

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Efeito da presença de SiO2, CaO e MgO em biocerâmicas de nitreto de silício, avaliando a microestrutura, comportamento biológico e propriedades mecânicas

CELSO RICARDO SONA FILHO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Chaves Guedes e Silva # #

São Paulo 2020

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Efeito da presença de SiO2, CaO e MgO em biocerâmicas de nitreto de silício, avaliando a microestrutura, comportamento biológico e propriedades mecânicas

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

CELSO RICARDO SONA FILHO

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Chaves Guedes e Silva

São Paulo 2020 Fonte de Financiamento: CAPES

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

SONA FILHO, C. R. *Efeito da presença de SiO2, CaO e MgO em biocerâmicas de nitreto de silício, avaliando a microestrutura, comportamento biológico e propriedades mecânicas*. 2020. 78 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sona Filho, Celso Ricardo
 Efeito da presença de SiO2, CaO e MgO em biocerâmicas de
nitreto de silício, avaliando a microestrutura, comportamento
biológico e propriedades mecânicas / Celso Ricardo Sona
Filho; orientadora Cecília Chaves Guedes e Silva. -- São
Paulo, 2020.
 78 p.
 Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2020.
 1. nitreto de silício. 2. biocerâmicas. 3. biomaterial. 4.
propriedades mecânicas. I. Chaves Guedes e Silva, Cecília,
orient. II. Título.

A Deus, por iluminar o caminho que percorro.

À minha família, principalmente tia Magna e Pedro, por todo o apoio, carinho e suporte que me deram nesta e em outras jornadas.

Aos meus amigos por tornarem tudo mais leve.

Ao meu amor, Débora, por me manter de cabeça erguida durante esta trajetória e pela compreensão.

Aos meus pais, Celso e Laurimar, e irmão Gustavo por sempre estarem dispostos à me ouvir, educar e motivar.

AGRADECIMENTOS

Este mestrado foi uma aventura. Saio desta jornada com mais conhecimento, amigos e experiência do que entrei. Agradeço imensamente todos os que me auxiliaram neste processo.

Inicio falando de minha orientadora, a Doutora Cecília Chaves Guedes e Silva, que me cedeu seu tempo e atenção, dando todo o apoio necessário, conselhos válidos, companheirismo e compreensão durante nosso projeto juntos.

✤ Ao professor Doutor Wilson Carlos da Silva Junior, que me indicou esta oportunidade e desencadeou todo o aprendizado que se fez então por parte deste ato, além da disponibilidade que me foi cedida para trocar informações.

Meus colegas do Laboratório de Materiais Multifuncionais, o Mestrando Sérgio Alessandro Tiguen Sinzato e o já Mestre Sérgio Ferreira do Nascimento que me deram suporte, ensinaram e divertiram muito em cada fração do tempo que dividimos, seja em conversas acadêmicas, em aulas e experimentos, ou em momentos de lazer.

Ao Dr. Flávio Machado de Souza Carvalho do Instituto de Geociências da Universidade de São Paulo (IGC/USP) que realizou minhas análises de Difração de Raios X e sanou todas as dúvidas que tive durante o processo, além de me dar todo o suporte necessário para entender o que os dados gerados significavam.

✤ Ao Centro de Processamento de Pós do CCTM, principalmente o Mestre Thiago Ferreira dos Santos, que sempre esteve disposto à me ajudar com informações, manuseio de equipamentos e dispositivos, bem como ao apoio imensurável nas sinterizações. Não esquecerei da ajuda fornecida.

✤ Aos Laboratórios do CCTM pela utilização dos equipamentos Microscópio Eletrônico de Varredura. Agradeço ao Doutor Luis Antônio Genova pela contribuição na disciplina de Tópicos Especiais em Tecnologia Nuclear – Materiais I. Aos funcionários do CCTM, Doutor Eguiberto Galego e Doutora Marilene Morelli Serna pela realização das análises de fluorescência de raios X e apoio no fornecimento de água deionizada, ao Mestre Mariano Castagnet pela utilização do microscópio óptico e apoio durante o ensaio de resistência à flexão, ao Laboratório de Ensaios Mecânicos pela realização dos ensaios de resistência à flexão, de dureza e tenacidade à fratura.

A Professora Doutora Emanuela Prado Ferraz, do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FO-USP) que realizou os testes celulares *in vitro*, além de me auxiliar no processo de interpretação dos dados.

Ao Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais (CCTM) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e à Universidade de São Paulo (USP), por possuir a infraestrutura utilizada para o desenvolvimento deste projeto e conhecimento adquirido.

À FAPESP pelo apoio financeiro (Processo 2015/02265-7) e à CAPES pelo apoio financeiro (Processo 88882.333441/2019-01).

Aos amigos acadêmicos, os Doutorandos Rodrigo Teixeira Bento, Talita Gishitomi Fujimoto e Margarida Szurkalo, e aos Mestrandos Leandro da Silva Oliveira, Eduardo Cesar, Daniel de Rezende Leme, André Almeida Silva, Vinicius Ribas, Tatyana Christina Faccion Borazanian e Thiago Fernando dos Santos pelos debates construtivos e produtivos.

Aos meus amigos Hernan Angulo, Marcos Vinicius Longato e Leonardo da Silva Costa Filho pelas conversas, suporte e palavras amigas.

Aos meus outrora chefes Paulo Castello, Cláudio Ferreira e Sarah Jane Akie Hirota pela compreensão, apoio, ensinamentos e oportunidade oferecida.

"Porque as pessoas que são loucas o suficiente para achar que podem mudar o mundo geralmente são as que acabam mesmo fazendo isso"

Steve Jobs

"O impossível existe até que alguém duvide dele e prove o contrário"

Albert Einstein

"O importante não é aquilo que fazem de nós, mas o que nós mesmos fazemos do que os outros fizeram de nós."

Jean-Paul Sartre

RESUMO

Sona Filho, Celso R. Efeito da presença de SiO₂, CaO e MgO em biocerâmicas de nitreto de silício, avaliando a microestrutura, comportamento biológico e propriedades mecânicas. 2020. 67 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Cerâmicas de nitreto de silício têm despertado o interesse para aplicações na área médica e odontológica devido à sua tenacidade à fratura relativamente alta, elevada resistência ao desgaste, e baixo coeficiente de atrito, bem como adequada osseointegração. Além disso, é de conhecimento que a presença de magnésio estimula o crescimento de osso novo, favorecendo a proliferação e diferenciação celular, bem como a formação de colágeno. A sílica auxilia na densificação do material durante a sinterização, devido sua baixa temperatura de fusão, e interfere positivamente no crescimento ósseo. A cálcia influencia positivamente nas atividades osteoblásticas, estimulando formação do tecido ósseo. Este trabalho tem como objetivo analisar o efeito da presença dos aditivos de sinterização SiO₂, CaO e MgO em cerâmicas de nitreto de silício, avaliando a microestrutura, comportamento biológico e propriedades mecânicas, a fim de melhorar a resposta biológica desses materiais in vivo. Para tanto, diferentes composições foram preparadas e conformadas por prensagem uniaxial, isostática à frio, e sinterização convencional (atingindo 1750°C). Os materiais sinterizados foram avaliados quanto à densidade, microestrutura, propriedades mecânicas e comportamento biológico in vitro. A avaliação microestrutural mostrou que as composições estudadas resultaram em uma microestrutura contendo grãos alongados de β -Si₃N₄ dispersos em fase secundária amorfa. No entanto, os valores de densidade variaram de cerca de 79 a 97% da densidade teórica, de acordo com a composição, sendo maiores para as composições com maiores teores de SiO₂. Após as imersões das amostras em SBF (Simulated Body Fluid), observou-se a presença de depósitos ricos em cálcio e fósforo, com morfologia típica da hidroxiapatita. Os valores de dureza Vickers das composições variaram de 9 a aproximadamente 12 GPa, sendo maiores para as composições com maiores teores de SiO₂. Os valores de tenacidade à fratura variaram entre 4 e aproximadamente 7 MPa.m^{1/2}, sendo que composições com altos teores de SiO₂ obtiveram os maiores valores desta propriedade, enquanto os valores de módulo de elasticidade variam de 132 a aproximadamente 269 GPa, sendo os menores valores

encontrados nas composições com maiores teores de MgO e menores teores de SiO₂, e os valores de resistência a flexão variaram entre 180 MPa e aproximadamente 620 MPa, sendo maiores para as composições com maiores teores de SiO₂. Todas as amostras apresentaram bioatividade nos testes de imersão em SBF, sendo os melhores resultados nas composições com maiores teores de CaO e MgO. Todas as composições também apresentaram não citotoxicidade nos testes de atividade de adesão celular, atividade de proteína durante o estágio de diferenciação no ensaio de ALP, e as células alcançaram diferenciação celular no ensaio de mineralização da matriz extracelular, sendo que os melhores resultados foram obtidos pelas composições com maiores teores de MgO e CaO. Dessa forma, os materiais estudados têm grande potencial para aplicações em implantes na área ortopédica. As composições que apresentaram os melhores resultados mecânicos foram SNM2 e SNM3, enquanto as que apresentaram melhores resultados biológicos foram SNM5 e SNM6.

Palavras-chave: nitreto de silício, biocerâmicas, biomaterial, propriedades mecânicas.

ABSTRACT

Sona Filho, Celso R. Effect of the presence of SiO₂, CaO and MgO on silion nitride bioceramics, evaluating the microstructure, biological behavior and mechanical properties. 2020. 67 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Silicon nitride ceramics have aroused interest for applications in the medical and dental field due to their relatively high fracture toughness, wear resistance, and low friction coefficient as well as adequate osseointegration. In addition, it is known that the presence of magnesium stimulates new bone growth, enhancing cell proliferation and differentiation, and the collagen formation. Silica assists in the densification of material during sintering, due to its low melting temperature, and positively interferes with bone growth. Calcium enhance osteoblastic activities, stimulating the formation of bone tissue. This Project aims to analyze or affect the presence of SiO¬2, CaO and MgO sintering additives in silicon nitride ceramics, to evaluate a microstructure, biological behavior and mechanical properties, in order to improve the response of these materials in vivo. Different compositions were prepared and formed by uniaxial, cold isostatic pressing, and conventional sintering (reaching 1750°C). The sintered materials were evaluated for density, microstructure and biological behavior in vitro. The microstructural evaluation showed that the studied compositions resulted in a microstructure containing elongated grains of β -Si3N4 dispersed in secondary amorphous phase. However, the density values varies from 79 to 97% of the theoritcal density, according to the composition, with the compositions with higher values of SiO₂ being the ones with higher values of density. After immersing the samples in SBF (Simulated Body Fluid), the presence of deposits rich in calcium and phosphorus was observed with a typical hydroxyapatite morphology, and the compositions with higher values of MgO and CaO showed better results. The Vickers hardness values of the

compositions ranged from 9 to approximately 12 GPa, with the compositions with higher values of SiO₂ showing higher values. The fracture toughness values ranged from 4 to approximately 7 MPa.m^{1/2}, with better results in compositions with higher values of SiO₂, while the values of Young's modulus ranged from 132 to approximately 269 GPa (the compositions with higher values of MgO and CaO showed higher values of this property), and the flexural strength values varied between 180 MPa and approximately 620 MPa, with the compositions with higher values of SiO₂ presenting higher values of flexural strength. All samples showed bioactivity and non-cytotoxicity in the ALP activity tests, and the cells achieved differentiation in the extracelular matrix mineralization test, with the best results being obtained by the compositions with higher levels of MgO and CaO. Thus, the materials studied seem to have great potential for applications in implants in both orthopedic and dental areas..

Key words: silicon nitride, bioceramics, biomaterial, mechanical properties.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composições estudadas (% em massa)29
Tabela 2 – Fluorescência de raios X dos pós de Si ₃ N ₄ , MgO, CaCO ₃ e SiO ₂
utilizados como material de partida37
Tabela 3 – Valores de densidade a verde (g.cm ⁻³) de cada composição40
Tabela 4 – Dados de porosidade, densidade, e perda de massa das composições
estudadas41
Tabela 5 – Dureza Vickers (Hv), tenacidade à fratura (K $_{IC}$), módulo de elasticidade
(E), e resistência à flexão (σ)45
Tabela 6 – Dados referentes à análise pelo método ANOVA da atividade de ALP
das células crescidas sobre a superfície de cada composição nos dois períodos do
tempo (7d. e 14d.) (p ≤ 0,05)56
Tabela 7 – Dados referentes à análise pelo método ANOVA da atividade de ALP
das células crescidas sobre a superfície de cada composição no dia 7 do
experimento (p ≤ 0,05)58

Tabela 8 – Dados referentes à análise pelo método ANOVA da atividade de ALP
das células crescidas sobre a superfície de cada composição no dia 14 do
experimento (p ≤ 0,05)59
Tabela 9 – Dados referentes à análise pelo método ANOVA da produção de matriz
extracelular mineralizada na superfície de cada composição nos dois períodos do
experimento (17d. e 21d.) (p ≤ 0,05)61
Tabela 10 - Dados referentes à análise pelo método ANOVA da produção de matriz
extracelular sobre a superfície de cada composição no dia 17 do experimento (p ≤
0,05)62
Tabela 11 - Dados referentes à análise pelo método ANOVA da produção de matriz
extracelular sobre a superfície de cada composição no dia 21 do experimento (p ≤
0,05)63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Unidade tetraédrica do nitreto de silício22
Figura 2 – Estrutura cristalina de Si $_3N_4$ α (a), β (b) e γ (c)23
Figura 3 – Difratograma de raios X do pó de Si $_3N_4$ (UBE) utilizado como material de
partida, e os picos característicos da fase α -Si ₃ N ₄ 38
Figura 4 – Difratograma de raios X do pó de MgO (Vetec) utilizado como material
de partida, e os picos característicos da periclase
Figura 5 – Difratograma de raios X do pó de CaCO3 (Merck) utilizado como material
de partida, e os picos característicos da calcita39
Figura 6 – Difratograma de raios X do pó de SiO2 (Sigma-Aldrich) utilizado como
material de partida, e os picos característicos do quartzo
Figura 7 – Diagrama de equilíbrio de fases para a mistura CaO-SiO2-MgO e as
composições estudadas neste trabalho42
Figura 8 – Difratogramas de raios X das composições estudadas43
Figura 9 – Micrografias eletrônicas de varredura das amostras de cada uma das

composições44
Figura 10 – Micrografias eletrônicas de varredura com ampliação de 600x das
amostras após 9 dias de imersão em SBF49
Figura 11 – Micrografias eletrônicas de varredura com ampliação de 600x das
amostras pós SBF – 24 dias50
Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura da amostra SNM4. Os pontos de
1 a 10 indicam os locais onde foram realizadas as análises de EDS51
Figura 13 – EDS realizado no ponto 1 da amostra SNM451
Figura 14 – EDS realizado no ponto 6 da amostra SNM452
Figura 15 – FEG da amostra SNM2 após imersão em SBF por 9 e 24 dias52
Figura 16 – Imagens obtidas por microscopia de epifluorescência das células-tronco
mesenquimais aderidas sobre a superfície das amostras após 24h de cultura
celular54
Figura 17 – Micrografia da amostra da composição SNM0 após 24 h de cultura

celular onde é possível visualizar as ranhuras na superfície da amostra, além de

células que aderiram à esta superfície55
Figura 18 – Gráfico representando a atividade de ALP das células crescidas sobre
a superfície de cada uma das composições nos dois períodos de tempo (7d. e 14d.)
(p ≤ 0,05)56
Figura 19 - Gráfico representando a atividade de ALP das células crescidas sobre
a superfície de cada composição e controle no dia 7 do experimento (p≤0,05)57
Figura 20 - Gráfico representando a atividade de ALP das células crescidas sobre
a superfície de cada composição e controle no dia 14 do experimento (p≤0,05)59
Figura 21: Gráfico representando a produção de matriz extracelular mineralizada
das composições e controle nos dois períodos do experimento (17d. e 21d.) (p ≤
0,05)60
Figura 22: Gráfico representando a produção de matriz extracelular mineralizada
das composições e controle no dia 17 do experimento (p ≤ 0,05)61
Figura 23: Gráfico representando a produção de matriz extracelular mineralizada
das composições e controle no dia 21 do experimento (p ≤ 0,05)63

