficiados pela facilidade de controle do animal, por ficarem à disposição da pesquisa alojados em um biotério, favorecendo observações clínicas pós-operatórias, exames laboratoriais e ou de imagem. Na Tabela 8 pode ser visto alguns tipos de análises normalmente realizadas após o sacrifício dos animais, cujos resultados exibem informações relevantes, presentes na literatura (XU, SHIMIZU, OOYA, 2005; THOMAIDIS et al., 2008; CARLO et al., 2009; MIÑO-FARIÑA et al., 2009; SCHENEIDER et al., 2009; HASSANEIN et al, 2011; GOMES et al., 2011; CHAVES et al., 2012; ZHANG et al, 2012; FREITAS et al., 2013; SAAD et al., 2015). Análises por imagem também são importantes ferramentas para serem utilizadas na avaliação do processo de cicatrização em ossos.

O coelho é um mamífero que apresenta semelhança ao humano, cujo modelo de estudo tem sido reconhecido ser adequado para estudo da bioengenharia óssea na região craniofacial.

Tabela 8 – Estudos prévios pré-clínicos desenvolvidos em coelhos, onde foi avaliada a evolução da cicatrização de defeitos ósseos críticos, através de diversas análises em intervalos variados de tempo.

Autor/Ano	Sítio experimental	n” Total	Análises realizadas	Intervalos de realização
Xu, Shimizu, Ooya, 2005	Seio maxilar	20	Histoquímica Histomorfométrica	14, 28, 32, 56, 70 dias
Thomaidis et al., 2008	Mandíbula	50	Histológica	70 dias
Carlo et al., 2009	Olécrano-Ulna	24	Radiográfica Histológica Histomorfométrica	8,45,90 dias
Miño-Fariña et al., 2009	Fêmur	36	Radiográfica Histológica Histomorfométrica	7, 30 e 90 dias
Schneider et al., 2009	Parietal/Frontal	9	Radiográfica Histológica Histomorfométrica Tomográfica Micro-CT	28 dias
Gomes et al., 2011	Mandíbula	28	Radiográfica Histológica	Rx semanal 15 e 30 dias
Hassanein et al., 2011	Calota craniana	19	Micro-CT	120 dias
Chaves et al., 2012	Seio maxilar	24	Histológica Imunohistoquímica Histomorfométrica	14 e 30 Dias
Zhang et al., 2012	Mandíbula	18	Histológica Micro-CT	30 e 90 Dias
Freitas et al., 2013	Tíbia	12	Morfológica Radiográfica	30, 60, 90 e 120 Dias
Saad et al., 2015	Mandíbula	16	Histológica Radiográfica Histomorfométrica	14, 28, 84 e 168 Dias

A partir de análise histológica Chaves (2012) observou discreta osteogênese na área de levantamento do seio maxilar aos catorze dias e aos trinta quando já podia ser visto trabéculas ósseas bem organizadas, ao redor de grânulos da HA implantados em coelhos. Em outro defeito ósseo criado pelo levantamento da membrana do seio maxilar de coelho e preenchido com coágulo sanguíneo coberto por membrana

sintética, Xu, Shimizu e Ooya (2005), mostraram que no espaço aumentado após duas semanas, nas superfícies de tecido ósseo recém-formado, havia forte expressão de fosfatase alcalina e presença de alguns osteoclastos corados junto à expressão de fosfatase ácida resistente ao tartarato, sugerindo remodelação óssea.

Vários estudos que avaliaram defeitos de tamanho crítico realizados nos ossos da mandíbula de coelhos mostraram resultados semelhantes com relação à cicatrização dos defeitos usados como controle negativo, destacando a falha na cicatrização, reforçando a necessidade do uso de um preenchimento ósseo para possibilitar uma cicatrização satisfatória. Da mesma forma pesquisadores utilizando análises histológicas e radiográficas mostraram uma aparente remodelação e osteogênese mais rápida em áreas ósseas preenchidas com um biomaterial, quando comparada a outra sem preenchimento (THOMAIDIS et al.2015; GOMES et al., 2011; ZHANG et al., 2010; SAAD et al., 2015).

Todos os conhecimentos presentes na literatura sobre defeitos ósseos apontam, até o momento, para a importância da utilização de preenchimentos dos defeitos para que uma cicatrização satisfatória aconteça no local.

2.5.1 – INTEGRAÇÃO DO BIOMATERIAL AO SÍTIO ÓSSEO DO HOSPEDEIRO

Existem vários fatores importantes que devem ser observados quando é almejada uma boa união do implante ao tecido ósseo, dentre eles destaque deve ser dado a estabilidade mecânica, pois um micromovimento na interface osso-implante poderá gerar a não-união. A osseointegração é a união do implante em contato direto com o osso vivo, o que possibilita a funcionalidade em longo prazo e também a remodelação óssea posteriormente. Cuidados devem ser tomados para que o local do defeito fique sujeito a uma mínima carga, com uma boa fixação e estabilidade. Além disso, uma eficaz união osso-implante dependerá de uma boa resposta dos tecidos moles que circundam o implante e de propriedades de superfície do material favoráveis aos processos biológicos. Para saber se o implante foi bem sucedido na cicatrização, bem como se houve a osseointegração será preciso verificar a presença de uma matriz bem mineralizada na sua superfície e também uma densidade crítica de osteoblastos (LIU; LIM; TEOH, 2012).

O processo de cicatrização de um defeito ósseo passará pela maturação do tecido de granulação que poderá evoluir para um tecido fibroso, cartilagem ou

fibrocartilagem, que será dependente do estímulo recebido por forças de compressão e de tração no gap da fratura (REIFENRATH et al, 2014).

Sun (2011), em uma revisão mostrou que os estudos *in vivo* até o momento têm destacado um ótimo desempenho dos compósitos formados por nHA/polímero possibilitando uma boa formação óssea em defeito extenso, além de comprovada biocompatibilidade por estímulo a neo-vascularização (SUN; ZHOU; LEE, 2011).

Ni e Wang (2002) demonstraram que uma camada de apatita ativa biologicamente é formada dentro de um período de tempo curto no compósito PHB/HA, após sua imersão num fluido corpóreo simulado, demonstrando alta bioatividade do compósito. Foi demonstrado também que a mudança na taxa percentual do volume de hidroxiapatita no compósito poderá modificar a bioatividade e propriedades mecânicas do compósito (NI e WANG, 2002).

Em terapias longas a interação do material e do meio ambiente vivo deve desenvolver estabilidade através de uma adequada união, entretanto, para materiais biodegradáveis e biorreabsorvíveis cuidados deverão ser voltados para os subprodutos da degradação, que são capazes de interagir e causar danos aos sistemas vivos (HUTMACHER et al., 1996; MURUGAN e RAMAKRISHNA, 2005).

CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – ESPECIFICAÇÕES DAS CERÂMICAS UTILIZADAS

3.1.1 – NANO-HIDROXIAPATITA (nHAP)

Nano-hidroxiapatita sintética – Sigma–Aldrich

Densidade – 2 – 6g/cm³

Área de superfície – 10 – 15 m²/g (BET)

Diâmetro de partícula – < 150nm (BET)

3.1.2 – HIDROXIAPATITA NATURAL

Osso bovino mineral natural – Geistlich Pharma do Brasil – SP

Forma de grânulos – Granulometria – 0,25 mm – 1 mm

Uso comparativo no ensaio biológico *in vivo*

3.2 – ESPECIFICAÇÃO DO POLÍMERO UTILIZADO

3.2.1 – POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (PHB)

O PHB utilizado foi doado pela PHB Industrial, na forma de pelletes. O PHB foi purificado, por um processo no qual primeiro foi dissolvido em clorofórmio (1g/100 ml) em um balão sob refluxo e posteriormente esta solução foi gotejada em metanol (50 ml/300 ml). Em seguida, o material ficou em repouso por 24 horas e, foi feito após isso a centrifugação desta solução, resultando na precipitação do PHB.

3.3 – NANOCOMPÓSITO PHB/nHAP

Com o objetivo de obter um material com maior homogeneidade, uma interface mais eficiente e, portanto melhores propriedades mecânicas foram realizadas formulações contendo menores cargas que nos trabalhos anteriores (PHB/HAP (74/26) %) (SIQUEIRA, 2009), considerando o efeito favorável do menor tamanho de partícula da nanocarga (MURUGAN, 2005; ZHANG, WEBSTER, 2009). Esses formulados foram caracterizados através de técnicas e ensaios como:

Termogravimétrico, Mecânico, Dinâmico-Mecânico e Microscopia. As respostas biológicas de biocompatibilidade e integração dos tecidos com os materiais formulados foram avaliadas através dos testes *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

3.3.1 – METODOLOGIA DE FORMULAÇÃO DO NANOCOMPÓSITO PHB/nHAP E CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

O PHB, depois de purificado, foi dissolvido em clorofórmio (1g/100 ml) e filtrado. A carga de nano HAP foi adicionada à solução e dispersa com auxílio de um ultrassom sendo necessário ou não a incorporação de um tensoativo para facilitar a desagregação das nanopartículas. Seguidamente foi dosada a solução contendo as nanopartículas dispersas num sistema de secagem e pulverização, para o encapsulamento da nanocarga na matriz de PHB.

Uma determinada porção das cápsulas PHB/nHAP foi utilizada para a confecção dos corpos de prova em um molde metálico esférico revestido por um anel cerâmico térmico e, adaptados a uma prensa hidráulica modelo Marcone Ero Eletronic, também equipada com um sistema de aquecimento. Esse biocompósito em forma de cápsula foi previamente pesado em uma balança de precisão, misturado de forma homogênea a 30% de cloreto de sódio (NaCl), colocado num molde metálico (aço inoxidável) dentro do anel e levados à prensa após a temperatura do conjunto ter atingido 150°C. Ao estabilizar a temperatura foi aplicada uma pressão de uma tonelada sobre um êmbolo do molde e o corpo de prova em forma de disco retirado a seguir.

3.3.1.1 – METODOLOGIA DE PRODUÇÃO DE POROS

Com o objetivo de produzir porosidade nos corpos de prova do biocompósito, foi adicionada uma porcentagem de NaCl depois de macerado por aproximadamente 20 minutos, a seguir peneirado para atingir um tamanho de grão micro e aspecto mais homogêneo. O NaCl foi então misturado aos grânulos de PHB/nHAP para a confecção do corpo de prova, numa proporção de 30% do total de massa em cada corpo de prova.

Os corpos de prova depois de prontos, em forma de discos sólidos por compressão, foram destinados ao processamento de Espuma de Gás/Lixiviação de

Partículas (EG/LP) para produção de porosidade na matriz polimérica. O processo teve início com a colocação dos corpos de prova em um cilindro metálico de uma autoclave e expostos ao gás de CO₂ em alta pressão, 800 psi, permanecendo no interior da autoclave durante 48 horas para saturar a matriz polimérica, como mostrado na Figura 7 – A e B. A seguir foi criada uma instabilidade termodinâmica com a redução da pressão do gás para a pressão ambiente, em consequência disso foi obtida a nucleação e o crescimento dos poros dentro da matriz polimérica. Tanto o processo de pressurização quanto de despressurização foi realizado lentamente, com uma vazão aproximada de 6 min. Logo após foi feita a remoção das partículas de NaCl pelo processo de lixiviação em ddH₂O por 48 horas (HARRIS, KIM, MOONEY, 1998). Todas as etapas foram realizadas em temperatura ambiente. Todo o processo foi realizado no Laboratório de Autoclaves do CENPES/Petrobrás-RJ, em uma autoclave de Hastelloy C-276, 2 L, 5.000 psi e 250°C.

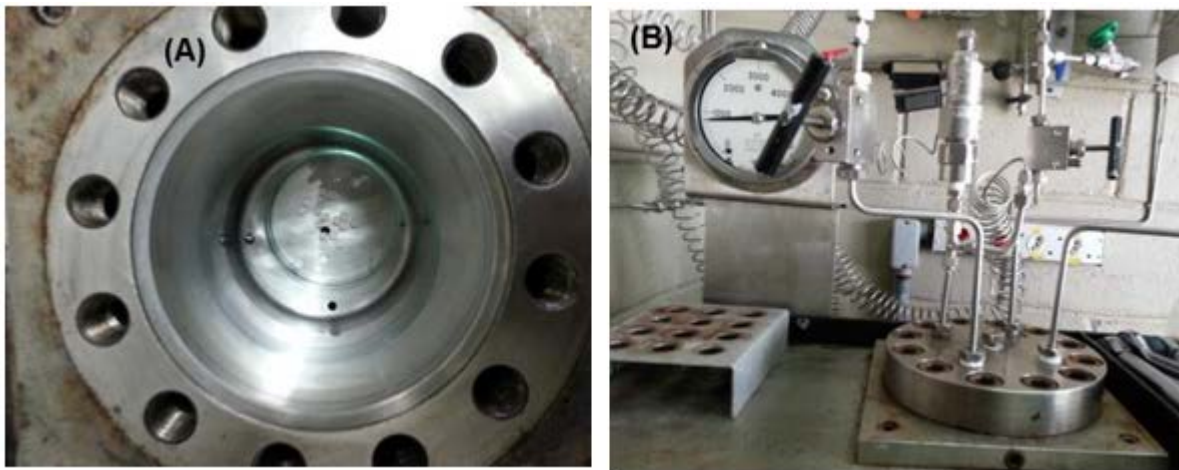


Figura 7 – A- Corpos de prova dentro do cilindro metálico; B- Pressão da autoclave regulada para 800 psi de CO₂.

3.4 – PREPARO DOS CORPOS DE PROVA PARA O TESTE DE NANOINDENTAÇÃO

Foram retirados com uma broca trefina, dez ossos dos defeitos esféricos realizados nas mandíbulas dos coelhos, com medidas correspondentes a 6 mm de diâmetro e espessura aproximada de 1,5 mm, dissecados e conservados em solução formalina a 10%. A seguir as amostras foram coletadas, desidratadas em uma série gradual de álcool (de 70 a 100%) totalizando 48 horas. Posteriormente cada amostra foi embutida em resina epóxi, na temperatura ambiente, em molde de silicone com

diâmetro de 20 mm X 4 mm de espessura. Devido às propriedades anisotrópicas do osso, três amostras foram embutidas para possibilitar a realização das nanoindentações no sentido longitudinal e, outras três para os testes no sentido transversal do osso. O sentido longitudinal foi considerado para o teste que o indentador penetrava paralelamente ao eixo do osso, carregamento axial e, o transversal quando a indentação era perpendicular ao eixo. Foi realizado ainda o embutimento de um corpo de prova P3HB/nHAP para avaliar comparativamente ao osso. Foram realizadas cinco endentações em cada corpo de prova. Logo após o embutimento, as superfícies que continham os corpos de prova, foram polidas usando papéis abrasivos de carbeto de silício progressivamente mais finos, de 400 a 1500 grãos, finalizando com polimento com pasta de alumina (0,05 µm). Os corpos de prova então foram limpos com etanol, para remover as partículas deixadas pelo polimento, secas com papel de seda e, montados em suportes metálicos do equipamento para teste de nanoindentação.

3.5 – TESTES BIOLÓGICOS *IN VITRO*

Para avaliar a ativação de processos biológicos existem muitos tipos de ensaios, porém se comparados com os testes de citotoxicidade eles necessitam de um maior período de tempo para avaliar a reação dos tecidos aos materiais. Os testes utilizados para avaliar a ativação de processos biológicos estão dentro das áreas de: inflamação, reação imune e mutagênese. A escolha do método depende do objetivo do estudo. Testes de citotoxicidade avaliam apenas efeitos ocorridos nas células nas primeiras 12 a 24 horas após exposição à substância “tóxica”. As células do hospedeiro ou se recuperam ou morrem devido à injúria química sofrida. Entretanto, muitas reações biológicas *in vivo* não são apenas citotóxicas e se propagam além de 24 horas, como exemplo a reação imune inflamatória (HANKS et al., 1996).

Nesse estudo os testes *in vitro* foram realizados para verificar se o biocompósito formulado poderá ser tóxico ou induzir uma resposta inflamatória no meio de cultura celular onde foi adicionado, os testes foram realizados no Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR/CBB/UENF).

3.5.1 – PREPARO DOS COMPÓSITOS PARA OS TESTES *IN VITRO*

O corpo de prova do nanocompósito preparado com o procedimento descrito no item 3.3.1, padronizado em forma circular – discos medindo 6 mm de diâmetro e 2 mm de espessura – foi dividido em quatro partes iguais e utilizados para o teste *in vitro*, após esterilização em autoclave, 121°C por 30 min.

Nos testes foram mantidos como controle, poços com células em meio de cultura, sem a presença do biomaterial testado.

3.5.2 – CULTURA CELULAR PARA O TESTE *IN VITRO*

As células usadas foram da linhagem celular permanente de macrófagos Murinos RAW 264.7 (ATCC TIB-71; *American Type Culture Collection, Manassas, VA*) armazenadas em nitrogênio líquido, que foram previamente descongeladas e expandidas numa garrafa com meio *Dulbeco's Modified Eagle Medium* (DMEM-F12) completo (DMEM-F12, 10% SFB, 2mM de L-glutamina, 50 mkg/ml gentamicina). As células foram coletadas, coradas por trypan-blue e quantificadas na Câmara de Neubauer. Realizada a contagem, as células foram plaqueadas (3×10^5 cel/ml) na placa de 24 poços, 300 µl/poço, para a formação da monocamada e início dos testes.

3.6 – TESTES *IN VIVO*

O experimento *in vivo* foi realizado após submissão e aprovação do projeto pela CEUA da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, através do protocolo de número 267 (ANEXO I).

Os biocompósitos preparados depois de esterilizados foram enviados para preenchimento dos defeitos ósseos preparados na mandíbula dos coelhos.

3.6.1 – POPULAÇÃO DE ESTUDO

A escolha do coelho para o experimento *in vivo* foi por este animal ter estrutura óssea maior que rato e camundongo, possibilitando a realização do experimento no osso da mandíbula e já ser um modelo de estudo bem estabelecido (CARLO et al.,

2009; MIÑO-FARIÑA et al., 2009; SCHENEIDER et al., 2009; GOMES et al., 2011; CHAVES et al., 2012).

Coelhos com aproximadamente dois meses, brancos, da linhagem Nova Zelândia, fêmeas, pesando em média 2 Kg foram adquiridos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) – MG. Os animais portavam atestado sanitário comprovando que se encontravam em bom estado de saúde, não apresentando nenhum sinal clínico de doença infectocontagiosa ou outra qualquer doença, emitido pelo médico veterinário da universidade. O transporte foi feito em gaiolas coletivas, com recipiente para água que foi oferecida nas paradas do percurso da viagem que foi feita em veículo climatizado para não expor os animais ao calor correndo risco de morte. Após chegarem ao Hospital Veterinário da UENF passaram por exames clínicos para avaliação das condições orgânicas sistêmicas, pois na hipótese de ser encontrada alguma alteração patológica, o animal seria descartado do estudo. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, receberam dietas sólidas duas vezes ao dia e água fornecida *ad libitum* até o início do experimento, após 5 meses da chegada. A média de peso dos animais no momento dos procedimentos cirúrgicos variou de 3,5 a 3,7 Kg.

A idade em que o coelho se torna adulto varia entre as espécies; para coelhos brancos, da linhagem Nova Zelândia a maturidade sexual é adquirida com 6 meses de idade (Macari & Machado, 1978). Com os animais adultos, o crescimento ósseo torna-se estabilizado, descartando a interferência nos resultados experimentais do animal mais novo que apresenta uma cicatrização óssea mais rápida e consistente quando comparado ao animal adulto (LIEBSCHINER, 2004; ACHARI et al, 2008; PERIC et al., 2015). Esse fato justifica a utilização de animais na fase adulta em nosso estudo.

3.6.2 – TAMANHO AMOSTRAL

Os dois grupos de materiais testados foram compostos por 12 animais, sendo o “n” 6 para cada grupo tanto controles quanto experimentais, com as avaliações realizadas em dois períodos de tempo. A determinação do tamanho da amostra desse estudo com modelo experimental em coelho, foi baseado nos estudos de Schneider et al. (2009), Carlo et al. (2009), Miño-Fariña et al. (2009), Chaves et al. (2012), Zhang et al. (2012) que utilizaram o mesmo modelo animal e o “n” variou entre 4 e

9. Nesses estudos foi avaliada a cicatrização de defeitos ósseos críticos em mandíbula de coelhos, preenchidos com biomateriais compósitos e controles positivo e negativo, em dois períodos de tempo, complementados com análises estatísticas.

3.6.3 – DESENHO EXPERIMENTAL

Com base nos eixos da pesquisa, o delineamento usado foi do tipo experimento controlado, em animais, aleatório para algumas variáveis. Como pode ser visto na Tabela 9 os animais foram randomizados em 2 grupos de biomateriais, grupo biomaterial I (PHB/nHAP – em grânulos) e grupo biomaterial II (PHB/nHAP – em forma de disco, moldado por compressão com porosidade), esses biomateriais foram testados em defeitos ósseos preparados em um lado da mandíbula. O outro lado da mandíbula não utilizado com o biomaterial experimental, foi utilizado como grupo controle, que foi subdividido em controle positivo e controle negativo.

Tabela 9 – Desenho do experimento com a distribuição do material experimental e os controles positivo e negativo.

Grupo	Características	Sacrifício	Tamanho
GEBG	Lado direito – PHB/nHAP – grânulos	45 dias	6 animais
	Lado direito – PHB/nHAP – grânulos	90 dias	6 animais
GCP	Lado esquerdo – Osso mineral bovino	45 dias	
GCN	Lado esquerdo – sem preenchimento	90 dias	
GEBD	Lado direito – PHB/nHAP – discos 6 mm c/ poros	45 dias	6 animais
	Lado direito – PHB/nHAP – discos 6 mm c/ poros	90 dias	6 animais
GCP	Lado esquerdo – sem preenchimento	45 dias	
GCN	Lado esquerdo – Osso mineral bovino	90 dias	

3.6.4 – PROCEDIMENTO PRÉ-CIRÚRGICO E ANESTESIA

Os coelhos foram mantidos em jejum alimentar e oferta de água reduzida, na noite que antecedeu os procedimentos cirúrgicos. Cada animal foi pesado antes da operação.

Previamente ao procedimento operatório foi realizada a tricotomia e logo após a antissepsia na pele da região posterior inferior da mandíbula, do lado direito e

esquerdo de cada animal, com povidona iodo e álcool 70% passado sobre a pele com gaze estéril.

