**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS - EESC**

KARLA REGINA PEREIRA

**Estudo da biocompatibilidade e descrição da utilização do
componente vitrocerâmico, com cristais de Anortita
($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$) como fase principal, para aplicações biomédicas**

São Carlos

2012

KARLA REGINA PEREIRA

**Estudo da biocompatibilidade e descrição da utilização do
componente vitrocerâmico, com cristais de Anortita ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$)
como fase principal, para aplicações biomédicas**

Tese apresentada ao Departamento de Engenharia Mecânica – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de **Doutor em Engenharia Mecânica**.

Área de concentração: Materiais

Orientador: Prof. Dr. João Manuel Domingos de Almeida Rollo

São Carlos
2012

ESTE EXEMPLAR TRATA-SE
DA VERSÃO CORRIGIDA.
A VERSÃO ORIGINAL
ENCONTRA-SE DISPONÍVEL
JUNTO AO DEPARTAMENTO
DE ENGENHARIA MECÂNICA
DA EESC-USP.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

P434e Pereira, Karla Regina
Estudo da biocompatibilidade e descrição da utilização do componente
vitrocerâmico, com cristais de Anortita ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$) como fase principal,
para aplicações biomédicas. / Karla Regina Pereira; orientador João
Manuel Domingos de Almeida Rollo. São Carlos, 2012.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Mecânica e Área de Concentração em Materiais) -- Escola de Engenharia
de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2012.

1. Alteração de pH. 2. Anortita. 3. Biocompatibilidade. 4. Osteointegração.
5. Vitrocerâmico. I. Título.

COMISSÃO JULGADORA

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: **Dacharyd KAYLA REGINA PEREIRA**

Título da tese: **"Teste de biocompatibilidade e descrição da utilização do componente vitreocêntrico, com cristais de quartzo (SiO_2) como fase principal, para aplicações biomédicas".**

Data da defesa: 05/11/2012

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Associado **João Manoel Domingos de Almeida Rollo**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADO

Prof. Associado **Carlos Alberto Fortulan**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EEESC)

Aprovado

Dra. **Claudia Cristiane Camilo**
(Pós-Doutorado/CAPES)

Aprovado

Prof. Dr. **Étney Neves**
(Universidade Estadual do Mato Grosso/UNEMAT)

Aprovado

Profa.Dra. **Ana Maria Minarelli Gaspar**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Araraquara)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica:
Prof. Associado **Marcelo Azeiteiro Trindade**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinicius Couxy**

DEDICATÓRIA

À TODOS, QUE LUTAM PELO BEM;
Especialmente, minha mãe Terezinha.

AGRADECIMENTOS

AO ÚNICO, MAIOR, EXALTADO ENTRE OS POVOS – O MEU DEUS – EI-SHADDAI!

Por Yeshua, agradeço pela oportunidade de Vida.

Obrigada:

De coração, ao meu Orientador, Prof. Dr. João Manuel Domingos de Almeida Rollo, por aceitar-me, pelo apoio nos momentos mais difíceis, por saber ser mestre e amigo ao mesmo tempo. Obrigada por toda liberdade de trabalho, por todo cavalheirismo e em especial, por confiar em mim, mesmo quando eu falhava.

Ao amigo Prof. Dr. Etney Neves, em delegar a mim, tão confiantemente parte do seu trabalho. O BR3G é uma benção em nossas vidas! Obrigada por todas as dicas, conversas incentivadoras, por todos os momentos de oração que fizeste por mim e minha família.

Ao Exemplo de Professor e Pesquisador Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan, por ser exatamente o professor e auxiliador que nós precisamos. Todos nós, que temos e/ou tivemos a experiência de trabalhar ao seu lado, dizemos em unânimidade: “quando crescermos... queremos ser iguais a você”.

Família, por todo Amor. É por vocês e sempre será a razão da minha luta!

“Marido”, por ter compreendido a minha necessidade de “free as a bird” – hoje temos certeza, fizemos as escolhas certas. Independente do tempo, longe ou perto, é pra sempre.

Amigos, somos flores do mesmo galho. Nossa amizade é pra sempre... Não nos perderemos entre nuvens e trovões...

Obrigada à equipe de Professores, Secretaria de Pós-Graduação e Técnicos da EESC – USP, com a ajuda do trabalho de vocês, o meu trabalho pôde se concretizar.

Obrigada ao Departamento de Engenharia Mecânica e ao Departamento de Engenharia de Materiais, por toda estrutura e suporte técnico-científico.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

Aos animais que cederam suas vidas para a realização desta pesquisa.

(...), e se clamares por inteligência e por entendimento alçares a voz, se buscares a sabedoria como a prata e como a tesouros escondidos a procurares, então entenderás o temor do SENHOR e acharás o conhecimento de DEUS.
Provérbios 2:3-5

Resumo

PEREIRA, K. R. Estudo da biocompatibilidade e descrição da utilização do componente vitrocerâmico, com cristais de Anortita ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$) como fase principal, para aplicações biomédicas. 2012. Tese (Doutorado) – Escola Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

O vitrocerâmico formado a partir de cristais de anortita, como fase principal ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$), foi manufaturado para avaliações iniciais quanto à transformação de fase e de biocompatibilidade. Através da análise do estudo dilatométrico, verificou-se as faixas de temperaturas, onde o material sofre alterações microestruturais, através do processo de sinterização. Juntamente com essa análise, seguindo o mesmo ciclo de sinterização, através do tratamento térmico sob vácuo, com microscopia acoplada, registrou-se as imagens obtidas no exato momento em que as transformações microestruturais do material aconteceram. Para a avaliação de biocompatibilidade foi utilizado ensaios *in vitro* e *in vivo*, preconizados pela Internacional Standards Organization (ISO) 10993-5 e 10993-6, sendo utilizado (testes *in vitro*) a linhagem celular McCoy. Esse método, permitiu concluir a não citotoxicidade do vitrocerâmico, mesmo em altas concentrações do extrato e/ou material diretamente com as células não houve lise celular. Esses resultados obtidos viabilizaram os experimentos *in vivo*, que compreendeu a análise da toxicidade sistêmica a implantação do material em teste, diretamente ao tecido ósseo de cobaias (*Rattus norvegicus albinus*), durante 30 dias. A histologia da região do implante demonstrou caráter de biocompatibilidade *in vivo* do vitrocerâmico com cristais de anortita. Os resultados obtidos nesse estudo, corroboram para o direcionamento deste vitrocerâmico, em outros aspectos de avaliação, no âmbito de engenharia e sugere possível utilização do mesmo como biomaterial.

Palavras-chave: anortita, vitrocerâmico, biocompatibilidade, osteointegração, Alteração de pH.

ABSTRACT

PEREIRA, K. R. Study of the biocompatibility and description in the use of the vitroc ceramic component, with Anorthite crystals ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$) as main phase, for biomedical applications. 2012. Thesis (Doctoral) – Escola Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

The vitroc ceramic formed starting from anorthite crystals as main phase ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$), it was manufactured for initial evaluations as for the phase transformation and biocompatibility. The analysis of the dilatometric study, it was verified the strips of temperatures, where the material suffers microstructures alterations, through the sinterization process. Together with that analysis, following the same sinterization cycle, through the thermal treatment under vacuum, with coupled microscopy, it registered images obtained in the exact moment in that the microstructure transformations of the material. For the biocompatibility evaluation it was used in vitro and in vivo tests, extolled by Standard International Organization (ISO) 10993-5 and 10993-6, being used (tests in vitro) the cellular lineage McCoy. This methods, allowed to conclude the non citotoxicity of the anorthite, even in high concentrations of the extract and/or material directly with the cells there was not cellular lise. Those obtained results made possible the experiments alive in, that it understood the analysis of the systemic toxicity and the implantation of the material in test, directly to the bone of animals (*Rattus norvegicus albinus*), for 30 days. The histological area of the implant, demonstrated character in vivo biocompatibility of the vitroc ceramic with anorthite crystals. The results obtained in that study, they corroborate for the direction of this vitrocêrâmica, in other evaluation aspects, in the engineering extent and is suggests possible use of the same as biomaterial.

Keywords: anorthite, vitroc ceramic , biocompatibility, osteointegration, pH alteration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cristalização controlada, através do tempo- temperatura - Processo vitrocerâmico.	24
Figura 2. Transformação de um vidro num material vitro-cerâmico; (a) formação de núcleos, (b) crescimento de cristais a partir dos núcleos, (c) microestrutura vitrocerâmica.	24
Figura 3. a) Implante dentário; b) Implante ortopédico ; c) Implante coclear.	26
Figura 4. Biomateriais: origem e resposta ao organismo.	30
Figura 5. Anortita ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$).: (a) célula unitária e (b) forma do cristal – planos cristalográficos.	31
Figura 6. Diagrama: ortoclásio – albita/anortita	33
Figura 7. Osso trabecular e Osso cortical	37
Figura 8. Esquema simplificado da remodelação óssea.	38
Figura 9. Osso cortical de tíbia de coelho: a) osteoclasto; b) osteoblastos; c) osso mineralizado; d) osteócito; e) osteóide (matriz não mineralizada). Corante Azul de Toluidina.	40
Figura 10. Material para teste - Pelets vítreos - ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$).	46
Figura 11. Moinho de jarro.	47
Figura 12. Prensa isostática.	48
Figura 13 . Tarugos prontos para usinagem.	49
Figura 14. Retífica CNC.	50
Figura 15. Processo de usinagem do material.	50
Figura 16. corpo de prova para o dilatometro.	51
Figura 17. Componentes do Dilatômetro (NETZSCH DIL 402C).	52

1-computador; 2- controladores do forno; 3-dilatômetro e cilindro de gás argônio; 4- estabilizador de corrente; 5- controlador do fluxo de água e compressor.

Figura 18. Amostra posicionado no compartimento interno do dilatômetro 53

Figura 19. Corpo de prova submerso – Teste de durabilidade química. 55

Figura 20. Corpo de prova – tratamento térmico sob vácuo. 56

Figura 21. Equipamento de tratamento térmico sob vácuo – microscopia acoplada: 1- cilindro de argônio; 2- controlador dos ciclos; 3- bomba de vácuo; 4- microscópio com câmera e forno; 5- receptor de imagem; 6- monitor de temperatura. 57

Figura 22. Posicionamento do corpo de prova. 57

Figura 23. Momento que o meio “overlay” é adicionado à cultura celular. 59

Figura 24. Cultura de células sendo incubadas. 60

Figura 25. Teste difusão em Agar. 61

Figura 26. Distribuição dos extratos A-0%, B-10%, C-30%, D-50%, E-65%, F-80%, H-100%. 63

Figura 27. a) Placa com extrato após incubação de 24h e b) placa tratada com brometo de tetrazolio 64

Figura 28. Leitor ELISA BIO-RAD. 65

Figura 29. Disco do vitrocerâmico anortita 65

Figura 30. Câmara de Neubauer 66

Figura 31. Animais na gaiola de condicionamento. 67

Figura 32. Animal pronto para aplicação intraperitoneal. 68

Figura 33. Aplicação dos extratos na linha média abdominal (intraperitoneal) do rato. 69

Figura 34. Retirada do osso com implante. 72

Figura 35. a) Corpo de prova à verde - Anortita antes e b) Vitrocerâmico 74

Anortita após ciclo térmico em dilatômetro.

Figura 36. . Imagens do vitrocerâmico obtido por tratamento 80
térmico sob vácuo. Temperatura 25 °C - 648 °C, aumento de
100x.

Figura 37. . Imagens do vitrocerâmico obtido por ataque térmico 81
sob vácuo.
a) 830°C e b) 1007 ° C, aumento de 100x.

Figura 38. . Imagens do vitrocerâmico obtido por tratamento 81
térmico sob vácuo.
a) 1028 °C e b) 1053 ° C, aumento de 100x.

Figura 39. . Imagens do vitrocerâmico obtido por tratamento 82
térmico sob vácuo. 1100°C por 10 min., aumento de 100x.

Figura 40. Teste Citotoxicidade – difusão em ágar 83

Figura 41. Presença celular sobre os discos de anortita nos dias: a) 20, 87
b) 10, c) 5, e d) 1, por fluorescência indireta com coloração vermelha.

Figura 42. Presença celular sobre os discos de Bioglass 45S5/controle 88
nos dias: a) 1, b) 5, c) 10, e d) 20, por fluorescência indireta com
coloração vermelha.

Figura 43. Imagem obtida através de microscopia óptica do defeito 91
ósseo. Seta 1, indica região de tecido cartilaginoso e seta 2, observa-se
tecido ósseo neoformado

Figura 44. Imagem obtida através de microscopia óptica do implante 92
vitrocerâmico anortita. Seta 1, indica região do implante seta 2,
observa-se tecido ósseo neoformado.