LISTA DE SIGLAS

- ALP Fosfatase alcalina
- CTM Célula tronco mesenquimal
- EDS espectroscopia de energia dispersiva
- EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético
- FEG Field Emission Gun
- HCA Hidroxiapatita carbonatada
- ME Meio de expansão
- MEV Microscópio eletrônico de varredura
- mM miliMolar
- PB Tampão fosfato
- PBS Tampão fosfato salino
- PEEK Poliéter-éter-cetona
- PLA Ácido polilático
- PLGA Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
- PVC Policloreto de vinila
- SBF Simulated Body Fluid
- TCP Fosfato tricálcico
- TII Íons inorgânicos terapêuticos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	. 18
2 OBJETIVOS	. 19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	. 19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	. 28
4.1 Materiais	. 28
4.2 Caracterização dos materiais de partida	. 28
4.3 Métodos	. 29
4.3.1 Obtenção dos corpos de prova	. 29
4.3.2 Caracterização das amostras	. 30
4.3.2.1 Densidade a verde e perda de massa	. 30
4.3.2.3 Densidade e porosidade aparentes	. 30
4.3.2.4 Difratometria de raios X	. 30
4.3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	. 31
4.3.3 Propriedades mecânicas	. 31
4.3.3.1 Dureza e tenacidade à fratura	. 31
4.3.3.2 Módulo de elasticidade	. 32
4.3.3.3 Resistência à flexão	. 32
4.3.4 Propriedades biológicas	. 32
4.3.4.1 Reatividade <i>in vitro</i>	. 32
4.3.4.2 Testes celulares in vitro	. 33
4.3.4.2.1 Obtenção e cultura de células	. 33
4.3.4.2.2 Avaliação das respostas celulares	. 34
4.3.4.2.2.1 Adesão e morfologia celular	. 34
4.3.4.2.2.2 Medida da atividade de fosfatase alcalina (ALP)	. 35
4.3.4.2.2.3 Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada	. 35
4.3.4.2.2.4 Análise Estatística	. 36

5.6 Análise do ensaio de reatividade <i>in vitro</i>	47
5.7 Testes celulares in vitro	53
5.7.1 Adesão celular	53
5.7.2 Medida da atividade de fosfatase alcalina (ALP)	55
5.7.2 Medida da atividade de fosfatase alcalina (ALP)5.7.3 Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada	55 60
 5.7.2 Medida da atividade de fosfatase alcalina (ALP) 5.7.3 Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada 6 CONCLUSÕES 	55 60 65

1. INTRODUÇÃO

Existem diversas definições de biomateriais, e na Conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas, 1982, foi definido que biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, com exceção de fármacos, de origem natural ou sintética, podendo ser usadas durante qualquer período de tempo, como parte de um sistema ou como os sistemas que tratam, aumentando ou substituindo qualquer tipo de tecido, órgão, ou funções do corpo (1). Outra definição é que são materiais (naturais ou sintéticos) capazes de interagir sistematicamente com um biossistema de maneira benéfica (2). Chen et al. 2015 (3) define um biomaterial como sendo "uma substância que tenha sido manipulada para assumir uma forma que, por si só ou como parte de um sistema complexo, seja usada para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico".

Os biomateriais podem ser metálicos, cerâmicos, poliméricos ou compósitos (4). Devido às suas boas propriedades mecânicas e alta resistência química, as cerâmicas são aplicadas na área ortopédica e odontológica, como por exemplo a alumina (Al₂O₃) e a zircônia (ZrO₂) (5). Porém, a baixa tenacidade à fratura e alto módulo de Young da alumina (6), além das altas taxas de fratura de próteses fabricadas com a zircônia (7) gerou a necessidade de encontrar materiais alternativos para substituí-las como biomaterial.

O nitreto de silício (Si₃N₄) apresenta grande potencial para aplicação como implantes estruturais devido aos altos valores de resistência mecânica, relativamente alta tenacidade à fratura, alta resistência ao desgaste (8), biocompatibilidade e boas características de imagem (5).

Dessa forma, o presente trabalho visa avaliar o desempenho mecânico e biológico de cerâmicas de nitreto de silício para aplicações ortopédicas, principalmente como espaçadores intervertebrais. Para isso, são adicionados óxidos de silício (SiO₂), de cálcio (CaO) e de magnésio (MgO), para promover a sinterização via fase líquida e formar uma fase secundária que, após o resfriamento, favoreça o processo de remodelamento ósseo.

A seleção dos óxidos foi, então, baseada nas características terapêuticas de seus cátions. O silício deve auxiliar o crescimento ósseo, estimulando a mineralização e aumentando a quantidade de água e colágeno no osso (9). Por outro lado, o cálcio tende a regular a ativação de osteoblastos e osteoclastos, melhorando as propriedades de adesão e crescimento celular das células ósseas (10). E por fim, o magnésio possui efeito

positivo na regeneração óssea, como também favorece a adesão e proliferação celular de células osteoblásticas, sem afetar negativamente as propriedades mecânicas do principal material utilizado como implante (11).

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo analisar o efeito da presença dos aditivos de sinterização SiO₂, CaO e MgO em cerâmicas de nitreto de silício, avaliando a microestrutura, propriedades mecânicas, e comportamento biológico *in vitro*, considerando sua aplicação como espaçadores intervertebrais.

3. <u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>

3.1 Biomateriais

A etimologia da palavra biomaterial vem do fato que a primeira parte da palavra, "bio", não é uma referência à biologia, biológico ou biomedicina, mas à biocompatibilidade (3), pois é necessário que o material seja biocompatível para ser chamado de biomaterial (12). Biocompatibilidade pode ser definida de diversas maneiras, uma delas é a propriedade que determina a toxicidade potencial de uma interação entre um corpo vivo e um material (ou dispositivo médico) (13). Outra definição de biocompatibilidade é a habilidade/característica de um material de induzir uma resposta biológica apropriada em uma determinada aplicação dentro de um corpo vivo (14). Esta interação pode gerar reações em todo o sistema vivo, e não somente no local onde o contato aconteceu (15).

Deste modo, para a utilização de biomateriais é necessário que os materiais cumpram certos requisitos para que sejam aceitos pelo sistema biológico e possam dar assistência a este em suas propriedades físicas e mecânicas (16).

3.2 Classificação dos biomateriais

Biomateriais podem ser classificados em quatro grupos: biomateriais metálicos, biomateriais cerâmicos, biomateriais poliméricos e biomateriais compósitos (17).

3.2.1 Biomateriais metálicos

Uma grande variedade de materiais metálicos pode ser utilizada como implantes e dispositivos protéticos, sendo o aço inoxidável, as ligas de cobalto-cromo (Co-Cr) e ligas de titânio, os mais comuns. A biocompatibilidade de implantes metálicos gera certa preocupação, pois esses materiais tendem a sofrer corrosão dentro do corpo vivo, com consequente desintegração do implante, perda de funcionalidade e liberação de produtos corrosivos tóxicos (8). Essa corrosão é atribuída ao íon de cloreto, às macromoléculas biológicas, e especificamente às proteínas nos fluídos extracelulares (18). Metais mais nobres como o ouro e certos tipos de platina, ou mesmo aqueles com maior facilidade de se passivar, como o titânio ou o cromo, permitem manter as taxas de corrosão em níveis aceitáveis (18).

As vantagens de utilizar biomateriais metálicos são a alta resistência mecânica, elevada dureza, alta resistência à fadiga e ao impacto, além da fácil fabricação e facilidade na esterilização. As desvantagens são a alta corrosão que o material sofre em ambiente biológico, a alta taxa de desgaste, alto coeficiente de atrito, alta densidade (baixa relação resistência/peso), e a alta condutividade elétrica e térmica (17).

3.2.2 Biomateriais poliméricos

Os polímeros sintéticos têm sido utilizados de diversas maneiras na área médica. Uma das vantagens dos biopolímeros (se comparados com os biometais, ou biocerâmicas) são a facilidade de fabricação para produzir várias formas (látex, filme, folha, fibras, etc.), custo razoável e propriedades físicas e mecânicas adequadas (16).

As propriedades necessárias para os biomateriais poliméricos são parecidas com as exigidas para os outros biomateriais, como biocompatibilidade, capacidade de ser esterilizado, determinadas propriedades físicas e mecânicas, e fácil manufatura (19).

Alguns exemplos de polímeros são: PVC (policloreto de vinila) utilizado no formato de filmes e bolsas para armazenar sangue em alguns hospitais, PLA (ácido polilático) e PLGA (poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), ambos utilizados em aplicações médicas devido a sua boa biocompatibilidade e biodegradabilidade controlada (16).

Como principais vantagens, têm-se que os biopolímeros são normalmente biodegradáveis e fáceis de serem produzidos. Por outro lado, estes materiais adsorvem

água e proteínas, contaminam a superfície, desgastam facilmente e são difíceis de esterilizar (16, 18).

3.2.2.2 Biomateriais cerâmicos

Biocerâmicas são cerâmicas biocompatíveis, ou seja, que possibilitam sua utilização em corpos vivos como implantes, devido às suas boas propriedades mecânicas e alta resistência química (20). Algumas das vantagens das biocerâmicas são as altas resistências à compressão, à corrosão e ao desgaste, além de poderem ter composições similares àquelas dos tecidos duros. No entanto, esses materiais apresentam alto módulo de elasticidade, alta fragilidade e dificuldade na fabricação (16).

As biocerâmicas podem ser classificadas como:

- Bioativas: são biocerâmicas que induzem atividade biológica específica, como a hidroxiapatita [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂], e os biovidros (18);

 Bioinertes: apresentam uma resposta interfacial mínima que não resulta na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro, formando uma cápsula fibrosa ao redor do material.
 Como exemplo dessas biocerâmicas, citam-se a alumina (α-Al₂O₃), a zircônia (ZrO₂), e o nitreto de silício (Si₃N₄) (16);

- Reabsorvíveis: cerâmicas que são degradadas e substituídas lentamente pelo tecido vivo, como é o caso do fosfato tricálcico (18, 21).

No caso das cerâmicas bioinertes, o nitreto de silício (Si₃N₄) tem se destacado por possuir alta resistência ao desgaste em condições agressivas, alta resistência mecânica, biocompatibilidade comprovada, além de apresentar capacidade bactericida e boas características de imagem. (22-25). Tal cerâmica já é consagrada em aplicações estruturais, podendo substituir, inclusive, o aço rápido e o metal duro em componentes de máquinas (26), em altas temperaturas (27).

3.2.2.3 Biomateriais compósitos

O nome "compósito" vem do fato de que este tipo de material é composto por dois ou mais materiais ou fases distintas (28). Muitas de suas propriedades podem ser alteradas de maneira significante em comparação com os materiais homogêneos. Assim, os cientistas ou engenheiros podem controlar de maneira considerável certas propriedades, fazendo com que existam biomateriais compósitos rígidos, resistentes e leves, assim como materiais altamente resilientes (29, 30).

Algumas das aplicações de biocompósitos são: compósitos para enchimento dentário e implantes ortopédicos porosos. Exemplos típicos são o termoplástico PEEK com adição de fibra de carbono (31) e os compósitos formados com o fosfato tricálcico (TCP) para aprimorar a integridade mecânica do componente (32), como um composto associado à uma base de hidroxiapatita ou TCP (fosfato tricálcico) que permite seu uso no tecido ósseo quando maleável ou injetável (33).

3.3 Nitreto de silício

3.3.1 Estrutura cristalina do nitreto de silício

O nitreto de silício possui ligações químicas predominantemente covalentes (onde há compartilhamento de elétrons) e possui agrupamento atômico com a forma tetraédrica, onde um átomo de silício localizado onde seria o centro deste tetraedro é cercado por átomos de nitrogênio, que formam os vértices do tetraedro, conforme é apresentado na Figura 1. Estes tetraedros são conectados pelos vértices, de modo que cada átomo de N participa de três tetraedros, em uma rede tridimensional, e se liga a três átomos de Si, enquanto cada átomo de Si possui quatro átomos de nitrogênio como vizinhos mais próximos (34, 35).





Fonte: Adaptado de WANG, et al., 1996 (34)

As duas fases cristalinas do nitreto de silício mais conhecidas são alfa (α) e beta (β), e as duas possuem estrutura hexagonal, diferenciando-se apenas na simetria e empilhamento dos planos cristalinos. Enquanto a fase alfa apresenta simetria trigonal em uma sequência de planos cristalinos ABCD, a fase beta apresenta simetria hexagonal estruturada em sequência de planos ABAB, com o dobro da largura da célula unitária da fase alfa, o que possibilita difusão de átomos no interior da estrutura (36-38).

A morfologia dos grãos de nitreto de silício da fase alfa é diferente da beta, por conta das especificidades de cada estrutura cristalina. Enquanto na fase alfa a morfologia é equiaxial, em beta os grãos são alongados, motivo pelo qual o nitreto de silício possui elevados valores de tenacidade à fratura, pois seus grãos desempenham o papel de reforço na microestrutura do material, viabilizando a absorção de energia na deflexão das trincas (36, 35). A fase alfa é comumente encontrada em pós de Si₃N₄ (39).