O protocolo anestésico para os procedimentos operatórios consistiu de medicação pré-anestésica com associação de cloridrato de cetamina (25 mg.kg^{-1}) e midazolam ($3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$), por via intramuscular. Foi realizada a canulação da veia marginal do pavilhão auricular esquerdo com o uso de um cateter 24 Gauge (24G), após antissepsia da região com álcool 70°. A indução e manutenção anestésica foram realizadas por meio de máscara facial em circuito semiaberto com vaporização de isoflurano em oxigênio 100% a 2 l/min. Os parâmetros cardíacos e respiratórios foram monitorados ao longo de todo procedimento operatório, que foi realizado em um ambiente asséptico em fluxo laminar de ar na Unidade Experimental Animal da UENF.

3.6.5 – PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Usando as condições anestésicas, antissépticas e ambientais descritas anteriormente, todo o procedimento operatório foi realizado por um mesmo cirurgião veterinário. A operação iniciou com uma incisão retilínea extraoral de 3 cm com uma lâmina nº 10 na pele, paralela ao longo da borda inferior posterior direita da mandíbula. Com a exposição do músculo masseter foi realizado o descolamento do músculo do lado bucal com elevação subperiosteal (Figura 8 A, B). Após exposição do osso do ângulo da mandíbula foi produzido um defeito ósseo com uma broca trefina de 6 mm de diâmetro introduzida até romper a tábua óssea, utilizando-se um motor com contra-ângulo redutor, com sistema de irrigação com soro fisiológico estéril em abundância (Figura 9 A, B, C). A irrigação tem a finalidade de evitar aquecimento ao osso e promover limpeza da área operada. Tem sido relatado que nesse modelo animal 5 mm representa um defeito ósseo de tamanho crítico. Defeito de tamanho crítico é aquele que não cicatriza sozinho durante a vida do animal (SCHMITZ, HOLLINGER, 1986). O mesmo procedimento foi realizado no lado esquerdo do mesmo animal e foi utilizado como controle positivo, quando preenchido com um osso bovino, ou como controle negativo, quando deixado sem preenchimento.

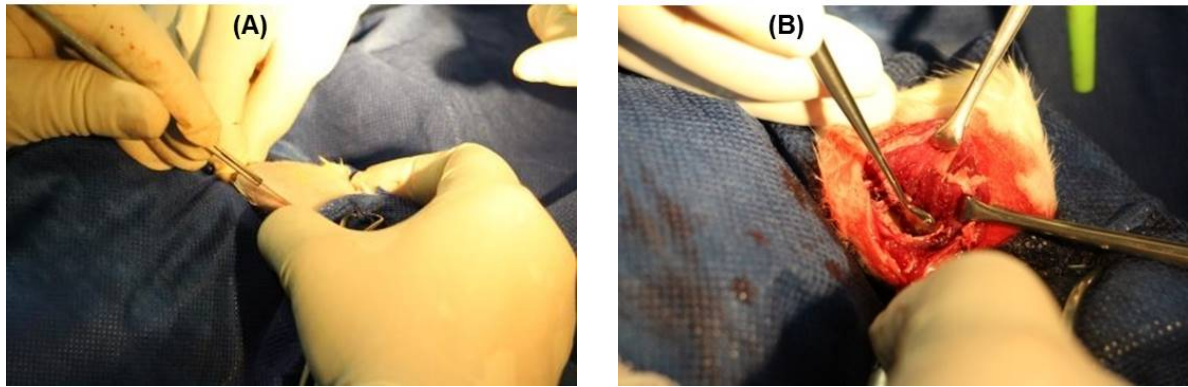


Figura 8 – Sequencia do procedimento operatório. (A) Incisão extraoral retilínea a frente do ângulo no bordo inferior da mandíbula, (B) Divulsão dos tecidos com exposição do osso mandibular.



Figura 9 – Preparo do defeito ósseo. (A) Broca trefina utilizada em contra ângulo redutor, (B) Osso da mandíbula osteotomizado, (C) Defeito ósseo – 6 mm.

Os defeitos ósseos resultantes, vistos na Figura 10 A, B, C foram preenchidos: os do lado direito com o biocompósito PHB/nHAP em grânulos ou em forma de disco e os do lado esquerdo com osso mineral bovino. O osso mineral bovino utilizado é um biomaterial comercializado, considerado dentre os xenoenxertos “padrão ouro” para regeneração óssea (SCHENEIDER et al., 2009), bastante utilizado clinicamente em preenchimento de defeitos ósseos na cavidade bucal. Também alguns defeitos do lado esquerdo não receberam nenhum preenchimento como pode ser visto na Figura 10 (D). Depois dos procedimentos descritos foi realizado o fechamento do sítio cirúrgico em dois planos, o interno com e o externo através de sutura simples com seda 3-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil).

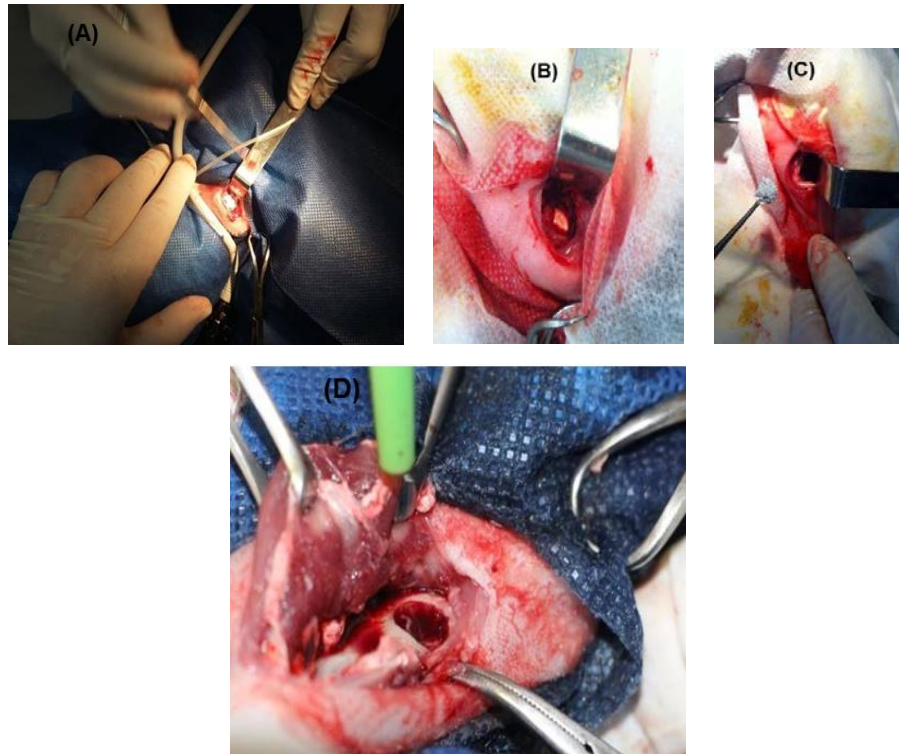


Figura 10 – Demonstração dos defeitos ósseos preparados e os biomateriais utilizados. (A) PHB/nHAP em forma de grânulos, (B) PHB/nHAP em forma de disco, (C) Biomaterial comercial – controle positivo, (D) Defeito sem preenchimento – controle negativo.

Os animais após o procedimento operatório foram mantidos na Unidade Experimental Animal da UENF, em gaiolas plásticas individuais, com alimentação balanceada, iluminação e temperatura controlada, durante todo o tempo do experimento.

3.6.7 – PROCEDIMENTO PÓS-OPERATÓRIO

Os animais receberam no pós-operatório medicação analgésica, anti-inflamatória e antibiótica. Foi administrada uma dose de antibiótico à base de enrofloxacina, bactericida, de amplo espectro e ação prolongada (Baytril 5% (Bayer)). Foi dada uma dose de 5mg/kg^{-1} de peso, intramuscular, imediatamente após o procedimento operatório e, repetida por cinco dias. Também foi administrada um anti-inflamatório não esteroide (Meloxicam 2% (Maxicam), Ouro Fino), sendo uma dose imediata de $0,1\text{ mg/Kg}$ de peso, intramuscular, repetida por cinco dias após a operação. A via de administração de ambos os medicamentos foi parenteral, intramuscular, sem necessidade de sedação.

Durante sete dias de pós-operatório os animais foram observados diariamente e verificado o comportamento com relação ao retorno à alimentação comercial, forma de mastigação, deglutição, presença de dor, deiscência da pele e edema no local do procedimento cirúrgico. Para avaliação da dor foi observado qualquer mudança no comportamento dos animais, além de verificado sinais de citotoxicidade como: movimentos involuntários, piloereção e depressão respiratória. Durante a observação foi realizada a antissepsia da área cirúrgica com povidina iodo em gaze estéril.

A integração dos biocompósitos com o tecido ósseo vizinho ao sítio cirúrgico foi avaliada histologicamente aos 45 e 90 dias após o procedimento cirúrgico.

3.6.8 – SACRIFÍCIO

A realização foi de acordo com as normas reguladoras de procedimentos relativos à eutanásia em animais, instituídas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) mediante a publicação da Resolução Nº 714, em 20 de junho de 2002, atualizada em maio de 2012 pela Resolução CFMV 1000/2012. Foram seguidas às recomendações contidas no Guia brasileiro de boas práticas para sacrifício de animais, que está de acordo com as normas do CFMV como também baseadas no Guia de boas práticas e literatura internacional.

Os animais foram submetidos ao sacrifício quando completados os tempos para análises necessárias, com uma sobredose anestésica (LUKLINSKA, BONFIELD, 1997), seguindo o protocolo cetamina (40 mg/Kg) associado ao diazepam (10 mg/Kg) IM. Após sedação e indução anestésica, foi colocado um cateter 24 G na veia marginal da orelha, por onde foi administrado uma infusão de fentanila (7,4 µg/Kg) e cloreto de potássio (100 mg/Kg), segundo os princípios éticos para animais em experimentação.

3.7 – CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS

3.7.1 – AVALIAÇÃO MECÂNICA, TÉRMICA E ESTRUTURAL

3.7.1.1 – ENSAIOS MECÂNICOS

Para avaliar as propriedades mecânicas dos nanocompósitos P3HB/nHAP foram realizados ensaios de resistência a flexão, compressão e indentação utilizando um equipamento Instron, modelo 5582, um analisador dinâmico-mecânico e um nanoindentador. Os ensaios foram realizados dentro das normas existentes para biomateriais com matrizes poliméricas, uma vez que a matriz do nanocompósito citado é polímero.

I – Resistência à flexão

Este teste possibilitou a determinação da resistência à flexão no ponto de escoamento, na ruptura e o módulo de flexão. Os corpos de prova foram nanocompósitos que possuíam matrizes de P3HB reforçadas pelas nanopartículas cerâmicas de HAP na proporção de massa (80-20) %.

O ensaio de flexão em três pontos foi realizado utilizando um vão de 30 mm, usado para a fratura do espécime, a uma velocidade de 0.5mm/min numa máquina de teste Instron. Os testes de resistência à flexão obedeceram a norma ASTM D-790.

Três corpos de prova foram submetidos ao ensaio de flexão em uma sala climatizada a uma temperatura de 25°C. Para os cálculos de resistência à flexão e módulo de flexão foram utilizadas as seguintes equações respectivamente:

$$\sigma = \frac{3FL}{2bh^2} \quad (1)$$

$$E = \frac{L^3 F}{4bh^3} \quad (2)$$

Onde:

- σ – resistência à flexão, (MPa);
- E – módulo de flexão, (GPa);
- F – é a carga suportada pelo material;
- b – largura do corpo de prova;
- h – espessura do corpo de prova;
- L – distância entre os dois apoios inferiores;

II – Resistência à compressão

Nesse ensaio a força aplicada é compressiva e o corpo de prova padronizado se contrai ao longo da direção da tensão, até o momento da fratura. O comportamento de um material quando submetido a uma força de compressão uniaxial será avaliado pelas suas propriedades compressivas. Estes testes obedecerão à norma ASTM D-695 e através deles teremos o módulo de compressão (elasticidade) (E_c) e a resistência à compressão (σ_c) do material.

III – Análise Dinâmico-Mecânica (DMA)

As propriedades dinâmico-mecânicas foram avaliadas na matriz polimérica e na formulação existente dos nanocompósitos, usando a técnica de análise dinâmico-mecânica em um DMA multifreqüência 2980 TA Instruments, sob uma atmosfera de nitrogênio. Os testes de DMA foram feitos em uma faixa de temperatura de -70 a 120 °C com taxa de aquecimento médio de 5 °C/min, em uma freqüência de 1HZ, utilizando uma garra de flexão de três pontos (“single cantilever”). Os testes foram realizados de acordo com a metodologia utilizada por Sadat-Shojai (2013) e os parâmetros viscoelásticos como módulo de armazenamento (E'), módulo de perda (E'') e tangente de perda ($\tan \delta = E''/E'$) foram registrados como função da temperatura.

O módulo de armazenamento indica a capacidade de determinado material armazenar energia mecânica e resistir à deformação. Assim quanto maior for o módulo maior rigidez apresentará o material.

IV – ENSAIO DE MICRODUREZA

A dureza do material tem sido de grande utilidade para fornecer informações sobre os materiais, a qualidade e processos de produção. O teste consiste na produção de uma pequena indentação na superfície do material produzida pela ponta do penetrador. O formato do diamante do penetrador vai variar determinando o tipo de dureza calculado se Vickers, Knoop, Rockwell, Brinel, etc., este é penetrado na superfície da amostra deixando uma marca quadrada ou em círculo, assim as dimensões são medidas e o valor de microdureza adquirido. A geometria do indentador usado para a dureza Vickers é de um diamante que tem o formato de pirâmide de três lados com razão, área e profundidade igual à pirâmide de quatro

lados de Vickers. Depois da penetração do diamante foram medidas as dimensões das diagonais deixadas e o valor da microdureza foi assim adquirido (ASTM 2013).

Foram realizados os ensaios de microdureza Vickers de acordo com a norma técnica ASTM E 384. O ensaio foi realizado através de um microdurômetro Shimadzu da série HMV-2 com uma carga de 300g (CHEN; WANG, 2002) e um tempo de indentação de 20 segundos. Foram realizadas 5 indentações em cada corpo de prova e depois verificadas as diagonais impressas no material pelo indentador, em um microscópio confocal, mostrado na Figura 11, para o cálculo dos valores de microdureza. Os valores dos números de HV foram reportados na unidade GPa.

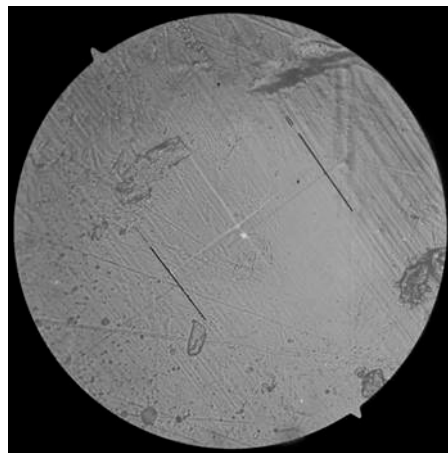


Figura 11 – Diagonais impressas pelo indentador usadas para o cálculo de valores de microdureza

V – ENSAIO DE NANOINDENTAÇÃO

O teste de nanoindentação foi utilizado para obter o módulo do osso da mandíbula retirado do local que recebeu preenchimento e do bionanocompósito formulado.

O nanoindentador mede o movimento de uma ponta em seu contato com a superfície do material analisado, que com a mudança da carga a ponta será impressa na superfície. O equipamento é formado por três partes principais, que são: informática, mecânica e eletrônica.

O equipamento utilizado foi um Dinâmico ultra-micro-dureza Tester Shimadzu DUH-211S, com uma carga de indentação de 30mN e uma ponta Vickers de diamante piramidal. Os valores médios do módulo elástico foram calculados para um mínimo de valores válidos de carga em cinco locais por amostra. Foi evitado indentação em defeitos visíveis ou macroporos observados ao microscópico antes dos testes.

3.7.1.2 – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

As análises térmicas pela técnica de termogravimetria, utilizando um sistema de análise termogravimétrica SDT 2960 – TA instruments, existente na Unidade de Caracterização Térmica (SEPOL) foram realizadas para determinar a composição efetiva do compósito, ou seja, a quantidade de nanohidroxiapatita existente no sistema P3HB/nHAP. Outro objetivo dessa análise foi avaliar o efeito da introdução da nanopartícula na estabilidade da matriz polimérica. As análises foram realizadas em panelas de platina com massa entre 7-10 miligramas de amostra, na faixa de 25 – 1000°C, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min e um fluxo de ar de 100 mL/min.

3.7.1.3 – CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A Calorimetria Exploratória Diferencial avaliará a influência da hidroxiapatita sobre a cristalinidade dos polímeros utilizados como matriz. Para a análise será utilizado o sistema modulado DSC Q 2000 – TA instruments, com alimentação controlada de nitrogênio líquido (LNCA), disponível na Unidade de Caracterização Térmica (SEPOL). Para a análise as massas das amostras serão de aproximadamente 10 mg e colocadas em panela de alumínio hermeticamente fechadas. Será analisada a faixa de -60 até 180°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min e atmosfera dinâmica de nitrogênio (20 mL.min⁻¹) com o objetivo de caracterizar as mudanças de cristalinidade da matriz pelo efeito da nanocarga.

3.7.1.4 – MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (MEV)

Foi feita a caracterização das cápsulas por avaliação do tamanho e distribuição das partículas do formulado e também avaliada a porosidade produzida nos compósitos PHB/nHAP em forma de discos.

Foi feita ainda a avaliação das interfaces do nanocompósito com o osso da mandíbula do animal receptor, após 90 dias de tempo experimental no GEBG e no GEBD. O osso retirado do local do defeito realizado na mandíbula do coelho teve também sua estrutura analisada. Cada amostra foi previamente fixada em um porta amostra por uma fita adesiva de carbono, desidratada abaixo do ponto crítico com

CO₂ e metalizada numa câmara a vácuo (Sputter Coating Unit) com uma fina camada de ouro (cerca de 20nm de espessura). Essa metalização é realizada sobre o corpo de prova com o objetivo de facilitar a penetração do feixe de elétrons na amostra, quando examinada ao MEV, pois a amostra é composta por um material não condutor. A amostra foi examinada num microscópio eletrônico de varredura EVO 40 ZEISS, numa tensão de trabalho de 10 KV.

3.7.2 – AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DOS NANOCOMPÓSITOS

Os corpos de prova para os testes foram preparados como descrito no item 3.3.1. Para avaliar a citocompatibilidade e a biocompatibilidade dos formulados foram realizados os testes *in vitro* e análises dos resultados *in vivo*.

3.7.2.1 – TESTE DE INDUÇÃO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A cultura de macrófagos Murinos RAW 264.7 foi adquirida como descrito no item 3.5.2. O biocompósito foi adicionado a cada poço contendo os macrófagos enquanto alguns poços sem o biocompósito foi mantido como controle. As células foram cultivadas em meio completo em estufa a 37⁰ C com CO₂ a 5%, durante todo o período do ensaio. Sobrenadantes das amostras foram coletadas no primeiro, terceiro e quinto dia dos poços testes e controles para a quantificação do mediador inflamatório - óxido nítrico (NO) - na cultura de macrófagos. A avaliação da produção do NO pelos macrófagos foi através do método de Greiss e a viabilidade celular foi avaliada no final do experimento, no quinto dia, utilizando o método da coloração com o corante Trypan-Blue (0,02% de *Phosphate-Buffered Saline* (PBS)) para contagem das células mortas coradas em azul.

3.7.2.2 – QUANTIFICAÇÃO DO MEDIADOR INFLAMATÓRIO: NO

O método de Greiss foi utilizado para a quantificação do mediador inflamatório NO; foi utilizado o reagente de Greiss p-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico, recém-preparado, foi adicionado a 50 µl de sobrenadantes coletados dos poços contendo as amostras do biomaterial. Esperou-se 10 minutos para medir a absorbância no comprimento de onda de 570 nm

usando um espectrofotômetro de placa (Dynatech MR 5000) do LBR/CBB/UENF. O cálculo da concentração de NO dos sobrenadantes coletados, no primeiro, terceiro e quinto dias, foi feito através dos dados de uma curva de referência de nitrito de sódio subtraída dos valores dos aditivos com ausência das células.

3.7.3 – AVALIAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DOS BIOMATERIAIS *IN VIVO*

Após o sacrifício dos coelhos e a dissecação dos tecidos moles para a obtenção das estruturas ósseas limpas, foram realizados os procedimentos para avaliação do processo de cicatrização dos defeitos ósseos, preenchidos ou não com biomateriais, através de análises histológicas e imunohistoquímicas. Essas avaliações foram realizadas após a cirurgia num período de tempo de 6 e 12 semanas.

O tempo final do nosso estudo foi determinado, baseado no conhecimento de que a cicatrização de um defeito ósseo em coelhos maduros ocorrerá em uma média 30 a 40% posterior ao tempo esperado para a cicatrização de uma fratura em um coelho, que tem o tempo determinado em seis semanas após ter sofrido o trauma. Portanto, a cicatrização final de um defeito não crítico nesse modelo animal ocorrerá aproximadamente em oito semanas (PERIC et al., 2015).

3.7.3.1 – PREPARO DOS ESPÉCIMES PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foi uma análise qualitativa e quantitativa, sendo caracterizados os tecidos e células presentes em toda a amostra visando mostrar nova formação do osso. Nos períodos de tempos programados, no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal da UENF, os fragmentos das mandíbulas foram retirados em bloco, seccionados no sentido longitudinal do osso, contendo o defeito ósseo anteriormente preparado, fixados em formalina tamponada a 10% (pH 7,4) por no mínimo 48 horas. Foram desmineralizados em solução de ácido etilenodiamino tetra acético a 10% (EDTA), pH 7.0, à temperatura ambiente, média de 30° C, por um período de 21 dias.

Na etapa seguinte as amostras foram clivadas, acondicionadas e identificadas em histossetes, retornaram ao formol neutro tamponado a 10%. Posteriormente foram submetidas ao processamento histológico automático de rotina que consiste nas etapas de desidratação em série gradual de alcoóis, seguindo a rotina histológica de desidratação até etanol 100%, diafanização pelo xilol, embebição e inclusão em

parafina derretida a 60° C. As amostras então foram submetidas à microtomia em micrótomo rotativo semiautomático para a secção de cortes histológicos de 5µm de espessura, que foram depositados em lâminas de vidro com extremidades foscas e sobrepostas por lamínulas.