Figura 45. Imagem obtida através de microscopia óptica do implante 93
Bioglass. Seta 1, indica implante e seta 2, observa-se tecido ósseo
neoformado.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matérias-primas e seu vitrocerâmico correspondente.	25
Tabela 2. Exemplos de aplicações dos vitrocerâmicos comercializados.	28
Tabela 3. Barbotina: 30% vol. sólido e 70% vol. Líquido.	47
Tabela 4. Índice de halo.	61
Tabela 5 Fórmula da saliva artificial de Fusayama (g/l).	62
Tabela 6. Extratos e seus componentes.	62
Tabela 7. Grupos de animais com respectivos extratos de inoculação.	68
Tabela 8. Possíveis reações causadas pelos extratos e controles aplicados intraperitonealmente e respectivos valores para o nível sérico- índice de toxicidade sistêmica	70
Tabela 9. Medidas da amostra – antes e pós ciclo térmico.	75
Tabela 10. Resultados do Teste de Citotoxicidade em ágar.	84
Tabela 11. Teste de eluição e Índice de Sobrevivência Celular	85
Extrato A: saliva artificial (controle total).	
Tabela 12. Teste de eluição e Índice de Sobrevivência Celular -	85
Extrato B: saliva artificial + Anortita (teste).	
Tabela 13. Teste de eluição e Índice de Sobrevivência Celular –	86
Extrato A: saliva artificial + Bioglass 45S5 (controle).	
Tabela 14. Proliferação celular em contato com os discos anortita e discos controle - número de células x 10 ⁴ /disco.	86
Tabela 15. Índices de toxicidade pós inoculação dos extratos.	89
Tabela 16. Peso inicial e final – período de experimentação 72 horas.	90

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva Dilatométrica	75
Grafico 2 . Durabilidade Química da Anortita	78
Gráfico 3. Curva Dilatométrica – Transformações	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION

ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS

DIU – DISPOSITIVO INTRA UTERINO

PBS – TAMPÃO FOSTATO ALCALINO

MTT - (4,5-dimetil) tiazol-2-il-2,5-DIFENIL BROMETO DE TETRAZOLIO

MEM –MEIO MINIMO DE EAGLE

RL – RETRAÇÃO LINEAR

EDTA – ÁCIDO ETILENODIAMNO TETRACÉTICO

PVB – POLIVINIL BUTIRAL

PTH – PARATORMÔNIO

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca – CÁLCIO

O – OXIGÊNIO

Si – SILÍCIO

Al – ALUMÍNIO

S – ENXOFRE

H – HIDROGÊNIO

Zr – ZIRCÔNIO

P – FÓSFORO

F – FLUOR

Fe – FERRO

Ti – TITÂNIO

Cr – CROMO

Mg – MAGNÉSIO

C – CARBONO

Lo – COMPRIMENTO INICIAL

Lf – COMPRIMENTO FINAL

α – ALFA

β - BETA

Kg – QUILOGRAMA

Π – PI

g – GRAMA

g/cm^3 – GRAMA POR CENTÍMETRO CÚBICO

pH - POTENCIAL HIDROGÊNICO

V – VOLUME

dA – DENSIDADE APARENTE

°C – GRAUS CELSIUS

mm – MILÍMETROS

μm – MICROMETRO

% - PORCENTAGEM

RPM – ROTAÇÕES POR MINUTO

mbar – MILIBAR

MPa – MEGAPASCAL

SUMÁRIO

Resumo
Abstract
Lista de Figuras
Lista de Tabelas
Lista de Gráficos
Lista de Abreviaturas e Siglas
Lista de Símbolos

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 DESENVOLVIMENTO DE VITROCERÂMICOS IMPLANTÁVEIS E O SISTEMA SiO_2 - Al_2O_3 - CaO	23
2.1.2 A FASE ANORTITA	30
2.2 BIOMATERIAIS E BIOCOMPATIBILIDADE	33
2.3 O OSSO E A REMODELAÇÃO ÓSSEA	36
2.4 TESTES PARA CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL	41
2.4.1 DILATOMETRIA, RETRAÇÃO LINEAR (VERDE-SINTERIZADO, COM VERIFICAÇÃO DE POROS RESIDUAIS), DURABILIDADE QUÍMICA E MICROSCOPIA DO TRATAMENTO TÉRMICO SOB VÁCUO.	41
2.5 TESTES PARA AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	42
2.5.1 TESTES <i>IN VITRO</i>: CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	42
2.5.2 TESTES <i>IN VIVO</i>: TOXICIDADE SISTÊMICA E IMPLANTE	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1 MANUFATURA DO CORPO DE PROVA	46
3.2 DILATOMETRIA, RETRAÇÃO LINEAR, POROS RESIDUAIS, DURABILIDADE QUÍMICA E MICROSCOPIA DURANTE	

TRATAMENTO TÉRMICO SOB VÁCUO.	51
3.3. ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	58
3.3.1 CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	58
3.4 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	67
3.4.1 TOXICIDADE SISTÊMICA	67
3.4.2 IMPLANTE	70
4. RESULTADOS	74
4.1 DILATOMETRIA, RETRAÇÃO LINEAR (VERDE-SINTERIZADO, COM VERIFICAÇÃO DE POROS RESIDUAIS), DURABILIDADE QUÍMICA E ANÁLISE DAS IMAGENS OBTIDAS POR TRATAMENTO TÉRMICO SOB VÁCUO.	74
4.2 TESTES <i>IN VITRO</i> – CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELLULAR.	83
4.3 TESTES <i>IN VIVO</i> - TOXICIDADE SISTÊMICA	89
4.4 TESTES <i>IN VIVO</i> - IMPLANTE	91
5. CONCLUSÕES	94
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	96
ANEXO	104
A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	

1. INTRODUÇÃO

Esse estudo é sucessor de trabalhos com o vitrocerâmico do sistema $\text{CaO-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$, os quais foram direcionados para a compreensão das etapas de obtenção do mesmo (utilizando como matéria-prima: cinza de carvão mineral), para desenvolvimento de um material para utilização na construção civil (pavimentos cerâmicos), contudo, os avanços nos estudos revelaram novas tendências para aplicações em Engenharia.^{1,2} Entre as novas possibilidades de uso em análise, estão: placas de fixação de fratura óssea (biomaterial), material para o encapsulamento de fármacos e uma característica de material inteligente devido ao seu comportamento, em relação às modificações e interações com o ambiente, ao qual está inserido.^{1,3,4} Nesta direção, foi criada uma versão sintética do vitrocerâmico, onde cria-se a necessidade de estabelecer novos parâmetros como: controle dos mecanismos de nucleação do vidro (o fenômeno de nucleação e a formação do cristal), a sinterização através de dilatometria, a caracterização mecânica da cerâmica anortita (dureza, desgaste, resistência à flexão) e as taxas de biodegradação deste novo material.^{5 - 10}

Há milhares de anos, ser humano utiliza os materiais cerâmicos com diversas finalidades, dentre as várias áreas de conhecimento. Apesar do uso desses materiais serem antigos, com enfoque na área da saúde, mais necessariamente no uso como materiais implantáveis, o primeiro relato foi em 1894, utilizando o gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) para substituição óssea. As propriedades desse gesso, acabaram sendo pouco atrativas para esse tipo de utilização, mas deu margem à outras possibilidades de estudo, com cerâmicas que perduram nos estudos da atualidade¹¹⁻¹⁵.

Com o avanço tecnológico, fica sendo possível então, estudar e desenvolver possibilidades de aplicação destes materiais, como materiais de implantes, onde os mesmos estão relacionados ao uso direto ou de substituição de algumas estruturas anatômicas, em especial as formadas por tecido ósseo. Pode-se classificar, baseando-se no uso desses materiais, como biomateriais, definidos basicamente como materiais que tem a capacidade de substituir tecidos e funções e/ou reconstituir os mesmos, sem que reajam de forma negativa ao implantado. Neste sentido, os cerâmicos usados para fins de implante são classificados como biomateriais e denominados biocerâmicos.¹⁶⁻²⁰

A maior parte dos materiais bioativos é de caráter cerâmico, pois seu desempenho está a cargo da interação com os tecidos vivos, resultando em reações favoráveis à sua aplicação. A fixação biológica, biocolonização, regeneração de tecidos e biodegradação, é um dos exemplos desse tipo de bioatividade realizada.^{12, 21,22}

Dentro do contexto comportamental de bioatividade desses materiais (biomateriais/biocerâmicos), necessita-se que os mesmos, tenham propriedade de não citotoxicidade, que não provoque alergia, que fatores carcinogênicos estejam ausentes, não pode causar reações inflamatórias, entre outras, devendo ser biocompatível e biofuncional ao local, o qual está sendo inserido.²³⁻²⁶

Os estudos para a aplicação de cerâmicos biodegradáveis sintéticos, com a intensão de substituição óssea, datam seu princípio de uso, no final da década de 1960, uma das observações sobre o desenvolvimento dos mesmos, ao meio biológico, é um caráter de degradação na região do implante, com consecutiva substituição por tecido endógeno. Esse fator de degradação, tem uma variação, que está inerente ao tipo de característica de cada material.^{25,26-30}

Baseados na especificidade de dissolução/degradação de alguns materiais cerâmicos, temos os minerais naturais de Anortita ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$) que estão sendo descritos em várias linhas de estudos.^{1-4, 10, 31-33} Neste sentido e dentro deste contexto, o desenvolvimento deste trabalho possui caráter interdisciplinar, onde os aspectos de caráter do material: de conformação e comportamental, foram avaliados e direcionam à outros processos de análises de engenharia e também avalia quanto ao comportamento do mesmo, quando inserido em ambiente biológico.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Desenvolvimento de Vitrocerâmicos Implantáveis e o Sistema SiO_2 - Al_2O_3 - CaO .

Com a cristalização controlada de materiais vítreos, realizada através de tratamentos térmicos, é possível segregar uma ou mais fases cristalinas do vidro original. A cristalização controlada é um fenômeno que ocorre quando há um vidro e a ele, adiciona-se um agente nucleante – processo vitrocerâmico (Figura 1). Quando esse material, nessas condições, atinge temperaturas de 500 a 1.100 graus célsius, obtêm-se os sólidos policristalinos – que recebe o nome geral de vitrocerâmicos (Figura 2).^{29,30,34 - 39}

Uma grande quantidade de agentes nucleantes (ZrO_2 , P_2O_5 , CaF_2 , Fe_2O_3 , TiO_2 e Cr_2O_3) foi testada em vidros do sistema ternário SiO_2 - Al_2O_3 - CaO . Conclusivamente, HE (1998)*, afirma que dentre todos os agentes nucleante citados o TiO_2 é o melhor. STRNAD (1986)** indica que regiões com quantidade elevada de sílica exigem a adição de aproximadamente 11% de TiO_2 (em peso) para assegurar a cristalização efetiva no volume. Para um conteúdo baixo de sílica a adição de TiO_2 deverá ser elevada para 18% (em peso).³⁹

*HE, L.; et all. Effect of the TiO_2 -Fraction on the Glass-Ceramic Crystallization in the System $\text{CaO-Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$. Interceram. Vol. 47, No 6, 1998.

**STRNAD, Zdenk. Glass-Ceramic Materials: Liquid phase separation, nucleation and crystallization. Czechoslovakia, Ed. Elsevier, 1986.

Figura 1. Cristalização controlada, através do tempo- temperatura - Processo vitrocerâmico.^{38,39}

Figura 2. Transformação de um vidro num material vitrocerâmico; (a) formação de núcleos, (b) crescimento de cristais a partir dos núcleos, (c) microestrutura vitrocerâmica.⁴⁰

De forma geral, os materiais vitrocerâmicos, recebem destaque devido sua dureza e alta resistência mecânica, apresentam excelente resistência ao desgaste decorrente do atrito, além de conservarem propriedades como acabamento superficial e

propriedades ópticas, que são encontradas nos vidros, mas não experimentam da mesma fragilidade, que os vidros apresentam. Ainda, como vantagem, tem grande facilidade de conformação, como exemplo, moldagem do vidro fundido, com pouquíssimas alterações de dimensão que podem aparecer durante o processo de cristalização. Estabelece-se, que a nucleação ou a estabilidade de núcleos cristalinos formados (ou quando sobre os núcleos primários há deposição posterior de elementos), sejam os principais mecanismos para processo de cristalização controlada.⁴¹⁻⁴⁴

Em relação aos tipos de matérias-primas utilizadas na obtenção dos produtos vitrocerâmicos, os mesmos são classificados, conforme a Tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Matérias-primas e vitrocerâmicos correspondentes.³⁸

Vitrocerâmicos	Matérias-primas
Técnicos	Formados a partir dos constituintes utilizados na fabricação dos vidros comerciais
De escórias (<i>slag sital</i>)	Fabricados a partir de escórias de origem metalúrgica.
De cinzas (<i>ash sital</i>)	Obtidos a partir de cinzas resultantes da combustão de lixos, e de resíduos sólidos derivados de atividades industriais.
Petrúrgicos (<i>perositall</i>)	Obtidos a partir de rochas.

No desenvolvimento dos vitrocerâmicos implantáveis, os primeiros a serem confeccionados, tinham certa dificuldade em conformação e traziam algumas limitações em relação às suas propriedades mecânicas. Esses pontos estavam ligados

diretamente à fragilidade do material e uma superior rigidez quando comparado ao osso.^{11,20} Deste modo, procurou-se desenvolver materiais (vitrocerâmicos) que pudessem apresentar módulo de elasticidade, que estivesse em proximidade ao módulo do tecido ósseo, outro fator, para que o material ficasse cada vez mais aplicável, é que fossem de fácil fabricação/modelação, para as principais áreas de aplicação: odontológica e médico-cirúrgica.^{11,30,45,46,}

Os materiais vitrocerâmicos, com fosfato de cálcio, contribuíram para o crescimento de utilização desse tipo de material, dentro da área biomédica. As aplicações na área da odontologia, em cirurgia maxilo-facial, de cabeça, ouvido médio, pescoço e na ortopedia, com reparações da coluna vertebral, são exemplos clássicos de aplicações (Figura 3).^{25, 47-49}

Figura 3. a) Implante Dentário ; b) Implante Ortopédico; c) Implante Coclear.⁵⁰⁻⁵²

Conforme a fase cristalina presente, pode-se classificar um vitrocerâmico implantável, como parte de alguns exemplos citam-se:

*Apatita – por volta de 1970, encontrava-se comercializado na Alemanha um

vitrocerâmico com propriedades bioativas, registrado como Ceravital®. O Ceravital® traz como característica em sua fase cristalina, apatita. Outro exemplo de preparação de vitrocerâmicos, com apatita presente, são os originados a partir do Bioglass® 45S5. Um dos aspectos de característica do vidro-base, que eles mantem, é a bioatividade, embora apresentem tardiamente uma cinética de formação da camada de hidroxiapatita carbonatada.⁵³⁻⁵⁵

*Flogopita - Apatita ou Flogopita - Cordierita – na Alemanha, em meados de 1980, os

vitrocerâmicos *Bioverit® I e II*, foram desenvolvidos. Esses vitrocerâmicos (*Bioverit® I e II*), trouxeram em sua formulação, grande semelhança aos vidros que são utilizados na formulação dos cimentos ionoméricos (pó do cimento de silicato, ligeiramente modificado, e do ácido poliacrílico, como componente líquido, incorporado), mas com

uma diferença, pois apresentam Mg (mercúrio) na formulação, resultando numa maior facilidade da moldabilidade desses vitrocerâmicos.⁵³⁻⁵⁵

*Oxifluoroapatita Volastonita – foi desenvolvido no Japão, o vitrocerâmico bioativo

(elevada resistência mecânica), comercialmente conhecido por *Cerabone®* A-W, como matriz vítrea: MgO—CaO—SiO_2 , e em sua fase cristalina: oxifluoroapatite e β -volastonite. Com variações de sinterização em condições térmicas diferenciadas, pode-se preparar distintas fases cristalinas e propriedades mecânicas para o vitrocerâmicos A-W. Para as avaliações dos testes *in vivo*, quando comparado, o vitrocerâmico A-W ao granulado de hidroxiapatita (porosa), o mesmo mostrou-se com uma superioridade, em relação à osteocondução.⁵³⁻⁵⁵

Como exemplo de interação cerâmico-polímero (compósito), pode-se citar a inserção de polietileno à um biovitrocerâmico, agregando-se o mesmo ao vitrocerâmico de apatita-volastonita (*Cerabone®* A-W); as variações de conjugação são várias: o mesmo vitrocerâmico e polimetacrilato de metila (PMMA), utilizado como cimento ósseo bioativo ou então, agregá-lo (vitrocerâmico) à fibrina (função de ligante), com uma resposta (em testes *in vivo*) de acréscimo à osteocondutividade.⁵³⁻⁵⁹

Na Tabela 2, estão representados alguns exemplos de aplicações dos vitrocerâmicos comercializados.