Por meio de tratamento térmico em elevadas temperaturas e pressões (2000 K e acima de 15 GPa) é possível obter o nitreto de silício em uma terceira fase: a fase gama (γ), que possui estrutura do tipo espinélio, onde existe uma coordenação octaédrica formada por dois átomos de silício com seis átomos de nitrogênio, e uma coordenação tetraédrica formada por um átomo de silício e quatro de nitrogênio (39). Uma curiosidade sobre esta fase é que é considerado o terceiro material mais duro (35,31 GPa), sendo o primeiro o diamante e em segundo o nitreto de boro cúbico (40).



Figura 2: Estrutura cristalina de Si₃N₄ α (a), β (b) e γ (c)

Fonte: Adaptado de PETZOW, et al. 2002.

A história das aplicações de nitreto de silício têm início em 1955, na Inglaterra, onde foi primeiramente utilizado em revestimentos de termopares e cadinhos para fusão de

metais. O motivo desta aplicação aconteceu devido à algumas de suas propriedades (boa estabilidade térmica e química em banhos metálicos) (27).

Em comparação com os motores de ignição convencionais, quando o nitreto de silício é utilizado em determinados componentes de turbina a gás, possibilita uma maior eficiência na queima do combustível, além de menor emissão de gases e um nível relativamente baixo de particulados, e por isso esta aplicação se tornou comum entre 1960 e 1980 (26, 41).

Hoje em dia as propriedades deste material que mais chamam a atenção são sua resistência mecânica, alta resistência ao desgaste, baixo coeficiente de dilatação, condutividade térmica moderada, estabilidade química (42), alta resistência ao desgaste e baixa densidade (26). É aplicado em ferramentas de corte e meios de moagem (43), componentes de motores de combustão interna (válvulas de exaustão, sedes de válvulas e rolamentos) (26).

Devido às suas ótimas propriedades mecânicas, não citotoxicidade e capacidade de osteointegração, cerâmicas à base de nitreto de silício vêm sendo muito considerada para aplicações na área médica (componentes de próteses de quadril, espaçadores e discos intervertebrais), além de placas e pinos para fixação óssea. No entanto, suas características bioinertes dificultam sua fixação junto ao tecido vivo, além de conduzirem a maiores períodos de tempo de osteointegração. Uma forma de contornar tais limitações é promovendo a bioatividade da superfície dessas cerâmicas, seja pela utilização de recobrimentos bioativos, ou mesmo pela formação de biocompósitos (44, 45).

Biocompósitos porosos de nitreto de silício e biovidro foram estudados por Frajkorová et al. (46), avaliando suas propriedades mecânicas e biológicas, e resultando em uma confirmação de bioatividade do material, porém sem melhorias na densificação final (o máximo valor obtido foi 65,7%) e propriedades mecânicas (máximo valor de dureza Vickers foi de 1,19 GPa, enquanto a tenacidade à fratura atingiu um valor máximo de 1,28 MPa) (46).

Com o intuito de verificar o impacto que aditivos de sinterização diferentes dos normalmente utilizados (Al₂O₃ e Y₂O₃) teria nas propriedades biológicas e superficiais, Fu et al. (47) prepararam amostras de Si₃N₄ utilizando SrO, MgO e SiO₂ como aditivos de sinterização, em diferentes proporções. Como resultado, os autores notaram que as composições estudadas obtiveram baixa afinidade bacteriana nos testes *in vitro*, e que houve alta proliferação e diferenciação de células pré-osteoblásticas, devido à presença dos íons Sr²⁺, Mg²⁺ e Si⁴⁺. (47)

Em 2014, Wananunuruksawong et al. (48) realizaram experimentos de citotoxicidade e microdureza em amostras de nitreto de silício. Amostras de nitreto de silício revestidas com vidros de borosilicato, e amostras de nitreto de silício revestidas com vidros de borosilicato e com 5% em peso de ZrO_2 foram estudadas. Os materiais foram sinterizados sem aplicação de pressão, em atmosfera de nitrogênio, e em temperatura de sinterização relativamente baixa (1650°C). Como aditivos de sinterização, o autor do trabalho utilizou Y_2O_3 , SiO₂ e MgO. Esta pesquisa resultou em materiais não citotóxicos e com valores de microdureza próximos ao do dente humano (3 - 5 GPa). (48)

Buscando somar as propriedades bactericidas do nitreto de silício ao PEEK, que já é utilizado em aplicações médicas, Xu et al. (49) recobriram o Poli (éter-éter-cetona) com Si₃N₄. Os autores realizaram testes de imersão em SBF, analisaram a rugosidade, força de ligação do revestimento de nitreto de silício, cultura, morfologia, adesão e proliferação celular. Foi concluído que as amostras revestidas com Si₃N₄ tiveram suas propriedades melhoradas em comparação ao PEEK sem o recobrimento, aprimorando a adesão, proliferação e diferenciação celular, além de desenvolver atividade bactericida no material, bem como citocompatibilidade (49).

Guedes-Silva et al., 2018, (50) estudaram as propriedades microestruturais, mecânicas e *in vitro* de cerâmicas de nitreto de silício. Como aditivos eles utilizaram a sílica (SiO₂), a cálcia (CaO) e a alumina (Al₂O₃), atingindo um valor de cerca de 97% da densidade teórica após a sinterização, bem como transformação completa da fase $\alpha \rightarrow \beta$ -Si₃N₄. Após ensaio biológico de imersão em SBF, foi observada a deposição de apatita, enquanto os testes *in vitro* com células osteoblásticas resultaram em proliferação celular e até mineralização. Com boas propriedades mecânicas analisadas, como valores de dureza satisfatórios (até 12,40 GPa), valores relativamente altos de tenacidade à fratura (até 5,76 MPA.m^{1/2}) e valores relativamente baixos de módulo de elasticidade (de até 265,40 GPa), as composições estudadas por Guedes-Silva et al., demonstraram potencial para as aplicações em dispositivos de substituição óssea.

Dessa forma, as ótimas propriedades mecânicas combinadas com bioatividade superficial aumentam ainda mais o campo de aplicações de cerâmicas de nitreto de silício na área biomédica, trazendo diversos benefícios à população pela obtenção de próteses mais resistentes e que promovam interação química com o tecido hospedeiro, como é a intenção no caso de espaçadores intervertebrais (20).

3.3.1 Sinterização do nitreto de silício

Devido à natureza covalente de suas ligações químicas, materiais como o nitreto de silício possuem baixo coeficiente de difusão e são difíceis de serem densificados pelo processo de difusão no estado sólido. Deste modo, a densificação deve ocorrer por sinterização via fase líquida, o que torna a utilização de óxidos (óxido de terras raras ou de elementos de transição) como aditivos de sinterização uma necessidade. Estes aditivos de sinterização permanecem nos contornos de grãos e pontos triplos como uma fase secundária (amorfa ou cristalina) (43).

A reação dos aditivos de sinterização com a sílica da superfície do pó de Si₃N₄ forma uma fase líquida, gerando assim uma reação de dissolução da fase α - Si₃N₄ e reprecipitação na fase β - Si₃N₄. Compreender o papel dos aditivos de sinterização nas propriedades finais do material é fundamental, pois existem fases cristalinas secundárias ou amorfas nos contornos de grão que afetam as propriedades finais do material (26). Isso acontece de acordo com os aditivos selecionados e a quantidade utilizada de cada um destes (20).

Para um material ser utilizado como aditivo de sinterização existem algumas propriedades que este deve possuir: estabilidade a altas temperaturas, a existência de uma região que permita formação de fase líquida no sistema, e a fase líquida resultante deve ser capaz de promover a dissolução do material a ser sinterizado (que no caso é o nitreto de silício) (51).

Os óxidos de terras raras têm se destacado dos demais aditivos utilizados atualmente devido ao fato de elevarem a viscosidade da fase intergranular, e por poderem formar fases cristalinas durante o processo de resfriamento ou após tratamentos térmicos específicos, promovidos após a sinterização, o que gera materiais de elevada resistência mecânica mesmo a elevadas temperaturas. É possível aumentar a tenacidade à fratura do material, pois os óxidos de terras raras desenvolvem estruturas com grãos finos, com elevada razão de aspecto (26).

Nesse trabalho, os aditivos de sinterização utilizados deverão não só promover a sinterização via fase líquida do material, por meio da técnica de sinterização sem pressão, mas também deverão formar uma fase bioativa, amorfa ou parcialmente, cristalina nos contornos de grão do nitreto de silício para promover a bioatividade do material final. Tais aditivos são os óxidos de silício e de cálcio e de magnésio, sendo os primeiros que já demonstraram ser eficientes na densificação, propriedades mecânicas e bioatividade do

nitreto de silício (6). Como exemplo disso temos o estudo de Guedes-Silva, et al. 2018, já citado anteriormente (50), e de Fu, et al. 2018, (52) que utilizaram Sr, Mg e Si como aditivos de sinterização do Si₃N₄ e realizaram ensaios de caracterização superficial e biológicos para fusão espinhal. Óxido de magnésio também é introduzido às composições estudadas, considerando que magnésio é um dos substitutos do cálcio em apatitas biológicas, e é associado à mineralização de tecidos calcificados e estimular as atividades osteoblástica e osteoclástica (22).

Deste modo, este trabalho tem como foco estudar o efeito da presença de óxido de magnésio (MgO), em conjunto com a sílica e a cálcia, em biocompósitos de nitreto de silício, avaliando a microestrutura, bioatividade e propriedades mecânicas.

3.3.2. Íons terapêuticos

Existem íons metálicos capazes de aprimorar a formação óssea, estimulando a osteogênese e a angiogênese. Alguns exemplos destes íons são os de cobre, estrôncio, zinco, cobalto, boro e silício. Eles vêm sendo estudados nas últimas décadas, e receberam o nome de íons inorgânicos terapêuticos (TII). Comparando este tipo de íons com as biomoléculas orgânicas, os íons inorgânicos terapêuticos apresentam vantagens, como a habilidade de interagir com outros íons para alterar funções biológicas, e também permitir ser processado nas condições necessárias para a produção de *scaffolds* de biomateriais inorgânicos (53).

Uma estratégia utilizada na aplicação destes íons é vinculá-los com um substrato adequado, como a hidroxiapatita, vidros bioativos, sílica ou fibras de carbono, que permitem aumentar a duração que os íons são liberados (54).

Estudos sobre os efeitos dos TII em biovidros revelam que *scaffolds* contendo TII aumentam a bioatividade, promovem novas funcionalidades aos biovidros, como indução de formação óssea e angiogênese e podem aumentar sua taxa de degradação, o que é vantajoso dependendo da aplicação (53). No entanto, é importante que exista um controle na quantidade de íons liberados dentro do corpo vivo, pois existem efeitos adversos, como a corrosão em implantes metálicos, o que significa alta concentração de íons metálicos no tecido vivo, com consequente aumento na probabilidade de inflamações (55, 56).

Os trabalhos de Wu, et al. (57), 2011 indicaram que íons de boro incorporados em vidros à base de silicato influenciaram positivamente na proliferação celular e expressão gênica relacionados à osteogênese, enquanto Isaac et al., 2011 (58) apresentaram

resultados onde íons de estrôncio apresentaram melhorias na diferenciação de células osteoblásticas quando comparados aos vidros à base de silicato sem estes íons.

He, et al., 2016 demonstraram por meio de experimentos *in vitro* em que células humanas e os íons de magnésio interagiam, que estes TII auxiliavam na viabilidade, proliferação e diferenciação celular, o que explica o magnésio impactar no remodelamento ósseo e osteogênese (59).

Também realizando estudos *in vitro* Zhou, et al., 2010 (60) avaliaram algumas propriedades modificadas pelo cálcio. Seus resultados mostraram que íons de cálcio estimulam a proliferação de osteoblastos e expressão gênica, assim como a viabilidade celular, o que mostra o impacto positivo deste material em implantes ortopédicos.

Segundo Dashnyam, et al., 2017 (61) íons de silício impactam positivamente em aplicações biomédicas, estimulando a angiogênese, enquanto Götz, et al., 2019 (62) afirma que este tipo de íon também influencia positivamente na diferenciação de células osteoblásticas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os materiais utilizados neste trabalho foram o nitreto de silício (α -Si₃N₄, UBE, SN-E10, 99,89% de pureza), o óxido de magnésio (MgO, Vetec, 94,12% de pureza), sílica (SiO₂, Sigma-Aldrich, 96,58% de pureza) e carbonato de cálcio (CaCO₃, Merck, 99,98% de pureza).

4.2 Caracterização dos materiais de partida

A primeira etapa do trabalho consistiu em caracterizar química e fisicamente os materiais de partida. Dessa forma, os materiais foram caracterizados quanto ao teor de impurezas (fluorescência de raios X por dispersão de energia, Shimadzu EDX-720) e fases cristalinas (difração de raios X, difratômetro BRUKER: D-8, radiação CuK-α).

4.3 Métodos

4.3.1 Obtenção dos corpos de prova

As composições foram preparadas com base na Tabela 1. Com os materiais devidamente dosados, foi realizada a moagem de cada composição em moinho de bolas durante 24 horas, utilizando esferas de alumina e álcool isopropílico como meio líquido. Os pós secos em rotoevaporador a 90°C e em estufa a 100°C por 24 horas foram desaglomerados em almofariz. Pastilhas e barras foram compactadas por prensagem uniaxial (50 MPa para as pastilhas e 40MPa para as barras) e isostática a frio (200 MPa para ambas).

Composição	Si ₃ N ₄	SiO ₂	MgO	CaO
SNM0	80	12	0	8
SNM1	80	12	4	4
SNM2	80	12	6	2
SNM3	80	12	8	0
SNM4	80	8	4	8
SNM5	80	6	6	8
SNM6	80	4	8	8

Tabela 1: Composições estudadas (% em massa)

As amostras colocadas em um cadinho de grafite e imersas em uma cama de pó de nitreto de silício foram sinterizadas em forno de resistência de grafite (Thermal Technology), com taxa de aquecimento de 5°C/min até 400°C, sob vácuo. De 400°C até a temperatura de patamar (1750°C por uma hora) a taxa de aquecimento foi de 10°C/min.

4.3.2 Caracterização das amostras

4.3.2.1 Densidade a verde e perda de massa.

A massa e as dimensões geométricas das amostras (n=6) foram medidas antes da sinterização, permitindo calcular a densidade a verde das amostras. O percentual de perda de massa após a sinterização também foi determinado.