As amostras foram então coradas com Hematoxilina-Eosina (H-E) e também no GEBD foi utilizado o Ki-67 clone MIB 1 para o ensaio histoquímico. As análises foram feitas por microscopia de luz em um microscópio Olympus BX 41 e as fotomicrografias realizadas com (Nikon Eclipse 80i, Kurobane Nikon Co., Ltd, Otawara, Tochigi, Japan) using the NIS – Elements – BR software program).

O Ki-67 é um antígeno encontrado no núcleo de células humanas que se encontram em processo de divisão celular, presentes também em células de coelhos (SUNEEL, 1990).

Observações histológicas foram realizadas para verificar o tipo de união da área do defeito nas interfaces com os tecidos vizinhos, além de avaliar a reação inflamatória, a reabsorção e formação óssea, presença de trabéculas ósseas e de vascularização do enxerto.

Para mensurar a reação inflamatória, reabsorção e revascularização do enxerto, foi utilizada uma escala ordinária crescente de 0 a 3, onde: 0 = ausente, 1 = presença leve, 2 = presença moderada e 3 = presença acentuada (GOMES et al., 2011). Para a avaliação da inflamação foi feita uma análise qualitativa através da contagem do infiltrado inflamatório de polimorfonucleares constituído por neutrófilos, eosinófilos, basófilos e de mononucleares formado por monócitos, linfócitos e plasmócitos. O número de trabéculas foi determinado por tabela ordinária crescente onde: 0 = ausente, 1 = 3 trabéculas, 2 = de 4 a 6 trabéculas e 3 = acima de 7 trabéculas. Para a quantificação de vasos sanguíneos foi utilizada a mesma escala ordinária crescente usada anteriormente, de 0 a 3, onde: 0 = ausente, 1 = cinco capilares, 2 = até 10 capilares e 3 = acima de 11 capilares.

As análises histológicas foram realizadas por um histologista e confirmadas por outro histologista, ambos não tinham conhecimento do tipo de tratamento que cada grupo recebeu.

3.7.3.2 – PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DAS AMOSTRAS DO GEBD

As amostras foram fixadas em solução de formalina a 10% tamponada, pH 7,0 por 24 a 48 horas, e depois lavadas em água corrente por 1 hora. Após isso, os fragmentos foram transferidos para uma solução de álcool 70%. Todas as amostras foram inicialmente descalcificadas em solução de ácido fórmico/citrato de sódio 50%, por 07 dias, com troca da solução descalcificadora a cada 48 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas em água corrente por 1 hora, transferidas para água destilada (dois banhos de 30 minutos), e só então armazenadas em solução de álcool 70%. As amostras foram processadas conforme a técnica de rotina histológica para microscopia ótica e inclusão em parafina. Com o auxílio do micrótomo rotativo secções de 5 µm de espessura de todas as amostras foram obtidas e colocadas em lâminas, as quais foram coradas pelos métodos da hematoxilina e eosina e Tricrômio de Masson (DE TOLOSA et al., 2003).

Os cortes depositados foram submetidos à técnica de imunohistoquímica.

3.7.3.3 – TÉCNICA DE COLORAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

As reações imunohistoquímicas (técnica do polímero em duas etapas) foram realizadas conforme o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Patologia Animal - LAPA.

Cortes dos fragmentos ósseos foram colocados em lâminas histológicas sinalizadas, desparafinizados e hidratados. Os cortes foram submetidos à recuperação antigênica, onde foi usado a solução tampão de Tris-EDTA, pH 9,0 em panela de pressão por 20 minutos. O material foi resfriado até atingir a temperatura ambiente.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, foi utilizada solução de água oxigenada a 30 volumes diluída em metanol na proporção de 7:3, por 15 minutos, depois lavadas em água destilada e solução PBS pH 7,2 por 5 minutos. Em seguida todos os cortes foram incubados por 5 minutos com o bloqueador de proteínas (Super Block – ScyTek). Na sequência as lâminas foram incubadas com os anticorpo primário Ki-67 clone MIB-1 (Dako), em câmara úmida por 60 minutos e lavadas em solução PBS pH 7,2. Logo após, foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente com o polímero Reveal HRP - Complement (Spring Bioscience), e na sequência

incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente com o HRP Conjugate (Spring Bioscience).

Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3'diaminobenzidina (Liquid DAB K3468 - Dako) durante cinco minutos; posteriormente, foram contra coradas com hematoxilina de Mayer. As lâminas foram avaliadas pela intensidade da marcação imunohistoquímica. As reações foram graduadas como negativa ou positiva.

O índice de proliferação foi obtido contando-se em cinco campos aleatórios, e fazendo-se a média das células positivas para cada amostra. Os valores médios aferidos para as contagens de células Ki-67 positivas foram codificadas em escores (0: imunomarcção negativa; 1: <10% células positivas; 2: 10 a 50% de células positivas e 3: >50% de células positivas), conforme metodologia usada por Zuccari (2004). As amostras foram analisadas utilizando software da Micrometrics ® o SE Premium.

3.7.4. – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na avaliação dos biomateriais representados por tratamentos GEBD, GCN, GEBG e GCP cuja cicatrização foi avaliada aos 45 e 90 dias após o enxerto, os dados obtidos foram submetidos às análises de normalidade e homocedasticidade dos erros para os escores avaliados, número de fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos e neovascularização, infiltrado de polimorfonucleares e mononucleares, trabéculas ósseas e porcentagem de células em multiplicação marcadas com KI-67, não foram satisfatórios quando avaliadas pelos testes de Lilliefors e Chrocan & Bartle, respectivamente, impedindo o uso da análise da variância. A diferença na comparação de médias entre os tratamentos e períodos de cicatrização, foi analisada por meio do intervalo de confiança ao nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando o sistema computacional R version 3.0.2 (2013-09-25).

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS BIOCOMPÓSITOS ENCAPSULADOS

Uma medida da eficiência do encapsulamento e a morfologia das micropartículas dos encapsulados é mostrada na imagem obtida na MEV (Figura 12) formada por partículas esféricas com maior concentração em média de tamanho entre 4 e 5 μm , Figura 13 (A) e (B). O formato uniforme e a distribuição larga das partículas do compósito contribui na distribuição homogênea da nHAP no biomaterial formulado por processamento posterior de moldagem por compressão.

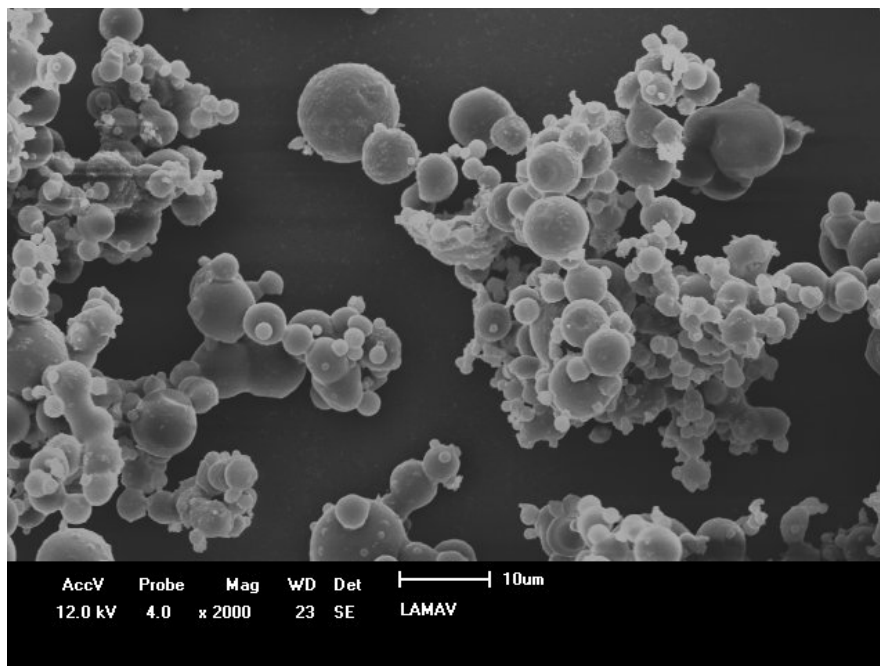


Figura 12 – Fotomicrografias das micropartículas dos encapsulados PHB/nHAP – Escala de 10 μm .

As capsulas do biomaterial (Figura 13) apresentam o máximo de distribuição em um valor médio próximo de 5 μm , contendo em seu interior grânulos de hidroxiapatita de tamanho nanométrico. O objetivo é formar “discos” ou “blocos” moldados a partir destas cápsulas, para serem utilizados como material de enxerto sem a formação de aglomerados e, com uma distribuição relativamente homogênea da cerâmica, o que deverá propiciar um melhor desempenho mecânico e biológico no organismo vivo a ser implantado.

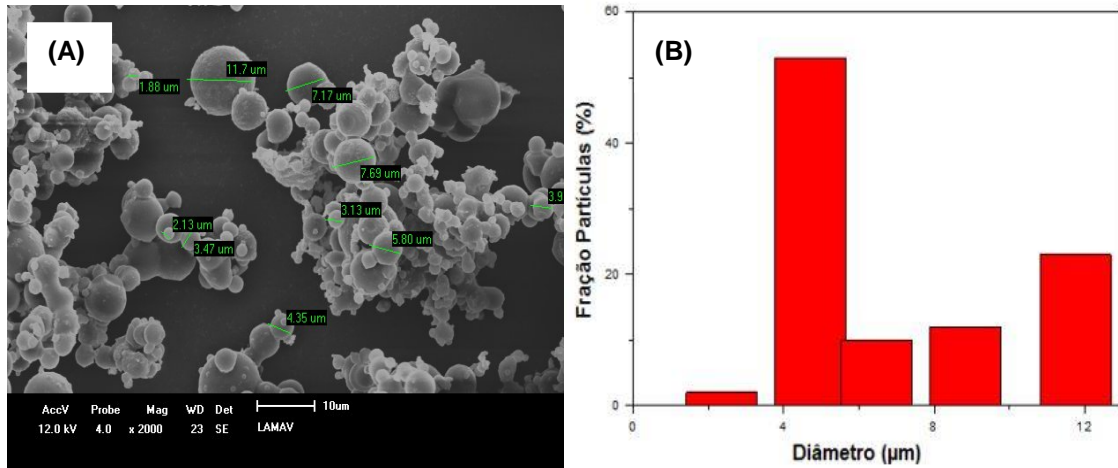


Figura 13 – Fotomicrografia das partículas (A) – Escala de 10 μm e Gráfico (B) de tamanho e distribuição das micropartículas dos encapsulados PHB/nHAP

A homogeneidade na distribuição de carga do compósito melhora as propriedades mecânicas como módulo, dureza e principalmente favorece o desempenho biológico (HABRAKEN; WOLKE; JANSEN, 2007; LIU; LIM; TEOH, 2012).

A formulação tradicional realizada a partir da mistura direta da fase polimérica e a cerâmica favorece em geral a formação de aglomerados da carga no compósito resultante, principalmente quando são utilizadas cargas nanométricas, em consequência do papel das forças de Van der Waals, responsáveis pela aglomeração das nanopartículas. A presença de partículas maiores de hidroxiapatita, ao mesmo tempo que apresentam menor tendência a formar estes aglomerados, introduz cristais grandes contrastando com a apatita do osso natural, isso aumenta o tempo de remodelamento dentro do tecido ósseo implantado (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005; CHEN et al., 2006).

4.2 – AVALIAÇÃO DA POROSIDADE DOS ENCAPSULADOS

As matrizes formadas foram analisadas por MEV e microscópio confocal como pode ser visto na Figura 14. Ao confocal foi verificada uma matriz brilhante em função do seu maior índice de refração e regiões escuras, com menor índice de refração, destacadas com setas vermelhas, indicando os poros criados na matriz após a combinação dos processos, EG em alta pressão de CO₂ com LP. Uma imagem semelhante pode ser vista ao MEV. Nas micrografias pode ser observado que a

distribuição de poros se deu de forma aleatória, o que pode ser atribuído a distribuição não homogênea do NaCl quando misturado à massa do compósito antes da compressão.

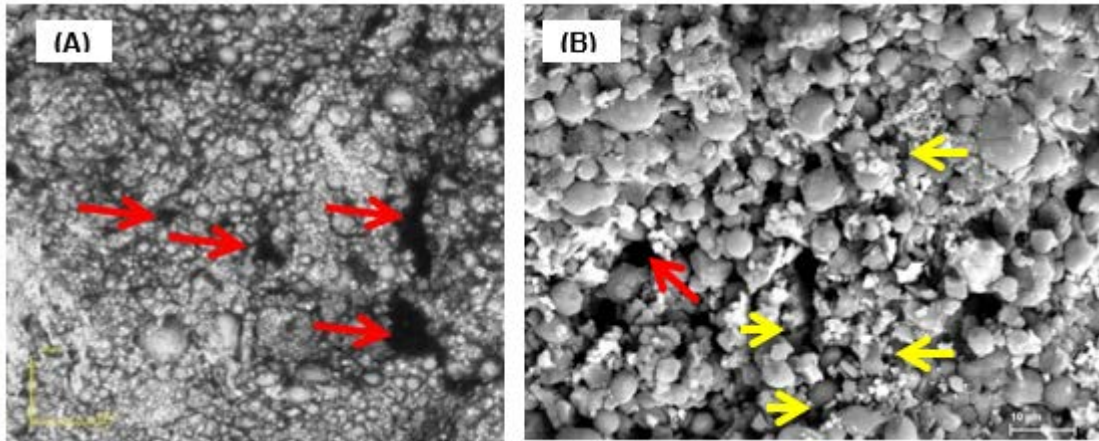


Figura 14 – Fotomicrografias da superfície de um disco esférico de PHB/nHAP evidenciando presença de poros (A) Confocal e (B) MEV, setas vermelhas e amarelas, poros maiores (NaCl) e menores (Gás) respectivamente – Escala de 10 μm .

Pode ser observado uma variação em tamanho nas cavidades ou poros, que está relacionada à distribuição de tamanho que apresentaram os grânulos de NaCl utilizados para originar a porosidade.

A formação de poros no disco pode ser observada na Figura 14 cuja micrografia mostra uma matriz com moderada formação de poros, que foi proporcional aos 30% de NaCl utilizado. A porosidade da matriz foi condicionada pela proporção de NaCl enquanto o tamanho de poro foi determinado por sua granulometria, que foi restrita a tamanhos até 150 μm .

É conhecido que os processos EG/LP promovem o surgimento de matrizes com dois níveis de porosidade: macroporos com origem da lixiviação de partículas de NaCl e poros menores que são formados pela nucleação e crescimento de poros de gás dentro das partículas de polímero. Também, a estrutura de poros das matrizes formadas pelo processamento EG/LP possui relativa uniformidade nas superfícies exteriores da matriz (HARRIS; KIM; MOONEY, 1998).

O processo de EG sozinho mantém uma película sobre a superfície da matriz cobrindo os poros, o que poderá reduzir a integração com o ambiente biológico. O método utilizado na superfície da nossa matriz polimérica foi a combinação dos processos EG/LP, que proporciona a eliminação da película através da LP de NaCl

permitindo a exposição dos poros na superfície já demonstrado em estudo anterior (HARRIS; KIM; MOONEY, 1998). No entanto, Saadat (2015) observou em um estudo de um filme do nanocompósito P3HB/HA que os poros fechados foram diminuindo à proporção que a concentração do NaCl foi aumentando de 70, 80 e 90% em peso, sendo a última proporção a de maior número de poros abertos (SAADAT et al, 2015). No nosso estudo a escolha por menor proporção do espaçador foi visando obter melhores propriedades mecânicas não abrindo mão de benefícios biológicos, como migração celular para os poros abertos, apesar de estar claro na literatura que a proporção não alcança a melhor concentração para conseguir maior quantidade de poros abertos.

A porosidade e a sua interconectividade nos biomateriais implantados tem grande importância para a ancoragem e sobrevivência das células respectivamente, entretanto a porosidade também aumenta a razão de degradação podendo piorar o desempenho mecânico dos biocompósitos (HABRAKEN; WOLKE; JANSEN, 2007).

Ainda a combinação dos métodos EG/LP nesse estudo visou promover a produção de poros, evitando a utilização de solventes e altas temperaturas, eliminando assim os riscos de resíduos remanescentes e a degradação da matriz polimérica respectivamente, o que atrapalharia o bom desempenho tanto biológico quanto mecânico do nanocompósito.

4.3 – COMPORTAMENTO MECÂNICO DO BIOCOMPÓSITO

A formulação do compósito P3HB/nHAP passa por um processo de encapsulamento da nHAP em P3HB formando partículas micrométricas que são conformadas por compressão para obtermos os materiais submetidos aos diferentes ensaios.

O teste de flexão foi realizado para determinar o módulo de flexão e avaliar a influência da distribuição das nanopartículas cerâmica e a metodologia de preparação nas propriedades do nanocompósito. Os resultados mostrados na Tabela 10 e na Figura 15, nos quais se observa um discreta redução do módulo, tem que ser associado à morfologia da superfície de fratura tanto da matriz como do nanocompósito.

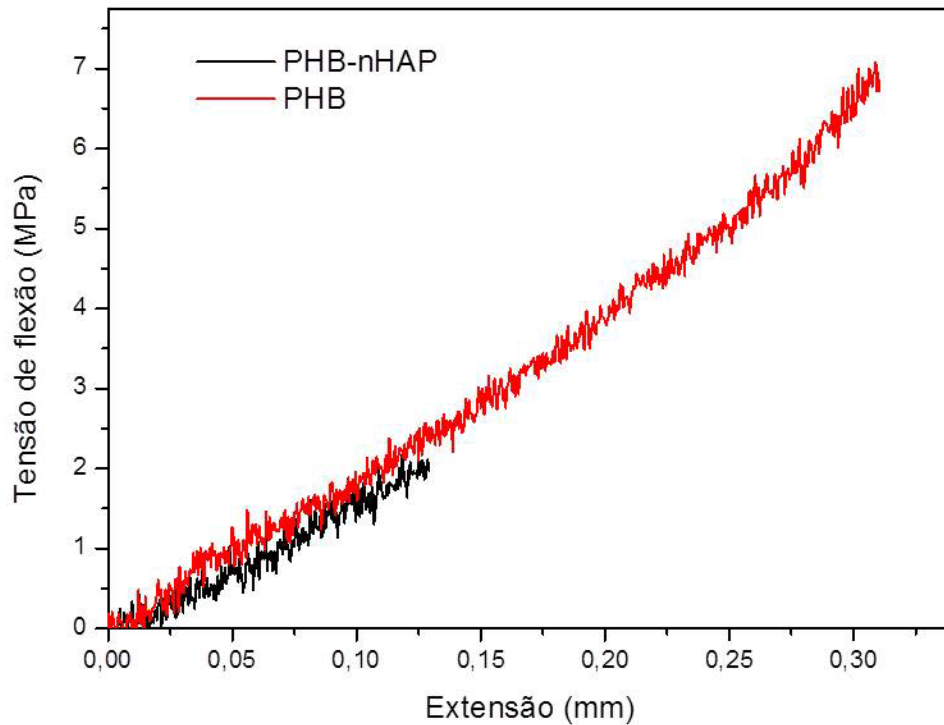


Figura 15 – Curvas de tensão- deformação para o nanocompósito e o P3HB.

Tabela 10 – Resultados obtidos a partir de teste mecânico de flexão.

Corpo de prova	$\sigma_{flexão}$ (MPa)	$\epsilon_{flexão}$ (%)	$E_{flexão}$ (GPa)
P3HB	7,08	0,11	1,0
P3HB/nHAP	2,09	0,27	0,8

Réplicas dos corpos de prova usados para os ensaios de flexão foram analisados por Ensaio Dinâmico-Mecânico (DMA).

De forma mais acentuada que nos ensaios anteriores (Figura 15) se registrou um menor módulo de armazenamento para o nanocompósito (Figura 16) assim como uma variação com a temperatura menos acentuada que a do P3HB. As diferenças acentuadas do comportamento mecânico nestes ensaios devem-se ao forte impacto que tem a morfologia do material nos resultados dos ensaios com a técnica de DMA.

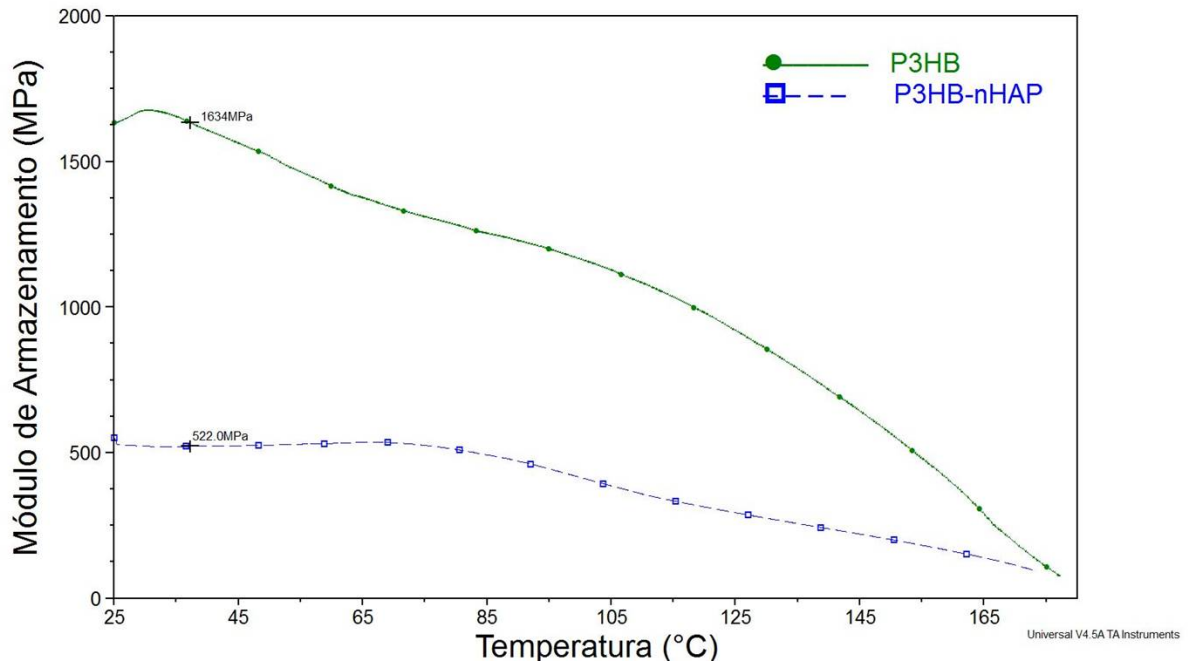


Figura 16 – Curva de DMA do nanocompósito e da matriz polimérica versus temperatura.