Tabela 2. Exemplos de aplicações dos vitrocerâmicos comercializados.⁵³

Fases cristalinas	Função – aplicação clínica
Oxifluoroapatita e volastonita	implantação em vértebras enchimento de defeitos ósseos artroplastia
Flogopita e cordierita	cirurgia da cabeça e do pescoço, da orelha médio, odontologia (material de cobertura de dentes e próteses dentárias)
Apatita e berlinita	incorporação em compósitos
Flogopita e apatita	cirurgia ortopédica, da coluna vertebral, do nariz, da orelha médio, do maxilar, e em odontologia (raízes de dentes)
Apatita	cirurgia do ouvido médio (substituição dos ossículos da cadeia ossicular) cirurgia maxilo-facial do nariz cirurgia dentária

Notas: flogopita corresponde à fórmula $(\text{Na,K})\text{Mg}_3\text{AlSi}_3\text{O}_{10}(\text{F,OH})_2$; cordierita a $\text{Mg}_2\text{Al}_4\text{Si}_5\text{O}_{18}$; berlinita a AlPO_4 ; oxifluoroapatita a $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{O,F}_2)$; e β -volastonita a

$\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$.

Os materiais direcionados para serem empregado no corpo humano podem ser divididos nas três classificações de biomateriais, baseada nos três tipos principais de resposta tecidual: inerte, bioativo e degradável (Figura 4).

*Os materiais inertes (termo mais apropriado seria, quase inertes) apresentam uma resposta de tecido limitada, praticamente nula. Sua suscetibilidade a causar reação contrária á biológica é muito pequena, pois sua estabilidade química, quando comparada aos outros materiais é bem maior.⁶⁰

*A bioatividade de um implante está relacionada à propriedade de formar tecido sobre a superfície do material implantado (biomaterial) além de promover uma interface onde haja capacidade de cargas funcionais serem suportadas. Um exemplo para

material bioativo é quando há crescimento ósseo, devido ativação celular, provocada pela presença do material no tecido adjacente ao implante.^{54, 55, 60}

*Materiais degradáveis, ou reabsorvíveis, são incorporados ao tecido circunvizinho implantado, ou em alguns casos específicos são completamente absorvidos pelo organismo, após um período de tempo.⁶⁰

Os vitroceramicos implantáveis, atendem uma grande variedade de necessidades, todas voltadas para o sucesso do implante nas suas mais diversas funções. Apresentam-se associados a outros materiais com componentes polímeros (compósitos), revestindo implantes metálicos, formando redes porosas, como microesferas, para preenchimento entre outras.⁶⁰⁻⁶²

Figura 4. Biomateriais: origem e resposta ao organismo.⁶⁰

2.1.2 A FASE ANORTITA

Na obtenção de vitrocerâmicos, o sistema $\text{SiO}_2 - \text{Al}_2\text{O}_3 - \text{CaO}$ é considerado de extrema importância, pois o fundido primário pode ser originado de escórias metalúrgicas, possibilitado devido sua composição química da fase cristalina principal.^{5, 32, 39} Nas diversas possibilidades de materiais vitrocerâmicos desse grupo, em temperaturas acima de 800°C , há separação de fase líquida e precipitação de

soluções sólidas, possibilitando a nucleação das fases cristalinas principais, dentre elas a anortita. De modo geral, as fases evidenciadas, trazem propriedades como boa resistência mecânica, resistência abrasiva, resistência ao ataque químico e uma excelente resistência à abrasão.^{63, 64}

A Anortita, possui uma estrutura totalmente ordenada, onde igualmente o número de átomos Si e Al alternam-se com total regularidade. Este ordenamento faz com que haja indução da duplicação da dimensão c , fazendo com que a localização dos átomos de Si e Al, permitam que a célula unitária apresente simetria monoclinica ou cúbica de corpo centrado. Com a presença dos íons Ca, ocorre uma distorção da rede tridimensional, o que resulta na indução da célula unitária para uma simetria triclinica ($a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$), e apresenta 10 planos cristalográficos, conforme demonstrado na Figura 5 (a) e (b) respectivamente, mas também pode apresentar-se, em outras simetrias, como ortorrômbica, pseudo-ortorrômbica, e hexagonal.⁶⁵⁻⁶⁷

Figura 5. Anortita ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$): (a) célula unitária e (b) forma do cristal – planos cristalográficos.³⁹

Quanto as propriedades físicas e químicas, a Anortita representa-se no grupo Feldspato, subgrupo plagioclásio, descrevendo-se por uma solução sólida entre Anortita ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$) e Albita ($\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$), demonstrado no diagrama da Figura 6. Teoricamente, apresenta as seguintes propriedades: (a) dureza 6 (escala Mohs), (b) traço branco, cinzento, azulado, avermelhado ou esverdeado, (c) brilho vítreo, (d) clivagem perfeita em $\{001\}$ e boa em $\{010\}$, (e) densidade $2,73 \text{ g/cm}^3$, (f) cristais nas formas de prismas ou plaquetas. A Anortita apresenta uma característica divergente dos demais materiais deste subgrupo mineralógico (plagioclásios): seus cristais são sensivelmente vulneráveis aos meios ácidos. Adicionalmente, a substituição entre plagioclásios e feldspatos potássicos, por exemplo, Ortoclásio (KAlSi_3O_8) limita-se ao pólo albita da série. Os Feldspatos potássico-sódicos são agrupados sob o nome de feldspatos alcalinos. ^{66,67}

Figura 6. Diagrama: ortoclásio - albita/anortita.⁶⁵

2.2 BIOMATERIAIS E BIOCOMPATIBILIDADE

O uso dos biomateriais e a busca de possibilidades em projetar novos destes, crescem cada vez mais, não somente na questão científica em que o mesmo está inserido, mas principalmente no que se referem às condições para a melhoria e/ou aumento na qualidade de vida das pessoas, que necessitam ser assistidas clinicamente, com esses dispositivos implantáveis.

Os biomateriais são embasados e classificados através de normas, como por exemplo, a ISO 10993 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION), que separam e classificam os diversos tipos de materiais e dispositivos médicos da seguinte forma:

-dispositivos que não entram em contato com o paciente (não apresentadas pela norma ISO 10993); ^{68,69}

-dispositivos com contato superficial – utilizada para designar materiais e/ou produtos que entram em contato com a pele íntegra (ex.: eletrodos e bandagens), mucosas intactas (ex.: próteses dentárias e DIUs) e superfícies com lesões ou comprometidas tais como as que passaram por processos de queimaduras e que apresentem ulcerações; ^{68,69}

-dispositivos de comunicação externa – esses dispositivos manterão contato com a via sanguínea indiretamente (ex.: dutos para administração de soluções e de sangue), com tecido, osso ou sistema polpa/dentina (ex.: artroscópios e materiais dentários de preenchimento) e com sangue circulante (ex.: cateteres intravasculares e dialisadores); ^{68,69}

-dispositivos de implantes – são os materiais que entram em contato direto com a estrutura anatômica/tecido (ex.: implantes dentários e marcapassos) e sangue (ex.: válvulas cardíacas). ^{68,69}

Certos fatores devem ser seguidos para que um material venha atingir a especificidade adequada que um implante necessita.⁶⁹ De forma geral, obriga-se a ter o conhecimento e realizar testes das propriedades estruturais do material, para que o mesmo encaixe-se com o que se deseja projetar. As normas para avaliações (testes) de

engenharia, são formuladas pela ASTM (American Society for Testing and Materials) e também pela ISO. Outros fatores, como a fase de produção, a tecnologia envolvida na mesma, viabilidade de mercado, entre outras observações, permitirão a finalização do produto com seu uso específico.

Os projetos de avaliação e confecção de cunho da engenharia, não são os únicos quesitos que um material experimenta para ser considerado implantável, mas com certeza é o que possibilita a sua próxima fase de aprovação. Essa nova etapa compreende estágios de análise referentes à certificação do material/produto, no âmbito da biocompatibilidade.⁴⁰ Neste processo o que se analisa é a inserção do material dentro de um meio anátomo-fisiológico, considerando as particularidades funcionais que um meio biológico oferece. Obrigatoriamente, assegura-se que a capacidade de funcionamento desse dispositivo, quando implantado, não cause distúrbios imuno-fisiológicos ao implantado. De igual forma, para que o dispositivo de implante não venha perder sua função, o ambiente biológico não pôde interagir negativamente à presença do mesmo. Como exemplo, pode-se citar o efeito mecânico de uma peça mal projetada ou com uso de material inadequado, podendo ocorrer desgaste e corrosão, gerando um quadro de reações sistêmicas, ocasionando necrose local, hipersensibilidade, toxicidade, perda do implante entre outros infortúnios ao implantado.⁶⁹

Os testes laboratoriais *in vitro* e posteriormente *in vivo*, são realizados para dar a certificação final, a qual um material com perspectiva de uso como biomaterial necessita. Esses testes são embasados por normas técnicas (principalmente o conjunto da ISO 10993) e éticas. Dentro dos conceitos éticos de avaliação e testes, a aplicação

dos testes *in vivo*, só é permitida, após os resultados dos testes *in vitro* não apresentarem reações de toxicidade e/ou letais ao ambiente celular. Se os resultados *in vitro*, apresentarem tal aspecto, a próxima fase de experimentação (*in vivo*) torna-se impedida, questionando o uso desse material como um possível biomaterial e em alguns casos até descartando-o para tal finalidade.⁶⁹⁻⁷²

A biocompatibilidade é uma característica imprescindível no estudo dos materiais implantáveis, pois estes materiais não devem reagir com os tecidos, salvo para alguns materiais e situações específicas onde tal propriedade seja necessária para que os processos de restabelecimento e cura aconteçam. Reações alérgicas ou inflamatórias devem estar ausentes, mas caso apresentem-se, que sejam mínimas e que estejam dentro dos parâmetros de aceitação desses níveis.^{69,70}

Os principais testes preconizados pela *ISO 10993 – Biological Evaluation of Medical Devices* são: citotoxicidade, sensibilização, irritação, reatividade intracutânea, toxicidade sistêmica aguda, implantação e hemocompatibilidade. Essas normas técnicas são as responsáveis pela certificação dos testes de biocompatibilidade dos materiais em uso e de novos materiais e dispositivos candidatos a biomateriais.⁴⁹

2.3 O OSSO E A REMODELAÇÃO ÓSSEA

O tecido ósseo, quando observado do ponto de vista, como um material, apresenta características mecânicas e biológicas muito interessantes e particulares. Biologicamente falando, apresenta-se como um tecido estrutural e também como um

tecido metabólico, com capacidade de remodelação, conforme necessidade exigida. Dentre os tecidos do corpo humano é o mais resistente e rígido, com funções específicas como: sustentação do corpo e proteção aos órgãos vitais (como a caixa craniana, torácica e o canal vertebral). Encontra-se na estrutura óssea, alojada e protegida a medula óssea, responsável pela produção do tecido hematopoiético e juntamente com os músculos esqueléticos, realizam os complexos movimentos do corpo.^{19,18,28,47,73,}

O tecido ósseo também é considerado depósito e controlador de concentrações de íons no metabolismo humano, como por exemplo: cálcio, fosfatos, potássio, magnésio, sódio, entre outros. A estrutura óssea pode ser classificada, quanto ao tipo em: osso cortical ou compacto e osso trabecular. O tipo cortical abrange cerca de 70 a 80% da estrutura óssea total e representando de 20 a 30%, está então, o osso trabecular.^{73,74} A Figura 7, demonstra esquematicamente a presença de osso cortical e trabecular.