4.3.2.3 Densidade e porosidade aparentes

Após sinterização, a densidade e a porosidade aparentes das amostras (n=6) foram determinadas pelo método de Arquimedes (Equações 1 e 2), utilizando-se água destilada como líquido de imersão. Para o cálculo da densidade relativa, foi realizada uma estimativa da densidade teórica das amostras sinterizadas por meio da regra das misturas.

$$dc = \left(rac{m_{seca}}{m_{ ilde{u}mida} - m_{imersa}}
ight) . d_L$$
 (eq. 1)

Na Equação 1, d_c é a densidade aparente da composição, m_{seca} representa a massa seca, m_{iumida} é a massa saturada, m_{imersa} é a massa imersa, e d_L é a densidade do líquido. Estas mesmas variáveis são utilizadas na Equação 2, para determinar a porosidade aparente de cada composição.

$$Porosidade_{Aparente} = \left(\frac{m_{\acute{u}mida} - m_{seca}}{m_{\acute{u}mida} - m_{imersa}}\right) . 100 \text{ (eq. 2)}$$

4.3.2.4 Difratometria de raios X

A técnica de difratometria de raios X foi empregada para verificação da ocorrência de fases cristalinas nos contornos de grão e da transformação $\alpha \rightarrow \beta$ nas amostras sinterizadas. O equipamento utilizado foi um difratômetro de raios X Bruker D-8, com radiação CuK α .

4.3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A distribuição das fases e a forma e distribuição dos grãos foram observadas por meio de microscopia eletrônica de varredura. Para isso, as amostras foram lixadas na sequência das lixas com mesh #200, 400, 800, 1200 e 2400, respectivamente.

Após o lixamento, as amostras foram submetidas a ataque por plasma com mistura dos gases $SF_6 e O_2 e$ em seguida recobertas com ouro. As análises foram, então, realizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Phillips, XL-30).

4.3.3 Propriedades mecânicas

4.3.3.1 Dureza e tenacidade à fratura

A dureza e tenacidade das amostras (n=6) foram determinadas utilizando o método da impressão Vickers, com 100 N de carga no durômetro (BUEHLER VMT-7). Após o ensaio, as amostras (já contendo impressões Vickers) foram analisadas no microscópio óptico (Mitutoyo) acoplado ao durômetro e com base nas medidas das trincas e semi-diagonais das impressões (n=7) foram calculados os valores de dureza e de tenacidade à fratura de cada uma das composições, conforme pode ser visto, respectivamente, nas Equações 3 e 4 (56).

Na Equação 3, H_v representa a dureza Vickers, P representa a carga aplicada (Newton), e *a* representa o comprimento médio da diagonal impressa (metros).

$$Hv = \frac{1,8544 xP}{a^2}$$
 (eq. 3)

Na Equação 4, K_{IC} representa a tenacidade à fratura (MPa.m^{1/2}), E representa o módulo de elasticidade (GPa), c representa o tamanho da trinca em metros e P representa a carga aplicada ao corpo de prova (Newton). Para o cálculo de tenacidade à fratura foram utilizados os valores de módulo de elasticidade (E) específicos de cada composição, determinados de acordo com o item 4.3.3.2

$$K_{IC} = 0.016 \cdot \left(\left(\frac{E}{Hv} \right)^{1/2} \right) \cdot \frac{P}{c^{3/2}}$$
 (eq. 4)

4.3.3.2 Módulo de elasticidade

O módulo de elasticidade (E) dos corpos de prova (n=5) foi determinado por meio de um método dinâmico não destrutivo (ASTM E1876 – 15) (65), no qual o equipamento (Grindosonic) capta a frequência de ressonância emitida pelo material excitado em um determinado modo de vibração. As amostras utilizadas neste ensaio possuíam formato de barras com secção retangular, com suas superfícies retificadas. Com os dados das dimensões geométrica das amostras e da frequência de ressonância captada, foi possível determinar o módulo de elasticidade.

4.3.3.3 Resistência à flexão

Os valores de resistência à flexão (*S*) (MPa) dos corpos de prova (n = 4) foram determinados por meio de um ensaio destrutivo (ASTM C1161 – 13) (66) de três pontos, no qual a amostra (em formato de barra com secção retangular) é fixada em uma base no equipamento (Instron 4400R), e recebe uma carga aplicada, que aumenta gradativamente, no centro de sua face, até que ocorra a ruptura da amostra. A velocidade de avanço utilizada foi de 0,2 mm/min. Com os dados do ensaio, foi possível calcular o valor de resistência à flexão de cada amostra, conforme pode ser visto na Equação 5, onde *P* representa a carga máxima aplicada à amostra, *L* a distância entre os roletes inferiores onde a amostra foi posicionada (no caso foi 20 mm, pois as amostras tinham 40 mm de comprimento), *b* representa a largura da amostra, e *d* a espessura da amostra:

$$S = \frac{3 PL}{2bd^2} \qquad (eq. 5)$$

4.3.4 Propriedades biológicas

4.3.4.1 Reatividade in vitro

Para a realização dos testes de reatividade *in vitro*, corpos de prova em duplicata foram limpos com água em equipamento de ultrassom, e álcool isopropílico, e então imersos em SBF (Simulated Body Fluid) pelos períodos de 9 e 24 dias, tendo a solução renovada a

cada 60 horas. Os testes foram realizados considerando uma razão de área da amostra em função do volume da solução de 0,1cm^{-1.}

Após as imersões, as amostras tiveram suas superfícies caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (Hitachi, TM-3000 e FEG (Field EmissionGun) JEOL, JSM-6701F) e EDS (espectroscopia de raios X, Thermo, 6706C-3UUS-SN).

4.3.4.2 Testes celulares in vitro

Todos os procedimentos foram realizados em acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (protocolo 027/2019).

4.3.4.2.1 Obtenção e cultura de células:

Foram eutanaziados dois ratos machos, Wistar, com 4 semanas de vida e pesando aproximadamente 200 g. Para a eutanásia foi utilizada dose excessiva (1 mg/kg) de Tiopental Sódico 1% (Thiopentax, Cristália, Brasil), via intraperitoneal, e em seguida os ratos foram decapitados. Os fêmures dos ratos foram removidos e transportados para o fluxo laminar em meio de transporte, constituído por Meio Essencial Mínimo modificação alfa (α-MEM) (Gibco-Life Technologies, EUA) suplementado com 500 µg/ml de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 3 µg/ml de fungisona (Gibco-Life Technologies). As epífises passaram por antissepsia, e em seguida foram removidas, enquanto a medula óssea foi coletada por lavagem do canal medular com irrigação com 10 ml meio de expansão (ME) que possuía α-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 50 µg/ml de gentamicina (Gibco- Life Technologies) e 0,3 µg/ml de fungisona (Gibco-Life Technologies). Após coletada, a medula óssea foi mantida em frascos de poliestireno de 75 cm² (CorningIncorporated, NY, EUA) contendo 20 mL de ME. Após 72 h, os frascos foram limpos com PBS (Gibco-Life Technologies) com o objetivo de remover as células não aderidas e para seleção das CTMs (células tronco-mesenquimais) que permaneceram aderidas ao poliestireno. As células foram mantidas em atmosfera umidificada (5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico), a 37°C, e até que as células atingissem a subconfluência, o meio foi trocado a cada 48 h.

O meio de cultura das garrafas onde estavam as CTMs durante a subconfluência foi removido, e as garrafas lavadas com PBS aquecido. Foram adicionados às garrafas 9,5 ml de solução de tripsina a 0,25% (Gibco-Life Technologies) e 500 µl de EDTA a 1mM (Gibco-Life Technologies). Estas garrafas foram mantidas em incubadora a 37°C por 5 minutos, visando a suspensão de células. Após isso, a tripsina foi inativada com metade do volume de ME, e as células foram contadas no hemocitômetro (Fischer Scientific, PA, EUA) para determinar qual seria o volume necessário para o plaqueamento na densidade de 10^4 células/poço em placas com 48 poços (Corning, EUA) onde estavam os sete grupos experimentais (SNM0, SNM1, SNM2, SNM3, SNM4, SNM5 e SNM6). As células foram cultivadas em 1,8 ml de meio osteogênico (ME suplementado com 5 µg/ml de ácido ascórbico (Gibco-Life Technologies), beta-glicerofosfato 7 mM (Sigma-Aldrich) e dexametasona 10-7 M (Sigma-Aldrich)) para diferenciação em osteoblastos. Células crescidas sobre o poliestireno foram utilizadas como controle. As culturas foram mantidas em meio osteogênico por períodos de até 21 dias, em incubadora a 37°C, em atmosfera umidifacada (5% CO₂ e 95% ar atmosférico), e seu meio trocado a cada 48h.

- 4.3.4.2.2 Avaliação das respostas celulares:
- 4.3.4.2.2.1 Adesão e morfologia celular

Ao fim de 24 h de cultivo, os osteoblastos em fase inicial cultivados sobre discos de cada grupo experimental foram fixados em uma solução de paraformaldeído 4% (Labsynth, SP, Brasil) em tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,2, por 10 minutos à temperatura ambiente e colocados na geladeira por 48 h. Após isso, foi realizado a permeabilização com a solução de Triton X-100 (AcrosOrganics, NY, EUA) 0,5% em PB, durante 10 minutos. Foi utilizada faloidina conjugada com AlexanaFluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen, OR, EUA) 1:200 para visualização das membranas, enquanto para os núcleos celulares foi utilizado 4'6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Molecular Probes) 300 nM. Depois da montagem da lamínula de vidro (Fisherbrand, PA, EUA) sobre os discos com meio de montagem anti-fade Prolong (Molecular Probes), as marcações foram examinadas em um microscópio de epifluorescência Axio-Imager (Zeiss) nas objetivas de 10X, acoplado a uma câmera fotográfica digital AxionCamMRm (Zeiss).
4.3.6.1.2.2 Medida da atividade de fosfatase alcalina (ALP):

A atividade de ALP das amostras foi avaliada nos dias 10 e 14 do ensaio, através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, com o uso de um kit comercial (Labtest, Brasil). Foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e os testes. Foram adicionados 50 µl de substrato e 500 µl de tampão em todos os tubos. No tubo padrão foram acrescentados 50 µl da solução padrão. Os poços onde estavam as células foram incubados com 1ml de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma-Aldrich). Após 30 minutos, a solução em cada poço foi homogeneizada e 50 µl do lisadoforam colocados nos tubos de ensaio por 10 minutos. Estes tubos já estavam aquecidos a 37°C, por banho maria. Então, todos os tubos receberam 2 ml do reagente de cor, 150 µL da solução de cada tubo foram transferidas para placas de 96 poços (CorningIncorporated) e a densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 590 nm em espectrofotômetro µQuant (BioTek). Para calcular a atividade de ALP, a medida do tubo padrão foi normalizada pela quantidade de proteína total, que foi obtida de acordo com o que Lowry et al., 1951, descreveram (67). Assim, 1ml do mesmo lisado utilizado para quantificar a atividade de ALP e 1 mL da solução de Lowry (Sigma-Aldrich) foram colocados em tubos de ensaio, em repouso durante 20 minutos e em temperatura ambiente. Depois deste período, 0,5 ml da solução de reagente de fenol de Folin e Ciocalteau's (Sigma-Aldrich) foi adicionado em cada tubo, e mantido em temperatura ambiente por 30 minutos. Cada tubo teve absorbância lida no espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 680 nm, enquanto a concentração de proteína total em mg/ml foi calculada por meio de uma curva padrão feita com albumina bovina (BSA, Sigma-Aldrich). A partir de triplicatas (n=3), sem repetição, e com resultados de uma única cultura, os dados foram expressos por absorbância calculada, como descrito acima e expressa como µmol de timolftaleína/h/mg de proteína. O grupo Controle (células cultivadas na ausência do biomaterial) foi utilizado para avaliação das condições da cultura, e não foi utilizado para fins de comparação.

4.3.4.2.2.3 Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada

A formação de matriz extracelular mineralizada foi detectada nos dias 17 e 21 do experimento, por meio da coloração com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich), que cora áreas de mineralização ricas em cálcio. O meio foi removido, os poços foram lavados com

PBS aquecido (37°C) e as células fixadas em paraformaldeído 4% por 24 h. Após isso, as células foram submetidas a desidratação em séries crescentes de álcoois e secos em temperatura ambiente por 24h. Depois, elas foram coradas com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich) 2%, pH 4,2, em temperatura ambiente por 15 minutos, e lavadas com PBS (Gibco-Life Technologies). Para quantificar a matriz extracelular mineralizada foi utilizada a extração de cálcio, conforme Gregory et al., 2004, descreveu (68). 280 µl de ácido acético (Acros Organics) a 10% foi adicionado em cada poço, e mantido em temperatura ambiente por 30 minutos, sob agitação, e então as soluções foram homogeneizadas e transferidas para tubos de 1,5 ml. Os tubos foram incubados por 10 minutos, a 85ºC, e depois colocados em recipientes contendo gelo, onde foram mantidos por 5 minutos. Estes tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 20 minutos (Fischer Scientific) e 100 µl do sobrenadante foram transferidos para placa de 96 poços (Corning Incorporated). Após isso, cada poço recebeu 40 µl de hidróxido de amônia 10% (Reagen, Brasil) com o objetivo de neutralizar o ácido. Para a leitura, em espectrofotômetro µQuant (BioTek) em comprimento de onda de 405 nm, foi utilizado o volume final do sobrenadante. As amostras cultivadas sem células foram submetidas ao mesmo procedimento, e os valores de absorbância descontados. Os dados foram obtidos em triplicatas (n=3), sem repetição, em uma única cultura e expressos por absorbância. O grupo Controle foi utilizado apenas para avaliar as condições da cultura, não sendo utilizado com o propósito de comparação estatística.

4.3.4.2.2.4 Análise estatística

Atividade de ALP e a produção de matriz extracelular mineralizada foram avaliadas por análise de variância com dois fatores (*two-way* ANOVA), seguido pelo pós-teste de *Student-Newman-Keuls*, quando indicado. O índice de significância foi adotado de 5% (ou p<0,05).

5. <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>

5.1 Caracterização dos pós de partida

A caracterização dos pós de partida é importante para a interpretação dos resultados aqui obtidos. Observando a Tabela 2, é possível perceber que a pureza dos

materiais de partida é relativamente alta, com exceção do MgO que contém uma quantidade significativa de cálcio, e da sílica que possui 3% em massa de Al₂O₃ em sua composição.

Elemento	Si₃N₄	MgO	CaCO₃	SiO ₂
Si	99,897%	0,448%	-	-
Cr	0,047%	-	-	-
Mn	0,044%	-	-	-
Cu	0,012%	0,109%	-	-
Mg	-	94,119%	-	-
Ca	-	4,206%	99,979%	-
S	-	0,793%	-	-
Fe	-	0,325%	-	-
Sr	-	-	0,021%	-
SiO ₂	-	-	-	96,584%
Al ₂ O ₃	-	-	-	3,287%
Fe ₂ O ₃	-	-	-	0,054%
TiO ₂	-	-	-	0,04%
Sc ₂ O ₃	-	-	-	0,021%
CuO	-	-	-	0,015%

Tabela 2: Fluorescência de raios X dos pós de Si₃N₄, MgO, CaCO₃ e SiO₂ utilizados como material de partida.