A análise da região de fratura com auxílio das imagens de MEV (Figura 17) permite explicar os resultados dos ensaios mecânicos anteriores (Tabela 10, Figuras 15-16). Observa-se uma compactação parcial das cápsulas contendo nHAP na qual as micropartículas esféricas permanecem íntegras e empacotadas formando cavidades/poros e originando descontinuidade no volume do material.

Esta característica morfológica observada no material objeto de estudo (P3HB/nHAP) é consequência das condições de processamento selecionadas com o propósito de originar e preservar a existência de cavidades interconectadas no volume entretanto compromete as propriedades mecânicas do material.

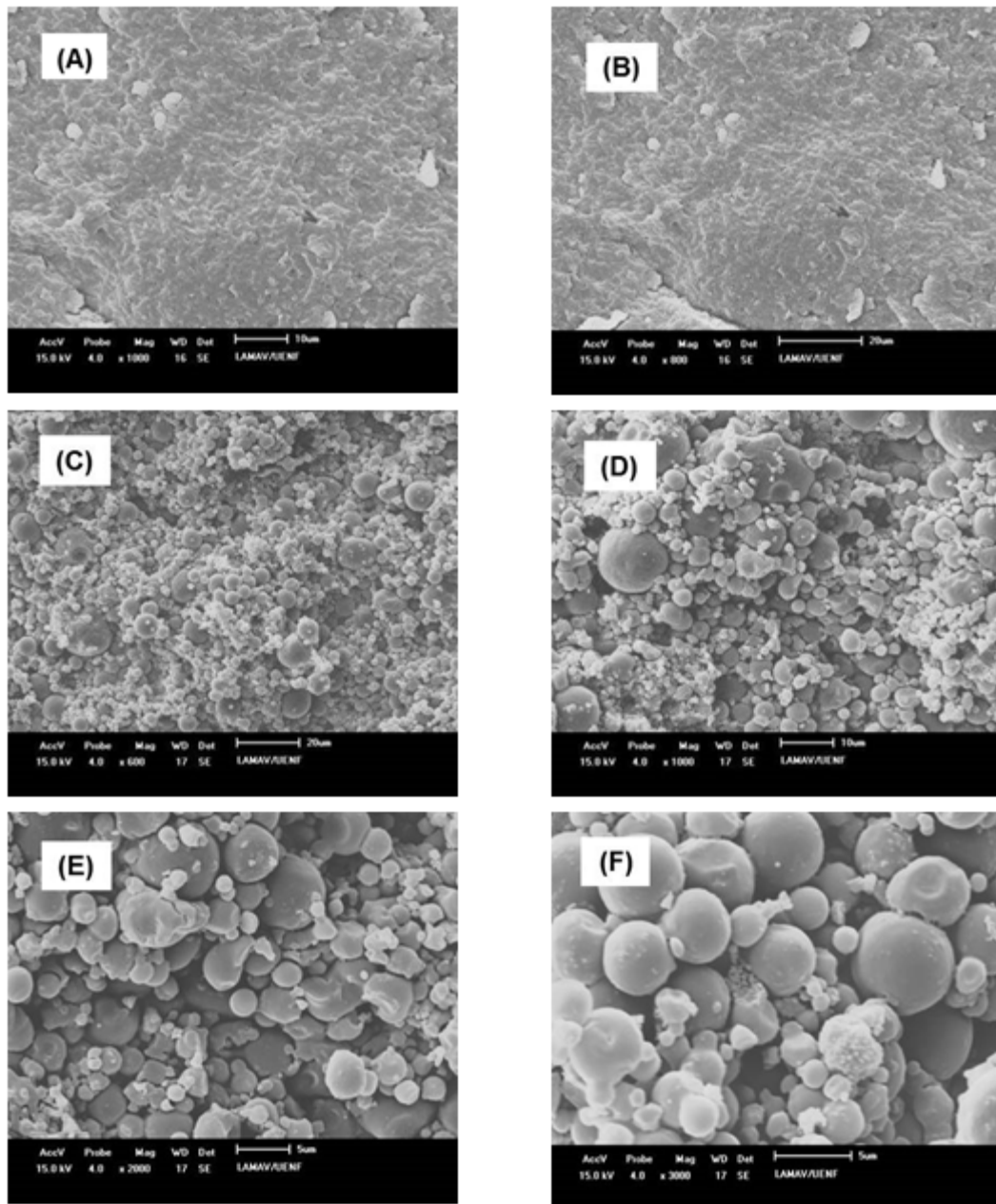


Figura 17 – Fotomicrografias das regiões das fraturas dos corpos de prova – (A) e (B) Corpos de prova do P3HB; (C), (D), (E) e (F) P3HB/18%nHAP

Esta morfologia do P3HB/18%nHAP, com a presença de cavidades/porosidade interconectada, tem um impacto particularmente favorável na bioincorporação do biomaterial conformado principalmente para favorecer a osteointegração e evitar a perda de material enxertado quando utilizado em forma particulada.

O ensaio de compressão, de particular importância quando a pretensão de uso é a enxertia óssea em uma área que poderá estar sujeito a pequena carga compressiva, é frequentemente utilizado na caracterização de “scaffolds” com alta

porosidade e comportamento mecânico anisotrópico semelhante ao osso (CHEN et al., 2006; BLAKER et al., 2005).

Os resultados dos ensaios oscilatórios (DMA) de compressão observados na Figura 18 estão associados a valores do módulo de compressão para o P3HB/18%nHAP de 2,26 MPa, 0,66 MPa para o P3HB e 12,2 MPa para a cerâmica comercial.

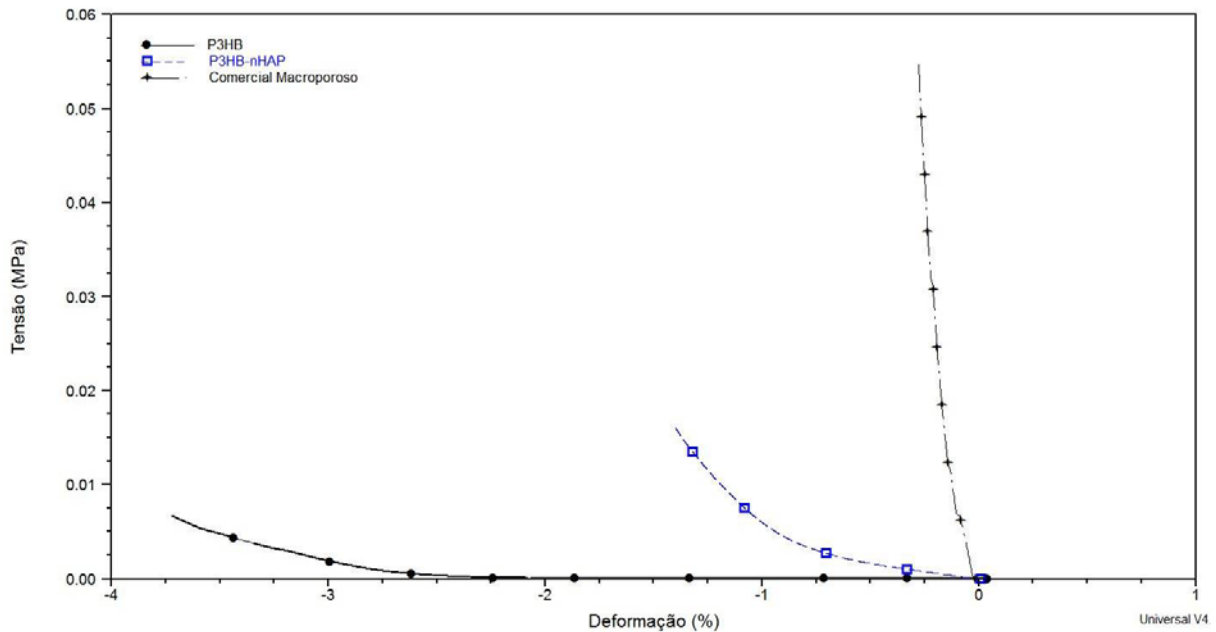


Figura 18 – Gráfico de compressão tensão versus deformação (DMA) do nanocompósito P3HB-18%nHAP, P3HB, e Cerâmica comercial.

O valor do módulo de compressão obtido para o nanocompósito foi maior que o do PHB puro e, menor quando comparado ao comercial, que é uma matriz óssea mineral natural. Porém foi verificado que o módulo apresentado ficou próximo de outros resultados presentes na literatura para biomateriais sintéticos porosos, como o obtido por Blaker (2005), por teste de compressão semi-estático em um biomaterial compósito PDLLA/15%Bioglass® com módulo axial de 1,20 MPa e 0,16 MPa para o módulo transversal.

A comparação com os valores do osso deve considerar tanto para ossos compactos como para trabeculares, o que origina uma ampla escala, com variações do módulo de 3,9 – 71 GPa e 0,05 – 900 MPa respectivamente, sendo os valores obtidos através de diferentes testes mecânicos, em ossos localizados em regiões distintas do corpo humano (LIEBSCHNER, 2004).

Trabalhos anteriores têm associado os resultados das propriedades mecânicas dos compósitos à existência de uma porcentagem de carga crítica, inferiores a 10%, que caso seja ultrapassada o efeito sobre o módulo poderá ser contrário, reduzindo assim o módulo para esses compósitos, quando comparado ao polímero puro (FU et al., 2008). Sendo assim, o uso de porcentagem relativamente elevada de 18% nHAP, principalmente tratando-se de um nanocompósito, pode ter comprometido a resistência à compressão (módulo) do compósito, embora este não deve ter sido o fator determinante e sim o grau de compactação alcançado. A porcentagem usada teve o intuito de preservar a existência de cavidades/porosidade no biomaterial, associado ao favorecimento do desempenho biológico, com base nos melhores resultados indicados em estudos anteriores (SADAT-SHOJAI et al., 2013).

Visando desenvolver um material para preenchimento ósseo com melhores propriedades mecânicas, utilizando esta metodologia, deverão ser adequadas as condições de processamento por compressão, principalmente com relação à carga aplicada e ao tempo de aplicação desta, já que a variação da temperatura é extremamente crítica, devido à existência de uma estreita janela de processamento do P3HB, originando com facilidade sua degradação, inclusive quando a temperatura é próxima ao ponto de fusão (GALEGO et al., 1999).

CORRELAÇÃO – PROPRIEDADES MECÂNICAS BIOMATERIAIS X OSSO

Devido à anisotropia do osso os valores reportados são variáveis, não só quanto a localização no corpo humano como também de acordo com sua especificidade, assim ossos compactos e trabeculares apresentam uma escala ampla de valores. Na mandíbula humana por exemplo, Mish (1999), reportou valores de módulo que variam entre 3,5 – 125,6 MPa para o osso trabecular e para o compacto de 24,9 a 240 MPa.

Uma visão mais ampla e comparativa com a literatura, dos resultados apresentados e os módulos de flexão e compressão dos ossos trabecular, cortical e cortical da mandíbula pode ser observada na Tabela 11.

Tabela 11 – Propriedades de flexão e compressão dos biomateriais estudados comparadas as do osso humano presente na literatura.

Amostras	E_{compressão} (MPa)	$\sigma_{flexão}$ (MPa)	E_{flexão} (GPa)	Referências
P3HB	0,66	7,08	1,0	Dados do estudo
P3HB/18%nHAP	2,26	2,09	0,8	Dados do estudo
Osso trabecular Fêmur	50 - 500	1,5 - 45	-	Carter, 1977
Osso cortical Fêmur	14,7-19,7 (GPa)	-	9,82 -15,7	Liebschiner, 2004
Osso trabecular Mandíbula	3,5 - 125,6	0,22 - 10,44	-	Mish, Qu, Bidez, 1999
Osso trabecular com cortical Mandíbula	24,9 - 240,0	-	-	Mish, Qu, Bidez, 1999
Osso trabecular Mandíbula	*DA = 4,2 **DT = 2,7	-	-	Giesen, 2001
Osso desproteínizado (Industrial)	12,2	1,28	0,011	Siqueira, 2009

*DA = Direção Axial

*DT = Direção Transversal

O módulo de flexão associado a formulação P3HB/18%nHAP assim como o de compressão apresentou uma resistência compreendida ou próxima a faixa reportada para o osso trabecular da mandíbula (Tabela 11), que por ter um comportamento anisotrópico, apresenta um amplo intervalo de variação nos valores reportados, associados aos ensaios mecânicos, realizados por diferentes autores. Desse modo, do ponto de vista mecânico o P3HB/18%nHAP também poderá satisfazer as necessidades de preenchimento em pequenas cavidades ósseas.

As medidas de microdureza realizadas (Tabela 12) nesse estudo, indicam que a microdureza aumentou no compósito com 18% de nHAP em relação a matriz P3HB, sem evidências de formação de agregados.

Tabela 12 – Microdureza Vickers do P3HB e do compósito P3HB/18%nHAP

Amostra	MHV
P3HB	10,6
P3HB/18%nHAP	14,9

O P3HB/18%nHAP se tornou mais rígido, quando comparado a matriz polimérica, este aumento da dureza está diretamente relacionado com o aumento do módulo, ao considerar esta como um indicador do módulo de elasticidade (CHEN; WANG, 2002; JUNIOR, 2014).

O aumento da microdureza observado pode ser justificado pela dureza inerente às partículas da cerâmica – HAP que é maior que a do polímero orgânico (SADAT-SHOJAI et al., 2013). A distribuição das nanopartículas, tem um impacto relevante na dispersão dos valores encontrados para a microdureza nas diferentes regiões da amostra (Tabela 12), resultado que indica a existência de uma distribuição homogênea das partículas nanométricas na matriz. Este é um resultado positivo da metodologia de pré-encapsulamento das partículas antes de serem processadas por compressão. Além da distribuição o pré-encapsulamento favorece a formação de uma interfase mais efetiva sobre as nanopartículas não aglomeradas. Deve-se destacar que o ensaio de microdureza é realizado na superfície e que apesar de envolver parte do volume do corpo de prova, não é afetado pela morfologia interna, na mesma proporção que os ensaios de flexão são, o que explica as diferenças encontradas nos resultados reportados (Tabelas 11 e 12). De acordo com a literatura, outros fatores poderão estar influenciando o módulo do compósito P3HB/18%nHAP como tamanho das nanopartículas e a adesão matriz-nanopartícula (FU et al., 2008).

Os valores médios dos módulos elásticos, obtidos por teste de nanoindentação dos biomateriais implantados em forma de disco, bem como dos ossos corticais mandibulares, retirados dos locais que foram preenchidos, são mostrados na Tabela 13. Como pode ser visto o módulo do bionanocompósito foi ligeiramente maior do que o dos ossos avaliados no sentido longitudinal (L) e transversal (T), enquanto os ossos apresentaram valores muito próximos um do outro nas diferentes direções das forças aplicadas nos testes.

Tabela 13 – Módulo Elástico dos Ossos mandibulares nas direções L/T e do P3HB/18%nHAP obtidos por nanoindentação

Amostra	E_{ind}(GPa)
P3HB/18%nHAP	4,93±1,09
Osso Coelho L	2,39±0,46
Osso Coelho T	2,39±1,18

De acordo com os valores registrados pode ser observado que o módulo do osso da mandíbula do coelho calculado no ensaio de nanoindentação, na posição longitudinal e transversal, não apresentou um valor médio com diferença significativa, sugerindo a não influencia da direção de carga aplicada para esse tipo de osso no animal utilizado na pesquisa. Resultado diferente foi observado por Li, Abdel-Wahab, Silberschmidt (2013), em um estudo realizado em femur bovino fresco os quais encontraram propriedades elástico-plásticas não uniformes com uma razão anisotrópica variando em função da posição anatômica e da direção de propagação da fratura. Também observaram que até as alterações anisotrópicas da microestrutura adjacente exercem influencia na variabilidade da resistência à fratura. A influência da direção da carga aplicada no osso bovino foi confirmada também por Bandini (2013).

Wang, Mabrey, Agrawal (1988), indicam que existem diferenças microestrutural e composicional significativa entre algumas espécies de animal e humana. A estrutura óssea do coelho é primária, apresentando vasos que acompanham o sentido longitudinal do osso e pequenas fibrilas colágenas na superfície da fratura do osso. Talvez essa estrutura de ósteons primários e a presença de pequenas fibrilas colágenas possam justificar a semelhança do módulo no sentido longitudinal e transversal, não exercendo desse modo influência significativa no osso do coelho, com relação a característica anisotrópica comprovadamente presente em ossos.

O conteúdo mineral e a porosidade presente também são fatores intrínsecos que exercem influência no módulo do osso. Assim, como a idade de cada animal pode influenciar o comportamento mecânico (ISAKSSON et al., 2010).

4.4 – COMPORTAMENTO TÉRMICO

O biocompósito P3HB/18%nHAP obtido foi processado visando, entre outras, propiciar um melhor contato (interfase) das nanopartículas e a matriz, evitando o favorecimento de formação de agregados. A formação de uma interfase adequada

pode exercer influência no comportamento térmico do compósito, sendo utilizada a termogravimetria para avaliar esta influência, assim como, determinar a carga efetiva de nHAP e, oferecer informações adicionais em relação a sua distribuição no material conformado por compactação.

A Figura 19 (TGA) é representativa de ensaios (3) em diferentes regiões do corpo de prova, registrando-se uma carga de nHAP no compósito P3HB/nHAP de 18% em massa, sem diferenças significativas. A diferença encontrada em relação a quantificação teórica da massa cerâmica de 20% deve-se a perdas inerentes ao processo de encapsulamento da nHAP com o P3HB.

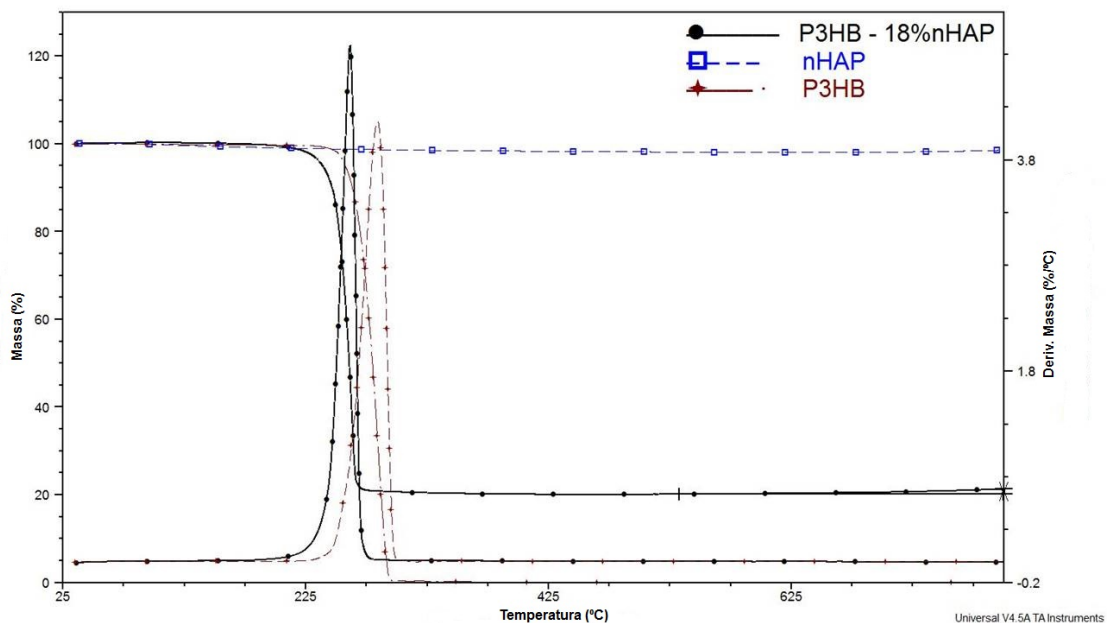


Figura 19 – Gráfico da perda de massa (TGA) e derivada da perda de massa (DTG) do P3HB e do biocompósito P3HB/X%nHAP.

O mecanismo de decomposição térmica do nanocompósito é dependente de diversos fatores entre estes a natureza da carga, da matriz e principalmente da interação carga-matriz. No perfil de degradação (Figura 19) se observa que a degradação térmica acontece em um único estágio associado a um estreito intervalo de temperatura.

Tanto na curva integral como na diferencial se observa nitidamente a redução da temperatura de degradação do P3HB/18%nHAP em relação ao P3HB, o que é consequência da interação da matriz P3HB com a nHAP denotando uma marcada influência da superfície da nHAP no mecanismo de degradação do P3HB (CHRISAFIS; BIKIARIS, 2011). Na curva integral de perda de massa as

temperaturas onset (T_{onset}) da termodegradação do PHB (264,2^oC) e do P3HB/18%nHAP (248,7^oC) apresentam diferenças de mais de 16^oC, assim como na curva diferencial (DTG), a taxa de termodegradação se reduz 22,6^oC em relação a do P3HB, como consequência da interação entre a matriz do P3HB e as nanocargas de nHAP, que favorecem a quebra das ligações covalentes da matriz (DORIGATO; D'AMATO; PEGORETTI, 2012).

O recobrimento eficiente das nanopartículas de cerâmica observado nas imagens de MEV (Figura 17), imagens nas quais não se apreciam partículas de nHAP sem recobrimento. Desse modo, permite inferir que o deslocamento (decréscimo) da temperatura de degradação térmica observada no compósito poderia ainda ser maior, se considerarmos que a baixa condutividade térmica da cerâmica presente (nHAP) deve originar um retardo no processo dinâmico de aquecimento do compósito, em relação a temperatura do forno, existindo um registro da transição a uma temperatura superior, o que não acontece na amostra do P3HB. Observação semelhante foi feita por Dorigato (2012) em nanocompósitos de polietileno/sílica e também por Sadat-Shojai (2013) em nanocompósito de polihidroxibutirato /nanohidroxiapatita.