Figura 7. Osso trabecular e Osso cortical.⁷⁵

O tecido ósseo apresenta matriz extracelular, representada por componentes orgânicos (cerca de 35%) e inorgânicos (aproximadamente 65%). Dentre esses componentes, está o colágeno, participando ativamente no processo de mineralização óssea, representa 90% da matriz orgânica, nos outros 10% restantes, encontram-se glicoproteínas, lipídeos e mucopolissacarídeos. Como representante da parte mineral do osso, está a hidroxiapatita, com composição a base de sais de cálcio e fosfato.^{62, 73}

O tecido ósseo apresenta adaptação, quando há forças externas sendo aplicadas. Essa adaptação e/ou remodelação óssea (Figura 8), é expressa no organismo, através da degradação dos cristais mineralizados. Essa degradação ocorre e é necessária para que haja uma nova formação óssea reestruturada para acompanhar essa adaptação. A remodelação não ocorre apenas durante o crescimento à fase adulta ou em casos onde há uma aplicação de esforço anormal, é um fenômeno que está presente por toda a vida.^{73,76}

Figura 8. Esquema simplificado da remodelação óssea.⁷⁷

As células responsáveis pelo processo de remodelação e estruturação óssea (Figura 9), são representadas basicamente pelos osteoclastos e os osteoblastos. As células denominadas osteoclastos, apresentam mobilidade e estão presentes na superfície óssea. Estruturalmente apresenta em seu citoplasma mitocôndrias de forma abundante, seus vacúolos e vesículas são organelas importantes no processo de reabsorção. As enzimas lisossômicas presentes nos vacúolos, são as digestoras da matriz óssea (orgânica e inorgânica) em meio ácido. Íons de hidrogênio (da anidrase carbônica) em conjunto com essas enzimas são liberados por pré-determinação do osteoclasto, devido sua aderência na matriz. Através da liberação ativa de prótons, pela membrana apical (em contato direto com a área de reabsorção), há uma diminuição no pH. Com a acidez presente, faz-se um microambiente ideal para a atividade de hidrolases lisossômicas, que irão facilitar a dissolução de fosfato de cálcio. A matriz óssea é removida e através do citoplasma do osteoclasto, os produtos da absorção óssea são capturados, digeridos e liberados para a corrente circulatória.^{60,62,73, 78}

Figura 9. Osso cortical de tíbia de coelho: a) osteoclasto; b) osteoblastos; c) osso mineralizado; d) osteócito; e) osteóide (matriz não mineralizada). Corante Azul de Toluidina.⁶⁰

O outro tipo celular presente no tecido ósseo é chamado de osteoblastos (produtora de novo osso). São células de apresentação cuboidal (Figura.9), proemiam-se de células mesenquimais indiferenciadas, com complexo de golgi e retículo endoplasmático bem desenvolvidos, caracterizando sua especificidade em biossíntese e secreção de matriz óssea. Expressam fosfatase alcalina, colágeno, osteocalcina, collagenase, tem receptores para $1,25(\text{OH})_2$ (vitamina D) e glicocorticóides PTH (paratormônio) entre outros fatores de crescimento.^{19,73,79,80}

2.4 TESTES PARA CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL

2.4.1 DILATOMETRIA, RETRAÇÃO LINEAR (VERDE-SINTERIZADO, COM VERIFICAÇÃO DE POROS RESIDUAIS), DURABILIDADE QUÍMICA E MICROSCOPIA DO TRATAMENTO TÉRMICO SOB VÁCUO.

A dilatometria é um método analítico que fundamenta-se nas variações dimensionais dos materiais, quando submetidos a um aumento progressivo de temperatura, estando a mesma (temperatura) previamente definida. As curvas dilatométricas evidenciam variações dimensionais, como por exemplo, contração e expansão, as quais são provocadas pelas transformações de alguns constituintes, por formação de gases, sinterização e formação de novas fases, no material em estudo.⁸¹⁻⁸⁴

A retração linear é expressa em porcentagem (%RL) relativamente ao comprimento inicial do corpo de prova, L_0 . A verificação da % RL, dá-se após o material experimentar aumento de temperatura. A verificação dos poros residuais, dá-se através do volume da amostra ($V \text{ cm}^3$) e da densidade aparente ($d_A \text{ g/cm}^3$), onde é possível quantificar a porcentagem do material e da porosidade residual do material, após processo de queima. Os ensaios da durabilidade química demonstram o comportamento do material, quando inserido a meios (soluções) com variações de pH, após ciclo térmico, onde faz-se uma avaliação da possibilidade de degradação do material em diferentes situações.^{84,85}

Através da microscopia, realizada durante o tratamento térmico sob vácuo, seguindo o mesmo ciclo térmico do processo de dilatometria, é possível

observar/capturar as imagens das transformações microestruturais que o material experimenta, conforme aumento de temperatura.^{83,86}

2.5 TESTES PARA AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO*

2.5.1 TESTES *IN VITRO*: CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

A *International Organization for Standardization* – ISO, desenvolveu um conjunto de normas, a ISO 10993, que são utilizadas em técnicas da avaliação biológica dos dispositivos médicos. Todo processo de esterilização, resposta celular/biológica local ou sistêmica entre outras, passam pelos métodos de avaliação dessa norma.^{68, 71,}

Os testes *in vitro* são de grande importância, demonstram com segurança a resposta celular frente ao material em teste ou extrato do mesmo. Os testes *in vitro* são em sua grande maioria, rápidos, o investimento financeiro, na maioria das vezes é baixo, apresentam padronização bem definida, além de evitar e/ou diminuir o uso de cobaias.^{71,72,87}

Para as avaliações de materiais que venham necessitar de testes *in vivo*, a norma ISO 10993-6 indica para os testes, o uso de camundongos, ratos e coelhos. O uso desse tipo de cobaia é devido facilidade de manuseio e pela similaridade em relação à resposta fisiológica que eles apresentam, quando comparados ao dos humanos.⁸⁷ Em avaliações de citotoxicidade e toxicidade sistêmica, por exemplo, as normas técnicas ISO 10993-5, ISO 10993-10 e ISO 10993-12 referem-se à seleção e a preparação de amostras e extratos, que entrarão em contato direto ou indireto, com meios celulares e/ou cobaias. Em alguns testes tem-se a necessidade de utilizar o

material em condições normais de uso, apresentando-se na forma de fragmentos ou poderá ser utilizado nos testes o próprio dispositivo, onde o mesmo entra em contato direto com culturas celulares ou é implantado por processo cirúrgico.⁸⁷

Quando há utilização de extratos, necessita-se de um veículo de extração. Por exemplo, os veículos mais utilizados (preconizados na norma), são: óleos vegetais, soluções com similaridade fisiológica (saliva artificial), salina fisiológica entre outras. Para os ensaios de citotoxicidade, é recomendável, que os mesmos sejam realizados dentro da faixa de corporal humana, aproximadamente 36,5 °C, num período de tempo de 72 horas.⁸⁷

A ISO 10993 estabelece os procedimentos para cada tipo ou condição de amostra e a proporção estabelecida entre espessura, área superficial de contato da amostra com a solução e quantidade de material a ser extraído.

O principal objetivo do teste de citotoxicidade é identificar através do método de difusão em ágar ou eluição, se o material em teste, pode produzir efeitos letais ou subletais a nível celular e deve ser aplicado a todos os materiais candidatos a biomateriais.⁷¹

No teste de difusão, fragmento do material em teste é adicionado sobre uma camada de ágar com uma monocamada confluenta de células. Se o material liberar substâncias tóxicas, as mesmas difundem-se através da camada de ágar, rompendo as células e causando lise. A visualização do resultado desse teste dá-se pela leitura de um halo, que forma-se com a morte celular.⁸⁷

No teste de eluição, o extrato originado do material em teste é adicionado em concentrações variadas em culturas celulares. A avaliação é realizada através da

resposta de viabilidade celular, após a inoculação dos extratos, observando presença ou ausência de inibição do crescimento celular através de incorporações de corantes vitais. Através do índice de sobrevivência celular, é possível quantificar níveis de citotoxicidade, através de corantes vitais, como o vermelho neutro, que tem passagem pela membrana celular concentrando-se nos lisossomos. As células com processo de lise acabam tendo menor absorção do vermelho neutro, facilitando a mensuração por absorbância, das células vivas intactas quando comparadas às mortas.⁸⁷

Para a proliferação celular, faz-se o cultivo celular na presença de discos do material em testes e após período de tempo determinado, faz-se a suspensão de células e realiza a contagem do número de células presentes.⁸⁷

2.5.2 TESTES IN VIVO: TOXICIDADE SISTÊMICA E IMPLANTE

É possível fazer a análise da toxicidade sistêmica, avaliando os possíveis efeitos dos componentes químicos liberados por um material (teste). Esses elementos podem interagir com o organismo, causando instabilidade e mal funcionamento sistêmico (geral) ou em determinados órgãos. Toxicidade hepática, cerebral, intestinal, entre outras, é indício que o material em teste causa prejuízos ao organismo, com resposta que pode ser identificada no local de contato ou distante. A norma *ISO 10993-11* estabelece o teste de toxicidade sistêmica aguda, com um espaço de observação de tempo curto, para os possíveis efeitos adversos, que a cobaia venha apresentar. Animais de pequeno porte, são os mais utilizados para os testes de toxicidade sistêmica, devido facilidade do manuseio técnico e as acomodações em biotérios, como

os camundongos albinos e ratos. No processo de avaliação de toxicidade sistêmica, extratos do material em teste podem ser utilizados (igualmente ao método de eluição). As vias de administração utilizada nesse teste, pode ser tópica, inalação intravenosa, intraperitoneal ou oral. Para o processo de avaliação dos resultados, os mesmos classificam-se da seguinte forma: efeitos adversos agudos, subagudos, subcrônicos e crônicos. Ainda há uma classificação numérica de 0 a 4 (sendo 0 a menor presença de alterações e 4 a maior) para avaliação macroscópica de alterações comportamentais da cobaia. Para as observações de toxicidade de fase aguda, os efeitos agudos ocorrem dentro das primeiras 24 horas após a aplicação, os resultados do teste estendem-se a uma observação do comportamento dos animais, em intervalos pré-determinados durante um período de 72 horas.⁸⁷

No processo de avaliação do implante utilizou-se a Norma ASTM F981-04, juntamente com a Norma ISO 10993 – 6, para padronização do procedimento cirúrgico e do implante.^{87, 88}

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MANUFATURA DO CORPO DE PROVA

Para manufatura dos corpos de prova, primeiramente foram confeccionados tarugos, utilizando pelets vítreos ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$) do sistema $\text{CaO-Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$, desenvolvido por: Instituto Hestia de Ciência e Tecnologia, sob reponsabilidade de Etney Neves. A dimensão média dos pelets foi de 1,5 mm (Figura 10). Como componente ligante da barbotina, o Poli-Vinil-Butiral (PVB / Butvar B-98) na quantidade de 1 grama e solvente, o álcool isopropílico PA - ACS (Labsynth Ltda).

O método de conformação selecionado para o processamento do corpo de prova foi o da prensagem isostática. Foram prensados tarugos de diâmetro aproximado 10mm x 55mm de comprimento, os quais foram usinados à verde por usinagem abrasiva na forma de cilindros de diâmetro 6 mm x 27 mm, para avaliação de sinterização por dilatometria.

Figura 10. Material para teste - Pelets vítreos ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$).

A mistura, desaglomeração e homogeneização da matéria-prima utilizada para o preparo da barbotina foi realizada em moinho de jarro (Figura 11) no Laboratório de Tribologia e Compósitos – LTC - EESC, com jarro de polietileno, contendo como elementos de moagem cilindros de zircônia (diâmetro = 12,0 mm, comprimento = 12,0 mm).

Figura 11. Moinho de jarro – LTC – EESC/USP.

A barbotina (componentes na tabela 2.) foi obtida com a moagem anortita e de álcool isopropílico, num período de 120 horas. Após este período foi adicionado o PVB e seguiu-se a moagem por mais 6h .

Tabela 3. Barbotina: 30% vol. sólido e 70% vol. líquido

Sólido - Anortita	Líquido – Álcool Isopropílico
75g	55 g.

Após a barbotina pronta, o solvente foi evaporado com o auxílio de um soprador de ar quente e, simultaneamente, desaglomerado manualmente em grãos menores até passar em malha de abertura 100 μm . A secagem dos grânulos foi finalizada em estufa a 80°C durante 30 minutos. A Conformação dos tarugos foi feita no molde isostático tipo *wet bag*, carregado com pós granulados e prensados em prensa isostática a 100 MPa (Figura 12) durante 1 minuto.

Figura 12. Prensa isostática – LTC – EESC/USP

Após prensados, os tarugos (Figura 13) seguiram o processo de usinagem, em torno CNC (Figura 14) à verde. Usou-se disco abrasivo de alumina com diâmetro 40 mm x 1,5 mm, com velocidade de avanço de 100 mm/min e profundidade de corte 0,3mm, a peça foi rotacionada à 800 rpm (Figura 15.)

Figura 13 . Tarugos prontos para usinagem

Figura 14. Retífica CNC – LTC – EESC/USP.

Figura 15. Processo de usinagem do material.

O corpo de prova, após usinado ficou com as seguintes dimensões: comprimento 10,6 mm e diâmetro 6 mm (Figura 16).

Figura 16. Corpo de prova para o dilatômetro.

3.2 DILATOMETRIA, RETRAÇÃO LINEAR, POROS RESIDUAIS, DURABILIDADE QUÍMICA E MICROSCOPIA DURANTE TRATAMENTO TÉRMICO SOB VÁCUO.

O corpo de prova foi levado ao dilatômetro NETZSCH DIL 402C (Figura17) em contato com uma haste de alumina, que através de sensores, é capaz de medir variações da dimensão do corpo de prova, tanto em contração como expansão.

Figura 17. Componentes do Dilatômetro (NETZSCH DIL 402C). 1-computador; 2- controladores do forno; 3-dilatômetro e cilindro de gás argônio; 4- estabilizador de corrente; 5- controlador do fluxo de água e compressor.

Um termo par, que fica próximo ao corpo de prova controla a temperatura deste. Todo o conjunto fica submetido a fluxo de argônio. O corpo de prova foi posicionado no dilatômetro 402C (Figura 18), para dar início ao processo de sinterização da amostra.