As Figuras 3, 4, 5 e 6 apresentam os difratogramas de raios X dos materiais de partida. A partir delas é possível identificar os picos característicos do difratograma de cada material, como a fase α -Si₃N₄, a periclase, MgO, a calcita-CaCO₃, e o quartzo-SiO₂.



Figura 3: Difratograma de raios X do pó de Si₃N₄ (UBE) utilizado como material de partida, e os picos característicos da fase α -Si₃N₄.

Figura 4: Difratograma de raios X do pó de MgO (Vetec) utilizado como material de partida, e os picos característicos da periclase.





Figura 5: Difratograma de raios X do pó de CaCO₃ (Merck) utilizado como material de partida, e os picos característicos da calcita.

Figura 6: Difratograma de raios X do pó de SiO₂ (Sigma-Aldrich) utilizado como material de partida, e os picos característicos do quartzo.



5.2 Densidade a verde e perda de massa

A Tabela 3 apresenta os dados de densidade a verde das composições. Os valores de densidade a verde das composições variaram entre 51 e 53% da densidade teórica do material, o que representa eficiência e reprodutibilidade no processo de prensagem.

· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·									
Composição	Densidade a verde	Densidade relativa	Perda de massa						
	(g.cm ⁻³)	(%)	(%)						
SNM0	1,61±0,01	51,83±0,41	7,86±0,06						
SNM1	1,63±0,01	52,19±0,38	7,44±0,04						
SNM2	1,64±0,01	52,36±0,45	9,67±0,01						
SNM3	1,63±0,02	52,18±0,54	8,18±0,03						
SNM4	1,66±0,02	52,69±0,51	8,95±0,02						
SNM5	1,69±0,02	52,73±0,66	7,36±0,01						
SNM6	1,70±0,01	53,14±0,35	7,57±0,01						

Tabela 3: Valores de densidade a verde (g.cm-3) de cada composição

Com a Tabela 3 pode-se notar que altos teores de MgO somados aos altos teores de CaO das composições SNM5 e SNM6 resultaram em aumento nos valores de densidade a verde, quando comparado às demais composições.

Sobre os valores de perda de massa, é possível notar que todas as composições apresentaram valores próximos, que variam entre 7,5 e 9,5%, sendo a composição SNM5 a composição com menor valor de perda de massa, e a composição SNM2 com o maior valor de perda de massa.

5.3 Densificação e porosidade

A densidade e porosidade aparentes das amostras é uma característica importante para aplicações desses materiais como implantes estruturais, pois influenciam tanto o processo de remodelamento ósseo, como as propriedades mecânicas. A Tabela 4 apresenta os dados de porosidade aparente e densidade.

Composição	Porosidade (%)	Densidade aparente (g.cm ⁻³)	Densidade relativa (%)
SNM0	2,69±0,24	2,94±0,16	94,30±1,95
SNM1	2,38±0,35	2,97±0,06	94,88±0,59
SNM2	2,29±0,31	3,04±0,03	97,08±1,94
SNM3	2,45±0,88	3,05±0,02	97,14±2,19
SNM4	2,60±0,39	2,99±0,01	94,67±1,12
SNM5	8,52±1,03	2,64±0,19	82,44±2,33
SNM6	9,44±0,97	2,52±0,17	78,77±0,04

Tabela 4: Dados de porosidade, densidade, e perda de massa das composições estudadas

Analisando a porosidade das amostras, pode-se notar a influência da composição nesta característica. Os valores de porosidade variaram de cerca de 2,4% até aproximadamente 9,5%, e as amostras mais porosas foram SNM5 e SNM6, e isto provavelmente deve-se ao fato do baixo teor de SiO₂, já que as demais composições possuem valores relativamente baixos de porosidade e maiores teores de SiO₂.

Sobre densidade após a sinterização, altos teores de SiO₂ aparentam impactar positivamente na densidade relativa das composições, bem como altos teores de SiO₂ somados a altos teores de MgO, conforme pode ser visto pelos dados das amostras nas composições SNM0, SNM1, SNM2 e SNM3.

A variação nos dados de densidade e porosidade das amostras está relacionada com a temperatura de *liquidus* da composição, solubilidade do sólido no líquido, viscosidade da fase líquida, e molhabilidade das partículas na fase líquida formada.

A molhabilidade é importante neste processo de difusão das partículas dos materiais durante a sinterização via fase líquida, pois quanto maior a molhabilidade dos materiais na temperatura utilizada na sinterização, mais rápida e eficiente será a sinterização. Deste modo, o processo de densificação exige um baixo ângulo de contato para ser favorecida (69). Já a viscosidade da fase líquida impacta na sinterização das composições estudadas afetando a densidade e a porosidade, pois quanto maior a viscosidade na temperatura de sinterização, mais lenta será a difusão durante a sinterização.

No diagrama de fases SiO₂-MgO-CaO da Figura 7, estão indicadas as composições da Tabela 1, sendo possível notar a temperatura de formação de líquido para cada uma delas. Estes valores são importantes, pois como a temperatura de *liquidus* é um dos fatores que influenciam na densificação, nota-se que conforme a temperatura de *liquidus* das

composições aumenta, maiores valores de densificação são encontrados na Tabela 4. Analisando a Figura 7, verifica-se que as composições com maiores teores de SiO₂ possuem menores valores de temperatura de formação de líquido, ou seja, as composições com teor de sílica de 12 % em massa apresentam temperatura de *liquidus* entre 1500 e 1600°C, o que também justifica suas altas densidades e baixas porosidades.

A composição SNM5 apresenta valor de temperatura de *liquidus* superior à 1700°C, enquanto a composição SNM6 possui o maior valor de temperatura de *liquidus*: ~2200°C, que devem ter influenciado na baixa densificação dessas amostras.





Fonte: Adaptado de Park, 2013 (70)

5.4 Análise da microestrutura

Os difratogramas de raios X das amostras após sinterização podem ser vistos na Figura 8. Os difratogramas foram similares para as diferentes composições, contendo exclusivamente picos referentes à fase β -Si₃N₄.

A presença exclusiva da fase β -Si₃N₄ demonstra que tanto a temperatura como os aditivos de sinterização foram adequados para promover a dissolução da fase α -Si₃N₄ e reprecipitação na fase β -Si₃N₄. Caso contrário, seria possível visualizar os picos característicos da fase α -Si₃N₄.





Para analisar a morfologia dos grãos das amostras de cada uma das composições, observa-se as micrografias eletrônicas de varredura, onde foram obtidas as imagens da Figura 9. Esta análise mostra, para todas as composições, a presença dos grãos de Si₃N₄ (fase β -Si₃N₄) em diversas orientações e distribuídos homogeneamente em uma fase secundária. Tal microestrutura é desejável, pois a fase β -Si₃N₄ permite melhores propriedades que a fase α devido à forma alongada dos grãos.



Figura 9: Micrografias eletrônicas de varredura das amostras de cada uma das composições

5.5 Propriedades mecânicas

A Tabela 5 apresenta os valores de dureza Vickers, tenacidade à fratura, módulo de elasticidade, e resistência à flexão de cada composição.

Composição	Hv(GPa) K _{ic} (MPa.m ^{1/2})		E (GPa)	σ (MPa)	
SNM0	10,82±0,49	5,66±0,14	268,90±4,03	527,01±65,51	
SNM1	11,57±0,29	6,83±0,49	268,55±5,57	569,01±40,33	
SNM2	10,54±0,29	6,93±0,40	219,48±4,33	515,48±63,70	
SNM3	11,70±0,35	6,81±0,64	259,75±2,34	620,11±54,23	
SNM4	9,34±0,20	6,32±0,37	252,78±5,98	621,25±61,81	
SNM5	9,29±0,49	5,04±0,13	150,18±5,93	229,09±62,58	
SNM6	8,98±0,29	4,85±0,17	132,28±6,63	182,52±25,82	

Tabela 5: Dureza Vickers (Hv), tenacidade à fratura (K_{IC}), módulo de elasticidade (E), e resistência à flexão (σ).

Os valores de dureza variaram de aproximadamente 9 GPa até aproximadamente 12 GPa, e as composições que apresentaram os maiores valores de dureza foram SNM1, SNM2 e SNM3, enquanto SNM4, SNM5 e SNM6 apresentaram os menores valores de dureza. Altos teores de SiO₂ levaram ao aumento dos valores de dureza das amostras (SNM0, SNM1, SNM2 e SNM3). Além disso, na ausência de CaO, o alto teor de SiO₂ somado com alto teor de MgO influenciou positivamente para o aumento da dureza na composição (SNM3).

Neste trabalho não foi analisada a razão de aspecto dos grãos, nem a amplitude de deflexão da trinca, porém é importante ressaltar que a tenacidade à fratura em cerâmicas de nitreto de silício depende, dentre outros fatores, da forma alongada dos grãos de β -Si₃N₄, pois quanto maior for a razão de aspecto dos grãos, maior é a amplitude de deflexão da trinca (71).

Os valores de tenacidade à fratura variaram de aproximadamente 4 MPa.m^{1/2} até aproximadamente 7 MPa.m^{1/2}. As composições que apresentaram os maiores valores de tenacidade à fratura foram SNM1, SNM2, SNM3 e SNM4, enquanto as composições SNM0, SNM5 e SNM6 apresentaram valores relativamente baixos de tenacidade à fratura. Novamente é possível notar a relação entre a composição e a propriedade, onde alto teor de SiO₂ resultou em um aumento no valor de tenacidade à fratura nas amostras SNM1, SNM2, SNM2, SNM3 e SNM4. A exceção é a composição SNM0, que possui um menor valor de

tenacidade à fratura, demonstrando que o MgO impactou positivamente, junto a determinado teor de CaO e um alto teor de SiO₂.

É importante entender que baixos valores de tenacidade à fratura podem significar um risco de propagação de trincas nas próteses, podendo lesionar o local do implante (68, 72). O PEEK, material utilizado em próteses ósseas, como espaçadores intervertebrais, apresenta valores de tenacidade à fratura entre 2 e 8 MPa.m^{1/2}, o que significa que os valores de tenacidade à fratura aqui apresentados estão dentro da faixa aceitável para a aplicação do nitreto de silício neste tipo de próteses ósseas. (73, 74, 75, 76, 77, 78)

Os valores de módulo de elasticidade variaram entre aproximadamente 130 GPa até cerca de 270 GPa, sendo que os maiores valores de módulo de elasticidade foram das composições SNM0 e SNM1, e os menores valores foram das composições SNM5 e SNM6.

O módulo de elasticidade parece ser influenciado pelos teores de MgO e SiO₂, pois composições com maiores teores de MgO e menores teores de SiO₂ apresentam menores valores de módulo de elasticidade (SNM5 e SNM6, por exemplo), e o contrário também é visto: composições com menores teores de MgO e maiores teores de SiO₂ (SNM0 e SNM1) apresentaram maiores valores de módulo de elasticidade. A porosidade, impactada pela composição, também parece influenciar esta propriedade (módulo de Young).

Visto que as cerâmicas visam sua utilização como espaçadores intervertebrais, é interessante que o valor de seu módulo de elasticidade seja o mais próximo possível ao do osso humano (varia de 7 a 25 GPa), o que faz com que valores relativamente baixos de E sejam pontos positivos. Isto se deve ao fato de que quanto mais próximo o valor do módulo de elasticidade entre a prótese óssea e o osso, menor a probabilidade de falha devido ao fenômeno de *stress shielding* (79). Além disso, um alto valor de módulo de elasticidade pode resultar em lesões no local implantado devido ao desgaste por fadiga (80).

Os valores de resistência à flexão das composições estudadas variaram entre 182 MPa e 621 MPa, e parecem ser impactados pela composição, onde composições com altos teores de SiO₂ (SNM0, SNM1, SNM2, SNM3 e SNM4), apresentam valores de resistência à flexão superiores às composições com teores menores de SiO₂ (SNM5 e SNM6). Esta relação é visível até mesmo na diferença de valores de resistência à flexão entre SNM5 e SNM6, onde SNM5 possui um valor de resistência à flexão e de teor de SiO₂ maior do que SNM6. É válido notar também que um aumento nos teores de MgO em composições com relativos baixos valores de SiO₂ resultam em menores valores de resistência à flexão (SNM5 possui valor de resistência à SNM6). Assim, é possível assumir que as composições com maiores teores de SiO₂ e de MgO apresentaram melhor combinação de valores de dureza, tenacidade à fratura e resistência à flexão para a aplicação de Si₃N₄ para próteses ortopédicas. As composições com menores teores de SiO₂ apresentaram os melhores valores de módulo de elasticidade para o nitreto de silício ser utilizado nesta aplicação, porém devido aos baixos valores de resistência à flexão apresentadas por estas composições (SNM5 e SNM6) elas não devem ser consideradas para as aplicações em questão. Analisando todas as composições, as composições SNM2 e SNM3 destacam-se positivamente para suas aplicações em próteses ósseas, a primeira devido aos seus valores nestas propriedades mecânicas, com destaque para seu relativo baixo valor de módulo de elasticidade (aproximadamente 219 GPa), e a segunda devido ao alto valor de resistência à flexão apresentado (aproximadamente 620 MPa).

5.6 Análise do ensaio de reatividade in vitro

Para os ensaios de reatividade *in vitro*, as amostras foram divididas em dois grupos. O primeiro grupo foi utilizado em um ensaio com nove dias de imersão em SBF, enquanto para o segundo grupo um ensaio com 24 dias de imersão em SBF foi realizado. Ambos tiveram o pH inicial de suas soluções de SBF de 7,28.

A Figura 10 apresenta as micrografias eletrônicas de varredura das superfícies de cada composição. Nelas, é possível observar que após nove dias de imersão em SBF, já ocorreu a deposição de pequenas estruturas, que provavelmente são núcleos de apatita.

A amostra de composição SNM6 foi a que teve maior quantidade de cristais depositados, possivelmente devido à alta porosidade aparente combinada aos altos teores de MgO e CaO.

Após 24 dias de imersão em SBF o ensaio com o segundo grupo de amostras foi finalizado e as amostras foram analisadas via micrografias eletrônicas de varredura (MEV), conforme mostrado na Figura 11. A partir desta figura, é possível notar claramente a semelhança entre a morfologia dos cristais depositados nas superfícies das amostras e a dos cristais de hidroxiapatita formados nas amostras de nitreto de silício em trabalho anterior (45). Além disso, é possível notar que as composições contendo CaO + MgO e maior teor de sílica tiveram os melhores resultados de reatividade *in vitro*, já que as amostras SNM1, SNM2 e SNM4 resultaram na formação de uma grande quantidade de cristais superficiais, e as composições SNM0, SNM3 e SNM5 não contêm quaisquer depósitos superficiais.

Apenas não seguiu este comportamento a amostra SNM6, com o menor teor de sílica, mostrando que o efeito da porosidade ocultou o efeito da composição.



AL D5.1 x600 100 w

SNM60019

Figura 10: Micrografias eletrônicas de varredura com ampliação de 600x das amostras após 9 dias de imersão em SBF



Figura 11: Micrografias eletrônicas de varredura com ampliação de 600x das amostras pós SBF -

24 dias

Com o intuito de identificar o material depositado nas superfícies das amostras estudadas, análises de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foram realizadas (Figura 10). Os dados obtidos nas análises de EDS confirmam a presença de íons de cálcio (Ca), fósforo (P), silício (Si), oxigênio (O) e carbono (C), elementos estes que compõe a hidroxiapatita carbonatada (HCA) (45). As Figuras 13 e 14 apresentam os elementos identificados na composição SNM4, representando os elementos encontrados em todas as composições.

Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura da amostra SNM4. Os pontos de 1 a 10 indicam os locais onde foram realizadas as análises de EDS



Figura 13: EDS realizado no ponto 1 da amostra SNM4







As imagens das amostras após ensaio de imersão em SBF com duração de nove e 24 dias, obtidas por FEG, confirmaram a morfologia globular e porosa da hidroxiapatita. Para representar a morfologia da hidroxiapatita encontrada em todas as composições, a Figura 15 apresenta as imagens do FEG das estruturas observadas na superfície das amostras da composição SNM2 após imersão em SBF por nove e 24 dias (imagem na esquerda e imagem na direita, respectivamente).



Figura 15: FEG da amostra SNM2 após imersão em SBF por 9 e 24 dias

Sossa et al., 2018, (81) estudaram hidroxiapatita natural e sintética em ensaio de SBF durante 14 dias. Comparando as imagens dos cristais depositados na superfície dos materiais aqui estudados (Figura 15) com as imagens da hidroxiapatita estudada no trabalho de Sossa et al., é possível notar grande semelhança na morfologia. Esta semelhança também é notada ao comparar as imagens dos cristais deste trabalho com as encontradas em Kaygili et al., 2016, (82) que estudou o efeito do SBF em propriedades estruturais de hidroxiapatita sintetizada sob presença de ácido cítrico. Outro trabalho que

possui imagens de cristais de hidroxiapatita muito parecidos com as aqui estudadas é o de Sooksaen et al., 2015 (83), que pesquisou a formação de uma camada porosa de apatita durante um estudo *in vitro* (SBF por 28 dias) de compósitos de vidro à base de hidroxiapatita-AW (apatita wollastonita).

5.7 Testes celulares in vitro

5.7.1 Adesão celular

A Figura 16 apresenta fotomicrografias de células-tronco mesenquimais em estágio inicial de diferenciação, cultivadas sobre as diferentes superfícies por 24 horas. As imagens evidenciam o citoesqueleto (em verde) e o núcleo celular (em azul). Diferenças na morfologia celular identificadas por aparentes estágios de espraiamento, correspondem às ranhuras das superfícies das amostras, conforme mostra a Figura 17.. Estas ranhuras são causadas pela retificação após a sinterização. Pode-se notar que a morfologia destas células é semelhante às registradas no trabalho de Ferraz, 2016 (84), onde as células proliferaram na superfície do material estudado.



Figura 16: Imagens obtidas por microscopia de epifluorescência das células-tronco mesenquimais aderidas sobre a superfície das amostras após 24 h de cultura celular





Figura 17: Micrografia de epifluorescência da amostra da composição SNM0 após 24 h de cultura celular onde é possível visualizar as ranhuras na superfície da amostra, além das células que aderiram à esta superfície.

5.7.2 Medida da atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina (ALP) é um marcador durante o estágio de diferenciação que mede a atividade da proteína, mostrando que ela está ativa.

A atividade de ALP apresentou diferença estatisticamente significante na dependência do tempo (p = 0,002), do material/Grupo (p < 0,001), e na interação material x tempo (p < 0,001). Em relação aos tempos experimentais, nota-se aumento da atividade de ALP de 7 para 14 dias nas células crescidas sobre a superfície dos grupos SNM0 (p = 0,002) e SNM3 (p < 0,001), enquanto nos grupos SNM1, SNM2, SNM4, SNM5 e SNM6 não houve diferença (p=789, p=0,794, p=0,109, p=0,772 e p=0,089, respectivamente) (Figura 18 E Tabela 6).

Comparando a Figura 18 com os encontrados em Ferraz, 2016, (84) no Capítulo 3-Efeitos do BioS-2P nos OBs e UMRs (onde BioS-2P é um biosilicato com 2 fases cristalinas, OBs significa osteoblastos em estágio inicial de diferenciação, e UMRs significa osteoblastos derivados de ratos da linhagem UMR-106 (ATCC[®], VA, EUA)), nota-se que as amostras SNM0 e SNM3 refletiram um perfil semelhante ao observado nas células do trabalho de Ferraz, pois seu valor de ALP também aumentou com o tempo. Em Ferraz et al., 2012 (86), o objetivo foi avaliar em cultura de células osteoblásticas o efeito das modificações da superfície de Ti provocadas pelo tratamento por duas diferentes técnicas de nitretação (cátodo oco e planar), e uma das avaliações foi pela análise de dados de fosfatase alcalina (ALP), onde os valores também aumentaram com o avanço temporal.

Figura 18 – Gráfico representando a atividade de ALP das células crescidas sobre a superfície de cada uma das composições nos dois períodos de tempo (7d. e 14d.) ($p \le 0.05$).



Atividade de ALP

Tabela 6 – Dados referentes à análise pelo método ANOVA da atividade de ALP das células crescidas sobre a superfície de cada composição nos dois períodos do tempo (7d. e 14d.) ($p \le 0.05$)

0,00).					
Composições					
analisadas entre	р				
7d. e 14d.					
SNM0	0,002				
SNM1	0,789				
SNM2	0,794				
SNM3	<0,001				
SNM4	0,109				
SNM5	0,772				
SNM6	0,089				
SNM5 SNM6	0,772 0,089				

Aos 10 dias de cultivo, a atividade de ALP apresenta diferenças estatisticamente significantes em relação aos grupos experimentais. A Figura 19 apresenta os valores de atividade de ALP médio de cada composição, enquanto os valores de p estão representados na Tabela 7. É possível notar que SNM0 apresentou maior atividade de ALP se comparado à SNM2 (p=0,025) e SNM3 (p=0,048), enquanto não apresentou diferença quando comparado às células crescidas sobre SNM1, SNM4, SNM5 e SNM6. As células crescidas sobre SNM1 apresentaram menor atividade de ALP comparadas à SNM5 (p=0,04), porém, não há diferença quando comparadas às células crescidas sobre as outras superfícies SNM0, SNM2, SNM3, SNM4 e SNM6. Células crescidas sobre SNM2 apresentaram menor valor de atividade de ALP comparadas à SNM0 (p=0,025), SNM4 (p=0,011), SNM5 (p<0,001) e SNM6 (p=0,009), enquanto não apresentaram diferenças estatísticas significantes se comparadas às células crescidas sobre a superfície de SNM1 e SNM3. Células crescidas sobre a superfície de SNM3 apresentaram menores valores de atividade de ALP comparado à SNM0 (p=0,048), SNM4 (p=0,011), SNM5 (p<0,001) e SNM6 (p=0,009), enquanto não apresentaram diferenças estatísticas significantes se comparadas às células de SNM1 e SNM2.Em SNM4, as células crescidas sobre sua superfície apresentaram maiores valores de ALP que SNM3 (p=0,03), mas não apresentou diferença estatística significativa diante das demais composições. Células crescidas sobre a superfície de SNM5 apresentaram maiores valores de atividade de ALP que SNM1, SNM2 e SNM3 (p=0,04; p<0,001 e p=0,003, respectivamente), enquanto não apresentou diferenças estatísticas significativas quando comparadas às demais composições. Por último, células crescidas sobre a superfície de SNM6 apresentaram maiores valores de atividade de ALP quando comparadas às composições SNM2 (p=0,009) e SNM3 (p=0,023), enquanto nenhuma diferença estatística significativa foi apresentada nas demais comparações.



Figura 19 - Gráfico representando a atividade de ALP das células crescidas sobre a superfície de cada composição e controle no dia 7 do experimento (p≤0,05).

Grupos	Atividade de ALP (7 dias)							
experimentais	SNM0	SNM1	SNM2	SNM3	SNM4	SNM5	SNM6	
SNM0	-	0,204	0,025	0,048	0,813	0,364	0,59	
SNM1	0,204	-	0,228	0,255	0,242	0,04	0,171	
SNM2	0,025	0,228	-	0,609	0,011	<0,001	0,009	
SNM3	0,048	0,255	0,609	-	0,03	0,003	0,023	
SNM4	0,813	0,242	0,011	0,03	-	0,307	0,944	
SNM5	0,364	0,04	<0,001	0,003	0,307	-	0,517	
SNM6	0,59	0,171	0,009	0,023	0,944	0,517	-	

Tabela 7 – Dados referentes à análise pelo método ANOVA da atividade de ALP das células crescidas sobre a superfície de cada composição no dia 7 do experimento (p ≤ 0,05).

Após 14 dias de cultivo, a atividade de ALP também apresentou diferenças estatísticas significantes em relação aos grupos experimentais. Os valores de p estão representados na tabela abaixo. A Figura 20 apresenta os valores de atividade de ALP médio de cada composição, enquanto os valores de p estão representados na Tabela 8. As células crescidas sobre a superfície de SNM0 apresentam valores de atividade de ALP superiores à SNM1 (p=0,001), SNM2 (p<0,001) e SNM4 (p=0,002), enquanto não apresentou diferenças estatísticas significativas quando comparadas às células crescidas sobre a superfície de SNM3, SNM5 e SNM6. As células crescidas sobre a composição SNM1 apresentou valores de atividade de ALP inferiores à SNM0, SNM3, SNM5, porém não apresentou diferença estatística quando comparada às demais composição. Células crescidas sobre SNM2 apresentou valores de ALP inferiores quando comparados à SNM0 (p<0,001), SNM3 (p<0,001), SNM4 (p=0,033), SNM5 (p<0,001) e SNM6 (p<0,001), enquanto não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados à SNM1. As células crescidas sobre a superfície de SNM3 apresentaram valores de atividade de ALP superiores quando comparados às composições SNM1 (p<0,001), SNM2 (p<0,001) e SNM4 (p=0,001), enquanto não apresentaram diferença estatística significativa quando comparado às demais composições (SNM0, SNM5 e SNM6). Células crescidas sobre a superfície de SNM4 apresentaram valores de atividade de ALP inferiores guando comparados aos encontrados em SNM0 (p=0,002), SNM3 (p=0,001) e SNM6 (p=0,01), além de valores de ALP superiores à SNM2 (p=0,33), e não foram apresentadas diferenças estatísticas significativas quando comparados os valores de atividade de ALP de SNM4 com SNM1 e SNM5. Células crescidas sobre a superfície de SNM5 apresentaram valores de atividade de ALP superiores quando comparados à SNM1 (p=0,022), SNM2 (p<0,001) e SNM4 (p=0,056), enquanto não apresentou diferença estatística significativa quando

comparados às demais composições (SNM0, SNM3 e SNM6). Por último, células crescidas sobre a composição SNM6 apresentaram valores de atividade de ALP superiores quando comparadas às composições SNM1 (0,006), SNM2 (p<0,001) e SNM4 (p=0,01), enquanto não apresentou diferença estatística quando comparados às demais composições.

Dessa forma, as composições SNM0, SNM5 e SNM6 apresentaram melhores resultados de atividade ALP após 10 dias de cultivo e também após 14 dias. Nesse último período a amostras SNM3 também apresentou elevada atividade ALP.

Figura 20 - Gráfico representando a atividade de ALP das células crescidas sobre a superfície de cada composição e controle no dia 14 do experimento (p≤0,05).



Tabela 8 – Dados referentes à análise pelo método ANOVA da atividade de ALP das células crescidas sobre a superfície de cada composição no dia 14 do experimento (p ≤ 0,05).

Grupos	Atividade de ALP (14 dias)							
experimentais	SNM0	SNM1	SNM2	SNM3	SNM4	SNM5	SNM6	
SNM0	-	0,001	<0,001	1	0,002	0,243	0,599	
SNM1	0,001	-	0,082	<0,001	1	0,022	0,006	
SNM2	<0,001	0,082	-	<0,001	0,033	<0,001	<0,001	
SNM3	1	<0,001	<0,001	-	0,001	0,151	0,337	
SNM4	0,002	1	0,033	0,001	-	0,056	0,01	
SNM5	0,243	0,022	<0,001	0,151	0,056	-	0,358	
SNM6	0,599	0,006	<0,001	0,337	0,01	0,358	-	

5.7.3 Detecção e quantificação de matriz extracelular mineralizada

Quando a célula alcança o estágio de mineralização, ela se torna uma célula osteoblástica, formando uma matriz extracelular mineralizada, rica em cálcio. A mineralização é uma das variáveis mais importantes em termos de bioatividade, pois significa que as células alcançaram seu objetivo: tornarem-se células osteoblásticas (87). Como algumas composições estudadas possuem cálcio, os ensaios foram realizados primeiro nas amostras sem células e depois com as amostras com células, para que os valores fossem normalizados.

Os valores de matriz extracelular mineralizada de cada composição apresentaram diferença estatisticamente significante na dependência do tempo (p<0,001), do material/Grupo (p<0,001), e na interação material x tempo (p<0,001) (Figura 21 e Tabela 9). Em relação aos tempos experimentais, nota-se aumento de matriz extracelular mineralizada de 17 para 21 dias nas células crescidas sobre a superfície dos grupos SNM0 (p<0,001) e SNM6 (p<0,001), enquanto nos grupos SNM1, SNM2, SNM3, SNM4 e SNM5 não houve diferença (p=0,266 p=0,23, p=0,219, p=0,254 e p=0,114, respectivamente).





р
0,622
0,256
0,22
0,209
0,244
0,106
<0,001

Tabela 9 – Dados referentes à análise pelo método ANOVA da produção de matriz extracelular mineralizada na superfície de cada composição nos dois períodos do experimento (17d. e 21d.) (p ≤ 0.05).

Os valores de produção de matriz extracelular mineralizada apresentados pelas composições no 17 dia de experimento só tiveram diferenças significativas nas comparações relacionadas à composição SNM5, onde seus valores de produção de matriz extracelular mineralizada são superiores quando comparados com todas as composições, sendo p<0,001 para a comparação com SNM0, SNM1, SNM4 e SNM6, p=0,001 para a comparação SNM5 x SNM3, e p=0,002 para a comparação SNM5 x SNM2. Estas informações são apresentadas na Figura 22 e Tabela 10.

Figura 22: Gráfico representando a produção de matriz extracelular mineralizada das composições e controle no dia 17 do experimento (p ≤ 0,05).



Grupos	Produção de matriz extracelular mineralizada (17 dias)						
experimentais	SNM0	SNM1	SNM2	SNM3	SNM4	SNM5	SNM6
SNM0	-	0,976	0,741	0,884	0,998	<0,001	0,187
SNM1	0,976	-	0,637	0,764	0,976	<0,001	0,365
SNM2	0,741	0,637	-	0,629	0,485	0,002	0,13
SNM3	0,884	0,764	0,629	-	0,506	0,001	0,251
SNM4	0,998	0,976	0,485	0,506	-	<0,001	0,505
SNM5	<0,001	<0,001	0,002	0,001	<0,001	-	<0,001
SNM6	0,187	0,365	0,13	0,251	0,505	<0,001	-

Tabela 10 - Dados referentes à análise pelo método ANOVA da produção de matriz extracelular sobre a superfície de cada composição no dia 17 do experimento (p ≤ 0,05).

No 21º dia do experimento (Figura 23 e Tabela 11), os valores de matriz extracelular mineralizada apresentados pela composição SNM0 apresentaram-se inferiores à composição SNM6 (p<0,001), enquanto nenhuma diferença estatística significativa foi detectada quando comparada às demais composições. SNM1 também apresentou valores de matriz extracelular mineralizada inferiores à SNM6 (p<0,001), e nenhuma diferença estatística nas demais comparações. SNM2 apresentou valores de matriz extracelular mineralizada superiores à SNM4 (p=0,009) e inferiores quando comparados à SNM6 (p<0,001), e sem diferença estatística quando comparados às demais composições. Os valores de matriz extracelular mineralizada de SNM3 apresentam valores superiores aos encontrados em SNM4 (p=0,019) e inferiores quando comparados à SNM6 (p<0,001), porém seus valores não apresentaram diferença estatística significativa nas demais comparações. SNM4 teve valores de matriz extracelular mineralizada inferior à SNM1 (p=0,074), SNM2 (p=0,009), SNM3 (p=0,019), SNM5 (p=0,003) e SNM6 (p<0,001), enquanto não apresentou diferença estatística significativa na comparação com SNM0. SNM5 apresentou valores de matriz extracelular mineralizada superiores à SNM4 (p=0,003) e inferiores à SNM6 (p<0,001), enquanto nenhuma diferença estatística significantes foi apresentada nas demais comparações. SNM6 apresentou valores de matriz extracelular mineralizada superiores à todas as composições (p<0,001).



Figura 23: Gráfico representando a produção de matriz extracelular mineralizada das composições e controle no dia 21 do experimento (p ≤ 0,05).

Tabela 11 - Dados referentes à análise pelo método ANOVA da produção de matriz extracelular sobre a superfície de cada composição no dia 21 do experimento (p ≤ 0,05).

Grupos	Produção de matriz extracelular mineralizada (21 dias)						
		110000ç0					
experimentais	SNMO	SNM1	SNM2	SNM3	SNM4	SNM5	SNM6
SNM0	-	0,506	0,223	0,305	0,121	0,133	<0,001
SNM1	0,506	-	0,414	0,415	0,074	0,318	<0,001
SNM2	0,223	0,414	-	0,65	0,009	0,65	<0,001
SNM3	0,305	0,415	0,65	-	0,019	0,635	<0,001
SNM4	0,121	0,074	0,009	0,019	-	0,003	<0,001
SNM5	0,133	0,318	0,65	0,635	0,003	-	<0,001
SNM6	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	-

Analisando os dados de produção de matriz extracelular mineralizada das composições nos 2 períodos de tempo, percebe-se que no 17º dia do experimento a composição que se destaca positivamente é SNM5, com um valor relativamente alto de matriz extracelular mineralizada produzida, enquanto no 21º dia do experimento a composição SNM6 é a que mais se destaca positivamente. Isso pode significar que um aumento nos teores de CaO e MgO influenciam positivamente para a produção de matriz extracelular mineralizada.

Os resultados de produção de matriz extracelular mineralizada deste trabalho apresentaram valores que permite ser constatado que todas as composições atingiram o objetivo: a diferenciação celular aconteceu.

6 <u>CONCLUSÕES</u>

O presente trabalho mostrou que as cerâmicas de nitreto de silício utilizando os aditivos SiO₂, CaO e MgO, possibilitaram transformação da fase $\alpha \rightarrow \beta$ -Si₃N₄, com formação de grãos alongados, com variação de densidade entre 82 e 97% da densidade teórica. As composições com maiores valores de densidade foram aquelas com maiores teores de SiO₂.

Os ensaios mecânicos apresentaram resultados animadores para a utilização do nitreto de silício em aplicações de substituição óssea. Os valores de dureza (de até aproximadamente 12 GPa), de tenacidade à fratura (de até aproximadamente 7 MPa.m^{1/2}) e de resistência a flexão (próximo à 621 MPa), somados aos satisfatórios valores de módulo de elasticidade (tão baixos quanto 132 GPa), demonstram que esta cerâmica é promissora para certas aplicações ortopédicas, que necessitam de materiais bioativos, como espaçadores intervertebrais.

De um modo geral, altos teores de SiO₂, resultaram em maiores valores de dureza, tenacidade à fratura, módulo de elasticidade, e resistência à flexão, embora a porosidade também tenha refletido nisso, se mostrando inversamente proporcional (quanto menor a porosidade da composição, maior os valores destas propriedades). Para o módulo de elasticidade é importante notar que o alto teor de MgO somado com uma redução no teor de SiO₂ resultou em baixos valores, o que é positivo ao cogitar utilizar estas composições em materiais utilizados para próteses ortopédicas. Já para a tenacidade à fratura, composições com maiores teores de MgO apresentaram uma tendência a atingirem maiores valores dessa propriedade.

Os resultados do ensaio de reatividade *in vitro* sugeriram que a bioatividade das amostras foi influenciada por sua composição e porosidade. Os melhores resultados foram obtidos pelas amostras contendo os três aditivos (SNM1, SNM2 e SNM4) e para aquelas com alta porosidade aparente (SNM5 e SNM6)

Avaliando as respostas celulares às composições, percebe-se que todas as composições aqui estudadas são bioativas e não citotóxicas. As composições influenciaram na atividade de ALP e matriz extracelular mineralizada. Todas as composições alcançaram o estágio de diferenciação celular em células osteoblásticas e relativamente boa atividade de ALP, destacando-se positivamente as composições SNM5 e SNM6 que apresentaram os melhores resultados. Estes experimentos demonstram ainda

mais o potencial das cerâmicas estudadas em determinadas aplicações como espaçadores intervertebrais, por exemplo.

As composições contendo MgO estudadas neste trabalho são inéditas, e apresentaram resultados satisfatórios e promissores para a aplicação de cerâmicas de nitreto de silício como biomateriais em casos onde é necessário um material bioativo, que permita a osteointegração.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials, Progress in Biomedical Engineering, v.
 4, p. 1-72, mar. 1987.
- SHARMA, C. P. Biomaterials and Artificial Organs: Few Challenging Areas. *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, v. 18, n. 2, p. 148-157, jan. 2005.
- 3 CHEN, Q.; THOUAS, G. A. Metallic implant biomaterials. *Materials Science and Engineering R*, v. 87, p. 1-57, nov. 2014.
- 4 OLIVEIRA, S. M.; MIJARES, D. Q.; TURNER, G.; AMARAL, I. F.; BARBOSA, M. A.; TEIXEIRA, C. C. Engineering endochondral bone: in vivo studies. *Tissue Engineering Part A*, v. 15, n. 3, p. 635- 643, mar. 2009.
- 5 GUEDES E SILVA, C. C. *Estudo da biocompatibilidade de nitreto de silício*. 2005.
 143 f. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear Materiais) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- 6 HENCH, L.L. Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 74, n. 7, p. 1487-1451, 1991.
- 7 HUMMER, CD.; ROTHMAN, R.H.; HOZACK, W.J. Catastrophic failure of modular zirconia ceramic femoral head components after total hip arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty*,v.10, p. 848-850, 1995.
- 8 KUE, R.; SOHRABI, A.; NAGLE, D.; FRONDOZA, C; HUNGERFORD, D. Enhanced proliferation and osteocalcin production by human osteoblast-Like MG63 cells on silicon nitride ceramic discs. **Biomateriais**, v. 20, p. 1195-1201, 1999.
- 9 HENSTOCK, J. R.; CANHAM, L. T.; ANDERSON, S. I. Silicon: the evolution of its use in biomaterials. *Acta Biomaterialia*, v.11, n.1, p. 17-26, 2015.

- **10** JEONG, J.; KIM, J. H.; HWANG, N. S.; HEO, C. Y. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomaterials Research*, v. 23, n. 4, p. 1-11, 2019.
- 11 LIU, C.; REN, Z.; XU, Y.; PANG, S.; ZHAO, X.; ZHAO, Y. Biodegradable Magnesium Alloys Developed as Bone Repair Materials: A Review, *Scanning*, v. 2018, n. 1, p. 1-15, 2018.
- 12 BAUER, S.; SCHMUKI, P.; VON DER MARK, K.; PARK, J. Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces. *Progress in Materials Science*, v. 58, n. 3, p. 261–326, 2013
- 13 DETSCH, R.; WILL, J.; HUM, J.; ROETHER, J.A.; BOCCACCINI, A.R. Biomaterials. Cell Culture Technology, p. 91-105, 2018.
- 14 SAKAGUCHI, R.; FERRACANE, J.; POWERS, J. Biocompatibility and Tissue Reaction to Biomaterials. *Craig's Restorative Dental Materials*, Amsterdã, v. 1, n. 14, p. 109– 133, 2011.
- **15** WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, v. 29, n.1, p. 2941-2953, 2008.
- 16 ALI, S. H. R.; AL-MAATOQ, M.; MOHAMED, A. S. A. Classifications, Surface Characterization and Standardization of Nanobiomaterials. *International Journal of Engineering and Technology*, v. 2, n. 3, p. 187-199, jun. 2013.
- PATEL, N. R.; GOHIL, P. P. A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. *International Journal of Emerging Technology and Advancaed Engineering*, v. 2, n. 5, p. 91-101, abr. 2012.
- WILLIAMS, D. F. Tissue-biomaterial interactions Review. Journal of Materials Science, v. 22, p. 3421-3445, out. 1987.

- **19** RAMOS, J. J. M. *Boletim sociedade português de química*. 24. Ed. Lisboa: Sociedade Português de Química, 1986.
- 20 GUEDES E SILVA, C. C.; *Estudo da biocompatibilidade de nitreto de silício*. 2005.
 143 f. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear Materiais) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 2005.
- 21 KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 518-522, jul. 2000.
- 22 SOUZA, P. A. H.; CARVALHO, F. M. S.; GENOVA, L. A.; GUEDES-SILVA, C. C. Microestrutura e Propriedades Mecânicas de Compósitos Bioativos de Nitreto de Silício. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CERÂMICA, 60, 2016, Águas de Lindóia, *Anais*, São Paulo: ABCERAM, 2016, p. 1806-1813.
- **23** WEBSTER, T. J.; PATEL, A. A.; RAHAMAN, M. N.; SONNY BAL, B. Anti-infective and osteointegration properties of silicon Nitride, poly(ether ether ketone), and titanium implants. *Acta Biomaterialia*, v. 8, n. 12, p. 4447-4454, dez. 2012.
- 24 GUEDES-SILVA, C. C.; HIGA, O. Z.; BRESSIANI, J. C. Cytotoxic evaluation of silicon nitride-based ceramics. *Materials Science & Engineering C*, v. 24, n. 5, p. 643-646, nov. 2004.
- 25 GUEDES E SILVA, C. C.; KÖNIG, B. Jr.; CARBONARI, M. J.; YASHIMOTO, M.; ALLEGRINI, S. Jr.; BRESSIANI, J. C. Tissue response around silicon Nitride implants in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 84, n. 2, p. 337-343, fev. 2008.
- 26 GUEDES-SILVA, C. C. Estudo de sinterização de nitreto de silício com adições dos óxidos de lantânio, gadolínio e alumínio. 2000. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear Aplicações) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

- 27 PEREIRA, J. L.; SOUZA, J. V. C.; SILVA, O. M. M.; RAYMUNDO, E. A. Análise das propriedades de ferramenta de corte cerâmicas de nitreto de silício (Si₃N₄) usando diferentes aditivos. *Cadernos UniFOA*, v. 4, p. 11-17, jun. 2013.
- 28 NEJATIAN, T.; KHURSHID, Z.; ZAFAR, M. S.; NAJEEB, S.; ZOHAIB, S.; MAZAFARI, M.; HOPKINSON, L.; SEFAT, F. Dental biocomposites. *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering*, v.1, p.65-84,2018.
- AMARAL, M.; COSTA, M.A.; LOPES, M.A.; SILVA, R.F.; SANTOS, J.D.; FERNANDES, M.H. Si3N4-bioglass composites stimulate the proliferation of MG63 osteoblast-like cells and support the osteogenic differentiation of human bone marrow cells. *Biomateriais*, v. 23, p. 4897-4906, dez. 2002.
- 30 AMARAL, M.; LOPES, M.A.; SANTOS, J.D.; SILVA, R.F. Wettability and surface charge of Si3N4-bioglass composites in contact with simulated physiological liquids. *Biomateriais*, v. 23, p. 4123-4129, out. 2002.
- 31 LIMA, M. S. C. F. Resposta Térmica de um Compósito PEEK + PTFE + Fibra de Carbono + Grafite. 2012. 137 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica na Área de Tecnologia de Materiais) – Centro de Tecnologia Industrial, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.
- **32** PETER, S. J.; KIM, P.; YASKO, A. W.; YASZEMSKI, M. J.; MIKOS, A. G. Crosslinking characteristics of an injectable poly(propylene fumarate)/β- tricalcium phosphate paste and chemical properties of the crosslinked composite for use as a biodegradable bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 44, n. 3, p. 314-321, mar. 1999.
- 33 BENNET, S.; CONNOLLY, K.; LEE, D. R.; JIANG, Y.; BUCK, D.; HOLLINGER, J. O.; GRUSKIN, E. A. Initial biocompatibility studies of a novel degradable polymeric bone substitute that hardens in situ. *Bone*, v. 19, p. 101-107S, jul. 1996.
- WANG, C; PAN, X.; RÜHLE, M.; RILEY, F. L.; MITOMO, M. Review Silicon nitride crystal structure and observations of lattice defects. *Journal of Materials Science*, v. 31, 1996, p. 5281-5298, fev.1996.
- **35** GRESKOVICH, C.; GAZZA, G. E. Hardness of dense α- and β- Si₃N₄ ceramics. *Journal of Materials Science Letters*, v. 4, 1985, p. 195-196, fev. 1985.
- 36 ZIEGLER, G.; HEINRICH, J.; WOTTING, G. Review -Relationships between processing, microstructure and properties of dense and reaction-bonded silicon nitride. J. Mat. Sci., v. 22, p. 3041-3086, 1987.
- 37 FERREIRA, T. S. Compósitos Si₃N₄-TiN para aplicações estruturais. 2019. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear Materiais) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.
- 38 PIERSON, H. O. *Handbook of Refractory Carbides and Nitrides*. 1. Ed. Nova Jersey: Noyes Publications, 1996.
- **39** PETZOW, G.; HERRMANN, M. *High Performance Non-Oxide Ceramics II*. 1. Ed. Berlin: Spring, 2002.
- **40** JIANG, J.; KRAGH, K.; FROST, D.; STAHL, K.; LINDELOV, H. Hardness and thermal stability of cubic silicon nitride. *Journal of Physics: Condensed Matter*, v. 13, n. 22, p. L514-L520.
- 41 SWAIN, M.V. *Materials Science and Technology*. 11 Ed. New York: VCH, 1994. 842p.
- 42 HNATKO, M.; LENCES, Z.; COPAN, P.; BIROSOVÁ, L.; MATEJOV, P.; JANTOVÁ, S. Synthesis, Characterizations and *in Vitro* Assessment of the Cytotoxicity and Genotoxicity of Novel Silicon Nitride-Based Porous Ceramics, *Materials Sciences and Applications*, v. 4, n. 7, p. 407-418, jul. 2013.
- 43 COUTINHO, A. C. S.; BRESSIANI, J. C.; BRESSIANI, A. H. A. Estudo de sinterização de compósitos à base de nitreto de silício. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 15, 2002, Natal, *Anais*, São Paulo: CBECiMat, 2002, p. 302-308.

- 44 AMARAL, M.; SALGUEIREDO, E.; OLIVEIRA, F. J.; FERNANDES, A. J. S.; COSTA, F. M.; SILVA, R. F. NCD by HFCVD on a Si₃N₄-bioglass composite for biomechanicalapplications. *Surface & Coatings Technology*, v. 200, p. 6409-6413, fev. 2006.
- 45 GUEDES E SILVA, C. C.; RIGO, E. C. S.; MARCHI, J.; BRESSIANI, A. H. A.; BRESSIANI, J. C. Hydroxyapatite coating on silicon Nitride surfaces using the biomimetic method. *Materials Research*, v. 11, p. 47-50, mar. 2008.
- 46 FRAJKOROVÁ, F.; BODISOVÁ, K.; BOHÁC, M.; BARONICKOVÁ, E.; SEDLÁCEK, J. Preparation and characterisation of porous composite biomaterials based on silicon nitride and bioglass. *Ceramics International*, v. 41, n. 8, p. 9770-9778, set. 2105.
- 47 FU, L.; XIONG, Y.; CARLSSON, G.; PALMER, M.; ORN, S.; ZHU, W.; WENG, X.; ENGQVIST, H.; XIA, W. Biodegradable Si3N4 bioceramic sintered with Sr, Mg and Si for spinal fusion: Surface characterization and biological evaluation. *Applied Materials Today*, v. 12, p. 260-275, set. 2018.
- WANANURUKSAWONG, R.; WASANAPIARNPONG, T.; DHANESUA, N. DIDRON, P.
 P. Microhardness and Biocompatibility of Silicon Nitride Ceramic Developed for Dental Applications. *Materials Sciences and Applications*, v. 5, n. 14, jan. 2014.
- 49 XU, Z.; WU, H.; WANG, F.; KAEWMANEE, R.; PAN, Y.; WANG, D.; QU, P.; WANG, Z.; HU, G.; ZHAO, J.; ZHAO, R.; WEI, J. Hierarchically nanostructural coating of amorphous silicon nitride on polyetheretherketone with antibacterial activity and promoting responses of rBMSCs for orthopedic applications. *Journal of Materials Chemistry B*, p. 1-26, set. 2019.
- 50 GUEDES E SILVA, C. C.; RODAS, A. C. D.; SILVA, A. C.; RIBEIRO, C.; CARVALHO,
 F. M. S.; HIGA, O. Z.; FERREIRA, T. S. Microstructure Properties and *in vitro* Biological Behavior of Silicon Nitride Ceramics. *Materials Research*, p. 1-12, ago. 2018.

- 51 MARCHI, J. Estudo de Sinterização de cerâmicas à base de nitreto de silício utilizando-se como aditivos óxidos de cério e alumínio. 1999. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear Materiais) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- 52 FU, L.; XIONG, Y.; CARLSSON, G.; PALMER, M.; ÖRN, S.; ZHU, W.; WENG, X.; ENGQVIST, H.; XIA, W. Biodegradable Si₃N₄ bioceramic sintered with Sr, Mg and Si for spinal fusion: Surface characterization and biological evaluation. *Applied Materials Today*, v. 12, p. 260-275, jun. 2018.
- **53** HOPPE, A.; MOURIÑO, V.; BOCCACCINI, A. R. Therapeutic inorganic ions in bioactive glasses to enhance bone formation and beyond. *Biomaterials Science*, v. 1, p. 254-256, nov. 2012.
- **54** MOURIÑO, V.; CATTALINI, J. P.; BOCCACCINI, A. R. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 9, n. 1, p. 401-419, jan. 2012.
- 55 CADOSCH, D.; CHAN, E.; GAUTSCHI, O. P.; FILGUEIRA, L. Metal is not inert: Role of metal ions released by biocorrosion in aseptic loosening - Current concepts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 91, n. 4, p. 1252-1262, dez. 2015.
- 56 GUINDY, J. S.; SCHIEL, H.; SCHMIDI, F.; WIRZ, J. Corrosion at the marginal gap of implant-supported suprastructures and implant failure. *International Journal of Oral* and Maxillofacial Implants, v. 19, n. 6, p. 826-831, dez. 2004.
- 57 Wu, C.; Miron, R.; Sculean, A.; Kaskel, S.; Doert, T.; Schulze, R.; Zhang, Y.Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing assciated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds. *Biomaterials*, v. 32, n. 29, p. 7068-7078, out. 2011.

- 58 Isaac, J.; Nohra, J.; Lao, J.; Jallot, E.; Nedelec, J.; Berdal, A.; Sautier, J.Effects of strotium-doped bioactive glass on the differentiatio of cultured osteogeic cells. *European Cells and Materials*, v. 21, p. 130-143, fev. 2011.
- 59 HE, L. Y.; ZHANG, X. M.; LIU, B.; TIAN, Y.; MA, W. H. Effect of magnesium ion on human osteoblast activity. *Brazillian Journal of Medical and Biological Research*, v. 49, n. 7, p. 1-6.
- 60 ZHOU, H.; WEI, J.; WU, X.; SHI, J.; LIU, C.; JIA, J.; DAI, C.; GAN, Q. The bio-functional role of calcium in mesoporous silica xerogels on the responses of osteoblasts in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 21, n. 7, p.2175-2185, jul. 2010.
- 61 DASHNYAM, K.; EL-FIQI, A.; BUITRAGO, J. O.; PEREZ, R. A.; KNOWLES, J. C.; KIM, H. A mini review focused on the proangiogenic role of silicate ions released from silicon-containing biomaterials. *Journal of Tissue Engineering*, v. 8, n. 13, p. 1-13, mai. 2017.
- 62 GOTZ, W.; TOBIASCH, E.; WITZLEBEN, S.; SCHULZE, M. Effects of Silicon Compounds of Biomineralization, Osteogenesis, and Hard Tissue Formation. *Pharmaceutics*, v. 11, n.3, p.1-27, mar. 2019.
- 63 ZHAI, W.; LU, H.; CHEN, L.; LIN, X.; HUANG, Y.; DAI, K.; NAOKI, K.; CHEN, G.; CHANG, J. Silicate bioceramics induce angiogenesis during bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, v. 8, n. 1, p. 341-349, set. 2011.
- 64 ANSTIS, G. R.; CHANTIKUL, P.; LAWN, B.R.; MARSHALL, D. B. A Critical Evaluation of Indentation Techniques for Measuring Fracture Toughness. Indirect Crack Measurements. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 62, n. 9, p. 535-538, 1981.
- 65 ASTM American Society for Testing Materials. ASTM E 1876 01: Standard Test Method for Dynamic Young's Modulus, Shear Modulus, and Poisson's Ratio by Impulse Excitation of Vibraton. West Conshohocken, p. 1-16. 2005.

- 66 ASTM American Society for Testing Materials. ASTM C 1161 13: Standard Test Method for Flexural Strength of Advanced Ceramics at Ambient Temperature. West Conshohocken, p. 1-19. 2013.
- 67 LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 266-275, nov. 1951.
- 68 GREGORY, C. A.; GUNN, W. G.; PEISTER, A.; PROCKOP, D. J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetypyridiniumchrloride extraction. *Analytical Biochemistry*, v. 329, n. 1, p. 77-87, jun. 2004.
- 69 GERMAN, R. M.; SURI, P.; PARK, S. J. Review: liquid phase sintering. *Journal of Materials Science*, v. 44, n. 1, p. 1-39, jan. 2009.
- 70 PARK, J. H. Structure-Property Relationship of CaO-MgO-SiO₂ Slag: Quantitative Analysis of Raman Spectra. *Metallurgical and Materials Transactions B*, v. 44, n. 4, p. 938-947, ago. 2013.
- **71** HENCH, L.L. Bioceramics, a clinical success. *Ceramic Bulletin*, v. 77, n. 1. p. 67-74, 1998.
- 72 FABER, K. T.; EVANS, A. G. Crack deflection process I. Theory. *Acta Metall*, v. 31, n.
 4, p. 565-576, 1983.
- 73 CHIVERS, R. A.; MOORE, D. R. The effect of molecular weight and crystallinity on the mechanical properties of injection moulded poly(aryl-ether-ketone) resin. *Polymer*, v. 35, n. 1, p. 110-116, 1994.
- **74** CHU, J. N.; SHULTZ, J. M. The influence of microstructure on the failure behaviour of PEEK. *Journal of Materials Science*, v. 25, n. 8, p. 3746-3752, 1990.

- **75** KARGER-KOCSIS, J.; FRIEDRICH, K. Temperature and strain-rate effects on the fracture toughness of poly (ether ether ketone) and its short glass-fibre reinforced composite. *Polymer*, v. 27, n. 11, p. 1753-1760, 1986.
- 76 RAE, P.; BROWN, E.; ORLER, E. The Mechanical Properties of Poly (ether-etherketone) (PEEK) with Emphasis on the Large Compressive Strain Response. *Polymer*, v. 48, p. 598-615, 2007.
- 77 TALBOTT, M. F.; SPRINGER, G. S.; BERGLUND, L. A. The Effects of Crystallinity on the Mechanical Properties of PEEK Polymer and Graphite Fiber Reinforced PEEK. *Journal of Composites Materials*, v. 21, n. 11, p. 1056-1081, 1987.
- **78** SOBIERAJ, M. C.; RIMNAC, C. M. *PEEK Biomaterials Handbook*. 2 Ed. Amsterdam: Elsevier, 2012.
- **79** GRESKOVICH, C.; YEH, H. C. Hardness of dense β-Si₃N₄. *Journal of Materials Science Letter*, v. 2, p. 657-659, nov. 1983.
- 80 PIAO, C.; WU, D.; LUO, M.; MA, H. Stress shielding effects of two prosthetic groups after total hip joint simulation replacement. *Journal of Orhopaedic Surgery and Research*, v. 9, n. 71, p. 1-8, ago. 2014.
- 81 SOSSA, P. A. F.; GIRALDO, B. S.; GARCIA, B. C. G.; PARRA, E. R.; ARANGO, P. J. A. Comparative study between natural and synthetic Hydroxyapatite: structural, morphological and bioactivity properties. *Matéria*, v. 23, n. 4, dez. 2018.
- 82 KAYGILI, O.; KESER, S.; KOM, M.; BULUT, N.; DOROZHKIN, S. V. The effect of simulating body fluid on the structural properties of hydroxyapatite synthesized in the presence of citric acid. *Progress in Biomaterials*, v. 5, p. 173-182, out. 2016.

- 83 SOOKSAEN, P.; PENGSUWAN, N.; KARAWATTHANAWORRAKUL, S.; PIANPRADITKUL, S. Formation of Porous Apatite Layer during *in vitro* Study of Hydroxyapatite-AW Based Glass Composites. *Advances in Condensed Matter Physics*, v. 7, p. 1-9, jul. 2015.
- 84 FERRAZ, E. P. Engenharia de tecidos: Efeito da associação de células e o Biosilicato[®] com duas fases cristalias (BioS-2P) no reparo de defeitos ósseos.
 2016. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.
- 85 FERRAZ, E. P.; SA, J. C.; OLIVEIRA, P. T.; ALVES JR, C.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L. The effect of plasma-nitrided titanium surfaces on osteoblastic cell adhesion, proliferation, and differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 4, p. 991-998, mai. 2013.
- 86 FERRAZ, E. P. Superfícies de Titânio modificadas por plasma: avaliação in vitro em cultura de élulas osteoblásticas. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- 87 LIMA, S. A. F.; WODEWOTZKY, T. I.; LIMA-NETO, J. F.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; ALVARENGA, F. C. L. Diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 5, p. 463-469, mai. 2012.



Fundada em 1900 "Em constante busca da excelência UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais Tel. (11) 3091 7842 ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: "Efeito do MgO em biocompósitos de nitreto de silício na microestrutura, bioatividade, propriedade mecânicas e no potencial osteogênico de célulastronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos" registrada com o nº **027/2019**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Cecilia Chaves Guedes e Silva, Profa. Dra. Emanuela Prado Ferraz e Celso Sona Filho, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 08/10/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/12/2019 a 01/12/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	02
Peso/Idade	150 - 200g
Sexo	Μ
Origem	Biotério Central do Instituto de Ciências Biomêdicas da USP

São Paulo, 08 de outubro de 2019.

Houring

Profa. Associada Dra. Silvia Vanessa Lourenço Coordenadora do CEUA-FOUSP

78

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000 Fone/Fax(0XX11) 3133-8908 SÃO PAULO – São Paulo – Brasil http://www.ipen.br

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.