As análises com a técnica de DSC, são direcionadas principalmente para avaliar a presença da fase cristalina (Figura 20, Tabela 14) e, não constata diferenças significativas na temperatura de fusão, sendo sua principal diferença registrada em calor de fusão, ΔH_f e forma de sua transição endotérmica.

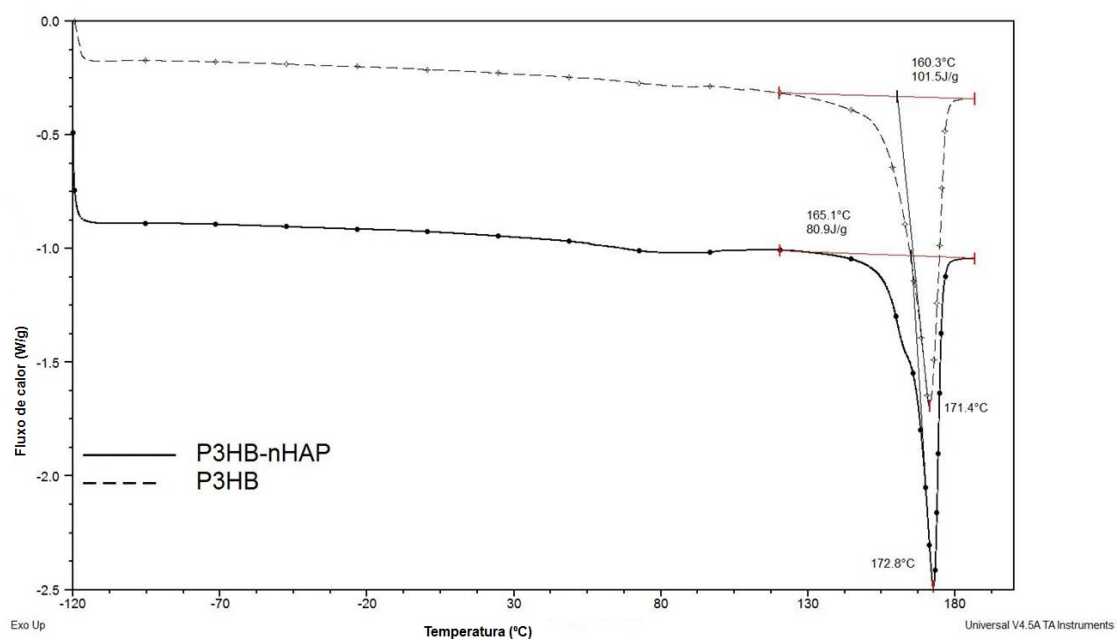


Figura 20 – Termogramas de DSC do P3HB e biocompósito P3HB/18%nHAP.

A entalpia de fusão do P3HB/18%nHAP é aproximadamente 20% menor que a da matriz devido ao efeito da nHAP na formação da fase cristalina. A formação de um ombro no pico endotérmico observado denota a formação de regiões cristalinas que fundem a menor temperatura provavelmente a região próxima as interfaces P3HB-nHAP.

Sadat-Shojai (2013), atribuiu a presença do ombro no pico de fusão do PHB, a fusão das lamelas com distintos números de dobras e espessura, resultado de cadeias poliméricas de tamanhos diferentes. Embora o ombro permaneça presente no pico endotérmico com a introdução de nHAP, observaram o desaparecimento quando a porcentagem em massa alcançou 15 – 30%, sendo atribuído a formação de cristais mais perfeitos na presença de nanopartículas de HAP durante o resfriamento.

Tabela 14 – Resultados DSC para P3HB e P3HB/nHAP.

Amostra	Tf (°C)	ΔH_f (J/g)
P3HB	171,4	101,5
P3HB/18%nHAP	172,8	80,9

O decréscimo na cristalinidade tem um impacto contrário, nas propriedades mecânicas, ao esperado com o aumento da nanocarga no biocompósito que deve ser considerado nas análises comparativas das propriedades mecânicas deste em relação a matriz.

4.5 – TESTES BIOLÓGICOS – BIOCAMPATIBILIDADE E TOXICIDADE

TESTE DE INDUÇÃO DE RESPOSTA INFLAMATÓRIA: PRODUÇÃO DE NO

O óxido nítrico desempenha desde um papel essencial a vida, como a regulação da circulação da placenta até um processo letal demonstrável, como em um choque séptico (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). O NO têm funções complexas e antagônicas e é produzido por macrófagos ativados por citocinas; é uma pequena molécula versátil que tem ação imuno-reguladora na inflamação e nos mecanismos de autoimunidade (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997).

Pode ser visto na Tabela 15 a concentração de NO para os poços com macrófagos. Os testes que avaliaram a indução da resposta inflamatória através da produção de NO, estimulada pelo nanobiomaterial, em meio de cultura do macrófago

RAW 264.7, pelo método de Greiss, demonstraram que não houve indução da produção de NO nas culturas durante os cinco dias de análise.

Tabela 15 – Concentração de NO produzido pelos macrófagos RAW 264.7 em contato com o nanocompósito, o controle (células sem o material) e com LPS (lipopolissacarídeo – indutor de inflamação).

[NO] micromolar			
Amostra	1º dia	3º dia	5º dia
P3HB/nHAP	0	0	0
Controle	0	0	0
LPS	5,6		

Este resultado é importante, já que visamos o uso do compósito testado para preenchimento ósseo. De acordo com a literatura caso a ativação dos macrófagos aconteça por algum material estranho ao organismo pode ser induzida a produção do mediador inflamatório NO e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), estando estes relacionados com reabsorção óssea, formação de granuloma e outras atividades biológicas presentes na inflamação (HANKS et al., 1996).

CITOTOXICIDADE

No final do teste de avaliação de produção de NO, quinto dia após iniciado os testes, as células dos poços testes foram coletadas para serem avaliadas com o corante trypan-blue (0,2% PBS) para contagem das células mortas coradas em azul. Não foi observada atividade citotóxica e citostática em cultura de macrófagos da linhagem RAW 264.7, já que as culturas dos poços testes e dos controles não apresentavam células mortas após o quinto dia de teste e as células apresentavam a mesma taxa de crescimento.

É importante ressaltar que o nanocompósito que possui 18% em massa de nHAP mostrou ser citocompatível corroborando os resultados de estudo anterior de um nanocompósito P3HB/HAp com a razão cerâmica de 15%, muito próxima do nosso, que exibiu o maior número de células em quatro dias de cultura em teste *in vitro*, quando comparada a outras proporções cerâmicas e a matriz polimérica sem preenchimento (SADAT-SHOJAI et al., 2013). Pode ser visto na Figura 21 o comportamento não citotóxico do nanomaterial estudado para cultura de macrófagos

que foi demonstrado através da aparência celular normal observado no primeiro, terceiro e quinto dias, com formação de monocamadas, aderidas e em multiplicação (SADAT-SHOJAI et al., 2013).

Boa adesão e expressão de fibroblastos foram verificadas anteriormente, na superfície de biomaterial compósito micrométrico PHB/HAP (74/26 %m/m), mostrando a citocompatibilidade *in vitro* (SIQUEIRA, 2009).

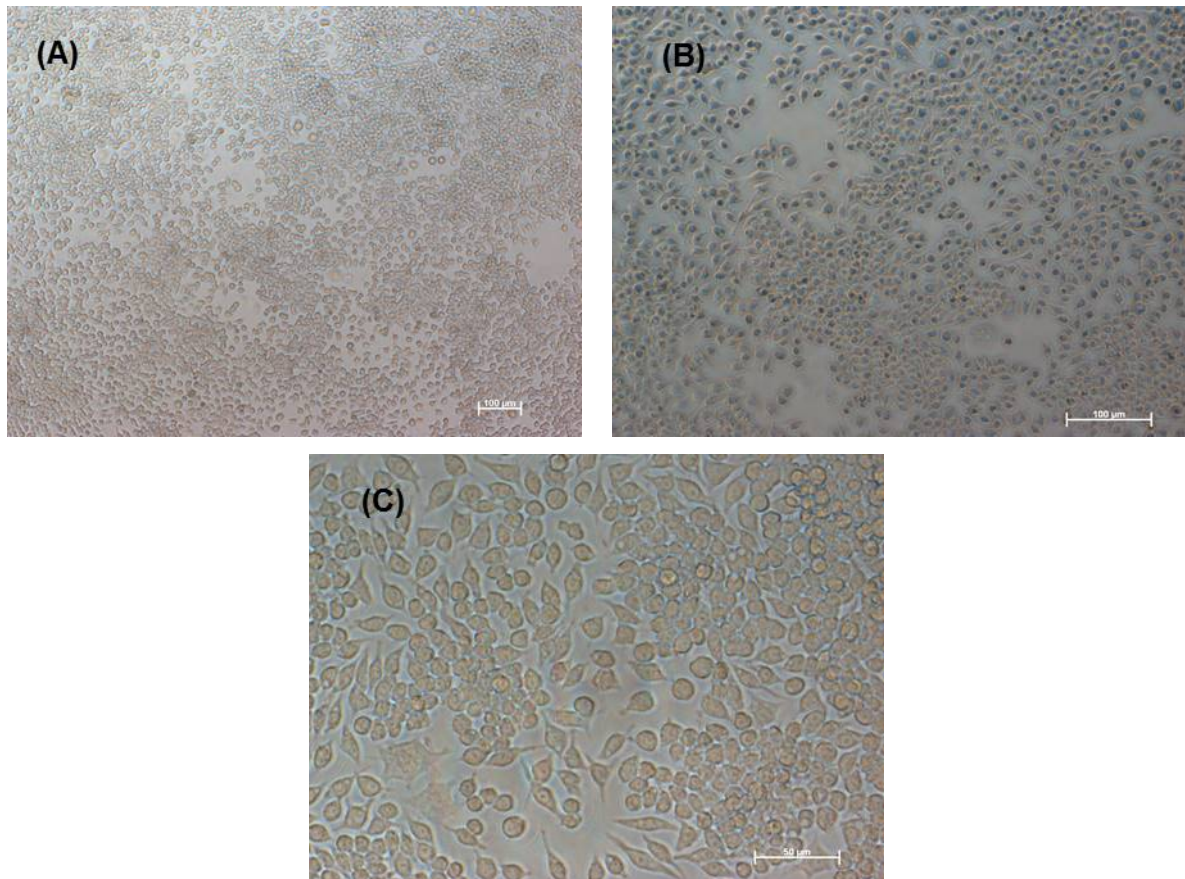


Figura 21 – Fotomicrografias Óticas mostrando o crescimento celular das células em presença do P3HB/nHAP no primeiro e no quinto dia do experimento. (A), (B), (C), Escalas de – 100, 100, 50, respectivamente.

A evolução dos biomateriais aponta para as vantagens do uso de materiais em nanoescala. A nanohidroxiapatita tem se destacado por ter algumas propriedades importantes, dentre elas, proporcionar a realização de processos celulares básicos como: adesão, diferenciação e proliferação dos osteoblastos, além da osseointegração e deposição de minerais, como cálcio e fósforo em sua superfície, mais evidente que na hidroxiapatita convencional; estimulando dessa forma a formação de novo tecido ósseo em um menor período de tempo (MURUGAN; RAMAKRISHNA, 2005; ZHANG; WEBSTER, 2009; SADAT-SHOJAI et al., 2013).

4.6 – AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS – TESTES *IN VIVO*

4.6.1 – AVALIAÇÕES CLÍNICAS

Um coelho morreu imediatamente após o procedimento cirúrgico, talvez pelo fato de serem animais muito sensíveis, é provável que esse tenha ficado mais estressado do que os outros, o que fez com que não conseguisse passar do momento de recuperação anestésica com vida. Um segundo animal teve uma parada cardíaca, também imediatamente após o procedimento cirúrgico, mas devido às manobras de ressuscitação utilizada ele sobreviveu, tendo recuperação e sobrevida igual aos outros do mesmo período experimental. Esses dois foram os últimos dos procedimentos o que reforça a teoria de estarem estressados. Todos os outros animais recuperaram da anestesia em poucas horas e ficaram bem dispostos durante todo o período do experimento.

Nas avaliações clínicas feitas nos animais nos cinco dias imediatamente após os procedimentos cirúrgicos, pode ser observado que no primeiro dia apresentavam o sítio cirúrgico próximo da incisão realizada ligeiramente edemaciado, sendo reduzido até o terceiro dia e, a partir de então já não mostrou qualquer sinal inflamatório ao exame visual. Todos os animais voltaram a se alimentar e a tomarem água normalmente, depois de passado o efeito da anestesia, o que permitiu a interpretação de ausência de dor durante a mastigação no pós-operatório imediato. Para avaliar a dor dos animais foi observada ainda qualquer mudança no comportamento como: movimentos involuntários, piloereção e depressão respiratória. A não apresentação de qualquer desses sinais e sintomas teve a interpretação de ausência de dor. Pode ser observada cicatrização completa em torno de dez dias, sem apresentar deiscência, em todos os animais.

4.6.2 – AVALIAÇÕES MACROSCÓPICAS E ANÁLISES EM MEV

A avaliação morfológica macroscópica da interface tecido-implante foi possível ser realizada após dissecação cuidadosa dos tecidos moles e periósteo expondo o tecido ósseo e a região do defeito. Pode ser observado aos 45 dias que os grânulos do material implantado encontravam-se no leito receptor parcialmente reabsorvido e com a aparente substituição por um novo tecido de consistência gelatinosa, sem

apresentar falha na superfície de união entre o implante e o osso, semelhante ao controle positivo. Aos 90 dias nos defeitos preenchidos com grânulos de PHB/nHAP o aspecto macroscópico era semelhante aos 45 dias, porém o novo tecido de preenchimento nos defeitos, encontra-se mais firme ao toque quando comparado ao controle negativo.

Na figura 22 pode ser visto as observações macroscópicas confrontadas com observações microscópicas.

Os defeitos preenchidos com os biocompósitos PHB/nHAP em forma de disco, quando avaliados macroscopicamente, tanto aos 45 quanto aos 90 dias, apresentou um tecido aparentemente melhor estruturado, quando comparado com o encontrado nos defeitos do mesmo tempo preenchidos com PHB/nHAP, em forma de grânulos. Foi observada uma cápsula com aparência fibrosa, vascularizada, cobrindo os materiais implantados em todos os locais dos defeitos.

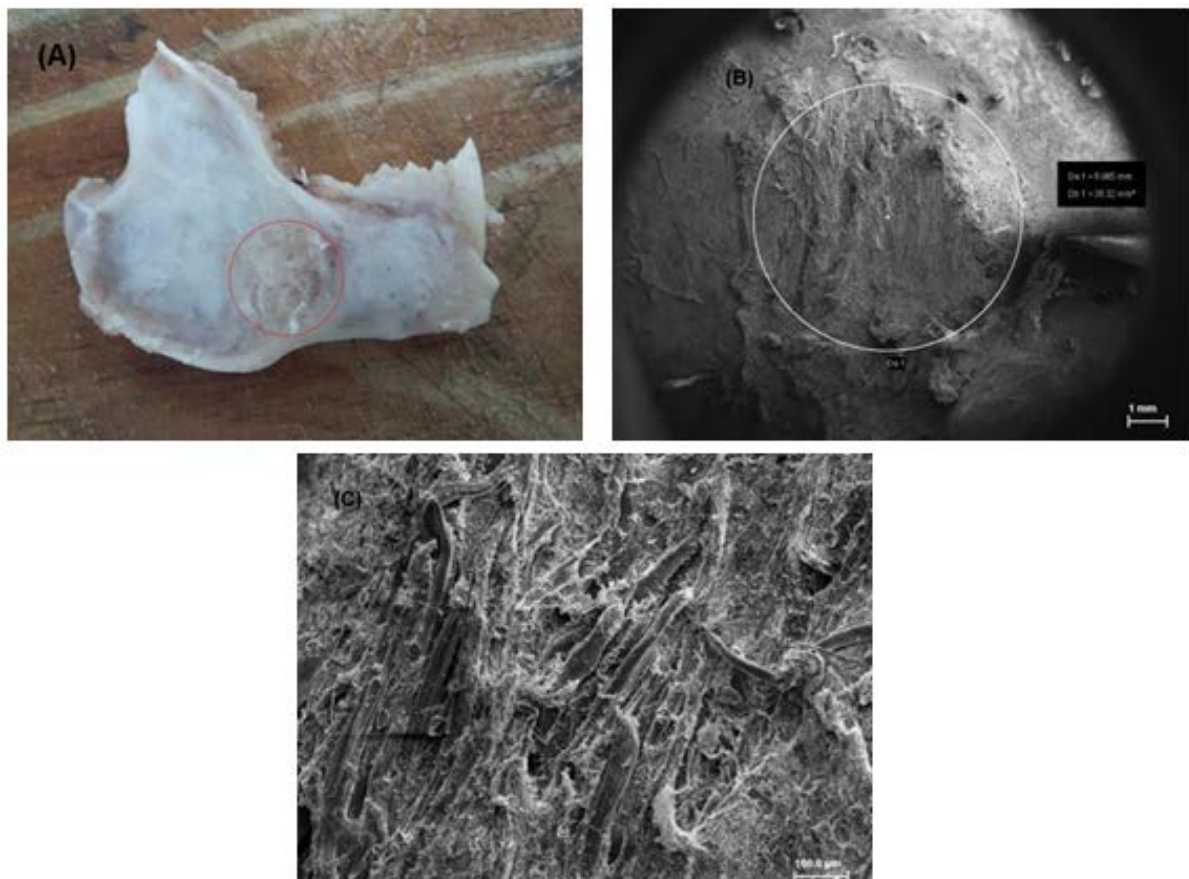


Figura 22 – Imagem macroscópica do fragmento ósseo após dissecação (A); Fotomicrografias do fragmento ósseo com defeito destacado – escala de 1 mm (B); Micrografia da cápsula fibrosa – escala de 100 μ m.

As observações macroscópicas de uma superfície com aspecto granuloso, gelatinoso na área dos defeitos mostraram por análise em MEV uma camada de aspecto fibroso que cobria todas as áreas de defeitos preparados nos ossos das mandíbulas dos coelhos.

4.6.3 – ANÁLISES MICROSCÓPICAS

4.6.3.1 – MICROSCOPIA ÓTICA (MO)

Uma variedade expressiva de biomateriais vem sendo disponibilizada para preenchimento de defeitos ósseos, paralelamente a isso cresce o número de pesquisas com caracterização mecânica e biológica, que são necessárias para que os novos materiais sejam disponibilizados ao uso em humanos. O preenchimento ósseo com um biomaterial proporciona uma melhora na cicatrização quando utilizado em defeito de tamanho crítico se comparado ao mesmo defeito sem utilização de nenhum biomaterial (MILORO, HARALSON, DESA, 2010). Com base nesse conhecimento o nosso biomaterial foi utilizado para o preenchimento de um defeito ósseo de tamanho crítico, visando favorecer o processo de cicatrização, analisando paralelamente atividades homeostáticas que não seriam possíveis ser reproduzidas em testes de laboratório, inerentes a resposta tecidual ao material implantado.

A avaliação histológica permitiu a análise e caracterização dos diferentes tipos de células distribuídos em toda área dos defeitos e na interface osso/implante. Aos 45 dias após implantação do bionanocompósito no GEBG a interface osso/implante consistia de um tecido fibroso, com um infiltrado inflamatório mononuclear moderado em todas as amostras. Na interface também foram observados inúmeros osteoblastos próximos à formação de linhas cimentantes. Na Figura 23 pode ser visto na interface osso/implante sinais de hiperatividade osteoblástica, assim como macrófagos e células gigantes no entorno de substâncias birrefringentes sugerindo serem os grânulos implantados, localizados na área mais central dos defeitos. Pode ser verificada ainda a proliferação de células endoteliais, mesenquimais, fibroblásticas, periosteais e heterófilos (neutrófilos), distribuídas em toda a região analisada. Na área dos defeitos pode ser verificada também a formação de novos vasos distribuídos aleatoriamente.

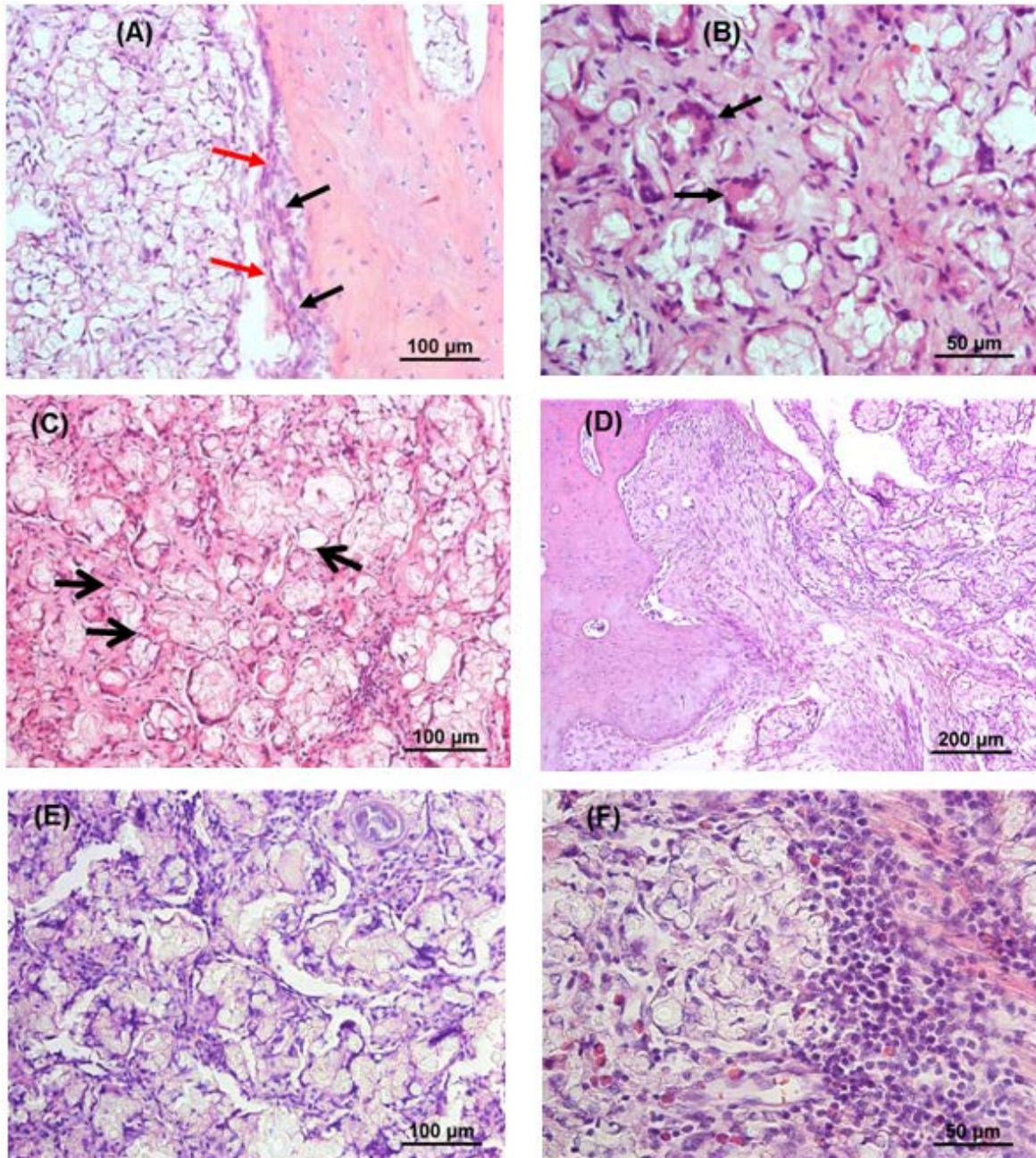


Figura 23 – Fotomicrografias Grupo experimental – GEBG – 45 d. (H-E) (A) presença de osteoblastos (setas vermelhas) e união fibrosa (setas pretas) – escala de 100 µm; (B) células gigante multinucleadas envolvendo grânulos PHB/nHAP – escala de 50 µm; (C) células endoteliais, mesenquimais e fibroblásticas – escala de 100 µm. GEBG – 90 d. (D); (E); (F) – escalas de 200, 100, 50 µm, respectivamente.