Figura 18. Amostra posicionada no compartimento interno do dilatômetro

O ciclo de térmico programado para o processo de sinterização foi o seguinte:

- 1- Dynamic – 25 °C – (10.0°C min) - 600°C;
- 2-Dynamic- 600 °C – (10.0°C min) - 830 °C ,
- Isothermal- 830°C – (30min) - 830 °C;
- 3-Dynamic -830°C– (10.0°C min) - 1100 °C,
- Isothermal - 1100 °C – (15 min) - 1100 °C,
- 4- Resfriamento (sem programação).

Através do ciclo térmico, foram obtidos gráficos de dilatação ($dL/d\theta$) pela temperatura através do software NETZSCH Proteus Thermal Analysis. Os corpos de prova utilizados na avaliação dilatométrica, após resfriado, foram utilizados também, para a avaliação da retração linear, porosidade residual e durabilidade química.

A retração do corpo de prova foi calculada em percentagem, através da seguinte equação:

Equação 1, onde:

L_0 é o comprimento inicial do corpo de prova

L_f é o comprimento final do corpo de prova

$$\% RL = \frac{L_0 - L_f}{L_0} \times 100$$

Com base nas medidas do corpo de prova, após dilatometria, calculou-se a quantidade de material presente e de poros residuais, utilizando as equações 2 e 3.

O Volume da amostra ($V \text{ cm}^3$) é representado pela equação matemática (2) e a densidade aparente ($dA \text{ g/cm}^3$) é representada pela equação matemática (3).

(2) $V = \pi r^2 C$, sendo C = comprimento da amostra; r = raio

(3) $dA = \frac{M}{V}$, sendo M = peso da amostra e V= volume.

Partindo da densidade aparente, é possível quantificar a porcentagem do material e da porosidade residual do material (equação matemática 4), tendo como densidade teórica para anortita (99% pureza): $2,73 \text{ g/cm}^3$.

$$(4) \% \text{ do material} = \frac{\text{densidade teórica} \cdot x}{dA \cdot 100}$$

Para a durabilidade química, o corpo de prova (após ciclo térmico) foi imerso (Figura 19) por um período de 24 horas, com temperatura controlada de 37°C , nas seguintes soluções:

5% de NaOH (hidróxido de sódio), HCl (cloreto de sódio) e H₂O (água) como controle. Após esse período, o material foi retirado das soluções, foi seco e pesado em balança de precisão, para assim ser realizado o cálculo da durabilidade química, seguindo a seguinte equação 5 onde, m_i é massa inicial do corpo de prova, m_f massa após as 24 horas de imersão e A_i a área da amostra antes da imersão.

Equação 5: $DQ = \frac{M_i - M_f}{A_i}$

Figura 19. Corpo de prova submerso – Teste de durabilidade química.

A partir do mesmo ciclo térmico, também foram observadas as imagens obtidas das transformações de fase da anortita, através do tratamento térmico sob vácuo. O processo de obtenção do corpo de prova (para essa análise), foi o mesmo utilizado para dilatometria, exceto as dimensões do corpo de prova (Figura 20), onde a peça final obteve as seguintes dimensões: 3 mm x 2 mm.

Figura 20. Corpo de prova – tratamento térmico sob vácuo.

Para o teste de tratamento térmico sob vácuo, foi utilizado o equipamento demonstrado na figura 21 abaixo.

Figura 21. Equipamento de tratamento térmico sob vácuo – microscopia acoplada: 1- cilindro de argônio; 2- controlador dos ciclos; 3- bomba de vácuo; 4- microscópio com câmera e forno; 5- receptor de imagem; 6- monitor de temperatura.

No ensaio de tratamento térmico sob vácuo, o corpo de prova foi posicionado em um cadinho de titânio e inserido na câmara de alta temperatura do microscópio do equipamento. O cadinho é apoiado no termopar que envia os dados da temperatura de dentro do forno ao monitor de temperatura (Figura 22).

Figuras 22. Posicionamento do corpo de prova.

O sistema foi submetido a um fluxo de argônio para limpeza da atmosfera e então a vácuo de $6 \text{ a } 8 \cdot 10^{-5} \text{ mBar}$, minimizando a oxidação pelo contato com o ar. O ensaio foi acionado pelo controlador do forno que foi programado com o mesmo ciclo térmico utilizado no dilatômetro. Na evolução deste ciclo obteve-se as imagens, que revelam as transformações do material. As imagens foram utilizadas para justificar as transformações de fase, identificadas pela sinterização em dilatométrica.

3.3. ENSAIOS *IN VITRO*

3.3.1 CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para o teste de difusão em ágar (meio para crescimento celular), primeiramente o corpo de prova (vitrocerâmico/anortita) foi esterilizado em autoclave e após foi colocado sobre uma camada de ágar que recobre uma monocamada confluyente de células. A linhagem celular utilizada para esse teste foi a McCoy (CRL-1696 ATCC-USA). A concentração celular foi de $1,5 \times 10^5$ células/ml, que foram semeadas em placas de petri (15 x 60 mm), num volume de 5 ml, sendo posteriormente incubadas por um período de 48 horas, com atmosfera úmida a 5% de CO_2 e temperatura de 37°C . Terminado o processo descrito acima, é adicionado 5 ml do meio “overlay” para cada placa de petri. O meio “overlay” é composto por partes iguais de mínimo de Eagle (MEM) e ágar a 1,8% com 0,01% de vermelho neutro (Figura 23).

Figura 23. Momento que o meio “overlay” é adicionado à cultura celular.

Com o ágar solidificado foi adicionado em sua superfície os fragmentos do vitrocerâmico-Anortita e consecutivamente as placas foram incubadas novamente em estufa com 5% de CO₂, a uma temperatura de 37°C por um período de 24 horas (Figura 24). Caso haja liberação de toxinas, evidencia-se um halo devido a ruptura ou morte celular.

Figura 24. Cultura de células sendo incubadas.

As amostras foram avaliadas em triplicata e, como controle positivo, serão adicionados sobre o mesmo tipo de ágar, fragmentos de látex e para o controle negativo, foram utilizados fragmentos de filtro atóxico com tamanho médio de área superficial de $0,25 \text{ cm}^2$.

A avaliação dos resultados do teste de citotoxicidade de difusão em ágar foi feita pela observação do índice do halo (Figura 25), que é representado pela área não corada pelo corante vital. Os índices, apresentados na Tabela 3, são numerados e é feita uma correlação, fornecendo o índice de resposta.

Figura 25. Teste difusão em ágar.

Tabela 4. Índice de halo

Índice de halo	Descrição
0	nenhum halo sob e ao redor da mostra
1	zona limitada sob a amostra
2	zona menor que 0,5 cm ao redor da amostra
3	zona entre 0,5 e 1,0 cm ao redor da amostra
4	zona maior que 1,0 cm sem envolver toda placa
5	zona que envolve toda placa

Para o teste de eluição, as células permaneceram na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/ml em placas de petri de 60 mm de diâmetro, no volume de 5 ml, e incubadas durante 48 h a 37 °C em atmosfera ambiente controlada com 5% de CO₂. Para o teste, obteve-se o extrato do material em teste (anortita) e o extrato controle, foi utilizada uma quantidade de 2 g do material em teste e controle (Bioglass 45S5), para cada 20 ml de veículo de extração. O veículo de extração foi saliva artificial – Fusayama, tabela 4.2 abaixo:

Tabela 5. Fórmula da saliva artificial de Fusayama (g/l).

KCl	NaCl	CaCl ₂ .2H ₂ O	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Na ₂ S.9H ₂ O	Uréia
0,4	0,4	0,906	0,690	0,005	1

Então, os frascos contendo o veículo de extração com as amostras de em teste foram condicionados a 37 °C (± 2 °C) por 72 horas. Após este período, foi retirada a amostra e os extratos (Tabela 6) foram vertidos em frascos estéreis e armazenados até o momento de utilização.

Tabela 6 Extratos e seus componentes.

Extrato	Componentes
A	saliva artificial pura
B	saliva artificial + Vitrocerâmico/Anortita
C	saliva artificial + BIOGLASS 45S5

O extrato foi então pipetado e transferido para os compartimentos das placas (Figura 26) com as seguintes concentrações: 0% (apenas meio de cultura para controle), 10%, 30%, 50%, 65%, 80%, 100%. Portanto cada poço representa um ensaio isolado, sendo que cada fileira corresponde às concentrações e cada coluna pode ser considerada um ensaio completo.

Figura 26. Distribuição dos extratos: A-0%, B-10%, C-30%, D-50%, E-65%, F-80%, H-100%.

As placas voltaram à incubadora onde passaram 24 h, em seguida retirou-se os extratos, lavou-se com PBS e colocou-se o meio de cultura, retornando à incubadora por mais 24 h. Após esse período, as células foram tratadas com 3-(4,5-dimetil)tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazolio (MTT), de coloração amarela, voltando a incubadora por 3 h, para que haja redução ao produto formazan, de coloração violeta com absorbância na faixa de 570 nm (Figura 27). A redução é feita pelas desidrogenases mitocondriais que só estão ativas nas células vivas.

Figura 27. a) Placa com extrato após incubação de 24h e b) placa tratada com brometo de tetrazolio.

O meio com MTT é retirado e 50 μ l de etanol são adicionados, após diluição, adiciona-se 150 μ l de PBS com isopropanol na proporção 1:1. A placa de 96 poços foi lida em leitor de Elisa Bio-Rad (Figura 28) em 550 nm, onde se verificou o percentual de lise das células, dessa forma a absorbância medida será proporcional ao número de células vivas.

Figura 28. Leitor ELISA BIO-RAD.

Para a verificação da proliferação celular, foi utilizada como placa de deposição celular ao vitrocerâmico anortita (em forma de disco – Figura 29). Após os discos serem esterilizados em autoclave (120 °C), a cultura celular foi depositada em sua superfície.

Figura 29. Disco do Vitrocerâmico Anortita

A cultura celular utilizada foi a de células vero (rim de macaco verde africano), por um período de 10 dias, as células ficaram em frascos de cultivo celular, contendo, meio essencial mínimo – α (Gibco), 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de fungisona (Gibco), 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Gibco), 5 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico (Gibco), β -glicerofosfato 7 mM (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e dexametasona 10^{-7} M (Sigma, St Louis, MO). Após o período de confluência celular, fez-se a retirada da cultura, utilizou-se EDTA 1mM (Gibco), colagenase (1,3 mg/mL) e tripsina 0,25% (Gibco). Com as células ressuspensas, voltou-se ao cultivo a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico, sobre os discos do material em teste (anortita). Para remoção do meio de cultura, foram lavados em triplicata com solução de salina tamponada com fosfato (37°C) para remoção das células que não se fixaram. Após, as placas foram recobertas com uma solução de tripsina 0,05%, 0,5 mM de EDTA e colagenase (1,3 mg/mL) para remover as células aderidas, para a contagem do número de células, foi utilizada Câmara de Neubauer (Figura 30), a proliferação celular foi expressa como número de células $\times 10^4$ /disco e por microscopia de fluorescência. Esse procedimento foi realizado ao final de 1, 5, 10 e 20 dias

Figura 30. Câmara de Neubauer.

3.4 ENSAIOS *IN VIVO*

3.4.1 TOXICIDADE SISTÊMICA

Os testes *In Vivo* foram autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais pela Universidade Federal de São Carlos, protocolado por número 045/2011 (Anexo A).

O teste de toxicidade sistêmica segue a norma ISO 10993 parte 11.^[50] Tem como objetivo observar o potencial de toxicidade sistêmica dos extratos originados do corpo de prova do vitrocerâmico anortita, após inoculação intraperitoneal em ratos. Como forma de controle usou-se o extrato originado do Bioglass 45S5 e saliva artificial pura. A observação é macroscópica e considera as reações adversas que os animais possam vir a desenvolver após a inoculação num período de 72 horas.

Para o teste foram utilizados 15 ratos - Wistar com peso médio de 245g, divididos em 3 grupos, sendo cada grupo com 5 animais. Os animais foram acondicionados em gaiolas próprias, com alimentação e água *ad libitum* conforme Figura 31.

Figura 31. Animais na gaiola de condicionamento.

Este teste avaliou sistemicamente a resposta do organismo dos animais frente ao extrato do material teste e dos controles. Cada grupo específico entrou em contato com o seguinte inóculo, como segue Tabela 7 abaixo:

Tabela 7. Grupos de animais com respectivos extratos de inoculação.

Grupo A	Grupo b	Grupo C
Extrato A (Saliva artificial pura)	Extrato B (Saliva artificial + Vitrocerâmico Anortita)	Extrato C (Saliva artificial + Bioglass 45S5)

Após separação dos animais em grupos, realizou-se tricotomia abdominal e identificação em todos os animais (Figura 32).

Figura 32. Animal pronto para aplicação intraperitoneal.

Foi realizada a primeira pesagem (os animais foram pesados também nos momentos 24h, 48h e 72h pós inoculação), e deu-se início a inoculação intraperitoneal dos extratos nos animais. A inoculação foi feita através de uma injeção na região da linha média abdominal. A dose de aplicação foi de 50 ml/Kg de peso corpóreo do animal (Figura 33)

Figura 33. Aplicação dos extratos na linha média abdominal (intraperitoneal) do rato.

Os animais foram observados a partir do momento de inoculação dos extratos, no momento 0h, 24h, 48h e 72h. As reações são avaliadas segundo Tabela 8 a seguir:

Tabela 8. Possíveis reações causadas pelos extratos e controles aplicados intraperitonealmente e respectivos valores para o nível sérico- índice de toxicidade sistêmica (adaptada ^[50])

Resposta	Descrição	Nível Sérico
Normal	Sem sintomas	0
Leve	Animal exhibe sintomas adversos leve, mas notáveis da hipocinesia, dispnéia ou irritação abdominal.	1
Moderada	Animal exhibe evidência definitiva de hipocinesia, dispnéia, irritação abdominal ou diarreia (usualmente o peso corpóreo cai entre 15 e 17 gramas.)	2
Severa	Animal exhibe prostração, cianose, tremores ou sintomas severos de dispnéia, irritação abdominal ou diarreia (perda extrema de peso corpóreo).	3
Morte	Animal morre	4

Todos os resultados obtidos através das reações que os animais tiveram após inoculação dos extratos em teste (período de 72 horas) foram anotados e comparados aos controles.