O comportamento celular observado no local receptor do implante, nesse primeiro período analisado observado na Figura 23, sugere que o biomaterial PHB/nHAP está possibilitando ao osso do coelho, respostas que são importantes e devem estar presentes em um processo de cicatrização considerado fisiologicamente normal, como uma aparente resposta inflamatória moderada.

Na avaliação histológica pode ser visto a presença de um infiltrado inflamatório formado por macrófagos e células gigantes multinucleadas envolvendo o biocompósito, sugerindo estarem relacionadas com o processo de reabsorção dos grânulos. De acordo com a literatura a reabsorção dá início a uma série de processos sucessivos de remodelação óssea que tem a osteogênese como um final fisiológico (IGNJATOVIC, USKOKOVIC, 2004).

Verificamos presença de células multinucleadas em vários locais no interior do defeito ósseo, circundando os grânulos do biocompósito, possivelmente para dar início ao processo de fagocitose e, ao mesmo tempo foram encontradas células mononucleares distribuídas na mesma área sugerindo uma resposta inflamatória moderada. Provavelmente essas células devem ser monócitos/macrófagos quando presentes na medula óssea ou osteoclastos quando próximo a ilhas ósseas, de acordo com observações anteriores (PIATTELLI; SCARANO; PIATTELLI, 1995).

A observação da resposta inflamatória do nosso estudo está ainda de acordo com observações feitas por Alves (2011) em análises com o compósito PHB/HA implantado em sítios ósseos de gatos. Van Blitterswijk (1986) demonstrou que durante os primeiros três meses de uma cerâmica hidroxiapatita macroporosa implantada em sítio intraósseo em ratos, a superfície das paredes dos poros foi coberta por células mononucleares e multinucleadas, mas que após esse período essas células fagocitárias permaneceram apenas nos locais onde o material implantado estava delimitado por tecido muscular (VAN BLITTERSWIJK, 1986). Portanto a presença de células inflamatórias observadas no atual estudo está dentro da normalidade da resposta biológica dos tecidos.

Também foi observada em nossas análises de 45 e de 90 dias dos dois grupos a presença de células gigantes e macrófagos apresentando substâncias birrefringentes em vacúolos nos seus citoplasmas, que sugere a reabsorção do biomaterial, como já demonstrado anteriormente (VAN BLITTERSWIJK, 1986; ALVES et al., 2011).

As características físicas da superfície dos materiais de implante têm sido descritas como importantes e que influenciam a integração ao tecido ósseo do sítio receptor. Ainda a vascularização óssea inadequada resulta em baixa celularidade e osseointegração deficiente (GOODACRE; KAN; RUNGCHARASSAENG, 1999). Verificamos a presença de vascularização nas áreas de provável formação posterior de novo osso, o que está de acordo com observações em análises histológicas feita

por alguns autores em estudos com coelhos (MIÑO-FARIÑA et al., 2009; ZHANG et al., 2012).

Nas avaliações histológicas de 45 dias, do grupo controle em que o defeito ósseo foi preenchido com o osso bovino mineral, pode ser visto uma resposta celular na interface osso/implante semelhante às observadas para o GEBG descrito anteriormente. Na Figura 24 pode ser visto linha cimentante óssea adjacente à lesão, presença de numerosos osteoclastos envolvendo material eosinofílico anuclear, moderado infiltrado neutrofílico, além de presença significativa de células mesenquimais, fibroblásticas e endoteliais.

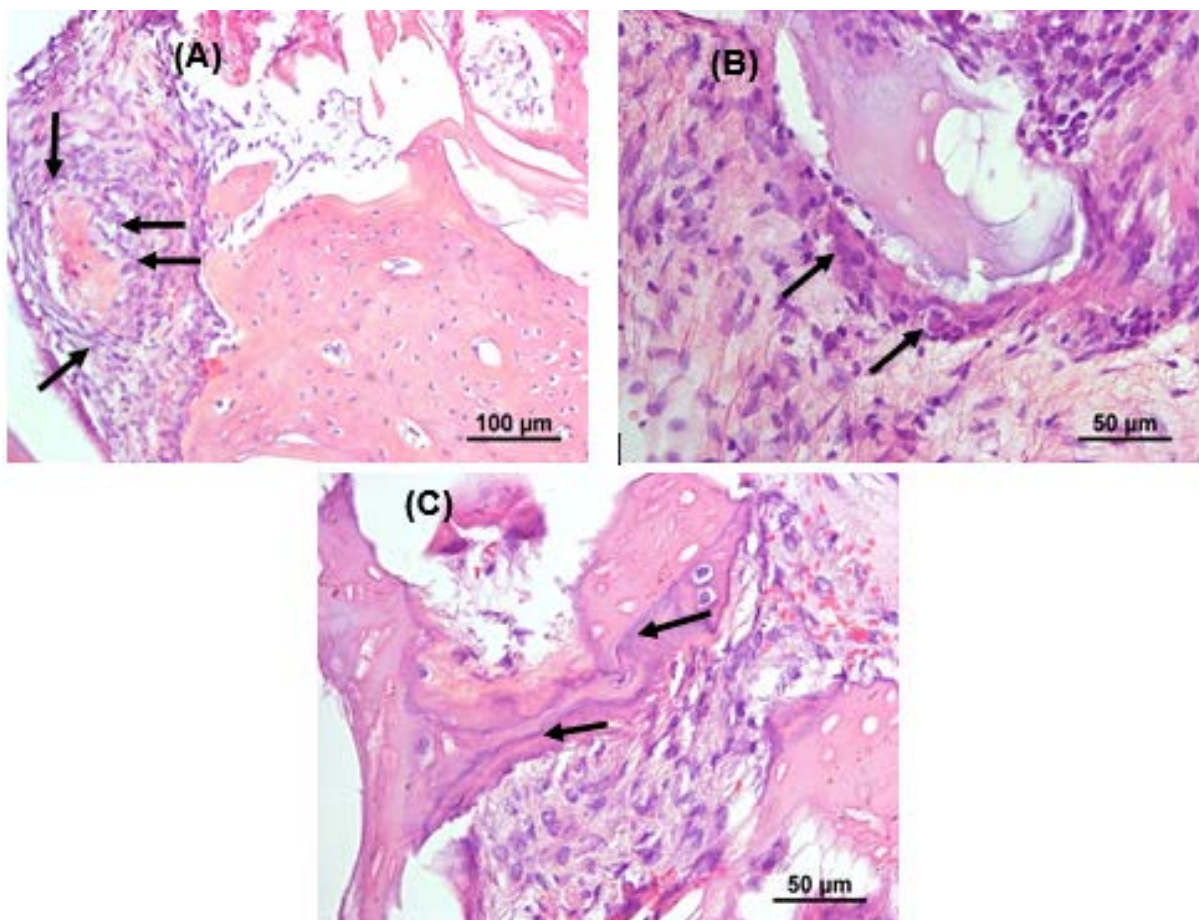


Figura 24 – Fotomicrografias Grupo controle positivo – GCP – 45d. (H–E) (A) numerosos osteoblastos (setas) – escala de 100 μm ; (B) Numerosos osteoclastos envolvendo o osso bovino mineral (setas) – escala de 50 μm ; (C) Linha cimentante (setas) – escala de 50 μm .

O osso bovino mineral, utilizado nesse estudo como controle positivo, é um tipo de enxerto xenogênico, de origem bovina, desproteínizado, com uma estrutura química e física idêntica a do osso humano e que apresenta baixa taxa de reabsorção.

Possui micro e macroporos em uma proporção de 75 a 80%, interconectados, o que favorece a formação de novos vasos e a migração de células como os osteoblastos (ARTZI, et al., 2004).

Podemos observar que o osso bovino mostrou uma boa integração com o tecido ósseo receptor com um possível estímulo à migração celular, mostrando presença de células com características de osteoblastos e células multinucleadas semelhantes à osteoclastos. Foi demonstrado para o mesmo osso bovino mineral do atual estudo, em estudo anterior através de avaliações por imunohistoquímica, expressão de osteoprotegerina e osteocalcina por células no entorno do osso, que foi implantado em defeito ósseo na mandíbula de coelho e, avaliados em períodos de 14 e 30 dias após a cirurgia. O osso bovino comparado ao osso autógeno particulado implantado em sítio controle obteve resultados de análises de imunoexpressividade sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, o que demonstra sua ação positiva como biomaterial para implante ósseo (CHAVES et al., 2012).

Nas análises histológicas do GEBD aos 45 dias cada amostra revelou fragmento ósseo contendo a área correspondente ao defeito que é revestida internamente por uma cápsula exuberante formada por fibroblastos dispostos em camadas compactas. Como pode ser visto na Figura 25 na parte interna da cápsula há formação multifocal de trabéculas ósseas, que são envoltas por agregados de osteoblastos e poucos osteoclastos. No interior da cavidade entre as trabéculas ósseas há conteúdo amorfo levemente eosinofílico indicando ser o nanomaterial implantado. Na parte externa da cápsula há intensa neovascularização e proliferação de osteoblastos com formação de trabéculas ósseas maduras.

Aos 45 dias, na Figura 26 pode ser visto nas amostras do fragmento ósseo do GCN a área correspondente ao defeito revestida internamente por cápsula exuberante formada por fibroblastos dispostos em camadas esparsas. Na parte interna da cápsula há proliferação de fibroblastos, com presença discreta de trabéculas ósseas, que são envoltas por poucos osteoblastos e raros osteoclastos. Na parte externa da cápsula há intensa neovascularização e proliferação de osteoblastos com formação de trabéculas ósseas maduras.

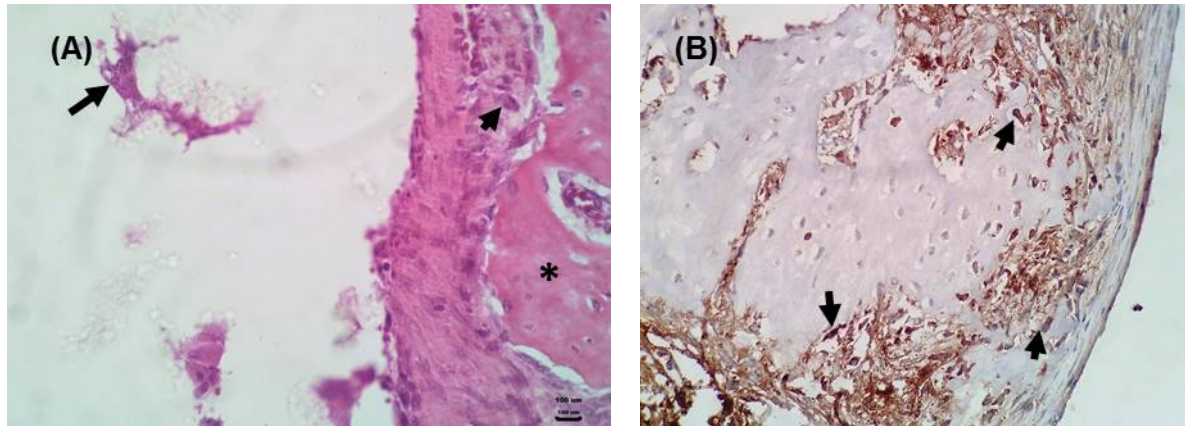


Figura 25 – Fotomicrografias Grupo experimental – GEBD – 45 d. A imagem (A) revela proliferação de osteoblastos (seta menor) na periferia da matriz óssea (*), e osteoclastos (seta maior) ao redor de trabécula óssea no centro da área implantada. A imagem (B) mostra intensa imunomarcagem intranuclear dos osteoblastos (setas) pelo anticorpo anti Ki-67 – escalas de 100 µm.

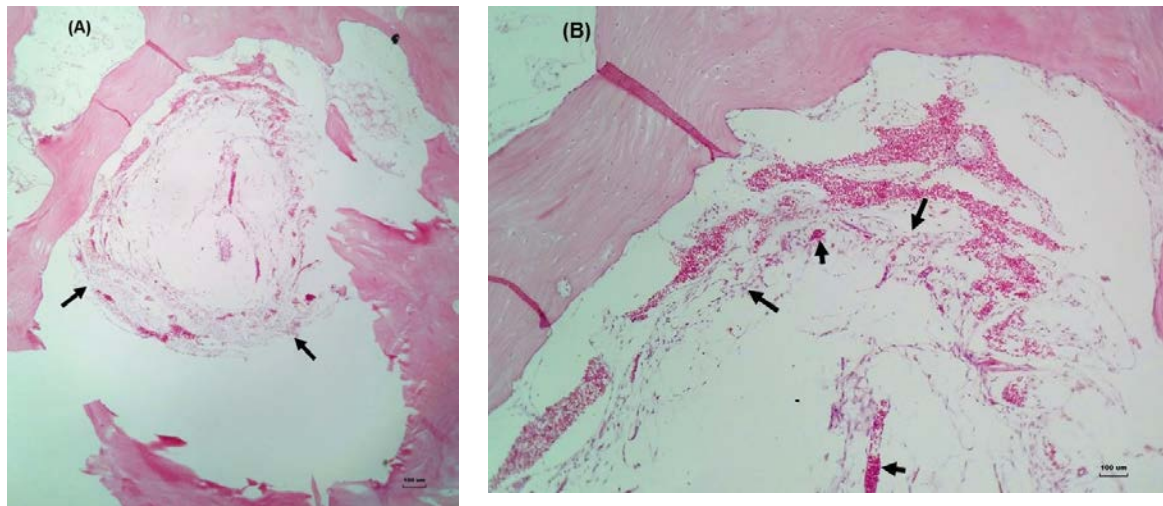


Figura 26 – Fotomicrografias Controle Negativo – GCN – 45 d. A imagem (A) revela proliferação de fibroblastos (setas) com arranjo circular no orifício (H-E, 4X). A imagem (B) é a ampliação da (A), onde nota-se os fibroblastos (setas maiores) e neovascularização (setas menores) moderada – escalas de 100 µm.

Nas análises histológicas do GEBD de 90 dias, mostradas na Figura 27 pode ser visto o fragmento ósseo com a área correspondente ao defeito revestida internamente por cápsula exuberante, formada por fibroblastos dispostos em camadas compactas. Na face interna da cápsula há proliferação de osteoblastos os quais se arranjam em camadas sobrepostas e formam projeções de matriz óssea em direção à luz da formação cística. As trabéculas ósseas são envoltas por agregados de osteoblastos e ao centro está preenchida por pequenos vasos. No interior da cavidade há conteúdo amorfo refringente indicando ser o nanomaterial implantado. Na parte

externa da cápsula há intensa neovascularização e proliferação de osteoblastos com formação de trabéculas ósseas maduras.

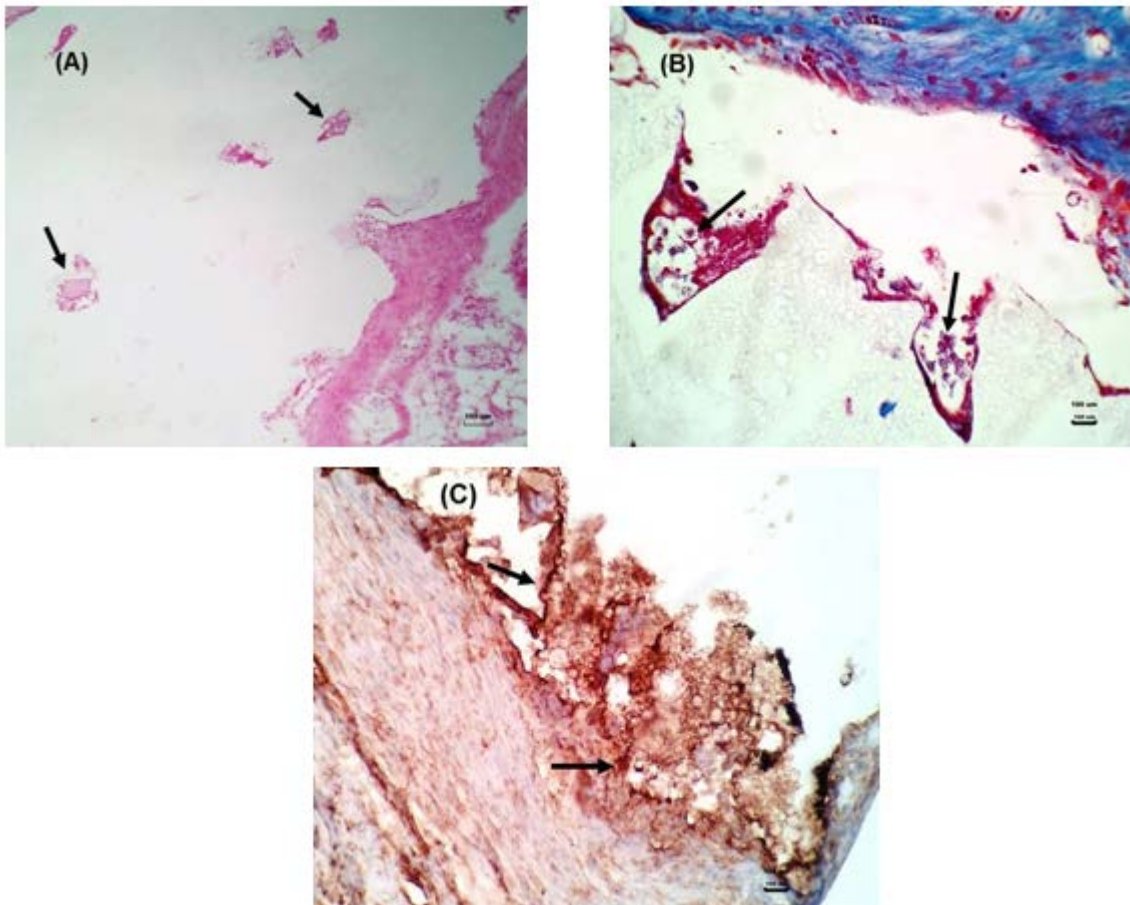


Figura 27 – Fotomicrografias Grupo experimental – GEBD – 90 d. A imagem (A) revela a formação de várias trabéculas ósseas (setas) no centro da área implantada (H–E). A imagem (B) mostra proliferação de osteoblastos ao redor das trabéculas ósseas (setas), Tricrômio de Masson. A imagem (C) mostra intensa imunomarcacão intranuclear dos osteoblastos (setas) pelo anticorpo anti Ki-67 – escalas de 100 μm .

As células em proliferação quando coradas com o imunomarcador Ki-67 apresentam os núcleos na cor marrom escuro. Como pode ser observado na Figura 27 (C) muitos osteoblastos estão se multiplicando dentro do defeito ósseo, como revelado pela coloração imuno positiva do Ki-67.

A presença das ilhas ósseas ou trabéculas na área do defeito, bem como presença de osteoblastos e osteoclastos, células envolvidas no processo de remodelação óssea, mostrada no presente estudo mostra que o nanomaterial está sendo capaz de ativar o processo cicatricial do osso, evidenciando assim um potencial promissor como biomaterial para preenchimento ósseo. Importante observar que não foi utilizado nenhum osteoindutor associado a esse biomaterial, isso faz com que os

resultados chamem mais atenção para esse nanomaterial entre os biomateriais osteocondutores. Observações semelhantes foram feitas recentemente com a utilização de um *scaffold* de hidrogel com células da polpa dentária, visando a osteoindução (PETRIDIS et al., 2015).

No estudo com PHB/nHAP foi então observada a presença de neoformação vascular na cápsula fibrosa, corroborando achado de Alves (2011) o que sugere a formação de novo tecido ósseo.

Aos 90 dias para o GCP pode ser visto na Figura 28 que as amostras revelam fragmento ósseo com a área correspondente ao defeito revestida internamente por cápsula formada por fibroblastos dispostos em camadas pouco coesas. Na parte interna da cápsula há proliferação de fibroblastos, os quais se arranjam em todas as direções com presença discreta de trabéculas ósseas. Observa-se ainda moderada neovascularização associada aos fibroblastos. Na parte externa da cápsula há marcante neovascularização e proliferação de osteoblastos com formação de trabéculas ósseas maduras.

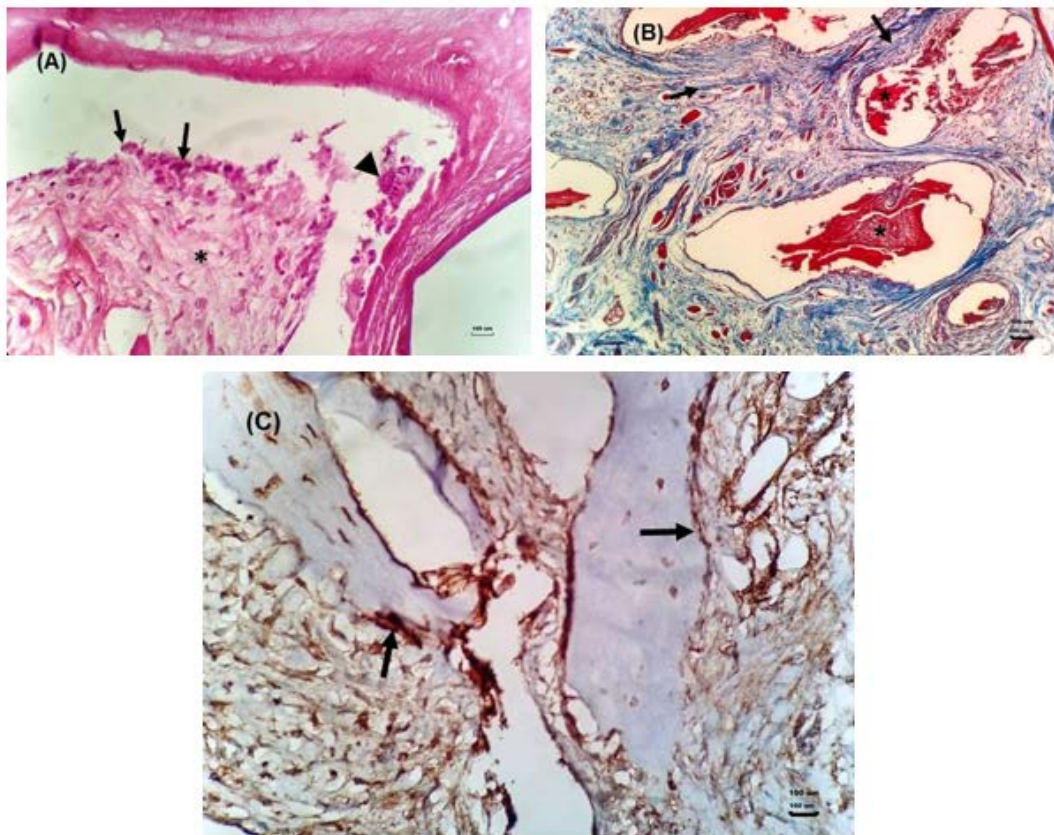


Figura 28 – Fotomicrografias Grupo Controle Positivo – GCP – 90 d. A imagem (A) revela deposição de fibras colágenas (*) rodeadas por células inflamatórias (setas) e osteoclasto (cabeça de seta). A imagem (B) mostra intensa imunomarcção intranuclear dos osteoblastos (setas) pelo anticorpo anti Ki-67 – escalas 100 µm.

As análises histológicas realizadas com enxerto xenogênico usado no estudo de Chaves (2012), sugere desempenho comparável ao biomaterial formulado no estudo atual com relação à resposta inflamatória desenvolvida no sítio ósseo receptor, mostrando um infiltrado inflamatório composto por células multinucleadas e mononucleares, como neutrófilos, macrófagos e células gigantes.

A Tabela 16 apresenta os resultados das avaliações histológicas e histoquímicas que foram realizadas.

A remodelação óssea deixa de ser um processo fisiológico normal quando ocorre o desequilíbrio entre a absorção e a formação, predominando osteoclastos e conseqüentemente a absorção. Isso normalmente está ocorrendo no desenvolvimento de doenças como osteoporose, artrite reumatóide, mieloma múltiplo, doença periodontal, bem como câncer metastático (Boyle, Simonet & Lacey, 2003).

Tabela 16 - Dados das análises histológicas e histoquímicas dos estudos realizados em Coelhos, da linhagem Nova Zelândia.

Evolução da Cicatrização Óssea							
Dias	N	Grupo	Neovascularização	Qtd. de Ossificação	Proliferação Osteoblastos	Proliferação Osteoclastos	Ki-67
45	5	GEBD	13	8	14	10	64%
	5	GEBG	8	-	11	6	-
	5	GCP	6	-	7	5	-
	5	GCN	9	1	8	4	31%
90	5	GEBD	11	11	11	6	68%
	5	GEBG	6	-	9	7	-
	5	GCP	9	5	7	7	36%
	5	GCN	4	-	6	0	-

Como pode ser visto na Tabela 15 a neovascularização, bem como a proliferação de osteoblastos e osteoclastos no lado experimental, apresentou resultado superior ao controle positivo usado em nosso trabalho, o que permite concluir que seu desempenho clínico será positivo como biomaterial para preenchimento ósseo.

Na Figura 29 pode ser verificado o efeito da incorporação dos tratamentos nas áreas onde os defeitos foram realizados, com avaliação aos 45 e 90 dias após intervenção. Com relação à produção de fibroblastos observou-se que aos 45 dias não houve diferença significativa (IC, $P \leq 0,05$) entre as médias dos escores de GEBD ($1,8 \pm 0,12$) e GEBG ($1,8 \pm 0,21$), bem como entre GCN ($1,4 \pm 0,15$) e GCP ($0,14 \pm$

0,15). Contudo aos 90 dias verificou-se que a produção de fibroblastos foi significativamente menor no GCN ($1,0 \pm 0,1$), manteve-se estável no GEBD ($1,6 \pm 0,15$) e aumentou significativamente nos grupos GEBG ($2,2 \pm 0,12$) e GCP ($2,8 \pm 0,12$), os quais diferiram entre si. Portanto aos 90 dias após intervenção a maior produção de fibroblastos ocorreu no GCP (Figura 29A).

Vários autores têm mostrado a importância da presença de fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos nos processos de cicatrização onde foi utilizado procedimento de enxertia óssea. Eles parecem estar envolvidos em uma série de eventos importantes da cicatrização óssea como, por exemplo, os fibroblastos atuam na produção de colágeno. Os osteoblastos também são importantes, pois eles estão relacionados com a produção da matriz e mineralização óssea e por sua vez, os osteoclastos participam da remodelação óssea e junto com os osteoblastos formam o volume ósseo adequado em um processo de cicatrização (SCHNEIDER et al., 2009; GOMES et al., 2011; ZHANG et al., 2012; PETRIDIS et al., 2015; SAAD et al., 2015).

A produção de osteoblastos avaliada aos 45 dias foi significativamente menor (IC, $P \leq 0,05$) nos tratamentos GCN ($1,6 \pm 0,12$) e GCP ($1,4 \pm 0,14$), os quais não diferem entre si. Os grupos GEBG ($2,2 \pm 0,22$) e GEBD ($2,8 \pm 0,12$) diferiram entre si, indicando maior produção de osteoblasto no GEBD. A produção de osteoblastos reduziu aos 90 dias para todos os tratamentos, exceto no GCP, conforme dados a seguir: GCN ($1,2 \pm 0,10$), GCP ($1,4 \pm 0,14$) GEBG ($1,8 \pm 0,22$) e GEBD ($2,2 \pm 0,12$), mesmo assim a produção de osteoblasto foi maior no GEBD em relação aos demais grupos (Figura 29B).

No processo de recuperação óssea aos 45 dias, observou-se de modo geral, menor produção de osteoclastos independente do grupo estudado (GCN= $0,8 \pm 0,10$; GCP= $1,0 \pm 0,10$; GEBG= $1,8 \pm 0,22$), exceto no GEBD ($2,0 \pm 0,2$). É interessante enfatizar que aos 90 dias, o GCN ($0,1 \pm 0,05$) produziu o mínimo de osteoclastos e houve significativa (IC, $P \leq 0,05$) redução no GEBD ($1,2 \pm 0,10$), já o grupo GEBG ($1,4 \pm 0,10$) manteve-se estável e o GCP ($1,4 \pm 0,22$) apresentou aumento significativo (Figura 29C).

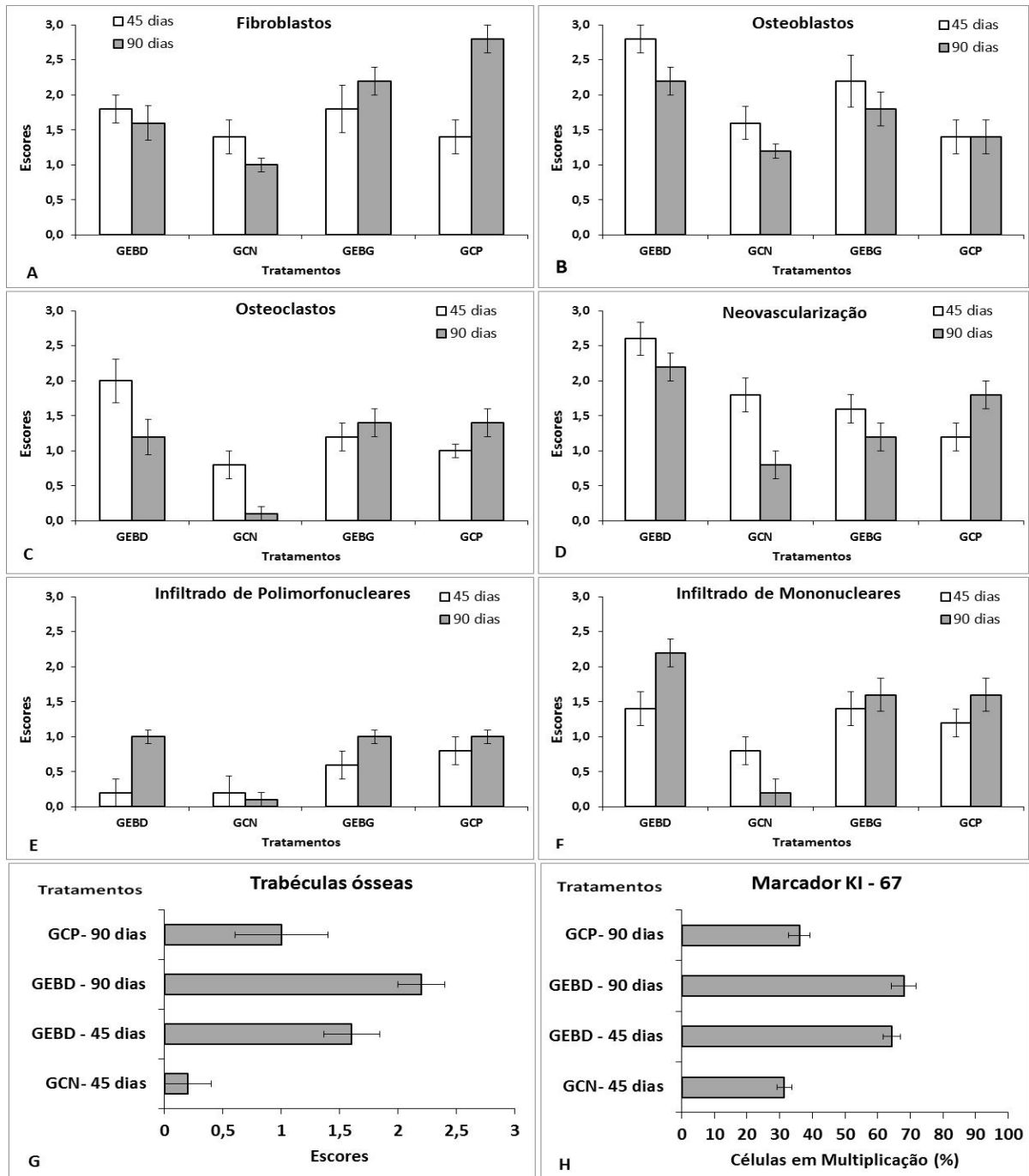


Figura 29 – Escores das principais respostas biológicas dos coelhos para os: GEBD, GEBG, GCP e GCN, avaliados aos 45 e 90 dias após o enxerto ósseo (Média \pm IC, $P \leq 0,05$, $n = 10$). Escores: todo o escore utilizado foi ordinário crescente em uma escala de 0 a 3, sendo 0 = ausente, 1 = presença leve, 2 = presença moderada e 3 = presença acentuada. Onde para fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, infiltrado inflamatório de polimorfonucleares e de mononucleares (ausente = 0 células, presença leve = 1 a 5 células, presença moderada = 5 a 10 células, presença acentuada = acima de 10 células). Para neovascularização: ausente = 0, presença leve = 5 capilares, presença moderada = até 10 capilares, presença acentuada = acima de 11 capilares. As trabéculas ósseas: ausente = 0, presença leve = 3 trabéculas, presença moderada = de 4 a 6 trabéculas, presença acentuada = acima de 7 trabéculas. O índice de proliferação celular foi determinado utilizando o anticorpo anti Ki-67, para cada 100 células foi verificado que porcentagem delas que expressava a imunomarcagem intranuclear positiva para o anticorpo.

A neovascularização, mesmo aos 45 dias após o enxerto, é bastante considerável, independente do tratamento (GCN= $1,8 \pm 0,15$; GCP= $1,2 \pm 0,12$; GEBG= $1,6 \pm 0,12$; GEBD= $2,6 \pm 0,15$), mas principalmente no GEBD. Aos 90 dias esse processo tende a reduzir principalmente no GCN ($0,86 \pm 0,11$), todavia observou-se o contrário para o GCP ($1,8 \pm 0,12$) para o qual a neovascularização foi significativamente (IC, $P \leq 0,05$) maior aos 90 dias (Figura 29D). De acordo com a literatura a neovascularização tem um importante papel nos processos de cicatrização óssea, pois está diretamente relacionada com a irrigação e trocas metabólicas que auxiliam na recomposição do tecido (STEVENSON et al., 1997; MIÑO-FARIÑA et al., 2009; ZHANG et al., 2012).

De modo geral houve pouca produção de infiltrado de polimorfonucleares independente do grupo estudado e observou um aumento significativo (IC, $P \leq 0,05$) de sua produção ao longo do processo de recuperação óssea apenas para os grupos GEBD e GEBG (Figura 29 E). Aos 45 dias os grupos (GCN= $0,2 \pm 0,06$; GCP= $0,8 \pm 0,10$; GEBG= $0,6 \pm 0,10$; GEBD= $0,2 \pm 0,15$) apresentaram menores ou iguais escores do que aos 90 dias (GCN= $0,1 \pm 0,05$; GCP= $1,0 \pm 0,05$; GEBG= $1,0 \pm 0,06$; GEBD= $1,0 \pm 0,05$).

Por outro lado, a produção de infiltrado de mononucleares foi de modo geral maior em relação aos polimorfonucleares para todos os grupos analisados (Figura 29F). A presença de mononucleares reduziu significativamente (IC, $P \leq 0,05$) no GCN entre a primeira ($0,8 \pm 0,12$) e segunda avaliação ($0,2 \pm 0,11$), ao contrário do que se observou para os demais grupos, inclusive o GEBD ($2,2 \pm 0,12$) apresentou o maior escore dentre todos os grupos aos 90 dias.

A presença de infiltrado inflamatório pode estar relacionada com o processo de reabsorção do enxerto, como também observado por Alves (2011), o que possivelmente deve ter estimulado maior produção de infiltrados mononucleares, especialmente quando se usou o nanobiocompósito na forma de disco (GEBD).

Segundo Thomaidis (2008), em 10 semanas de cicatrização foi observada a formação de novas trabéculas ósseas em um modelo de estudo em coelhos, no osso da mandíbula, em análise da utilização de cinco tipos de membranas, relatando ter encontrado nos locais dos defeitos vários indícios de formação de trabéculas. Na Figura 29G, apresentaram-se os escores para a presença de trabéculas ósseas no GCN ($0,2 \pm 0,10$) aos 45 dias, GEBD aos 45 dias ($1,6 \pm 0,24$) e 90 dias ($2,2 \pm 0,20$) de recuperação, bem como para o GCP ($1,0 \pm 0,4$) aos 90 dias após o enxerto. Os dados

indicam que a presença do nanobiocompósito na forma de disco (GEBD) mesmo aos 45 dias já apresentava significativamente (IC, $P \leq 0,05$) maior presença de trabéculas, inclusive em relação ao enxerto convencional (GCP) aos 90 dias. Esses dados mostram claramente a biocompatibilidade e o estímulo à formação óssea do nanomaterial testado nesse estudo, porém foi observada uma pequena demora na maturação do tecido nessa área. Provavelmente a demora pode ser explicada pela razão de reabsorção do P3HB, que por ter sido aparentemente lenta, pode ter dificultado o processo de maturação óssea.

Finalmente, são apresentadas as médias das porcentagens de células em multiplicação, avaliadas conforme a metodologia usando-se marcador KI, nas áreas dos enxertos (Figura 29H). Observou-se que essa porcentagem foi significativamente (IC, $P \leq 0,05$) menor nos grupos GCN ($31,4 \pm 2,3\%$) aos 45 dias e GCP ($36,0 \pm 3,2\%$) aos 90 dias, quando comparados aos grupos GEBD aos 45 dias ($64,0 \pm 2,6\%$) e 90 dias ($68,0 \pm 3,7\%$). Segundo Petridis (2015) a presença de células em multiplicação indica que a área danificada está em recuperação e que o nanobiocomposito está possibilitando o desenvolvimento do processo de cicatrização.

O tempo de degradação física do PHB in vivo é superior a 3 meses de implantação. Alguns fatores exercem influência na velocidade de degradação do PHB como o peso molecular e a organização da cadeia do polímero. Outro fator que também pode influenciar a taxa da degradação do polímero é a presença de material de enchimento como a hidroxiapatita, que cria na superfície do compósito microfissuras entre as partículas e o polímero, favorecendo a entrada de fluido para dentro da massa do material, aumentando assim a superfície disponível para o ataque hidrolítico, um fenômeno de superfície (DOYLE; TANNER; BONFIELD, 1991).

O fenômeno de superfície provavelmente não pode exercer influência na degradação do PHB no atual estudo, pois o método utilizado para o processamento dos nanocompósitos proporciona o encapsulamento das nanopartículas pelo polímero, dessa forma a HAP não fica exposta na superfície podendo provavelmente exercer o efeito reforço, possibilitar distribuição homogênea, mas não influenciar a velocidade de degradação do polímero. As características químicas de superfície também podem influenciar a velocidade de degradação do polímero, segundo Doyle; Tanner; Bonfield (1991) o PHB é relativamente hidrofóbico o que também pode ter influenciando negativamente a taxa de degradação do bionanocomposito estudado.

Conclusivamente, os dados observados indicam uma resposta biológica melhor para o biomaterial com a formulação em discos quando comparado ao mesmo material em forma de grânulo, também mostrando superioridade em relação ao biomaterial comercial na maioria dos aspectos estudados e sempre superior à cavidade óssea sem nenhum preenchimento, a maioria das diferenças foram significativas (IC, $P \leq 0,05$) e permitem essa inferência final.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

- O módulo elástico do compósito, obtido por nanoindentação, mostrou valor ligeiramente superior ao do osso do defeito preenchido, evidenciando sua adequada indicação como substituto ósseo em pequenas cavidades.
- As propriedades mecânicas em relação ao módulo de flexão e compressão poderão ser adequadas a aplicações específicas utilizando a metodologia de compressão desde que se adequem as variáveis tempo e carga de compressão para obter uma colagem eficiente das cápsulas contendo nHAP.
- O biomaterial com discreta porosidade interconectada é adequado para sua utilização como material de preenchimento ósseo de pequenas cavidades, que tenham exigência de pouca carga, desempenhando um papel osteointegrador, ainda que suas propriedades mecânicas sejam inferiores as desejadas para preenchimento ósseo em geral.
- Para os biocompósitos PHB/nHAP foi possível concluir que a cicatrização mostrou melhor evolução para o GEBD comparado ao GEBG, apesar de ambos mostrarem biocompatibilidade e ausência de reação citotóxica e citostática.
- Pode ser observado que as células de resposta imune aguda, mononucleares, estiveram presentes em quase todos os defeitos, sendo também observadas próximas ao material usado como controle positivo e em alguns defeitos sem preenchimento.
- O nanocompósito mostrou seu potencial condutor, sendo observada a presença de uma membrana de tecido conjuntivo na interface osso/implante.
- Foi verificado que a porosidade foi suficiente para exercer a influência positiva na migração celular, porém o material poderá ter sua porosidade aumentada, chegando a uma porcentagem que se aproxime a um mínimo de 75%, com interconexão de poros para aumentar a migração celular e proporcionar a adequada formação de vasos.
- O tempo de reabsorção precisa ser observado e adequado às exigências para que o biocompósito mantenha um bom desempenho mecânico, sem atrapalhar o biológico, visando preencher as necessidades do local do defeito.
- De acordo com as expectativas iniciais os nanocompósitos formulados obtiveram êxito no que tange ao desempenho biológico promovendo a

osteocondução e segundo sua formulação, superando a desvantagem de migração da hidroxiapatita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARI, Y., RENO, C. R., TSAO, H., MORCK, D. W., HART, D. A. Influence of timing (pre-puberty or skeletal maturity) of ovariectomy on mRNA levels in corneal tissues of female rabbits. **Molecular Vision**, 2008; vol 14, p. 443-455.

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

American society for testing and materials. ASTM D790 - Standard Test Methods for Flexural Properties of Unreinforced and Reinforced Plastics and Electrical Insulating Materials. **Philadelphia**.

AN, Y. H., KANG, Q., FRIEDMAN, R. J. Mechanical symmetry of rabbit bones studied by bending and indentation testing. **American Journal of Veterinary Research**, 1996, vol. 57, n. 12, 1786–1789.

ARMENTANO, I., DOTTORI, M., FORTUNATI, E., MATTIOLI, S., KENNY, J.M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. **Polymer Degradation and Stability**, 2010, vol. 95, p. 2126-2146.

ARTZI, Z., WEINREB, M., GIVOL, N., ROHRER, M. D., NEMCOVSKY, C. E., PRASAD, H. S., TAL, H. Biomaterial Resorption Rate and Healing Site Morphology of Inorganic Bovine Bone and β -Tricalcium Phosphate in the Canine: A 24-month Longitudinal Histologic Study and Morphometric Analysis. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, 2004, vol. 19, n. 3, p. 357-368.

ASTM, ASTM. E384: Standard Test Method for Knoop and Vickers Hardness of Materials. **ASTM Stand**, 2012, p. 1-43.

AYERS, R. A., MILLER, M. R., SIMSKE, S. J., NORRDIN, R. W. Correlation of flexural structural properties with bone physical properties: a four species survey. **Biomedical Science Instrumentation**, 1996, vol. 32, p. 251–260.

BANDINI, A., CHICOT, D., BERRY, P., DECOOPMAN, X., PERTUZ, A., OJEDA, D. Indentation size effect of cortical bones submitted to different soft tissue removals. **Journal of the Mechanical Behavior of biomedical Materials**, 2013, vol. 20, p. 338-346.