3.4.2 IMPLANTE

Para a avaliação do potencial de biocompatibilidade do material em teste com o tecido ósseo, foram realizados implantes em 10 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) adultos, peso médio de 300g os quais foram submetidos à incisão cirúrgica. Como controle utilizou-se 5 ratos, nos quais foram realizados apenas defeitos ósseos e não foi adicionado nenhum implante. A Norma ASTM F981-04 e Norma ISO 10993 – 6, foram utilizadas para padronização do teste.

As cirurgias foram em ambas as tíbias, os grupos (com 5 animais cada grupo) foram denominados conforme o tipo de implante recebido e pelo período de tempo experimental - em semanas. Os animais que receberam o implante em estudo (vitrocerâmico anortita) foram denominados Grupo 1, os animais que receberam o implante controle (Bioglass 45S5) Grupo 2, e os animais que receberam os defeitos ósseos sem implantação de biomaterial, foram denominados Grupo 3 Controle Negativo. O tempo experimental foi de 30 dias - ISO 10993 – 6 e todos os animais ficaram em gaiolas, recebendo ração e água “ad libitum”.

O procedimento para inserção do implante seguiu o seguinte protocolo:

*Procedimento anestésico.

Os ratos foram anestesiados com 40 mg/kg de Quetamina e 5 mg/kg Xilazina (Ketamina 10 %[®], Rompum[®])²⁷;

*Implantação do material em teste.

Foi realizada tricotomia da região medial entre o fêmur e a tíbia (local escolhido para inserir o implante); após tricotomia, foi feita uma incisão na pele, com lâmina para bisturi, de forma que o osso tibial fosse visualizado;

*Defeito ósseo, para posicionamento do implante.

Para realizar o defeito ósseo (tíbia) foi utilizada broca de diâmetro igual a 2,4 mm, acionada por um micromotor. A broca fica perpendicular ao osso e durante a perfuração, o local é irrigado com solução salina estéril ²⁵;

*Posicionamento do implante (teste e controle).

Na tíbia direita foi feito o defeito ósseo e o implante foi inserido manualmente ao defeito ósseo. Para a tíbia direita, foi selecionado o implante teste (vitrocerâmico Anortita – grupo1). Na tíbia esquerda foi realizado o mesmo procedimento, sendo que o material implantado foi o controle (Bioglass 45S51 – grupo 2). Para os animais identificados como controle total, foi feito o defeito cirúrgico e nada foi implantado (grupo 3) Após fixação dos implantes, a incisão foi suturada com fio poliamida monofilamentar.

Após o período pré-determinado (30 dias), como procedimento de eutanásia, foi realizada anestesia geral, seguida de sedativo. Quando o animal encontrou-se totalmente sedado, aplicou-se 1 ml de Zoletil 50 (virbac) no músculo cardíaco, levando o animal à morte. Após óbito, as peças ósseas foram removidas (Figura 34), para realização do procedimento histológico.

Figuras 34. Retirada do osso com implante.

Para as análises histológicas, primeiramente, fixou-se o osso em 4 % de paraformaldeído (pH 7.4) em 4° C durante 24h, seguida da descalcificação do material em 20 % EDTA (pH 7.4) em 4° C. A amostra após descalcificada passou para o processo de desidratação (em etanol) por um período de sete dias (4° C) e em seguida foi parafinada. Após processo de inclusão em parafina, as peças passaram por microtomia, obtendo assim cortes de 5-6 µm. O último passo para confecção dos cortes histológicos é a coloração por hematoxilina e eosina (100x).

4. RESULTADOS

4.1 DILATOMETRIA, RETRAÇÃO LINEAR (VERDE-SINTERIZADO, COM VERIFICAÇÃO DE POROS RESIDUAIS), DURABILIDADE QUÍMICA E ANÁLISE DAS IMAGENS OBTIDAS POR TRATAMENTO TÉRMICO SOB VÁCUO.

Após o ciclo térmico a amostra (vitrocerâmico Anortita), apresentou diminuição em suas dimensões (Figura 35). As medidas da amostra antes e pós ciclo térmico em dilatômetro, apresentam-se na Tabela 9 abaixo.

a)

b)

Figura 35. a) Corpo de prova à verde – Vitrocerâmico Anortita antes e b) Vitrocerâmico Anortita após ciclo térmico em dilatômetro.

Tabela 9. Medidas da amostra – antes e pós ciclo térmico.

	Antes do ciclo térmico	Pós ciclo térmico
Peso (gramas)	0,52 g	0,51 g
Comprimento (centímetro)	1,06 cm	0,87 cm
Diâmetro (centímetro)	0,6 cm	0,54 cm

Com base nas medidas apresentadas pela amostra (Figura 35 - a e b) após ciclo térmico, observa-se, que o material em teste, tem uma retração considerável. Essa retração pode ser observada, também, através da curva dilatométrica, ficando evidente a partir de 930 °C (Gráfico 1)

Gráfico 1. Curva Dilatométrica

Para o cálculo da retração linear da amostra, obteve-se um valor de 17,92 %, conforme demonstrado abaixo (equação 1):

$$(Eq. 1) \% RL = \frac{L_0 - L_f}{L_0} \times 100$$

$$\% RL = \frac{1,06 - 0,87}{1,06} \times 100$$

$$\% RL = 17,92$$

Com a observação da retração do material, onde o mesmo apresentou 17,92% de retração, seguiu-se a análise em relação à porcentagem de material e poros residuais, após o ciclo térmico. Para verificar a porcentagem de material e poros residuais, primeiramente fez-se o cálculo do volume da amostra e densidade aparente:

O Volume da amostra ($V \text{ cm}^3$) é representado pela equação matemática (1) e a densidade aparente ($dA \text{ g/cm}^3$) é representada pela equação matemática (2).

(Eq. 2) $V = \pi r^2 C$, sendo C = comprimento da amostra.

(Eq. 3) $dA = \frac{M}{V}$, sendo M= peso da amostra e V= volume da amostra

$$(Eq. 2) V = 3,14 \times 0,07 \times 0,87$$

$$(Eq. 2) V = 0,19 \text{ cm}^3$$

$$(Eq. 3) dA = \frac{0,51}{0,19}$$

$$(Eq. 3d) dA = 2,68 \text{ g/ cm}^3$$

Partindo da densidade aparente ($dA = 2,68 \text{ g/cm}^3$) foi possível identificar que 98,16% (Equação matemática 4) do corpo de prova é composto pelo vitrocerâmico anortita, sendo que 1,8% restante da amostra, é formado por poros residuais.

$$(\text{Eq. 4}) \% \text{ do material} = \frac{\text{densidade teórica} \cdot x}{dA \cdot 100}$$

*densidade teórica para anortita (99% pureza): $2,73 \text{ g/cm}^3$

$$(\text{Eq. 4}) \% \text{ do material} = \frac{2,73 \cdot x}{2,68 \cdot 100} = 98,16\% \text{ de material}$$

Outro fator analisado em relação a porcentagem do material, foi a durabilidade química que o vitrocerâmico anortita apresentou quando inserido em diferentes meios. Abaixo encontra-se o Gráfico 2, com os valores da durabilidade química (DQ), demonstrando que para meio ácido (HCl), a durabilidade química do vitrocerâmico anortita é menor, do que em meio neutro (H_2O) e básico (NaOH), num período de 24 horas.

$$\text{Equação 5 : } DQ = \frac{M_i - M_f}{A}$$

$$A = 2 \pi r (C + r)$$

$$A = 2 \times 3,14 \times 0,27 (0,87 + 0,27) = 1,9 \text{ cm}^2$$

$$DQ / \text{HCl} = \frac{0,51 - 0,462}{1,9} = 0,02 \text{ g/cm}^2$$

$$DQ / \text{NaOH} = \frac{0,51 - 0,493}{1,9} = 0,008 \text{ g/cm}^2$$

$$DQ / H_2O = \frac{0,51 - 0,508}{1,9} = 0,001 \text{ g/cm}^3$$

Gráfico 2 . Durabilidade Química do Vitrocerâmico Anortita em soluções com variação de pH.

Na análise da curva dilatométrica (Gráfico 3), observou-se diferentes regiões, como por exemplo, para a parte que antecede a região de transição, abaixo dos 600°C. Nessa região têm-se perda de oxigênio, do álcool isopropílico, do ligante PVB e umidade.

Gráfico 3. Curva dilatométrica – Transformações ocorridas durante o ciclo térmico estabelecido.

A região de transição fica sendo exatamente, o início das transformações que o material experimenta com o aumento da temperatura. Nessa região, somente com esse método avaliativo, não foi possível identificar em qual ponto exatamente inicia-se o processo de sinterização, mas é sabido (embasado nos estudos de materiais precursores à anortita aqui estudada)³⁹ que a partir dos 600°C, há um contato das partículas, iniciando assim a formação do pescoço. No Estágio 1, inicia-se o rearranjo dos átomos e a formação do pescoço. Dentro da faixa de temperatura designada Estágio 2, o pescoço, iniciado no Estágio 1, torna-se maior e a formação do grão e crescimento do mesmo, evidencia-se. O processo de retração, fica altamente visível no Estágio 2, pois observa-se uma decaída na linha de retração numa faixa de temperatura de 800°C até os 900°C e o crescimento do grão é proporcional a retração.

Com a aproximação do grão e seu adjacente, os contornos tendem a se unificar e a partir do estágio 3, o material já encontra-se com estabilidade no crescimento do grão, permanecendo assim até o final do ciclo térmico 1100°C.

Como forma de respaldo às transformações observadas acima, captou-se as imagens dessas transformações, durante o tratamento térmico sob vácuo, nas mesmas condições de temperatura do processo de análise dilatométrica.

A Figura 36, que está relacionada a faixa de temperatura inicial até aproximadamente 650°C, não identificou alteração em seu aspecto. Essa faixa de temperatura compreende a pré- transição, onde ocorre principalmente perda de oxigênio, umidade e dos componentes adicionados no processo de moagem e preparação da amostra.

Figura 36. Imagem do vitrocerâmico obtido por tratamento térmico sob vácuo. Temperatura 25 °C - 648 °C, aumento de 100x.

Quando a temperatura da câmara de alta temperatura atinge 830 °C, pode-se observar uma mudança do material Fig. 37 - a), seguindo até a temperatura de 1007°C (Figura 37 – b)), pois inicia-se a sinterização das

partículas de vidro acompanhada da nucleação do material, que seguem continuamente até o final do ciclo térmico.

Figura 37. Imagens do vitrocerâmico obtido por ataque térmico sob vácuo. a) 830°C e b) 1007 ° C, aumento de 100x.

A estrutura está em uma condição que permite um intenso rearranjo dos átomos, buscando uma forma de menor energia através do processo de cristalização e pode ser observada na Figura 38. a) e b).

Figura 38 . Imagens do vitrocerâmico obtido por ataque térmico sob vácuo. a) 1028 °C e b) 1053 ° C, aumento de 100x.

Quando o material atingiu a temperatura acima de 1053°C, detectou-se a última mudança mórfica (dentro do ciclo térmico estabelecido), registrada na Figura 39. Essa morfologia estrutural seguiu até atingir a temperatura de 1100°C, finalizando-se o ciclo térmico. O material permaneceu na temperatura de 1100°C, durante 10 minutos e nesse período de tempo não apresentou nenhuma alteração visível ou perceptível.

Figura 39. Imagem do vitrocerâmico obtido por tratamento térmico sob vácuo. 1100°C por 10 min., aumento de 100x.

4.2 TESTES *IN VITRO* – CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELLULAR

No método de citotoxicidade por difusão em ágar (Figura 40) , não foi encontrado halo indicativo de lise celular, para a amostra em teste. Segundo o método de observação do índice de halo da Tabela 4, produziu-se a Tabela 10 para as amostras.

Figura 40. Teste Citotoxicidade – difusão em ágar

O controle positivo forma um halo de 1,3 a 2,5 cm de diâmetro, caracterizando a lise celular devido à coloração mais clara e o vitrocerâmico anortita assim como o controle negativo, não apresentaram a formação deste halo de toxicidade.

Tabela 10. Resultados do Teste de Citotoxicidade em ágar.

Tabela 16: Resultados do teste de Oxiplacido em		
	Amostra	Índice do halo
McCoy	nº1	0
	nº2	0
	nº3	0
	nº4	0
	nº5	0
	nº6	0
Controle Positivo	Látex	4
Controle Negativo	Filtro	0

O ensaio de citotoxicidade por eluição em extrato obteve resultados semelhantes aos adquiridos no ensaio por difusão em ágar. O extrato do material em teste (anortita), quando em contato com a cultura celular, não causou lise considerável, independente da concentração que se encontrava, pois o índice médio de sobrevivência das células, observado através de absorbância das células vivas, foi superior a 90%. Como controle foi utilizado o valor do extrato com Bioglass e saliva artificial pura e podem ser observados nas tabelas (Tabela 11 a 13) abaixo.