BERGSMA, E. J., ROZEMA, F. R. M., BOS, R. R., DE BRUIJN, W. C. Foreign body reaction to resorbable poly(L-lactic) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 1993, vol. 51, p. 666–670.

BLAKER, J. J., MAQUET, V., JÉRÔME, R., BOCCACCINI, A.R., NAZHAT, S.N. Mechanical properties of highly porous PDLLA/Bioglass® composite foams as scaffolds for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, 2005, vol. 1, p. 643-652.

BOYLE, W. J., SIMONET, W. S., LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, 2003, vol. 423, p. 337-342.

BURSTEIN, A. H., REILLY, D. T., MARTENS, M. Aging of bone tissue: mechanical properties. **Journal of Bone & Joint Surgery**, 1976, vol. 58, n. 1, p. 82-86.

CALLISTER, W. D., RETHWISCH, D. G. Materials science and engineering: an introduction. New York: Wiley, 2007.

CARLO, E. C., BORGES, A. P. B., POMPERMAYER, L. G., MARTINEZ, M. M. M., ELEOTÉRIO, R. B., NEHME, R. C., MORATO, G. O. Compósito para fabricação de implantes reabsorvíveis para osteossíntese: avaliação da biocompatibilidade em coelhos. **Ciência Rural**, 2009, vol. 39, n. 1, p. 135–140.

CARTER, D. R., HAYES, W. C. The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. **Journal of Bone & Joint Surgery**, 1977, vol. 59-A, p. 954–962.

CEZAYIRLIOGLU, H., BAHNIUK, E., DAVY, D.T., HEIPLE, K.G. Anisotropic yield behavior of bone under combined axial force and torque. **Journal of Biomechanics**, 1985, vol. 18, n.1, 61–69.

CHAVES, M. D., NUNES, L. S. S., OLIVEIRA, R. V., HOLGADO, L. A., FILHO, H. N., MATSUMOTO, M. A., RIBEIRO, D. A. Bovine hydroxyapatite (Bio-Oss®) induces osteocalcin, RANK-L and osteoprotegerin expression in sinus lift of rabbits. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, 2012, vol. 40, p. e315-e320.

CHEN, D.Z., TANG, C.Y., CHAN, K.C., TSUI, C.P., YU, P. H. F., LEUNG, M. C. P., USKOKOVIC, P.S. Dynamic mechanical properties and in vitro bioactivity of PHBV/HA nanocomposite. **Composites Science and Technology**, 2006, vol.67, p. 1617-1626.

CHEN, L.J., WANG, M. Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer. **Biomaterials**, 2002, vol. 23, p. 2631-2639.

CHEUNG, H. S., HAAK, M. H. Growth of osteoblasts on porous calcium phosphate ceramic: an in vitro model for biocompatibility study. **Biomaterials**, 1989, vol. 10, p. 63–67.

CHRISAFIS, K., BIKIARIS, D. Can nanoparticles really enhance thermal stability of polymers? Part I: An overview on thermal decomposition of addition polymers. **Thermochimica Acta**, 2011, vol. 523, p. 1–24.

DALL'ARA, E., SCHMIDT, R., ZYSSET, P. Microindentation can discriminate between damaged and intact human bone tissue. **Bone**, 2012, v. 50, p. 925-929.

DE TOLOSA, E. M. C., DE FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo Livraria Editora, 1976, 331 p.

DIEZ-PEREZ, A., GÜERRI, R., NOGUES, X., CÁCERES, E., PENÃ, M. J., MELLIBOVSKY, L., RANDALL, C., BRIDGES, D., WEAVER, J. C., PROCTOR, A., BRIMER, D., KOESTER, K. J., RITCHIE, R. O., HANSMA, P. K. Microindentation for

In Vivo Measurement of Bone Tissue Mechanical Properties in Humans. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2010, V. 25, n. 8, p. 1877-1885.

DOI, Y., KITAMURA, S., ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, 1995, vol. 28, n. 14, p. 4822–4828.

DORIGATO, A., D'AMATO, M., PEGORETTI, A. Thermo-mechanical properties of high density polyethylene–fumed silica nanocomposites: effect of filler surface area and treatment. **Journal Polymers Research**, 2012, vol. 19, p. 1-11.

DOYLE, C., TANNER, E.T., BONFIELD W. In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite. **Biomaterials**, 1991; vol. 12, p. 841–847.

ENGEL, E., MICHIARDI, A., NAVARRO, M., LACROIX, D., PLANELL, J. A. Nanotechnology in medicine regenerative: the materials side. **Trends in Biotechnology**, 2007, vol. 26, n. 1, p. 39-47.

FILHO, R. F., ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 2000, vol. 46, n. 3, p. 265-271.

FREITAS, S. H., DÓRIA, R. G. S., MENDONÇA, F. S., CAMARGO, L. M., PRESSER, C. I., SANTOS, M. D., SHIMANO, A. C., AMBRÓSIO, C. E. Avaliação morfológica e por imagem radiográfica da matriz óssea mineralizada heteróloga fragmentada e metilmetacrilato, preservados em glicerina para reparação de falhas ósseas em tíbias de coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2013, vol. 33, n. 6, p. 765-770.

FU, S-Y., FENG, X-Q., LAUKE, B., MAI, Y-W. Effects of particle size, particle/matrix interface adhesion and particle loading on mechanical properties of particulate–polymer composites. **Composites: Part B**, 2008, vol. 39, p. 933–961.

GALEGO, N., ROZSA, C., SÁNCHEZ, R., FUNG, J., VÁZQUEZ, A., TOMÁS, J. S. Characterization and application of poly(β -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. **Polymer testing**, 2000, vol.19, p. 485-492.

GE, Z., BAGUENARD, S., LIM, L. Y., WEE, A., KHOR, E. Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. **Biomaterials**, 2004, vol. 25, p. 1049-1058.

GIESEN, E.B.W., DING, M., DALSTRA, M., VAN EIJDEN, T.M.G.J. Mechanical properties of cancellous bone in the human mandibular condyle are anisotropic. **Journal of Biomechanics**, 2001, vol. 34, p. 799-803.

GOMES, C., PAZ, A.H., BONILLA, A.T., CORRÊA, A., CAVALCANTE, R.L., VEIGA, D., COLOMÉ, L.M., FOERSTNOW, L.P., CONTESINI, E.A., CIRNE-LIMA, E.O. Bone regeneration in mandible defect with autograft bone and cell suspension from bone marrow in rabbits. **Arquivo Brasasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2011, vol. 63, n. 4, p. 836-843.

GOODACRE, C.J., KAN, J.Y. K., RUNGCHARASSAENG, K. Clinical complications of osseointegrated implants. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, 1999, vol. 81, n, 5, p. 537–552.

HABRAKEN, W.J.E.M., WOLKE, J.G.C., JANSEN, J.A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug for drug delivery in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2007, vol. 59, p. 234-248.

HANKS, C.T.; WATAHA, J.C.; SUN, Z.: In vitro models of biocompatibility: A review. **Dental Materials**, 1996, vol. 12, p. 186-193.

HARRIS, J. S., BEMENDERFER, T. B., WESSEL, A. R., KACENA, M. A. A review of mouse critical size defect models in weight bearing bones. **Bone**, 2013, vol. 55, p. 241-247.

HARRIS, L. D.; KIM, B.-S.; MOONEY, D. J. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. **Journal of Biomedical Materials Research**, 1998, vol. 42, p. 396–402.

HASSANEIN, A. H., COUTO, R. A., NEDDER, A., ZIELINS, E. R., GREENE, A. K. Critical-Size Defect Ossification: Effect of Leporid Age in a Cranioplasty Model. **The Journal of Craniofacial Surgery**, 2011, V. 22, n. 6, p. 2341-2343.

HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, 1991, vol. 74, n. 7, p. 1487-1510.

HOFFLER, C. E., GUO, X. E., ZYSSET, P. K., GOLDSTEIN, S. A. An application of nanoindentation technique to measure bone tissue lamellae properties. **Journal of biomechanical engineering**, 2005, vol. 127, n. 7, p. 1046-1053.

HUTMACHER, D., HURZELER, M. B., SCHLIEPHAKE, H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. **The international Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, 1996, vol.11, n. 5, p. 667-678.

HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, 2000, vol. 21, p. 2529–2543.

IGNJATOVIC, N., USKOKOVIC, D. Synthesis and application of hydroxyapatite/poly lactide composite biomaterial. **Applied Surface Science**, 2004, vol. 238, p. 314–319.

ISAKSSON, H., MALKIEWICZ, M., NOWAK, R., HELMINEN, H. J., JURVELIN, J.S. Rabbit cortical bone tissue increases its elastic stiffness but becomes less viscoelastic with age. **Bone**, 2010, vol. 47, p. 1030–1038.

JONES, J. R., EHRENFRIED, L. M., HENCH, L. L. Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, 2006, vol. 27, p. 964–973.

JUNIOR, L.P.B. Caracterização térmica, mecânica e in vitro de nanocompósitos de poli(3-hidroxiobutirato) (PHB) para aplicações em dispositivos ortopédicos. Campos dos Goytacazes, 2014, 124f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

KANG, Q., ANK, Y. H., FRIEDMAN, R. J. The mechanical properties and bone densities of canine cancellous bone. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 1998, vol. 9.

KELLER, T. S., MAO, Z., SPENGLER, D. M. Young's modulus, bending strength, and tissue physical properties of human compact bone [see comments]. **Journal of Orthopaedic Research**, 1990, vol. 8, n.4, p. 592–603.

KIM, H-W., KNOWLESA, J. C., KIM, H-E. Hydroxyapatite/poly(e-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. **Biomaterials**, 2004, vol. 25, p. 1279–1287.

KOPPERDAHL, D. L., KEAVENY, T. M. Yield strain behavior of trabecular bone. **Journal of Biomechanics**, 1998, vol. 31, n. 7, p. 601–608.

LEGEROS, R. Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. **Clinical Materials**, 1993, vol. 14, p. 65–88.

LI, S., ABDEL-WAHAB, A., SILBERSCHMIDT, V. V. Analysis of fracture processes in cortical bone tissue. **Engineering Fracture Mechanics**, 2013, vol. 110, p. 448–458.

LIEBSCHNER, M. A. K. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. **Biomaterials**, 2004, vol. 25, p. 1697–1714.

LINDE, F., HVID, I., PONGSOIPETCH, B. Energy absorptive properties of human trabecular bone specimens during axial compression. **Journal of Orthopaedic Research**, 1989, vol. 7, n. 3, p. 432–439.

LIU, Y., LIM, J., TEOH, S-H. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. **Biotechnology Advances**, 2012, vol. 31, p. 688-705.

LUKLINSKA, Z.B.; BONFIELD, W. Morphology and ultrastructure of the interface between hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite implant and bone. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 1997, vol. 8, p. 379-383.

KIM, H. W., KNOWLES, J. C., KIM, H. E. Hydroxyapatite porous scaffold engineered with biological polymer hybrid coating for antibiotic Vancomycin release. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 2005; vol. 16, p. 189-195.

MACARI, M., MACHADO, C. R. Sexual maturity in rabbits defined by the physical and chemical characteristics of the sêmen. **Laboratory animals**, 1978, vol. 12, p. 37-39.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review Immunology**, 1997, vol. 15, n. 1, p. 323–350.

MANO, J. F., SOUSA, R. A., BOESEL, L. F., NEVES, N. M., REIS, R. L. Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. **Composites Science and Technology**, 2004, vol. 64, p. 789–817.

MARTINIAKOVÁ, M., OMELKA, R., CHRENEK, P., RYBAN, L., PARKÁNYI, V., GROSSKOPF, B., VONDRÁKOVÁ, M., BAUEROVÁ, M. Changes of Femoral Bone Tissue Microstructure in Transgenic Rabbits. **Folia Biologica (Praha)**, 2005, vol. 51, p. 140-144.

MCELHANEY, J., FOGLE, J., BYARS, E., WEAVER, G. Effect of embalming on the mechanical properties of beef bone. **Journal of Applied Physiology**, 1964, vol. 19, p. 1219-1234.

MEHTA, M., SCHMIDT-BLEEK, K., DUDA, G. N., MOONEY, D. J. Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2012, vol. 64, p. 1257-1276.

MEYERS, M. A., CHEN, P-Y., LIN, A. Y-M., SEKI, Y. Biological materials: Structure and mechanical properties. **Progress in Materials Science**, 2008, vol. 53, p. 201–206.

MILORO, M.; HARALSON, D. J.; DESA, V. Bone healing in a rabbit mandibular defect using platelet-rich plasma. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, 2010, vol. 68, n. 6, p. 1225-1230.

MIÑO-FARIÑA, N., MUNÓZ-GUZÓN, F., LÓPEZ-PENÁ, M., GINEBRA, M-P., VALLE-FRESNO, S., AYALA, D., GONZÁLEZ-CANTALAPIEDRA, A. Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction of a macroporous calcium phosphate bone cement for the repair of a critical size defect in the femoral condyle. **The Veterinary Journal**, 2009, vol. 179, p. 264–272.

MISH, C.E., QU, Z., BIDEZ, M.W. Mechanical properties of trabecular bone in the human mandible: implications for dental implant treatment planning and surgical placement. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 1999, vol. 57, p. 700-706.

MITTON, D., RUMELHART, C., HANS, D., MEUNIER, P. J. The effects of density and test conditions on measured compression and shear strength of cancellous bone from the lumbar vertebrae of ewes. **Medical Engineering & Physics**, 1997, vol. 19, n. 5, p. 464–474.

MURUGAN, R., RAMAKRISHNA, S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. **Biomaterials**, 2004, vol. 25, p. 3829-3835.

MURUGAN, R., RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology** (Review article), 2005, vol. 65, p. 2385-2406.

NI, J., WANG, M. In vitro evaluation of hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composite. **Materials Science and Engineering**, 2002, vol. 20, p. 101-109.

PATRA, A.K., DE PAOLO, J.M., D'SOUZA, K.S., DE TOLLA, D., MEENAGHAM, M.A. Os guias para a análise e o planejamento dos implantes dentários. **Implante Dentário**, 2000, vol. 5, p. 500-563.

PEARCE, A. I., RICHARDS, R. G., MILZ, S., SCHNEIDER, E., PEARCE, S. G. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. **European Cells and Materials**, 2007, vol. 13, p. 1-10.

PEREIRA, N.R.; FAN, L.C.; NASCIMENTO, M.D.; ROSSI, M.I. Diferenciação dos Leucócitos de Galinhas e Coelho pelo Método Citoquímico de Sudan Negro B. **Anais do Congresso Estadual de Medicina Veterinária**, 1985, Santa Maria - RS, p. 68.

PERIC, M., DUMIC-CULE, I., GRCEVIC, D., MATIJASIC, M., VERBANAC, D., PAUL, R., GRGUREVIC, L., TRKULJA, V., BAGI, C. M., VUKICEVIC, S. The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. **Bone**, 2015, vol. 70. P. 73-86.

PETRIDIS, X., DIAMANTI, E., TRIGAS, G. Ch., KALYVAS, D., KITRAKI, E. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, 2015, vol. 43, p. 483-490.

PIATTELLI, A., SCARANO, A., PIATTELLI, M. Detection of alkaline and acid phosphatases around titanium implants: a light microscopical and histochemical study in rabbits. **Biomaterials**, 1995, vol. 16, p. 1333–1338.

PLANELL, J. A. **Bone repair biomaterials**. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited, CRC Press LLC, 2009, p. 476.

POSER, J. W. The importance & characteristics of matrices in the treatment of bone defects. **Folia Traumatologica Lovaniensia**, 2001.

REDDY, M. M., VIVEKANANDHAN, S., MISRA, M., BHATIA, S. K., MOHANTY, A. K. Biobased plastics and bionanocomposites: Current status and future opportunities. **Progress in Polymer Science**, 2013, v. 38, p. 1653-1689.

REIFENRATH, J., ANGRISANI, N., LALK, M., BESDO, S. Replacement, refinement, and reduction: Necessity of standardization and computational models for long bone fracture repair in animals. **Journal Biomedical Material Research Part: A**, 2014, vol. 102, p. 2884-2900.

REILLY, D. T., BURSTEIN, A. H., FRANKEL, V. H. The elastic modulus for bone. **Journal of Biomechanics**, 1974, vol. 7, p. 271–275.

REZNIKOV, N., SHAHAR, R., WEINER, S. Bone hierarchical structure in three dimensions: a review. **Acta Biomaterialia**, 2014, vol. 10, p. 3815-3826.

REZWAN, K., CHEN, Q.Z., BLAKER, J.J., BOCCACCINI, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, 2006, vol. 27, p. 3413-3431.

SAAD, K. A-E., ABU-SHAHBA, A. G. T., EL-DRIENY, E. A-E., KHEDR, M. S. Evaluation of the role of autogenous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for the repair of mandibular bone defects in rabbits. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, 2015, vol. 43, p. 1151-1160.

SAADAT, A., KARBASI, S., BEHNAM GHADER, A. A., KHODAEI, M. Characterization of Biodegradable P3HB/HA Nanocomposite Scaffold for Bone Tissue Engineering. **Procedia Materials Science**, 2015, vol. 11, p. 215-223.

SADAT-SHOJAI, M., KHORASANI, M-T., JAMSHIDI, A., IRANI, S. Nano-hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composites: A comprehensive study on the structural and in vitro biological properties. **Materials Science and Engineering C**, 2013, vol. 33, p. 2776-2787.

SAIZ, E., ZIMMERMANN, E. A., LEE, J. S., WEGST, U. G.K., TOMSIA, A. P. Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering. **Dental Materials**, 2013, vol. 29, p. 103-115.

SCHMITZ, J. P., HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for cranio-mandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, 1986, vol. 205, p. 299-308.

SCHNEIDER, O.D., WEBER, F., BRUNNER, T. J., LOHER, S., EHRBAR, M., SCHMIDLIN, P. R., STARK, W. J. In vivo and in vitro evaluation of flexible, cottonwool-like nanocomposites as bone substitute material for complex defects. **Acta biomaterialia**, 2009, vol. 5, p. 1775-1784.

SIQUEIRA, L. C. B. **Formulação e caracterização de biomateriais compósitos com hidroxiapatita**. Campos dos Goytacazes, 2009, 136f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

SKINNER, H. B. Ceramic bearing surfaces. **Clinical Orthopaedics & Related Research**, 1999, vol. 369, p. 83-91.

STEVENSON, S., LI, X. Q., DAVY, D. T., KLEIN, L., GOLDBERG, V. M. Critical biological determinants of incorporation of non-vascularized cortical bone grafts. Quantification of a Complex Process and Structure. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, 1997, vol.79, p.1-16.

SUN, F., ZHOU, H., LEE, J. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration. **Acta Biomaterials** (review), 2011, vol. 7, p.3813-3828.

SUNEEL, S. Expression of the cell proliferation-associated nuclear antigen reactive with the Ki-67 monoclonal antibody by cells of the skeletal system in humans and other species. **Bone and mineral**, 1990, vol. 10, p. 37-50.

THEIN-HAN, W.W., MISRA, R.D.K. Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, 2009, vol. 5, p. 1182–1197.

THOMAIDIS, KAZAKOS, V. K., LYRAS, D. N., DIMITRAKOPOULOS, I., LAZARIDIS, N., KARAKASIS, D., BOTAITIS, S., AGROGIANNIS, G. Comparative study of 5 different membranes for guided bone regeneration of rabbit mandibular defects beyond critical size. **Medical Science Monitor**, 2008; vol. 14, n. 4, p. BR67-BR73.

VAN BLITTERSWIJK, C.A.; GROTE, J.J.; KIJPERS, W.; DAEMS, W.Th.; DE GROOT, K. Macropore tissue ingrowth: quantitative and qualitative hydroxyapatite ceramic. **Biomaterials**, 1986, vol. 7, p. 137-143.

WANG, K., WU, J., YE, L., ZENG, H. Mechanical properties and toughening mechanisms of polypropylene/barium sulfate composites. **Composites: Part A**, 2003, vol. 34, p. 1199-1205.

WANG, X., MABREY, J. D., AGRAWAL, C. M. An interspecies comparison of bone fracture properties. **Bio-medical Materials and Engineering**, 1998, vol. 8, p. 1-9.

XU, H., SHIMIZU, Y., OOYA, K. Histomorphometric study of the stability of newly formed bone after elevation of the floor of the maxillary sinus. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 2005, vol. 43, p. 493–499.

ZHANG, J. C., LU, H.Y., LV, G.Y., MO, A. C., YAN, Y. G., HUANG, C. The repair of critical-size defects with porous hydroxyapatite/polyamide nanocomposite: an experimental study in rabbit mandibles. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, 2010, vol. 39, p. 469–477.

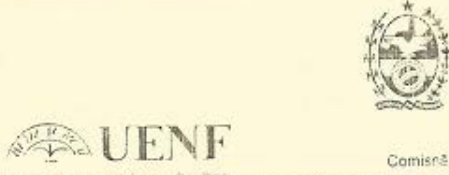
ZHANG, L., WEBSTER, T.J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. **Nano today** (review article), 2009, vol. 4, p. 66-80.

ZHANG, CAI, X. Q., LIU, H., HENG, B. C., PENG, H., SONG, Y., YANG, Z., DENG, X. Osteoconductive effectiveness of bone graft derived from antler cancellous bone: an experimental study in the rabbit mandible defect model. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 2012, vol. 41, p. 1330–1337.

ZUCCARI, D. A. P. C., SANTANA, A. E., CURY, P. M., CORDEIRO, J. A. Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. **Veterinary Clinical Pathology**, 2004, vol. 33; p. 23–28.

ANEXO I

APROVAÇÃO DO CEUA-UEA/UENF: protocolo nº 267.




Reitoria
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 267, intitulado "BIOCOMPÓSITOS P3HB/NANO-HAP PARA USO NA ÁREA MÉDICO-ODONTOLÓGICA" sob a responsabilidade do Dr. Rubén Sánchez Rodríguez, Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11.794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 28/06/2016. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 28/06/2020.

Campos dos Goytacazes, 28 de junho de 2016.



Clovis de Paula Santos
 Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais

Clovis de Paula Santos
 Presidente CEUA/UENF

Av. Alberto Luiz Lange, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes/ RJ - 28013-602
 Tel.: (22) 2739-7180 - Fax: (22) 2739-9578 - e-mail: etica@uenf.br