Tabela 11. Teste de eluição e Índice de Sobrevivência Celular –Extrato A:
saliva artificial (controle total)

% extrato A	Células 10⁵/ml	Desvio padrão	(%) Índice Sobrevivência
0	1,512	0,059	100
10	1,496	0,083	99
30	1,488	0,037	98
50	1,473	0,066	98
65	1,452	0,104	97
80	1,442	0,102	96
100	1,414	0,090	94

Tabela 12. Teste de eluição e Índice de Sobrevivência Celular –Extrato B:
saliva artificial + Anortita (teste)

% extrato B	Células 10⁵/ml	Desvio padrão	(%) Índice Sobrevivência
0	1,345	0,018	100
10	1,335	0,002	100
30	1,287	0,058	98
50	1,214	0,013	93
65	1,195	0,041	91
80	1,189	0,047	90
100	1,183	0,025	90

Tabela 13. Teste de eluição e Índice de Sobrevivência Celular –Extrato A: saliva artificial + Bioglass 45S5 (controle)

% extrato C	Células 10⁵/ml	Desvio padrão	(%) Índice Sobrevivência
0	1,601	0,036	100
10	1,578	0,063	98
30	1,545	0,084	96
50	1,522	0,074	95
65	1,523	0,079	95
80	1,511	0,013	94
100	1,509	0,072	93

Quanto a proliferação das células depositadas diretamente na superfície do disco de anortita e discos controles, avaliados em 1, 5, 10 e 20 dias, os resultados são expressos como número de células x 10⁴/disco. Conforme Tabela 14, a proliferação celular (Figura 41), sob o material em teste, apresentou-se praticamente igual ao controle, demonstrando crescimento celular em ambas.

Tabela 14. Proliferação celular em contato com os discos anortita e discos controle - número de células x 10⁴/disco

Tempo em Dias	Disco Anortita	Disco Controle (Bioglass)
1	1,83	1,85
5	7,36	8,13
10	16,47	15,21
20	23,72	24,19

Figura 41. Presença celular sobre os discos de anortita nos dias: a) 20, b) 10, c) 5, e d) 1, por fluorescência indireta com coloração vermelha.

Não houve inibição ao crescimento celular, no decorrer do experimento, indicando que o ambiente de crescimento é propício. O resultado obtido nessa forma de avaliação foi muito próximo ao resultado do controle, evidenciando a resposta celular ao contato direto com a anortita, como viável, que pode ser claramente observado nas Figuras 41 e 42. As setas identificam os pontos de maior concentração celular

Figura 42. Presença celular sobre os discos de Bioglass 45S5/control nos dias: a) 1, b) 5, c) 10, e d) 20, por fluorescência indireta com coloração vermelha.

4.3 TESTES *IN VIVO* - TOXICIDADE SISTÊMICA

Após a inoculação dos extratos (via intraperitoneal), os animais foram pesados e iniciaram-se as observações das suas reações. A Tabela 15 demonstra os resultados de comparação entre os animais e os respectivos índices de observação após inoculação dos extratos (composição dos extratos, vide Tabela 6).

Tabela 15. Índices de toxicidade pós inoculação dos extratos.

Tempo e animais	Grupo A Extrato A	Grupo B Extrato B	Grupo C Extrato C
0h	Índice	Índice	Índice
1	0	0	0
2	0	1	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
24h			
1	0	0	0
2	0	0	1
3	0	1	0
4	0	0	0
5	0	1	0
48h			
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
72h			
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0

Observou-se, que para o grupo A (inoculados com Extrato A), não houve nenhum tipo de alteração, baseada nos quesitos de avaliação do teste e o grupo C (Controle - Bioglass), apresentou apenas uma alteração de índice = 1

Com esse índice, fica certificado o grupo A, como controle para alterações que possam estar ligadas a inoculação da saliva artificial e o grupo C, como controle ao extrato com biomaterial.

Os animais do grupo B, que apresentaram reação de nível sérico com índice igual a 1 – LEVE, tiveram seu restabelecimento a partir das 24 horas de experimentação, voltando a um nível sérico igual a 0. Para a avaliação geral dos grupos, o nível sérico é igual a 0 – NORMAL, com ganho de peso ou estabilidade do mesmo, para a maioria dos animais em experimento (Tabela 16).

Tabela 16. Peso inicial e final – período de experimentação 72 horas.

Animal	Grupo A Peso (g)		Grupo B Peso (g)		Grupo C Peso (g)	
	Início	Final	Início	Final	Início	Final
1	238	240	242	243	254	255
2	245	244	256	255	264	263
3	258	260	263	261	249	254
4	243	241	249	253	263	263
5	261	261	261	261	248	246
Média (total)	249	249,2	254,2	254,6	255,6	256,2
Desvio padrão	8,9	9,2	7,7	6,6	6,0	6,3

Os ratos mantiveram suas funções orgânicas normais, não apresentaram qualquer disfunção intestinal, não perderam motilidade ou reflexos, não apresentaram qualquer tipo de sinais na pele da região de inoculação, como cianose ou vermelhidão. Se o extrato B (material em teste), apresentasse quaisquer produtos extraíveis tóxicos,

certamente a perda progressiva de peso nos animais seria notada, além de outros processos como imobilização do animal e até mesmo morte.

4.4 TESTES *IN VIVO* - IMPLANTE

Na análise histológica, o comportamento de interação do vitrocerâmico anortita, no período de 30 dias, foi muito semelhante ao do controle total (defeito ósseo) e do controle com um material biocompatível (Bioglass 45S5).

A Figura 43, evidencia o defeito ósseo com a presença de osso neoformado, indicado na imagem pela seta 2. O crescimento ósseo deu-se da periferia para o centro do defeito, apresentando centralmente tecido cartilaginoso, demonstrando a evolução e crescimento da nova estrutura óssea no local (seta 1).

Figura 43 Imagem obtida através de microscopia óptica do defeito ósseo. Seta 1, indica região de tecido cartilaginoso e seta 2, observa-se tecido ósseo neoformado.

Figura 44. Imagem obtida através de microscopia óptica do implante vitrocerâmico anortita. Seta 1, indica região do implante seta 2, observa-se tecido ósseo neoformado.

A Figura 44, também apresentou formação óssea na periferia do implante, representado pela seta 1. Nas regiões indicadas pela seta 2, encontra-se o tecido ósseo neoformado e a presença de células gigantes multinucleadas (em pequena quantidade).

A observação histológica do implante com Bioglass 45S5 (Figura 45), confirma o resultado histológico do vitrocerâmico anortita, como um material que não causa processo necrótico ou de exacerbação inflamatório. Como já era esperado, pelo fato de ser um biomaterial, o corte histológico do implante Bioglass, apresentou no período de 30 dias, crescimento de tecido ósseo, sem anormalidades. De igual forma o vitrocerâmico anortita, ao redor do implante (seta 1), encontra-se tecido ósseo jovem

(seta 2), além da presença do tecido conjuntivo frouxo, que com o decorrer da maturação celular, será substituído por tecido ósseo.

Figura 45. Imagem obtida através de microscopia óptica do implante Bioglass. Seta 1, indica implante e seta 2, observa-se tecido ósseo neoformado.

Observa-se que na Figura 44, no local do implante (anortita), há uma diminuição do mesmo, quando comparado com o implante de Bioglass - controle (Figura 45). Essa diferença na quantidade do implante pode ser um indicativo, de que o material apresenta caráter de reabsorção. Para que haja uma afirmação fidedigna, necessita-se estender o tempo experimental. Com um período de 30 dias de implante, para esse material, é possível afirmar (baseado nos cortes histológicos), que o vitrocerâmico anortita tem especificamente, perfil biocompatível ao tecido ósseo, não apresentando deformidades celulares, nem presença de células em lise ou processo inflamatório exacerbado.

5. CONCLUSÕES

Todos os testes realizados no processo de caracterização da anortita, obtidos por dilatométrica e/ou durante o tratamento térmico sob vácuo (25°C-1100°C), demonstram as transformações estruturais que o material experimenta, com suas respectivas faixas de temperaturas estabelecidas. A partir dessas análises é possível direcionar um tratamento térmico para uma faixa de temperatura específica, conforme as necessidades do material, em relação às propriedades mecânicas, físicas, de biocompatibilidade entre outras. Esse controle é de extrema importância, pois esses parâmetros adicionam-se à outros, na busca de propriedades mecânicas e de biocompatibilidade ajustadas às condições anátomo-fisiológicas que um implante necessita.

O material em teste (vitrocerâmico anortita - $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$) demonstra um perfil de biocompatibilidade, direcionando-o para a classificação de um vitrocerâmico biocompatível. Nos testes *in vitro* e *in vivo*, manteve-se em igualdade ao material controle (biomaterial comercial), ou seja, não causa efeitos destrutivos quando em contato direto a culturas celulares, quando absorvidos sistemicamente ou implantado no tecido ósseo. Todos os resultados obtidos nesse trabalho confirmam a possibilidade de desenvolvimento do vitrocerâmico anortita - $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$, para uso na área biomédica.

PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação *in vivo* (implante), em período maior que 30 dias, para observar e quantificar a absorção do material;
- Simular ambiente com variações de pH e utilizar corpos de provas, sinterizados, com diferentes ciclos térmicos, para poder estipular durabilidade química x ideal temperatura de tratamento;
- Estudar possibilidade de adição de aceleradores do processo de osteointegração, à anortita;
- Estudar possibilidade do controle do tamanho de poro e retração do material, por tratamento térmico.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. NEVES, E. and SPILLER, A. Intelligent Glass Ceramic Materials. GLASS ODYSSEY: 6th European Congress on Glass. Montpellier – France. June 2002, 168p.
2. NEVES, E., SPILLER, A. L., TRIDAPALLI, D., RIELLA, H. G., “Desenvolvimento de Cristais de Anortita em Vidros”, Simpósio Brasileiro de Estruturologia, Tiradentes / MG, Setembro 2001.
3. SILVEIRA, J. C. C. da, “Proposta de Utilização do Vitrocerâmico anortita como um Sistema de Liberação Controlada de Fármacos”, Mestrado, PUCPR, 2006.
4. CAVALHEIRO, L. B. B. H., “Estudo da Biocompatibilidade e da Degradação do Vitrocerâmico de Anortita”, Mestrado, PUCPR, 2005.
5. CAVALHEIRO, L. B. B. H., FERNANDES, B. L., NEVES, E., “Anorthite Glass Ceramic To Biomaterial”, 3rd International Symposium on non-crystalline solids and the 7th Brazilian Symposium on glass and related materials - Maringá, PR - Brazil - November 2005.
6. FERNANDES, B. L., NEVES, E., “In Vitro Degradation Analysis of Intelligent Glass Ceramic”, CLAEB – III Congresso Latino - Americano de Engenharia Biomédica – João Pessoa – João Pessoa – PB, 2004.
7. TOROPOV, N. A., TIGONEN, G. V., “The Influence of Primary Heat Treatment on the Crystallization of Anorthite-Wollastonite Glasses Containing Chromic Oxide”, Neorganicheskie Materialy, v. 1, n. 11, p. 2014-2019, 1965.
8. TOROPOV, N. A., TIGONEN, G. V., “Investigation of the Linear Rate of Growth of Anorthite Crystals in Glass at 1000°C”, Neorganicheskie Materialy, v. 1, n. 5, p. 775-779, 1965.
9. HISAO S., et. All., In-situ measurement of dissolution of anorthite in Na-Cl-OH solutions at 22°C using phase-shift interferometry, American Mineralogist 2007;92:503-509.

10. LOOMIS, T. P. An Investigation of Disequilibrium Growth Processes of Plagioclase in the System Anorthite-Albite-Water by Methods of Numerical Simulation. *Contrib Mineral Petrol* 76:196-205.
11. AZA, P. N. , UKLINSKA, Z. B. L Efecto de la microestructura sobre la bioactividad de dos materiales vitrocerámicos del sistema $\text{CaSiO}_3 - \text{ZrO}_2$. *Bol. Soc. Esp. Cerám. Vidrio*, 42 [2] 101-106 (2003)
12. SIKAVITSAS, V.I.; TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G.; Biomaterials and bone mechanotransduction; *Biomaterials*; v.22 p. 2581-2593, 2001.
13. AMOROS, J. L.; BELTRAN, V. P.; BARBA, A. Estruturas Cristalina de los Silicatos y Oxidos de las Materias Primas Ceramicas, 1a ed., AICE - Instituto de tecnologia ceramica, Espanha, 1994.
14. AMOROS, J. L.; BELTRAN, V. P. Introduccion all estudio de los diagramas de equilibrio, Instituto de Tecnologia Ceramica, Espanha, 1990.
15. ATKINSON, D. I. H.; MCMILLAN, P. W. Glass-ceramics with random and oriented microstructures. *Journal of Materials Science*. 11, p. 989-993, 1976.
16. BEREZHNOI, A. J. Glass-ceramics and photosittals. New York: Plenum Press, 1970.
17. CALLISTER, W. D. Materials Science and Engineering an Introduction, John Wiley & Sons, Inc., Estados Unidos, 1994.
18. BOUVIER, M.; The biology and composition of bone; In: COWIN, S. C.; Bone Mechanics; ed. CRC Press Ins.; Boca Raton; c.1; p. 14; 2000
19. GIORDANO, V; GIORDANO, M; KNACKFUSS, I, G.; Fatores de crescimento e diferenciação ósseos. Efeitos sobre o processo de consolidação de fratura: presente e futuro. *Rev. Bras. Medicina* , v. 57, nº 9, set/2000.
20. LYGRE, H. Prosthodontic biomaterials and adverse reactions: a critical review of the clinical and research literature. *Acta Odontology Scandinavian*, v. 60, p. 1-9. 2002.
21. ENDERLE, J. D.; BLANCHARD, S. M.; BRONZINO, J. D. *Introduction to biomedical engineering*. San Diego: Academic Press, 2000.
22. BOSKEY, A.L.; PASCHALIS, E.; Matrix proteins and biomineralization; In: DAVIES, J. E.; Bone Engineering; ed. Rainbow Graphics and Printing Ltd; c.5; p.44-62;...Toronto, 2000.

23. YONEMORI, K.; MATSUNAGA, S.; ISHIDOU, Y.; MAEDA, S.; YOSHIDA, H.; Early effects of electrical stimulation on osteogenesis .
24. CHEN, N. X.; RIDER, K. D.; PAVALKO, F. M.; TURNER, C.H.; BURR, D. B.; QIU, J.; DUNCAN, R. L.; Ca^{2+} regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*; 278: C989-C997, 2000.
25. KNETS, I. V. Adaptation and remodeling of articulate cartilage and bone tissue. In: HELMINIEN, H. J.; et.al; Joint Loading. Bristol, Wright, 1987, Cap. 10, p.251-263.
26. WIESMANN, H. P.; HARTIG, M.; STRATMANN, U.; MEYER, U.; JOOS, U.; Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cell in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1538, p. 28-37, 2001.
27. AMARAL, M. et. al. Densification route and mechanical properties of Si_3N_4 -bioglass composites. *Biomaterials*, v. 23, p. 857-862, 2002.
28. LENZA, H. R.; El síndrome osteoporótico. Sandoz. p. 13-25. 1986.
29. FERNÁNDEZ NAVARRO, J. M^a. El vidrio. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 2º ed. Madrid, 1991.
30. JAMES, P. F. Glass Ceramics: New Compositions and Uses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 181, p. 1-15, 1995.
31. PEREIRA, K.R., NEVES, E., FORTULAN, A.C., ROLLO, J.M.D.A. Biocompatibility: in vitro Tests of The BR3G – Biovitroceramic. 10th International Conference on Frontiers of Polymers and Advanced Materials, September 28 – October 2, 2009, Santiago, Chile.
32. DELLA, J. P.; NEVES, E. Matéria-prima cerâmica a partir de finos de carvão. 38o Congresso Brasileiro de Cerâmica. Rio de Janeiro, 1994.
33. PEREIRA, K.R., NEVES, E., FORTULAN, A.C., ROLLO, J.M.D.A. Análise da Toxicidade Sistêmica: Vitrocerâmico com Cristais de Anortita ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$). The 6th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, August 17-20, 2010, Gramado – RS, Brazil.
34. DUAN, R. G. e LIANG, K. M. A study on the crystallization of $\text{CaO}-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ system glasses. *Journal of Materials Processing Technology*, p. 75, 235-239, 1998.

35. HSU, J. e SPEYER, R. F. Comparison of the effects of titania and tantalum oxide nucleating agents on the crystallization of $\text{Li}_2\text{O}.\text{Al}_2\text{O}_3.6\text{SiO}_2$ glasses. *Journal American Ceramic Society*, New York, 72, 12, p. 2334-41, 1989.
36. JAMES, P. F. Kinetics of crystal nucleations in lithium silicate glasses. *Physics and chemistry of glasses*, 15, p. 95-105, 1974.
37. NEVES, E. ; FORTULAN, C. A. ; PURQUERIO, B. M. . (PI 0202241-9) Produção e utilização da fase mineralógica anortita ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$), a partir da cristalização controlada de vidros para utilização como material inteligente. 2006
38. VICENTE-MINGARO, I.; CALLEJAS, P.; RINCON, J. Ma. Materiales vitrocerámicos: El proceso vitrocerámico. *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr.* 32, 3, p. 157-167, 1993.
39. NEVES, E. (Tese) Obtenção de material vitrocerâmico a partir de cinza pesada de carvão mineral. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Junho , 2002.
40. WOLFRANM, H. "Glass-Ceramic Technology", The American Ceramic Society, Westerville, Ohio-USA (2002).
41. FREIMAN, S. W. y HENCH, L. L. Kinetics of crystallization in $\text{Li}_2\text{O} - \text{SiO}_2$ glasses. *Journal American Ceramic Society*. 51, p. 383-386, 1968.
42. DONEDA, Cristina. Obtenção e Caracterização de Vitrocerâmicos de Nefelina: Medição de Tamanho de Cristalito e Quantificação de Fases por Difração de Raios-X. Doutorado em Engenharia e Ciências dos Materiais. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - Brasil, 2000.
43. FERRANDIS, Aleixandre V.; PENÃ, Julia Maria Gonzalez; LOPEZ, J. Maria Rincon. Cristalización en algunos vidrios del sistema $\text{Li}_2\text{O}.\text{MgO}.\text{Al}_2\text{O}_3.\text{SiO}_2$, observada fundamentalmente por microscopía electrónica. *Bol. Soc. Esp. Ceram.* 10, p. 341-365, 1971.
44. GUTIÉRREZ, L. G. y FOZ, O. R. Eliminación de hierro en arenas por flotación para fabricación de vidrio. *An. Real Soc. Esp. Fis. Quim.* 47 B, p. 687-698, 1951.
45. FARIA. JR, L. J.; Diferentes métodos para análise crítica da osteointegração de implantes de titânio em tíbias de coelho. São Paulo, 2001. 314p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
46. ALMEIDA, J. M.; SENA, L. A.; JR. G. M. V.; SOARES, G. A. Avaliação da adesão de hidroxiapatita sobre implantes metálicos utilizando jato com suspensão de bicarbonato de sódio *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v. 18, n. 3, p. 133-139, set/dez 2002.

47. CHYUNG, C. K. Secondary grain growth of Li₂O - Al₂O₃ - SiO₂. TiO₂ glass-ceramics. *Journal of the American Ceramic Society*, 5, 52, p. 242-245. 1968.
- DEGUIRE, Eileen J.; RISBUD, SUBHASH H. Crystallization and properties of glasses prepared from Illinois coal fly ash. *Journal of Materials Science*. 19, p. 1760-1766, 1984.
48. AZEVEDO, C. R. F.; HIPPERT, E. Análise de falhas de implantes cirúrgicos no Brasil: a necessidade de uma regulamentação adequada. *Caderno Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2000.
49. AZEVEDO, V. V. C.; Chaves, S. A.; Bezerra, D. C.; Costa, A. C. F. M. Materiais cerâmicos utilizados para implantes. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.2.3 (2007)35-42 ISSN 1809-8797, 2007.
50. <http://vibernhard.wordpress.com/page/10>, disponível em: 13/11/2009
51. <http://www.ceramed.pt/servicos?setLn=pt>, disponível em: 17/02/2010
52. <http://www.medel.com/br/show/index/id/83/?PHPSESSID>, disponível em: 13/08/2011
53. GOMES, C. M.; *Cristalização de Biomateriais Vitrocerâmicos e Mineralização em Meio Fisiológico Simulado* dissertação apresentada à Universidade de Aveiro, Portugal, 2005.
54. DUCHEYNE, P., Kohn, D.H. "Materials for Bone and Joint Replacement", *Materials Science and Technology-A Comprehensive Treatment*, v. 14, p. 29-109, 1992.
55. PARK, J. B.; BRONZINO, J. D. *Biomaterials: principles and applications*. New York: CRC Press, USA, 2000.
56. PEREIRA, K.R., NEVES, E., SORIANI, N.C., FORTULAN, A.C., ROLLO, J.M.D.A. Cytotoxicity tests of the candidate to the biomaterial BR3G – vitroceramic. 1º Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos. 25-27 agosto de 2009, Rosário – Sta. Fé, Argentina.
57. YONEMURI, K; MATSANAGA, S. ISHIDOU, Y; MAEDA; S; YOSHIDA, H; Early effects of electrical stimulation on osteogenesis; *Bone*; v. 19; n.2; p. 173-180; aug/1996.
58. PARK, J. B., *Polymeric implant materials. Biomaterials science and engineering*, Ed.Plenum, Iowa, 1984, p.265-303.

59. MORAIS, F.A.I.; MELLO, B.A.; SOUZA, I.A.; PONZI, E.A.C.; REVOREDO, G. A. Polímeros a base de emtil metacrilato. Importância em Odontologia. INTERNATIONAL JOURNAL OF DENTISTRY, RECIFE, 6(2): 63-66 ABR / JUN 2007.
60. PASCHOAL, A.L. (2003). Estudo da viabilidade de aplicação do polímero piezelétrico fluoreto de polivinilideno (PVDF) entre osso cortical e placa de osteossíntese para estimulação de crescimento ósseo. São Carlos, 2003. 112 p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
61. GIORDANO, V; GIORDANO, M; KNACKFUSS, I, G.; Fatores de crescimento e diferenciação ósseos. Efeitos sobre o processo de consolidação de fratura: presente e futuro. Rev. Bras. Medicina , v. 57, nº 9, set/2000.
62. PEREIRA, A. C., FERNANDES, R. G., CARVALHO, Y. R. LEITE, I. Reparação de Defeitos Ósseos em Fêmures de Ratos Machos e Fêmeas Espontaneamente Hipertensos. Estudo Histológico e Histométrico. Arq. Bras. Cardiol. 88(1) : 104-109, 2007.
63. GOMES, V. Obtenção de material vitro-cerâmico utilizando escória de aciaria, Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica), Curso de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - Brasil, 1999.
64. DUAN, R. G. et al. Effect of changing TiO₂ content on structure and crystallization of CaOAl₂O₃- SiO₂ system glasses. Journal of the European Ceramic Society, 18, p. 1729-1735, 1998.
65. MARQUES, V. M. Desenvolvimento de vitro-cerâmicos do sistema Anortite-Diopsite-Apatite co-sinterizáveis a baixa temperatura para aplicações à microelectrónica. Universidade de Aveiro Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro 2006.
66. JOHNSON, Ole. L'encyclopédie des Minéraux. Lonay (Switzerland) - Paris: .A., p. 371-373, 2002.
67. FERNANDES, F., MOTTA, G. G., NAGAMINE, R. S. O estudo dos Plagioclásios. Instituto de Geociências – IG. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Junho de 2010.
68. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-2. *Guidance on selection of tests: biological evaluation of medical devices*, Switzerland, ISO, 1992.

69. WILLIAMS, D. F. *Definitions in biomaterial: progress in biomedical engineering*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1987.
70. SOARES, G. A. Biomateriais: *Classificação, seleção e avaliação*. Rio de Janeiro: EE e COPPE/UFRJ, 2000.
71. ROGERO, S. O., et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, v.6, p. 317-320, 2003.
72. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-12. *Sample preparation and reference materials, biological evaluation of medical devices*, Switzerland, ISO, 1995.
73. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; Histologia Básica; 8.ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S.A. 1995; Cap 8, p.108-26: Tecido ósseo (2001), Fisiologia óssea – Matriz orgânica óssea.
74. ERIKSEN, E. F; AXELROD, D. W.; MELSEN, F. Bone Histomorphometry. New York, Raven Press, p. 3 - 50. 1994.
75. http://www.ama-cmeonline.com/health_it/ disponível em: 26/11/2011.
76. ERIKSEN, E. F; AXELROD, D. W.; MELSEN, F. Bone Histomorphometry. New York, Raven Press, p. 3 - 50. 1994.
77. <http://www.webbiblioteca.com/> disponível em: 15/12/2011.
78. VASCONCELOS, E. N. Efeitos da acidose metabólica sobre a consolidação de fratura óssea – um estudo experimental. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.
79. CHEN, N. X.; RIDER, K. D.; PAVALKO; F. M.; TURNER, C.H.; BURR, D. B.; QIU, J.; DUNCAN, R. L.; Ca^{2+} regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*; 278: C989-C997, 2000.
80. YONEMURI, K; MATSANAGA, S. ISHIDOU, Y; MAEDA; S; YOSHIDA, H; Early effects of electrical stimulation on osteogenesis; *Bone*; v. 19; n.2; p. 173-180; aug/1996.
81. DUTRA, R.P.S.; ARAUJO, P.A.S.; VARELA, M.L.; NASCIMENTO, R.M.; GOMES, U.U.; PASKOCIMAS, C.A. Propriedades Tecnológicas de Materiais Cerâmicos de base argilos conformados por extrusão e submetidos a diferentes ciclos de queima. 17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 15 a 19 de Novembro de 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

82. SALMAN, S., GUNDUZ, O., YILMAZ, S. Sintering effect on mechanical properties of composites of natural hydroxyapatites and titanium *Ceramics International* 35 (2009) 2965–2971.
83. RODRIGUES, César Augusto Duarte ; TREMILIOSI FILHO, Germano ; Rollo, João Manuel Domingos de Almeida ; Yavari, A. R. ; Kiminami, C. S. ; BOTTA FILHO, W. J. . Milling and consolidation by hot rolling of Al-Fe-Cr alloy. *Materials Science Forum*, v. 591-93, p. 258-263, 2008.
84. REIS, S. T. Durabilidade química de vidros sinterizados à base de fosfato de ferro e chumbo. (Tese) Ciências na Área de Tecnologia Nuclear Aplicações, São Paulo, 1999.
85. SANTOS, G.R., SALVETTI, A.R. S. Propriedades físicas de corpos de prova de misturas realizadas com argilas das formações ponta grossa e Aquidauana. 17^o CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 15 a 19 de Novembro de 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.
86. PEREIRA, K.R, NEVES, E., FORTULAN, C.A., ROLLO, J.M.D.A. Análise de Imagens do vitrocerâmico com Cristais de anortita ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$) obtidas durante tratamento térmico sob vácuo. In: 19 CBECiMat Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2010, Campos do Jordão-SP. Anais do 19 CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2010. p. 59-64.
87. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-6 *Tests for local effects after implantation*, ISO, 1995.
88. ASTM F981 – 04. Standard Practice for Assessment of Compatibility of Biomaterials for Surgical Implants with Respect to Effect of Materials on Muscle and Bone, 2010.

ANEXO

Aprovação Comitê de Ética em Experimentação Animal

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética no Uso de Animais
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679
Fax: (016) 3351.8025
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
ceua@ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais
nº 063/2011

Protocolo nº. 045/2011

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado "*Estudo da biocompatibilidade, caracterização e descrição da utilização de componente vitrocerâmico, com cristais de Anortita (CaAl₂SiO₈) como fase principal, para aplicações biomédicas*" submetido pela pesquisadora *Karla Regina Pereira*.

São Carlos, 15 de dezembro de 2011.

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais