



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**DESENVOLVIMENTO DE VIDROS NIOBOFOSFATO  
BIOATIVOS**

**MARCELO JOSÉ CARBONARI**

**Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Doutor em Ciências na Área de  
Tecnologia Nuclear - Materiais.**

**Orientador:  
Prof. Dr. José Roberto Martinelli**

**São Paulo  
2003**

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

DESENVOLVIMENTO DE VIDROS NIOBOFOSFATO BIOATIVOS

MARCELO JOSÉ CARBONARI



Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear e Materiais.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Martinelli

SÃO PAULO  
2003



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

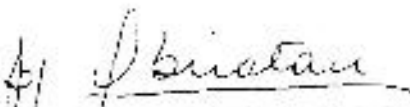
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (011) 3813-0900 -- telefax : (55) (011) 3818-7438  
e-mail: [icbseidir@icb.usp.br](mailto:icbseidir@icb.usp.br)

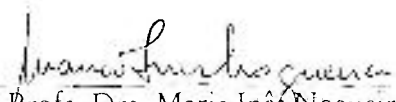
## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 097/2001, sobre o projeto intitulado “*Bio compatibilidade de enxertos de vidros compostos basicamente de fosfato*”, sob a responsabilidade de Marcelo José Carbonari, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de 17/09/2001.

(We certify that the protocol nº 097/2001 about “*Biocompatibility of glass grafts composed basically of phosphates*” agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 17/09/2001 meeting.)

São Paulo, 17 de setembro de 2001.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Estela Maris A. F. Bevilacqua  
Coordenadora da CEEA

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Inês Nogueira  
Secretária da CEEA

Aos meus **Pais**, que com simplicidade me ensinaram o respeito ao próximo e a viver com honra e dignidade, abdicando de muitas coisas em prol de tornar meus sonhos realidade.

À minha esposa **Joici Destro Carbonari**, motivo de coragem e incentivo na luta para alcançar meus objetivos. **Com amor lhe dedico este trabalho.**

O **Senhor** é Sutil e maravilhoso, sábio é aquele que segue seus mandamentos.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo e orientador Prof. Dr. José Roberto Martinelli pela orientação, amizade e principalmente pela confiança demonstrada ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Bruno König Júnior. Professor, não tenho palavras para agradecer-lo por todos os ensinamentos. Muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Libório José Faria Júnior por ter acreditado nesta pesquisa me ensinando os primeiros passos para realização dos ensaios “in vivo” e na ciência da osteologia.

Ao Eng. Tomaz Puga Leiva do IOT-HC-FMUSP pelas orientações e discussões durante a realização dos ensaios mecânicos e ao Técnico César Augusto Martins Pereira do Laboratório de Biomecânica do IOT-HC-FMUSP pela realização destes ensaios.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Muccilo e Prof. Dr. José Carlos Bressiani pela presteza e dedicação sempre demonstradas durante a realização este trabalho.

Aos amigos Pós-Graduandos do IPEN, Prof. Dr. Frank Ferrer Sene, Prof. Dr. José Mário Prison e Luciana Ghussn pelas discussões sempre proveitosas.

Aos técnicos do Departamento de Anatomia do ICB/USP Nilson, Boleta, Wilson e Martinha, sempre prestativos e atenciosos.

Aos amigos Pós-Graduandos do ICB-III, Profa. Dra. Cláudia de Carvalho Lopes, Prof. Dr. Nelson Adami Júnior, Marcelo Yoshimoto, Sérgio Allegrini Júnior, Marcos Salles, Fábio Mitri e Samuel Koo, pela amizade e auxílio nas discussões dos resultados deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IPEN Nildemar, Celso Vieira de Moraes e Rene pela operação do microscópio eletrônico de varredurada.

Ao Dr. Ariel Lenharo, Eng. Luiz Antonio Pugliessa e Fátima Tersi pela amizade e confiança.

A Profa. Dra. Dalva Lúcia Farias pelas análises de espectroscopia Raman.

A Profa. Dra. Sizue Ota Rogero pela realização dos ensaios de citotoxicidade.

Ao CNPq pela bolsa de estudos durante este trabalho e pelo apoio no registro dos pedidos de patentes frutos deste trabalho.

A CBMM por ter gentilmente cedido o óxido de nióbio.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela infra-estrutura disponível e pela facilidade do uso de seus equipamentos.

# Desenvolvimento de vidros niobofosfato bioativos

Marcelo José Carbonari

## RESUMO

Vidros niobofosfato contendo cálcio e sódio foram obtidos a partir da fusão de misturas de hidróxido de amônia di-básico, óxido de cálcio, óxido de sódio e diferentes teores de óxido de nióbio a 1400<sup>0</sup>C durante 1 hora. Os vidros foram conformados em diferentes moldes de aço inoxidável 304L pré-aquecidos, obtendo-se peças com formatos cilíndricos apropriados para ensaios “in vivo” e diferentes tipos de barras utilizadas nos ensaios mecânicos. Após a conformação e recozimento na faixa de 540 a 620<sup>0</sup>C, os vidros foram caracterizados por meio de difratometria de raios X, espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia Raman e análise térmica diferencial. Testes de lixiviação em meio aquoso mostraram o efeito do teor de óxido de nióbio na durabilidade química destes vidros. Foram também realizados ensaios de citotoxicidade segundo a norma ISO 10993-5 com a finalidade de se verificar o grau de toxicidade deste material. Enxertos foram instalados em tíbias de coelhos para determinar a osteointegração deste material. Após oito semanas de cicatrização, os animais foram sacrificados e o bloco ósseo contendo os implantes removidos, fixados, desidratados, incluídos em resina acrílica e preparados para avaliação histológica em microscopia de luz, microscopia de luz polarizada e microscopia eletrônica de varredura. A morfometria foi

realizada por meio da quantificação de três marcadores ósseos distintos injetados durante o período de cicatrização. Ensaios mecânicos de compressão diametral, flexão em três pontos e dureza foram realizados para verificar a influência do aumento do teor de óxido de nióbio nas propriedades mecânicas deste material. Os materiais produzidos no presente trabalho são amorfos, o nióbio participa como formador do vidro e o aumento do teor de nióbio contribui para a redução da quantidade de água presente na estrutura do vidro. O vidro é atóxico, apresenta bioatividade e não existe contaminação por nióbio no tecido neoformado. O remodelamento do tecido nas regiões próximas ao enxerto foi menor durante as duas primeiras semanas de cicatrização em relação aos períodos subseqüentes e o aumento do teor de óxido de nióbio não alterou o processo de remodelação. Com o aumento do teor de óxido de nióbio observou-se uma melhoria das propriedades mecânicas deste material, e o módulo de elasticidade determinado durante o ensaio de flexão é muito próximo ao do osso cortical.



# Development of bioactive niobium phosphate glasses

Marcelo José Carbonari

## ABSTRACT

Niobium phosphate glasses containing calcium and sodium were prepared by melting mixtures of  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , sodium carbonate, calcium oxide, and different amounts of niobium oxide at  $1400^\circ\text{C}$  for 1 h. Glasses were cast in pre-heated cylindrical 304L stainless steel moulds to obtain samples for “in vivo” tests, and in bar shapes for mechanical tests. After casting, the samples were annealed in the range of  $540$  to  $620^\circ\text{C}$ , and characterized by X-ray diffraction, FTIR, Raman, and differential thermal analysis. Leaching tests were also performed in water to determine the glass chemical durability as a function of the niobium content. Test of toxicity were performed according to the ISO 10993-5 to check the toxicity of those glasses. Grafts were installed in rabbit’s tibia to determine the osseointegration. After 8 weeks of healing process, the animals were sacrificed, and the bone blocks containing the grafts were removed, fixed, dehydrated, embedded in an acrylic resin, and prepared for a histological analysis by light microscopy, polarized light microscopy, and scanning electron microscopy. The morphometry was performed by measuring three different bone markers inoculated during the healing period. Diametral compression tests, three point bending tests, and measurement of hardness were performed to determine the influence of the amount of niobium oxide in the mechanical properties of

glasses. Besides being a glass former, niobium helps to reduce the amount of water molecules in the glass structure. These glasses are non-toxic, and bioactive. No niobium was detected in the neo-formed bone. The tissues remodeling near the grafts is lower during the first weeks of healing compared to the following period of time and by increasing the amount of niobium oxide in the glass composition, no changes in the remodeling process were observed. Improvements in the mechanical properties of glasses were observed as a function of the niobium concentration. The elastic modulus, determined from the bending tests, is very close to the one of the cortical bone.

## ÍNDICE

	Pág.	
1.	INTRODUÇÃO	01
2.	OBJETIVO	03
3.	JUSTIFICATIVA	04
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
4.1.	BIOMATERIAIS E OSTEOINTEGRAÇÃO	05
4.2.	VIDROS BIOATIVOS	10
4.3.	VIDRO FOSFATO	14
4.4.	VIDRO FOSFATO BIOATIVO	18
4.5.	VIDRO NIOBOFOSFATO	21
5.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	23
5.1.	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	23
5.2.	DIFRATOMETRIA DE RAIOS X	24
5.3.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	24
5.4.	ESPECTROSCOPIA RAMAN	25
5.5.	ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL	25
5.6.	ENSAIO DE LIXIVIAÇÃO	26
5.7.	DENSIDADE	27
5.8.	TESTE DE AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	28
5.9.	ENSAIOS “in vivo”	29
5.9.1.	ENXERTOS	29
5.9.2.	ANIMAIS, ANESTESIA E MEDICAÇÃO	29
5.9.3.	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	30
5.9.4.	PROTOCOLO CIRÚRGICO	32
5.10.	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	33
5.11.	MÉTODO MORFOMÉTRICO	35
5.12.	MÉTODO DO AZUL DE TOLUIDINA	38
5.13.	MÉTODO DE LUZ POLARIZADA	38
5.14.	MÉTODO DE PICRO-SÍRIUS	39
5.15.	PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	39
5.16.	ENSAIO DE COMPRESSÃO DIAMETRAL	40

5.17.	ENSAIO DE FLEXÃO	43
5.18.	MICRODUREZA	50
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1.	DIFRATOMETRIA DE RAIOS X	51
6.2.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	52
6.3.	ESPECTROSCOPIA RAMAN	56
6.4.	ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL	59
6.5.	ENSAIO DE LIXIVIAÇÃO	60
6.6.	DENSIDADE	61
6.7.	TESTE DE CITOTOXICIDADE	62
6.8.	ANÁLISE DA OSTEOINTEGRAÇÃO	64
6.8.1.	ANÁLISE PELO MÉTODO MORFOMÉTRICO	64
6.8.2.	MARCADORES FLUOROCROMÁTICOS	73
6.8.3.	MÉTODO DE AZUL DE TOLUIDINA	79
6.8.4.	MÉTODO DE LUZ POLARIZADA	89
6.8.5.	MÉTODO DE PÍCRO-SÍRIUS	92
6.8.6.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	95
6.9.	ENSAIOS MECÂNICOS	101
6.9.1.	COMPRESSÃO DIAMETRAL	101
6.9.2.	FLEXÃO A TRÊS PONTOS	104
6.9.3.	MICRODUREZA	107
7.	CONCLUSÕES	109
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

## Lista de Figuras

Número	Descrição	Página
01	Representação esquemática da estrutura tetraédrica do formador $[\text{PO}_4]^{3-}$ e das diferentes formas dos vidros de fosfato de acordo com o número de oxigênio com ligações em ponte.	16
02	Sistema básico para o desenvolvimento de vidros fosfatos bioativos.	20
03	Representação esquemática da estrutura do vidro fosfato contendo óxido de nióbio.	22
04	Esquema de esforços aplicados em um corpo de prova cilíndrico de dimensões D e L.	41
05	Representação esquemática da distribuição das tensões de compressão e de tração.	42
06	Representação esquemática do ensaio de flexão de uma barra de secção retangular.	45
07	Elemento da barra submetido a flexão. $\sigma_c$ tensão de compressão e $\sigma_t$ tensão de tração.	45
08	Representação esquemática do ensaio de flexão a três pontos.	48
09	Difratograma de raios X para amostra contendo 8% em mol de óxido de nióbio.	51
10	Espectros de transmitância no infravermelho para amostras contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.	52
11	Espectros de transmitância no infravermelho curto para amostras contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.	54
12	Espectros de transmitância no infravermelho longo para amostras contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.	55
13	Espectros Raman para vidros contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.	57

14	Temperatura de transição vítrea em função do teor de óxido de nióbio.	59
15	Densidade dos vidros em função do teor de óxido de nióbio.	62
16	Resultados obtidos por meio dos testes de citotoxicidade dos vidros contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio segundo a norma ISO 10993-5.	63
17	Imagem da região I (cortical) utilizada para contagem.	64
18	Imagem da região I associada ao dicionário de cores.	64
19	Imagem da região III (medula) utilizada para contagem.	65
20	Imagem da região III associada ao dicionário de cores.	65
21	Médias das áreas de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) agrupadas por composição do enxerto.	68
22	Médias das áreas de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) agrupadas pela região de contagem.	69
23	Médias das áreas de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) agrupadas por marcador.	71
24	Micrografia de fluorescência mostrando a região de instalação do enxerto ( $\Delta$ ) (BIO1) em corte longitudinal em relação à tíbia do coelho e as diversas regiões de remodelamento (*) na tábua óssea e osteocondução na medula ( $\uparrow$ ). Observa-se também a presença do perióstio ( $\circ$ ) preservado durante a cirurgia.	74
25	Micrografia de fluorescência mostrando a região de instalação do enxerto ( $\Delta$ ) (BIO4) em corte longitudinal em relação à tíbia do coelho e as diversas regiões de remodelamento (*) na tábua óssea e osteocondução na medula ( $\uparrow$ ). Observa-se também a presença do perióstio ( $\circ$ ) preservado durante a cirurgia.	75

26	Micrografia de fluorescência mostrando em corte transverso do enxerto, a instalação do enxerto nas regiões proximal (P – BIO2) e distal (D – BIO3). Na região medular (↓) pode-se observar a falta de tecido ósseo diferente da região cortical (⇒). A coloração verde representa o tecido marcado com calceína (C).	76
27	Micrografia de fluorescência mostrando processo de remodelamento ósseo na região de ancoragem na tábua oposta à instalação do enxerto(BIO1). Observa-se a presença dos três marcadores – tetraciclina (T), alizarina (A) e calceína (C). Nota-se também a presença de osteonas (OS) e tecido lamelar (TL). Enxerto (E).	77
28	Micrografia de fluorescência mostrando o processo de remodelamento ósseo por osteocondução na região medular. (BIO2)	78
29	Micrografia mostrando a remodelação óssea da região medular na interface entre a superfície do enxerto (E) e o tecido ósseo corado com azul de toluidina. Observa-se presença de osteócitos (Oc) dispersos pela matriz de colágeno. (BIO4)	80
30	Micrografia mostrando a medula óssea corada com azul de toluidina onde pode-se observar a presença de tecido adiposo (TA) e vaso sanguíneo (BV). (L) Luz do vaso, (TM) túnica média e (N) núcleos do endotélio.	81
31	Tecido remodelado corado com azul de toluidina, canal de Havers (HC), colar de osteoblastos (Ob) e osteócitos (Oc). Verifica-se regiões de contato entre a superfície do enxerto e o tecido remodelado. (BIO1)	82
32	Região de interface entre a tábua óssea e a medula. Verifica-se a presença do colar de osteoblastos (Ob) junto ao endóstio, células adiposas(CA) da medula e alguns vasos (BV).	83
33	Região da cortical cirúrgica e perióstio (P). (BIO 3)	84

34	Micrografia mostrando a região de instalação corada com azul de toluidina onde pode-se observar a presença de tecido conjuntivo de transição (ECT) e osteoblastos (→) na interface com o enxerto. (BIO4)	85
35	Micrografia mostrando a região de incisão corada com azul de toluidina com maior resolução onde observa-se a presença de tecido conjuntivo na interface com o enxerto. Nota-se a presença de colágeno (C), osteócitos (Oc), osteoblastos enfileirados (Ob) e osteoclastos (Ocl). Lacunas de Howship com osteoclasto (⇒) são também observados. (BIO4)	86
36	Grandes células multinucleadas osteoclastos (Ocl) que participam do processo de reabsorção óssea. (BIO4)	87
37	Micrografia de fluorescência onde observa-se a formação da trave óssea circundada por tecido conjuntivo. (BIO2)	88
38	Lâmina corada com azul de toluidina mostrando a formação da trave óssea circundada por tecido conjuntivo. (BIO2)	89
39	Micrografia de luz polarizada mostrando o padrão das fibras de colágeno formadas nas proximidades com o enxerto. (BIO1)	90
40	Precipitação de tecido remodelado junto à superfície do enxerto (E) de aspecto lamelar desorganizado (L). (BIO1)	91
41	Micrografia de luz polarizada da lâmina corada com picrossírius. Observa-se a presença de colágeno Tipo I (vermelho e amarelo) e Tipo III (verde) em pequena quantidade. (BIO2)	92
42	Região de ancoragem na tábua oposta. Presença de colágeno maduro em contato com a superfície do enxerto (M). (BIO3)	93



43	Lâmina corada com picro-sírius e analisada em microscópio de luz polarizada na região medular junto à superfície do enxerto. Aderência de colágeno de distribuição lamelar na superfície do enxerto (L). Remodelamento de osteonas (o). (BIO2)	94
44	Micrografia eletrônica de varredura. Observa-se a cortical óssea (C), região medular (M) e o enxerto instalado (E). (BIO1)	95
45	Micrografia eletrônica de varredura da superfície do enxerto. Observa-se o contato do tecido ósseo na superfície do vidro. Cortical (C). (BIO1)	96
46	Microscopia eletrônica de varredura. Formação da bainha (B) e processo de osteocondução (O) próxima à região da cortical (C). Enxerto (E) (BIO2)	97
47	Microscopia eletrônica de varredura da superfície periostal. Observa-se a existência de forames. (BIO3)	98
48	Microscopia eletrônica de varredura da superfície periostal. Observa-se o interior do forame nutrício. (BIO3)	99
49	Microscopia eletrônica de varredura mostrando o tecido remodelado (TR) junto à superfície do enxerto (E). Presença de osteócitos (Oc) e canais de Havers (HC). (BIO3)	100
50	Tensão de fratura dos vidros medida por compressão diametral em função do teor de óxido de nióbio.	102
51	Curva de carregamento por compressão diametral do vidro fosfato contendo cálcio, sódio e nióbio. (BIO1)	103
52	Tensão de fratura dos vidros contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio por flexão a três pontos.	105
53	Curva de carregamento por flexão em três pontos do vidro fosfato contendo cálcio, sódio e nióbio. (BIO1)	106
54	Valores de dureza para os vidros contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.	108

## Lista de Tabelas

Número	Descrição	Página
01	Interações entre materiais e tecido.	06
02	Seqüência dos eventos interfaciais envolvidas na formação de ligações entre tecidos ósseos e materiais bioativos.	11
03	Estágio das reações em implantes bioativos.	12
04	Composição nominal dos vidros (mol%).	23
05	Protocolo experimental.	31
06	Série de álcoois para a desidratação.	33
07	Procedimento de embebição.	34
08	Seqüência de injeção dos marcadores fluorescentes.	36
09	Velocidades de dissolução para vidros contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.	60
10	Área de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) totalizada por animal.	66
11	Médias das áreas de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) agrupadas por composição do enxerto.	67
12	Médias das áreas de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) e valor crítico para contraste agrupadas pelas regiões de contagem.	69
13	Médias das áreas de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) e valor crítico para contraste agrupadas por marcador.	70
14	Valores do módulo de elasticidade para os vidros contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.	107

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos materiais para uso em aplicações odontológicas e reposição de tecidos ósseos cresceu substancialmente nas últimas décadas desde a descoberta da osteointegração por Brånemark (1969) [1]. Estes tipos de reparos ósseos possibilitam grande impacto na qualidade de vida e na saúde da população [2].

A utilização de vidros e vitro-cerâmicas é hoje realidade com a comercialização de produtos já liberados pelos órgãos regulamentadores como é o caso do BIOGLAN® e do BIOGLASS® que são utilizados em reparações cirúrgicas de defeitos periodontais, tratamentos de dentinas hipersensíveis e reparos nos ossos da face. A composição química destes materiais, características morfológicas e suas propriedades mecânicas podem ser convenientemente ajustadas de acordo com as funções do enxerto a que se destina [3], inclusive para apresentar bioatividade ligando-se ao tecido ósseo. Estes tipos de materiais são conhecidos como vidros bioativos.

A característica comum dos vidros e vitro-cerâmicas bioativas é a formação da camada de hidroxiapatita carbonatada na superfície destes materiais quando instalados no organismo. Esta camada é responsável pela ligação entre o material instalado e o tecido vivo.

Outra possibilidade de uso deste tipo de material no organismo humano é como material “biologicamente inerte” em restaurações dentais como coroas e pontes.

Microesferas de vidros aluminossilicatos contendo isótopos radioativos de ítria estão sendo introduzidas no corpo humano e possibilitam um método eficaz de combate ao câncer fornecendo altas doses de radiação localizada [4]. Além disso,

novos materiais vitro-cerâmicos e compósitos do tipo vidro polímero estão substituindo amalgamas em obturações dentais.

Durante o desenvolvimento de um biomaterial algumas características fundamentais devem ser consideradas para que o material possa ser utilizado como implante ou enxerto. Dentre estas características, as propriedades químicas e biológicas devem sempre ser caracterizadas, para evitar o uso de materiais que provoquem danos aos tecidos vivos como tumores cancerígenos, reações inflamatórias, produção de radicais livres, entre outros.

O uso de processos de fabricação confiáveis, a existência de normatização internacional, regulamentação governamental, protocolo cirúrgico e controle de qualidade estão reduzindo a probabilidade de falhas nos implantes [5] nos países desenvolvidos. Este não é uma prática comum dos produtores de biomateriais nacionais onde a utilização de matérias-primas não certificadas, processos de fabricação artesanais e a utilização de materiais importados de procedência desconhecida coloca em risco a saúde da população, principalmente das classes menos favorecidas.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo do presente trabalho é desenvolver vidros niobofosfatos bioativos, testar a bioatividade, avaliar a citotoxicidade e caracterizar algumas propriedades mecânicas a fim de proporcionar uma comparação com vidros bioativos disponíveis comercialmente.

### **3. JUSTIFICATIVA**

Os vidros bioativos utilizados no Brasil são importados e seu custo é relativamente alto. O desenvolvimento de novos biomateriais pode reduzir o custo do tratamento, ampliando suas aplicações e estendendo os benefícios a um número maior de pacientes. Além disso, novos materiais bioativos que apresentem maior bioatividade poderão apresentar períodos de pós-operatório menores, aumentando a qualidade de vida dos pacientes.

Os vidros bioativos apresentam à capacidade de se ligar ao tecido ósseo, sendo assim usados preferencialmente em substituição a biomateriais metálicos em posições de instalação onde a resistência mecânica não é a principal propriedade requerida. Com relação aos materiais cerâmicos, os vidros são mais fáceis de serem produzidos em diversos formatos por meio de processos de fusão e modelagem.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. BIOMATERIAIS E OSTEOINTEGRAÇÃO

Biomaterial é definido como qualquer substância, droga, combinação de substâncias de origem natural ou sintética, que pode ser usada por um período como parte de um sistema tratado ou como reposição de algum tecido, órgão ou função do corpo.

A osteointegração é definida por Brånemark [1] como “a conexão direta, estrutural e funcional entre o osso vivo e a superfície do implante submetido à carga funcional” e sugere que, para se obter uma interface osteointegrada, a área que receberá o implante deve ser constituída por osso sadio.

Verifica-se durante a história na área médico-odontológica, incessantes pesquisas à procura por substâncias naturais ou sintéticas que pudessem substituir tecidos corpóreos, moles ou duros, não funcionais [6]. Os materiais utilizados para aplicações clínicas muitas vezes foram desenvolvidos sem o conhecimento das necessidades biológicas. Como exemplos destes materiais pode-se citar as ligas de titânio, desenvolvidas principalmente para aplicação na indústria aeroespacial, que apresentam baixo peso específico combinado com alta resistência mecânica [7]. Materiais compósitos estão sendo pesquisados para serem utilizados na reparação do tecido ósseo. Estes materiais são obtidos em diversos formatos, tipos de reforços, características mecânicas e químicas, sendo constituídos de matriz polimérica reforçada com cerâmica, vidro ou metal, dependendo das características necessária para a função no organismo [8].

Quando qualquer material é instalado no organismo, uma resposta associada ao tipo de material é produzida pelo hospedeiro; essas respostas estão divididas em quatro categorias como mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1** – Interações entre materiais e tecido [9, 10].

<b>Tipo de material</b>	<b>Resposta</b>
Material tóxico	Degeneração do tecido circundante.
Material não tóxico e biologicamente inativo (próximo a inerte)	Formação de tecido fibroso de espessura considerável.
Material não tóxico e biologicamente ativo (bioativo)	Formação de ligação interfacial.
Material não tóxico e reabsorvível	O tecido circundante substitui o material.

O sucesso de qualquer tipo de implante ou enxerto não depende apenas do tipo de material. Características como dimensões, propriedades da superfície e do sítio de implantação, do traumatismo tecidual durante a cirurgia e do movimento na interface entre o osso e o implante devem ser avaliadas para que ocorra a osteointegração na maior área possível do implante [11].

A adesão celular é o principal fator em muitos processos fisiológicos e patogênicos, como a manutenção da integridade de tecidos, cura de ferimentos, coagulação sanguínea, respostas imunológicas e transformações embriogênicas e malignas. A aderência de células a superfícies estranhas exerce profunda influência na integração biológica de implantes e no crescimento das células. A ligação da célula de ancoragem ao substrato é o primeiro passo no processo de interação entre a



célula e a superfície do material instalado e afeta, subseqüentemente, as respostas dos tecidos e das células. No caso de biomateriais ortopédicos ou dentais, a interação entre os osteoblastos formadores de ossos e o substrato pode influenciar a natureza da interface entre a superfície do implante e o osso remodelado a qual, no final, determinará a estabilidade ao longo do período da prótese implantada. Estudos “in vitro” mostraram que a osteomorfogênese é fortemente associada ao comportamento das células (adesão, migração e espalhamento pela superfície) e que a formação e deposição do osso diretamente sobre o implante requer superfícies não tóxicas e que também permitam ou favoreçam este comportamento [12].

Após a instalação do implante ocorrem às primeiras reações químicas entre a superfície do implante e os tecidos orgânicos que são reguladas pelos fluidos teciduais. Observa-se a formação de uma camada de macromoléculas glicoprotéicas e água, como parte do substrato para adesão, proliferação, diferenciação e síntese protéica de células de fenótipo osteoblástico.

Uma série de eventos bioquímicos ocorre devido à interação celular de superfície com alteração do pH, seguido da liberação de proteínas e enzimas reguladoras do processo de divisão e diferenciação celular; entre elas, os fatores de crescimento são fundamentais para que as células mesenquimais indiferenciadas existentes na medula óssea diferenciem-se em células osteoblástica e fibroblástica, sintetizando as proteínas necessárias para a composição dos tecidos calcificados responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção do processo de osteointegração [13].

Na segunda etapa do processo, com a presença do tecido de granulação entre osso e o implante, inicia-se o processo de reparação tecidual com a deposição de matriz de colágeno não calcificada, formando a matriz óssea primária na qual,

gradativamente, cálcio, fósforo, sódio, magnésio e outros minerais agregam-se produzindo a mineralização do tecido ósseo perimplantar.

A terceira etapa do processo de osteointegração é caracterizada pela remodelação óssea, regulada, entre outros fatores, pela carga funcional. Este processo de remodelação é realizado pelos osteoblastos e osteoclastos [13].

Em vários estudos histológicos, o osso primário invade o sítio de reparo. Similarmente, o osso cresce ou expande sobre a na superfície criada durante a remodelação óssea. Contudo, a matriz óssea não tem capacidade de crescer ou se expandir. De fato, uma vez formada, a matriz óssea por si só não se move em relação aos tecidos biológicos ao seu redor. Então, a superfície do implante é invadida por uma população de células osteogênicas migratórias [6]. Assim que essas células iniciam a formação da matriz óssea, o processo de migração é cessado. Na ausência de implantes ou superfícies ósseas maduras, isso resultará em espículas ósseas que possuem osteoblastos em sua superfície. Essas células secretam elementos que compõem a matriz óssea, mas são distintas da população de células osteogênicas migratórias. Conclui-se então que o crescimento invasivo de osso em sítios de reparo endósseo ou durante a remodelação é o resultado da migração de células osteogênicas, o que precede a formação óssea. A osteocondução tem sido descrita como infiltração de novos capilares com neoformação óssea rumo ao leito do implante e dentro do sítio, o que implica na migração de população de células osteogênicas.

O processo denominado como remodelação óssea é de grande importância em relação a formação da interface e a estabilidade de um implante em longos períodos, já que a cortical óssea sofre necrose como resultado de trauma ao tecido.

Os materiais utilizados na reparação óssea são classificados, quanto ao seu mecanismo de ação, em osteocondutivos, osteoindutivos e osteogênicos [6].

A osteocondução é caracterizada pela neoformação óssea por aposição até o material. Os materiais osteocondutores são biocompatíveis e formam arcabouços para depósito e proliferação celular com atividade osteoblástica, produzindo um novo osso. Os materiais osteocondutores mais comuns são os aloplásticos e os heterógenos.

Os materiais aloplásticos são exclusivamente sintéticos e biocompatíveis. Estão disponíveis no mercado em grande variedade de texturas, tamanhos e formas. Como exemplo de materiais aloplásticos pode-se citar: tricálcio fosfato (TCP), hidroxiapatita sintética (HA), sulfato de cálcio, carbonato de cálcio e os vidros bioativos.

Os materiais heterógenos são fabricados a partir da parte inorgânica do osso de animais, triturados e secos pelo processo de liofilização, que desidrata o material a 60°C sob vácuo.

Materiais orgânicos osteoindutivos promovem a formação de um novo osso a partir das células osteoprogenitoras, derivadas das células mesenquimais indiferenciadas que se diferenciam sob a influência de um ou mais agentes indutores [14]. As proteínas osteomorfogênicas (BMP) e o plasma rico em plaquetas (PRP) são os agentes osteoindutores mais utilizados na reparação do tecido ósseo.

O osso autógeno é o único material para enxerto com propriedades osteogênicas. A osteogênese é o processo pelo qual se processa o crescimento ósseo derivado de células viáveis transferidas dentro de um enxerto. O novo osso é regenerado pelos osteoblastos e pelas células que se originam na medula transferida com o enxerto [6].

## 4.2. VIDROS BIOATIVOS

Existem diversos vidros e vitro-cerâmicas usados em aplicações biomédicas contendo em suas composições sílica. Esses vidros são conhecidos pela capacidade de se ligar ao tecido ósseo, e por este motivo denominados bioativos [15]. Para que este material possa apresentar bioatividade, uma reação química na superfície do material ocorre após sua instalação no organismo. Uma camada de hidroxiapatita carbonatada é formada na superfície do material que promove a interface de ligação com o tecido.

Inicialmente foi demonstrada a capacidade de um vidro  $45\text{SiO}_2 \cdot 24,5\text{Na}_2\text{O} \cdot 24,5\text{CaO} \cdot 6\text{P}_2\text{O}_5$  (em mol %) designado como 45S5 [16] de se ligar ao tecido ósseo. Existem três fatores fundamentais para que um vidro silicato apresente bioatividade e se diferencie dos tradicionais vidros silicato soda-cal: 1) conter em sua composição teores inferiores a 60% em mol de  $\text{SiO}_2$ , 2) altos teores relativos de  $\text{Na}_2\text{O}$  e  $\text{CaO}$  e 3) alta razão  $\text{Ca/P}$ . Estes fatores permitem que a superfície do vidro se torne reativa quando em contato com meio aquoso.

Uma faixa muito limitada de composições de biovidros, contendo  $\text{SiO}_2 - \text{Na}_2\text{O} - \text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$ , que apresenta até 55% em mol de  $\text{SiO}_2$ , exibe alta bioatividade. Esta faixa de materiais foi designada de bioatividade Classe A. Uma importante característica da Classe A é que estes materiais apresentam osteoprodução, bem como osteocondução. A Classe B de materiais bioativos exibe apenas osteocondutividade, definida como a característica do osso crescer e ligar-se por meio da superfície. Os implantes de hidroxiapatita sintéticos (HA) apresentam bioatividade relacionadas com a Classe B.

Os mecanismos físico-químicos envolvidos na formação da ligação bioativa com o tecido, bem como a seqüência dos eventos celulares associada com a formação de ligação bioativa, já são bem compreendidos e estão apresentados na Tabela 2, embora detalhes da biologia molecular e nível genético são pouco conhecidos [16]. Estudos comparativos de várias composições de vidros bioativos, cerâmicas e vitro-cerâmicas têm mostrado que existe considerável faixa de níveis de bioatividade, medida nas áreas onde existe ligação entre o osso remodelado e a superfície do implante ou pela razão de proliferação do osso na presença de partículas bioativas.

Osteoprodução ocorre quando há proliferação óssea na superfície de uma massa devido ao aumento da atividade dos osteoblastos.

**Tabela 2** – Seqüência dos eventos interfaciais envolvidas na formação de ligações entre tecidos ósseos e materiais bioativos [16].

<b>Estágio das reações superficiais</b>	<b>Eventos</b>
1	Vidro bioativo em contato com os fluidos corpóreos
2	Formação de ligações SiOH
3	Transformação de $\text{SiOH} + \text{SiOH} \rightarrow \text{Si-O-Si} + \text{H}_2\text{O}$
4	Adsorção de $\text{Ca} + \text{PO}_4 + \text{CO}_3$
5	Formação de hidroxiapatita carbonatada
6	Ação de macrófagos
7	Aproximação de células mesenquimais
8	Diferenciação de células mesenquimais
9	Formação da matriz óssea
10	Cristalização da matriz óssea

A Tabela 3 resume os estágios das reações em implante bioativo. Os mecanismos envolvidos no estágio 1 (troca iônica) e estágio 2 (dissolução de sílica da rede) são descritos precisamente, entretanto os mecanismos que atuam no estágio 3 (condensação e repolimerização da sílica) não são bem conhecidos. As reações superficiais envolvidas nos estágios 1 a 4 estão sendo determinadas para um grande número de composições vítreas [16].

**Tabela 3** – Estágio das reações em implantes bioativos [16].

Estágio	Reação
1	<p>Rápida troca de íons <math>\text{Na}^+</math> e <math>\text{K}^+</math> com íons <math>\text{H}^+</math> e <math>\text{H}_3\text{O}^+</math> da solução</p> $\text{Si-O-Na}^+ + \text{H}^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{Si-OH}^+ + \text{Na}^+ (\text{solução}) + \text{OH}^-$
2	<p>Este estágio é controlado freqüentemente pelo processo de difusão. Perda de sílica solúvel na forma de <math>\text{Si}(\text{OH})_4</math> para a solução, resultando na quebra das ligações Si-O-Si e na formação de Si-OH na interface da solução vítrea. Este estágio é controlado freqüentemente pelas reações interfaciais.</p>
3	<p>Condensação e repolimerização da camada rica em <math>\text{SiO}_2</math> na superfície exaurindo cátions alcalinos e alcalinos terrosos.</p>
4	<p>Migração dos grupos <math>\text{Ca}^{2+}</math> e <math>\text{PO}_4^{3-}</math> para a superfície por meio da camada rica em <math>\text{SiO}_2</math> formando filme rico em <math>\text{CaO-P}_2\text{O}_5</math> na superfície da camada rica em <math>\text{SiO}_2</math>, seguido do crescimento de filme amorfo rico em <math>\text{CaO-P}_2\text{O}_5</math> pela incorporação de cálcio solúvel e fosfato da solução.</p>
5	<p>Cristalização do filme amorfo de <math>\text{CaO-P}_2\text{O}_5</math> pela incorporação dos ânions <math>\text{OH}^-</math>, <math>\text{CO}_3^{2-}</math> ou <math>\text{F}^-</math> da solução para formar camada de hidroxil, carbonato e fluorapatita.</p>

Todos os cinco estágios das reações mostradas na tabela 3 são claramente delimitados por mudanças no modo de vibração das espécies químicas na superfície do vidro.

A razão de formação de hidroxiapatita carbonatada (estágio 4) e o tempo de início de cristalização (estágio 5) varia de forma considerável. Quando a razão de formação torna-se excessivamente lenta, não ocorre a formação de ligação entre o material de implante e o tecido ósseo e o material não apresenta bioatividade. Os efeitos provocados por mudanças na composição do material de implante afetam de forma crítica os estágios 4 e 5, principalmente nas características de ligação, não ligação ou reabsorção [16].

Nas últimas duas décadas tem sido mostrado que o aumento da estabilidade das ligações na interface implante tecido, juntamente com melhor fixação bioativa poderá assegurar aumento no tempo de vida dos implantes.

As principais desvantagens dos vidros bioativos são a baixa resistência mecânica e a baixa tenacidade à fratura. Estas características dificultam o uso destes materiais em aplicações biomédicas estruturais. A resistência à flexão da maioria das composições de vidros bioativos comerciais estão na faixa de 40 a 60MPa o que os torna inapropriados para resistirem a tensões mecânicas de trabalho. Porém, a baixa resistência não afeta a utilização dos vidros bioativos em enxertia óssea na forma de pó com diversos tamanhos de partículas e variadas taxas de reabsorção, e em determinados enxertos como pequenos ossos do ouvido médio.

### 4.3. VIDRO FOSFATO

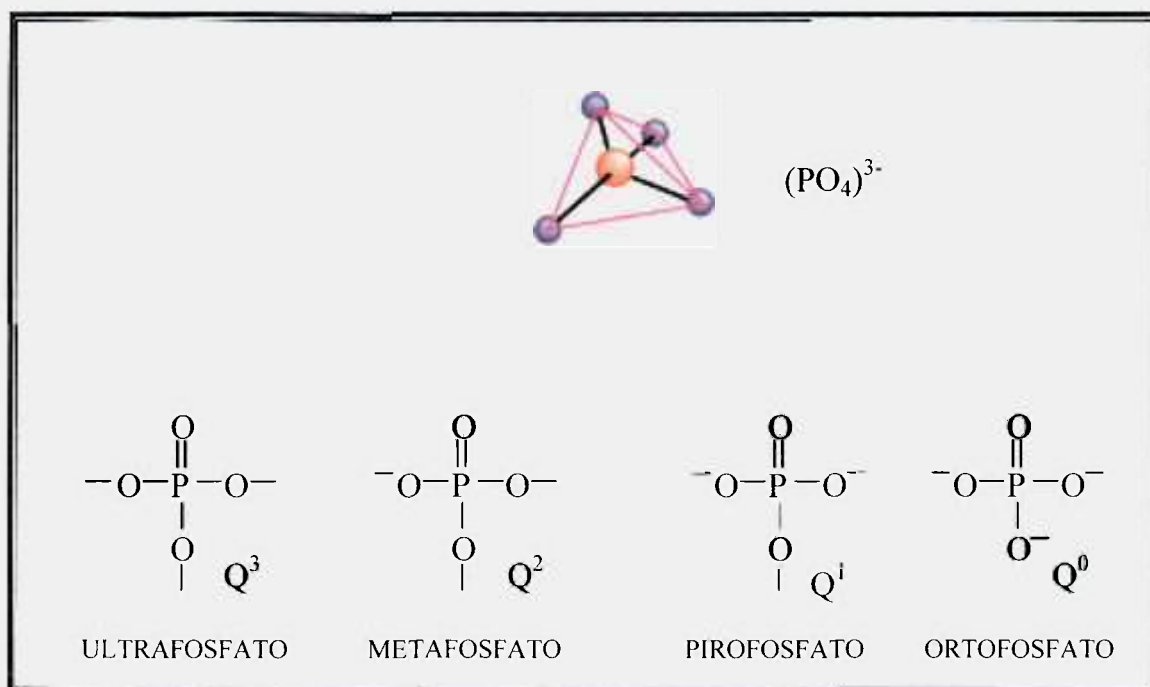
$P_2O_5$  é um clássico formador de vidros previsto pela teoria de Zachariasen [17]. Com  $P_2O_5$  pode-se obter vidros dentro de uma ampla faixa de composições binárias, ternárias ou mais complexas, por meio da mistura deste composto com óxidos de metais alcalinos, alcalinos terrosos e outros cátions modificadores de rede. Até a década de 80, os vidros fosfatos não apresentavam interesse tecnológico acentuado, principalmente devido sua susceptibilidade a ambientes úmidos, o que limitava suas aplicação.

Fósforo e silício são ligados a átomos de oxigênio com coordenação tetraédrica, sendo que no caso do fósforo, há três ligações simples e uma dupla entre os átomos de oxigênio e fósforo.  $P_2O_5$  é constituído por tetraedros  $[PO_4]^{3-}$  ligados pelos vértices, formando uma estrutura tridimensional. Cada tetraedro apresenta três oxigênios com ligações em ponte responsáveis pelas ligações entre os tetraedros  $[PO_4]^{3-}$  e um oxigênio formando uma dupla ligação com o átomo de fósforo. A adição de elementos alcalinos e alcalinos terrosos favorece a quebra das ligações em ponte, promovendo a formação de cadeias bidimensionais. Desta maneira, os vidros fosfatos recebem 4 diferentes denominações de acordo com a presença de grupos relacionados a oxigênios com ligações em ponte e representados por  $Q^n$ , onde n é o número de oxigênios com ligações em ponte. Se existirem três oxigênios ligados em ponte, o vidro é denominado ultrafosfato ( $Q^3$ ), se um dos oxigênios estiver ligado ao modificador, ou seja, um oxigênio não ligado em ponte, o vidro é denominado metafosfato ( $Q^2$ ); se existirem dois oxigênios não ligados em ponte teremos um pirofosfato ( $Q^1$ ), e finalmente se os três oxigênios estiverem não ligados em ponte teremos um ortofosfato ( $Q^0$ ). A Figura 1 é a representação esquemática da estrutura



tetraédrica do formador  $\text{PO}_4$  e das diferentes formas dos vidros fosfato de acordo com o número de oxigênio ligados em ponte.

Vidros binários do tipo  $\text{M}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5$  (onde M representa o metal alcalino modificador), como por exemplo  $\text{Na}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5$  e  $\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5$ , são obtidos com facilidade, contudo ainda apresentam alto grau de hidrólise. A melhoria dos vidros a base de fosfato, quanto a este aspecto, só foi obtida com a introdução de elementos de transição. Os sistemas do tipo  $\text{K}_2\text{O} - \text{M}_2\text{O}_3 - \text{P}_2\text{O}_5$  (M= Al, Ga, In, La, B, Fe e Bi) foram estudados com o propósito de obter vidros com boa durabilidade química e alto coeficiente de expansão térmica. Com o mesmo objetivo foram estudadas as composições:  $\text{P}_2\text{O}_5 - \text{M}_2\text{O}_3 - \text{M}_2\text{O} - \text{MO}$  ( $\text{M}_2\text{O}_3 = \text{Al}_2\text{O}_3$  ou  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{M}_2\text{O} = \text{Ag}_2\text{O}$  ou  $\text{K}_2\text{O}$  e  $\text{MO} = \text{BaO}$  ou  $\text{PbO}$ ) [18]. A obtenção de vidros fosfato a partir desses sistemas viabilizou suas aplicações em diversas áreas.



**Figura 1** - Representação esquemática da estrutura tetraédrica do formador  $[\text{PO}_4]^{3-}$  e das diferentes formas dos vidros de fosfato de acordo com o número de oxigênio com ligações em ponte.

Alguns estudos comprovaram que o vidro fosfato é composto por estrutura do tipo polimérica de tetraedros  $\text{PO}_4$  interconectados [19, 20]. A unidade básica desse sistema é composta de grupos  $[\text{PO}_4]^{3-}$ , que podem se interligar a três outros tetraedros por meio da formação de ligações  $-\text{P}-\text{O}-\text{P}-$ , como ocorre no  $\text{P}_2\text{O}_5$  cristalino. A adição de cátions, como por exemplo  $\text{Ca}^{2+}$ , na proporção de um cátion metálico para uma unidade de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , provoca a despolimerização da rede tridimensional do fosfato, por meio da quebra das ligações  $-\text{P}-\text{O}-\text{P}-$  favorecendo o aparecimento de oxigênios não ligados em ponte ( $-\text{P}-\text{O}-$ ). Esta despolimerização faz com que haja o aparecimento de longas cadeias de tetraedros  $\text{PO}_4$ .

A formação de íons oxigênio não ligados em ponte em vidros fosfatos foi estudada por Sales [21-22]. Em seu trabalho, demonstrou-se a relação entre o teor de

cátions metálicos e o número de oxigênio não ligados em ponte. À medida que o teor de modificadores é aumentado, o tamanho das cadeias poliméricas diminui, facilitando o aparecimento de grupos terminais  $\text{PO}_3^{2-}$  devido à quebra das ligações de oxigênio (ligados em ponte) que interligam os tetraedros  $[\text{PO}_4]^{3-}$ . Além disso, demonstrou-se que o aumento do teor de cátions metálicos está relacionado ao aumento da tendência de cristalização destes vidros.

Usando-se um modelo simples para a estrutura do vidro a base de fosfato, pode-se estimar o tamanho das cadeias fosfatadas diretamente da composição dos vidros [22].

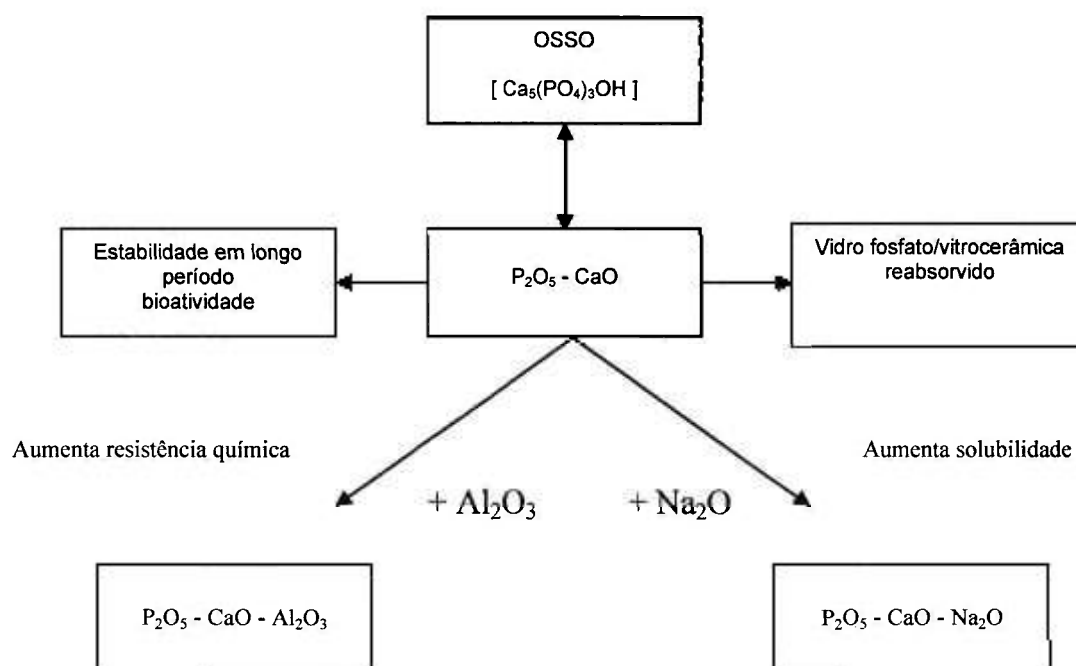
Dayanand e Salagram [23] observaram que na estrutura dos vidros fosfatos a adição de modificadores, como o  $\text{PbO}$ , quebra as ligações entre os grupos  $\text{PO}_4$  e a rede tridimensional transforma-se numa estrutura unidimensional, tipo cadeia, no caso dos vidros metafosfatos. Os cátions  $\text{Pb}^{2+}$ , por sua vez, ligam-se ionicamente aos oxigênios não ligados em ponte das diferentes cadeias, e o aumento das forças dessas ligações iônicas melhora a durabilidade química dos vidros. O aumento da força da ligação iônica fortalece a estrutura do vidro, tornando-o mais resistente mecanicamente. Por exemplo, devido a diferença do raio iônico dos íons  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Li}^+$  há variação da força de ligação iônica entre o oxigênio dos tetraedros e o cátion alcalino, e por isso há um aumento na durabilidade química na seguinte ordem:  $\text{K} > \text{Na} > \text{Li}$ .

#### 4.4. VIDRO FOSFATO BIOATIVO

De modo simplificado, pode-se dizer que o corpo humano é constituído por três componentes básicos: água, colágeno e hidroxiapatita [24]. Este último composto constitui a fase mineral dos ossos e dos dentes, que é responsável em manter a estabilidade estrutural ao corpo, protegendo órgãos como pulmão e coração e atuando como depósito regulador de íons. A hidroxiapatita biológica presente no tecido ósseo vivo se diferencia da obtida por métodos sintéticos por sua menor cristalinidade e a presença de troca iônica em sua estrutura, considerando-se que estas particularidades desempenham papel importante em seu comportamento biológico. Assim, todas as hidroxiapatitas biológicas presentes nos distintos sistemas vivos apresentam relação molar de Ca/P inferior a razão estequiométrica de 1,67. Observa-se que quanto mais maduro for o tecido ósseo, a razão Ca/P fica mais próxima do valor estequiométrico. De maneira semelhante, observa-se o aumento da cristalinidade do tecido com o aumento dessa razão. Este comportamento tem implicações fisiológicas de grandes magnitudes. Quanto mais jovem e menos cristalino for o tecido, melhor poderá desenvolver-se e crescer mais rapidamente, pois com o seu desvio estequiométrico pode armazenar outros elementos necessários para o organismo durante seu crescimento. São observadas na estrutura da hidroxiapatita biológica trocas e inclusões tais como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ , entre outras.

Os vidros fosfatos vêm encontrando grande espaço em aplicações como biomateriais, pois sua estrutura é mais próxima da parte mineral dos tecidos ósseos. Vidros do tipo  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  são candidatos em potencial para serem utilizados em implantes ósseos ou dentais [25-30].

A Figura 2 representa duas possibilidades para o desenvolvimento de vidros fosfatos de cálcio com modificadores do tipo óxido de alumínio e óxido de sódio, utilizados para uso em implantes: a primeira, com modificadores do tipo óxido de alumínio, permite a fabricação de implantes de duração prolongada, e a segunda, com adições de óxido de sódio, tem como objetivo a produção de implantes reabsorvíveis pelo osso. Neste sistema ternário, para produção de vidros com alta estabilidade química, visando a fabricação de implantes de duração prolongada, pode ser observado que a composição deve possuir teores molares superiores a 45% de  $P_2O_5$ . O aumento da quantidade de modificadores resulta em decréscimo da razão  $(Q^2/Q^1)$ , indicando encurtamento das cadeias de fosfato. Um recozimento posterior resultará na cristalização de ortofosfato de alumínio, metafosfato de alumínio, metafosfato de cálcio e pirofosfato de cálcio. A cristalização em ortofosfato de cálcio, resultando, por exemplo, em apatita, não é possível em vidros que apresentam estruturas na forma de cadeias. Entretanto, adicionando-se maiores quantidade de  $Na_2O$ , é possível quebrar a estrutura em forma de cadeia, e nestes casos, a formação do vidro não é determinada pela rede de fosfato ou por cadeias de fosfatos, mas pela interação entre os diferentes cátions.



**Figura 2** - Sistema básico para o desenvolvimento de vidros fosfatos bioativos [3].

Para a obtenção de vidros fosfatos utilizados em implantes que serão reabsorvidos pelo tecido ósseo, utilizando o sistema  $P_2O_5 - CaO - Na_2O$ , a composição deste sistema deve possuir teores molares superiores a 36% de  $P_2O_5$ . Nestes vidros, o grupo  $Q^2$  é influenciado principalmente pelo íon sódio e o grupo  $Q^1$  pelos íons sódio e cálcio.

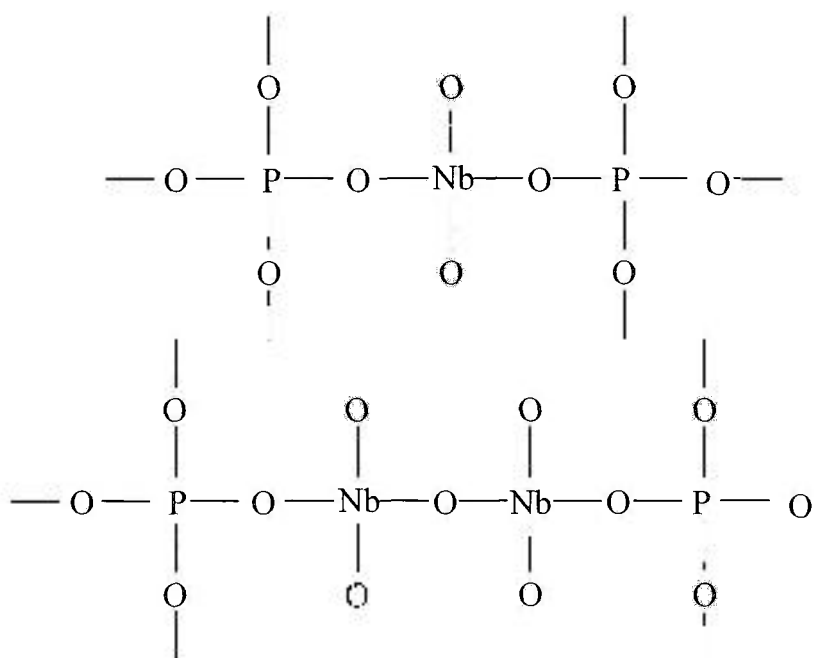
Vidros fosfatos contendo elevadas razões  $CaO/P_2O_5$  possuem em sua estrutura fosfato de cálcio sendo esta característica de fundamental importância para a formação da ligação entre a superfície do vidro e o tecido. No entanto, não é simples a produção de vidros fosfatos com razão molar  $CaO/P_2O_5$  superior a 1,2. Neste caso, altas temperaturas são necessárias e a possibilidade de cristalização é muito grande [31].

#### 4.5. VIDRO NIOBOFOSFATO

As modificações estruturais causadas pela adição de óxido de nióbio em vidros fosfatos foram estudadas em trabalhos anteriores [32, 33] demonstrando que a durabilidade química dos vidros fosfatos melhora com a adição deste óxido. O Brasil detém cerca de 86% das reservas mundiais de nióbio e estudos envolvendo este material no uso como biomaterial mostram sua biocompatibilidade [32].

Utilizando-se espectroscopia na região do infravermelho e espectroscopia Raman para o estudo da ordem à curta distância foi revelado que a estrutura vítrea, quando incorporado o óxido de nióbio, é constituída de cadeias (-O-P-O-Nb-O-P-O-) ou em alguns casos predominantemente ligação do tipo (-O-Nb-O-Nb-O-), justificando o aumento da estabilidade química dos vidros a medida que aumenta-se o teor de óxido de nióbio [34].

Um modelo estrutural bidimensional simplificado para um vidro fosfato contendo óxido de nióbio é apresentado na Figura 3.



**Figura 3** – Representação esquemática da estrutura do vidro fosfato contendo óxido de nióbio [33].

O nióbio forma estrutura de coordenação octaédrica em conjunto com seis átomos de oxigênio localizados nos vértices. No entanto, no modelo da Figura 3, foram representadas apenas as quatro ligações entre oxigênio e nióbio.

Não foram observados na literatura dados a respeito do comportamento das propriedades mecânicas dos vidros fosfatos em função da adição de óxido de nióbio. No entanto, o aumento da durabilidade química decorrente da incorporação do nióbio na estrutura vítrea dos vidros fosfatos pode indicar que as propriedades mecânicas destes sistemas vítreos sejam também modificadas.



## 5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 5.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Vidros fosfatos foram obtidos a partir da fusão de misturas de hidróxido de amônia di-básico (PA – CASA AMERICANA), óxido de nióbio (PA – COMPANHIA BRASILEIRA DE MINERAÇÃO E METALURGIA), óxido de cálcio (PA – CASA AMERICANA) e carbonato de sódio (PA – CASA AMERICANA) em fornos elétricos.

A Tabela 4 mostra as composições nominais dos vidros produzidos.

**Tabela 4** – Composição nominal dos vidros (mol%) [35 - 36].

<b>Amostra</b>	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>Na<sub>2</sub>O</b>	<b>CaO</b>
BIO1	35,00	8,00	7,00	50,00
BIO2	34,24	10,00	6,85	48,91
BIO3	33,10	13,00	6,62	47,28
BIO4	32,30	15,00	6,47	46,23

O processo de obtenção dos vidros tem início com a pesagem dos precursores e homogeneização da mistura à seco em misturador tipo túrbula por 1h. Após este procedimento, a mistura é colocada em cadinho de alumina e aquecida em forno elétrico a 450°C por 30min em ar para decompor o hidróxido de amônia di-básico. O material é então aquecido a 1400°C para a completa fusão dos precursores, permanecendo nesta temperatura por 1h para homogeneização e afinagem (procedimento realizado para eliminar as bolhas provenientes da decomposição dos materiais precursores). O líquido é vertido em molde de aço inoxidável pré-aquecido a

440°C e este conjunto é colocado em forno elétrico na mesma temperatura, permanecendo por 10min. Após este período, o vidro é sacado do molde e aquecido na faixa de 570°C – 620°C, por 2h. O vidro é então resfriado até a temperatura ambiente seguindo a própria inércia do forno, concluindo a etapa de recozimento necessária para eliminação das tensões termomecânicas causadas pelo processo de fabricação. O molde metálico possibilita conformar peças cilíndricas com 3,2mm de diâmetro por 30,0mm de comprimento que posteriormente são cortadas no comprimento máxima de 8,0mm [35-36].

## **5.2. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X**

Amostras foram preparadas na forma de pós por meio de moagem em pulverizador por 1 hora. Este pó foi submetido a análises de difratometria de raios X para avaliar o grau de amorfização do material. Neste estudo foi utilizado um difratômetro de Raios X (BRUKER - AXS - D 8 - ADVANCE<sup>1</sup>) utilizando radiação  $\text{CuK}\alpha$  varrendo de 10° a 80° com velocidade de 2° por minuto.

## **5.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO**

Espectroscopia no infravermelho (FTIR, do acrônimo do inglês, Fourier transform infrared) foi utilizada para avaliar a presença de radicais hidroxilas nos vidros e auxiliar na identificação de grupos de ligações químicas entre os elementos formadores e a influência dos elementos modificadores na estrutura vítrea.

---

<sup>1</sup> Projeto FAPESP (96/09604-9)

Para esta análise, pastilhas com diâmetro de 12 mm e espessura de 0,5 mm foram preparadas por meio da prensagem uniaxial de partículas de vidro de tamanho médio de 10 $\mu$ m e concentração de 2 % em peso, dispersos em pó de KBr (desidratado). Estas amostras foram mantidas em estufa a 100 °C para evitar a absorção de água da atmosfera e posteriormente utilizadas para a determinação dos grupos estruturais presentes [33]. O equipamento utilizado foi um espectrômetro FTIR (THERMO NICOLET OMNIC NEXUS 670 FT-IR<sup>2</sup>).

#### 5.4. ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman pode auxiliar na identificação de grupos de ligações químicas estabelecidas entre os íons formadores e o oxigênio e permite identificar os tipos de cadeias formadas. Esta técnica permite estudar os efeitos dos elementos modificadores, intermediários e formadores, nos grupos de ligações químicas e cadeias presentes nos vidros. Utilizou-se para estas medidas um dispositivo composto por laser de He-Ne ( $\lambda_0 = 632,8$  nm SPECTRA PHYSICS 127<sup>3</sup>) e um dispositivo de detecção CCD (WRIGHT) com resolução de 400 x 600 pixels [33].

#### 5.5. ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL

Análises térmicas diferenciais (ATD) foram realizadas para determinar a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) dos vidros. As amostras foram preparadas na

---

<sup>2</sup> Centro de Ciências e Tecnologia de Materiais - IPEN

<sup>3</sup> Instituto de Química – Universidade de São Paulo

forma de pó com tamanho médio de partícula de 10  $\mu\text{m}$  selecionados por meio de peneiras. Foi utilizado um equipamento (NETZSCH STA 409<sup>4</sup>) na faixa de temperatura de ambiente a 800°C com velocidade de aquecimento de 10°C/min em cadinho de alumina em atmosfera dinâmica de argônio.

## 5.6. ENSAIOS DE LIXIVIAÇÃO

Foram realizados ensaios de lixiviação em soluções aquosas neutras para determinar a perda de massa dos vidros em função do tempo de imersão. Deste modo, durante 14 dias, a durabilidade química dos vidros foi avaliada por meio do cálculo da velocidade de dissolução (VD) de acordo com a Equação (1):

$$VD = \frac{(m_i - m_f)}{s.t} \quad (1)$$

onde:

$m_i$  = massa inicial da amostra (g),  $m_f$  = massa final da amostra (g),  $s$  = área superficial da amostra ( $\text{cm}^2$ ),  $t$  = tempo de imersão (min).

O procedimento para preparação das amostras e realização do ensaio de lixiviação obedece a seguinte normatização: (a) lixamento com lixa 240 mesh (b) lavagem em acetona e uso de ultra-som (c) imersão em água destilada a 90°C num sistema fechado de destilação (soxlet) durante 14 dias. As massas foram determinadas em balança analítica com precisão de 0,01 mg (METTLER TOLEDO

---

<sup>4</sup> Projeto FAPESP 95/05172-4

AG245) nos seguintes intervalos de tempo: massa inicial (antecedendo o início do ensaio), 1, 3, 7 e 14 dias.

### 5.7. DENSIDADE

As densidades dos vidros foram determinadas pelo princípio de Arquimedes, expresso pela Equação 2, em balança analítica (METTLER TOLEDO AG245) com precisão de 0,01mg.

$$\rho = \frac{M_s \cdot \rho_a}{(M_v - M_h)} \quad (2)$$

onde:  $\rho$  é a densidade da amostra,  $M_s$  é a massa seca,  $M_u$  é a massa úmida e  $M_h$  a massa hidrostática da amostra e  $\rho_a$  é a densidade da água na temperatura de realização da medida.

## 5.8. TESTE DE AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Foram avaliados os efeitos tóxicos dos vidros em células por meio de ensaios “in vitro” de citotoxicidade utilizando extrato diluído do material em contato com culturas de células de Ovário de Hamster Chinês (CHO), *American Type Culture Collection* (ATCC) (ISO 10993-5, 1992) [37]. Uma solução fenol (0,02%) e alumina foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Os extratos foram preparados adicionando 0,1 g do composto testado e alumina por mL de RPMI-FCS (meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal de bezerro e antibióticos). Para a preparação das placas de cultura de células, 2 mL de  $1 \times 10^2$  células/mL de CHO foram adicionadas para cada 60 mm de diâmetro da placa de cultura ensaiada e incubada por aproximadamente 5 h a 37° C e umidade de 5% em incubadora com atmosfera de CO<sub>2</sub>, para adesão das células. O meio de cultura foi então removido e substituído por 5 mL de RPMI-FCS fresco na placa controle e na solução não diluída (100%) e em uma série de diluição dos extratos do material testado (50, 25, 12,5 e 6,25%) em placas de cultura com as células aderidas. Todas as concentrações foram testadas em triplicata. As colônias formadas foram fixadas e coloridas com 2% rhodamine B em 4% formaldeído depois de 7 dias de incubação. O número de colônias visíveis em cada placa foi contado utilizando contador de cultura digital e comparado com o número de colônias de CHO das placas controle [38-39].

## **5.9. ENSAIOS “*in vivo*”**

### **5.9.1. ENXERTOS**

Neste estudo foram usados 32 enxertos (8 por grupo) com formato cilíndrico, superfície lisa e com as seguintes dimensões: diâmetro externo = 3,2mm; comprimento do ápice à cabeça = 7,0mm. Os enxertos foram acondicionados em envelopes autosealantes, identificados e esterilizados em autoclave modelo DG LINE CLEAR S12L<sup>5</sup> (TERMOTRON do BRASIL) a 127<sup>0</sup>C por 6 minutos.

### **5.9.2. ANIMAIS, ANESTESIA E MEDICAÇÃO**

Oito coelhos adultos, brancos, da espécie Nova Zelândia, com peso aproximado de 3,3 Kg foram selecionados para este experimento. Os animais provieram do Campus de Piracicaba da Universidade de São Paulo (USP), permaneceram alojados no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, isentos de estresse, em sala climatizada com temperatura constante, sob iluminação em intervalos de 12 horas, separados em gaiolas adequadas, com livre acesso a água e alimentação. Como alimentação pré e pós-operatória, foi empregada ração seca apropriada.

No dia anterior à intervenção cirúrgica, como terapia preventiva, foi administrado o antibiótico Benzilpenicilina Benzatina (Benzectacil 200.000 UI).

---

<sup>5</sup> Centro de Estudo da Disfunção Dento Articular - CEDDA

Para os procedimentos cirúrgicos, coube a cada animal como medicação intramuscular: Cloridrato de (2-2,6-xilidino) – 5,6 – dihidro – 4H – 1,3 – tiazina (Rompum – Bayer do Brasil / dosagem 5,0 mg/Kg - sedativo, analgésico e relaxante muscular); Acepromazina (Acepran 1%-Univet / dosagem 0,75mg/Kg – neuroepilético e tranqüilizante); Cloridrato de Ketamina (Ketamina-Agener / dosagem 35mg/Kg – anestésico local).

Com esta dosagem, os animais permaneceram sob profunda narcose durante 90 a 120 minutos. Como anestésico local, foi aplicado nas áreas cirúrgicas 0,8ml de Cloridrato de Prilocaína-Felipressina a 3% (Citanest-Astra, México).

Quanto à medicação pós-operatória, os animais receberam dose intramuscular imediata do antibiótico Benzilpenicilina Benzatina (Benzetacil / 200.000 UI) e suplemento após seis dias. Na água, foram administradas seis gotas de analgésico (Dipirona)/ litro [40].

### 5.9.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Como protocolo experimental, os coelhos receberam os enxertos evitando a colocação de dois enxertos com composições iguais na mesma perna. As posições de instalação proximal (mais próxima à articulação do joelho) e distal (mais distante à articulação do joelho) receberam, de forma aleatória, cada composição sendo invertidas estas composições na perna oposta. O coelho denominado número 1 foi inicialmente operado como projeto piloto para verificar os procedimentos de instalação e possíveis infecções causadas pela presença do enxerto. As demais cirurgias foram realizadas após análise dos resultados obtidos no piloto. O coelho denominado



número 8 recebeu os enxertos seqüencialmente (BIO 1 e BIO 3 do lado direito e BIO 2 e BIO 4 do lado esquerdo). Este animal foi utilizado para análise da osteointegração por meio de microscopia eletrônica de varredura.

A Tabela 5 mostra os detalhes do protocolo experimental.

**Tabela 5 – Protocolo experimental.**

Coelho	Região de instalação	Lado direito (tipo do vidro)	Lado esquerdo (tipo do vidro)
1		BIO4	BIO2
	Proximal	BIO1	BIO3
	Distal	BIO3	BIO1
	Proximal	BIO2	BIO4
	Distal	BIO4	BIO2
	Proximal	BIO2	BIO1
	Distal	BIO1	BIO2
	Proximal	BIO3	BIO4
	Distal	BIO4	BIO3
6	Proximal	BIO1	BIO4
	Distal	BIO4	BIO1
7	Proximal	BIO3	BIO2
	Distal	BIO2	BIO3
8	Proximal	BIO1	BIO2
	Distal	BIO3	BIO4

#### 5.9.4. PROTOCOLO CIRÚRGICO

Esse estudo seguiu os procedimentos da Comissão de Ética de Pesquisas com Animais de acordo com o protocolo cirúrgico (Protocolo 97/2002). Após a tricotomia da região do joelho do coelho e assepsia com álcool iodado, os tecidos moles foram deslocados ântero-lateralmente, permanecendo estabilizados sobre o osso da tíbia pela mão esquerda, para impedir a sua movimentação durante a incisão. Esta manobra também afastou a sutura da área de intervenção no tecido ósseo. O bisturi foi introduzido perpendicularmente à pele e aprofundado pelo celular subcutâneo, fáscia e periósteeo, até atingir o plano ósseo. Subseqüentemente, o bisturi foi angulado em 45<sup>o</sup>, e realizada incisão retilínea, com movimento preciso e único, estendida de superior para inferior em cerca de 5,0cm paralelamente ao longo eixo da porção medial da tíbia. A incisão permitiu a elaboração de retalho total, e elevação do periósteeo, visando garantir o acesso e a visão à área de intervenção óssea, bem como a obtenção de uma boa hemostasia. A incisão foi obtida por meio de bisturi do tipo Bard-Parker número 03, portando lâmina número 15 de aço carbono (FEATHER, JAPÃO), empunhado em forma de pena de escrever. Os tecidos moles foram elevados pelo descolador de FREER e a hemostasia foi obtida pela compressão dos tecidos com gaze. O leito de inserção dos enxertos foi preparado com brocas seriadas de diâmetros sucessivos de 2,0; 3,1 e 3,15mm e o enxerto foi instalado manualmente. Após a instalação, foi realizada a síntese de plano por plano com suturas interrompidas. A fáscia foi suturada juntamente com o periósteeo no plano profundo, e o celular subcutâneo com a pele no plano superficial. Os tecidos isentos de tensão foram reunidos com as margens teciduais perfeitamente coaptadas para eximir espaços mortos nos planos profundos, que pudessem gerar acúmulo de sangue,

possível hematoma e complicações na cicatrização. A sutura foi realizada com agulha atraumática em semi-círculo, com curvatura pequena de 1,7cm e fio acoplado de mononylon 3-0 de 45cm (BIODINÂMICA), via porta agulha de MATHIEU empunhado pela mão direita e pinça dente de rato, segura pela mão esquerda. A opção pelo uso do nylon visou minimizar qualquer tipo de inflamação nas áreas operadas e, por consequência, interferências na cicatrização tecidual. Quanto aos nós de sutura, as extremidades do fio foram atadas por meio de três séries seqüenciais de nós duplos, para garantir a sua eficácia.

#### 5.10. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após o período de cicatrização de oito semanas, os animais foram sacrificados com alta dose de Ketamina (7ml/animal). Os tecidos moles foram dissecados e um bloco, contendo os enxertos, foi removido por meio de serra manual e mantido imerso em solução neutra de formalina a 10% durante 30 dias. Após a fixação, as amostras foram lavadas em água corrente por 12 horas e desidratadas em diferentes soluções de etanol por períodos consecutivos de 24 horas de acordo com a Tabela 6.

**Tabela 6** – Série de álcoois para a desidratação.

Seqüência	Concentração
1	70%
2	80%
3	90%
4	96%
5	100%

Após a desidratação, as amostras permaneceram em agitador (EXAKT 510 DEHYDRATION AND INFILTRATION SYSTEM – IKA SCHUETTLER 510 HS 501 DIGITAL)<sup>6</sup> com diferentes concentrações de resina plástica Technovit 7200 VCL (KULTZER & Co, Wehrhein, Germany) dissolvida em álcool absoluto (etanol) para infiltração desta solução no interior da cavidade medular dos blocos ósseos. A Tabela 7 mostra as diferentes soluções utilizadas durante o procedimento de embebição.

**Tabela 7 – Procedimento de embebição [41].**

<b>Solução</b>	<b>Tempo seqüencial (horas)</b>
30% Technovit + 70% Etanol	72
50% Technovit + 50% Etanol	72
70% Technovit + 30% Etanol	72
100% Technovit	72
100% Technovit	72

Após este procedimento, as amostras foram incluídas em recipientes apropriados, com os enxertos estáveis na parte inferior do recipiente e o longo eixo paralelo ao plano horizontal. Os recipientes foram preenchidos com resina plástica Technovit 7200 VCL e mantidos em equipamento para polimerização da resina (EXAKT 520 LIGHT POLYMERIZATION UNIT) permanecendo 3 horas sob luz branca e 96 horas sob luz azul.

As amostras, após completa polimerização da resina, foram retiradas dos recipientes e seccionadas no sistema EXAKT (EXAKT 310 BAND SYSTEM)<sup>6</sup>, por

<sup>6</sup> Projeto FAPESP 96/10221-7

meio de lâmina de diamante em formato de fita circular (0,1 mm de espessura), refrigerada por jato de água e com carga aplicada de 200 g. De cada amostra foram realizadas quatro cortes do longo eixo do enxerto com 700  $\mu\text{m}$  de espessura. Estes cortes foram colados em lâminas de acrílico utilizando resina Technovit 7210 VCL (KULTZER & Co, Wehrhein, Germany) polimerizadas em equipamento de prensagem adesiva de precisão (EXAKT 401 VACUUM ADHESIVE PRESS). Estas lâminas foram lixadas e polidas em politriz (EXAKT 400 CS MICRO GRINDING SYSTEM) utilizando lixas de carbo de silício com granulações 500, 800, 1000, 1200, 2000, 2400 e 4000 mesh para ajustar a espessura de 30 $\mu\text{m}$  [41].

### **5.11. MÉTODO MORFOMÉTRICO**

Durante o período de cicatrização de oito semanas foram administrados marcadores ósseos de união à apatita nos tecidos subcutâneos para determinar o processo de formação óssea pós-operatório, bem como para quantificar a deposição óssea em área na interface enxerto/tecido remodelado. Para a aplicação, os marcadores em forma de pó foram pesados em balança analítica (METTLER TOLEDO AG245) com precisão de 0,01 mg e diluídos em soro fisiológico e solução tampão de  $\text{NaHCO}_3$ . Iniciando no 14º dia após a cirurgia, o coelho recebeu semanalmente injeção subcutânea de marcadores fluorescentes – tetraciclina, alizarina e calceína. A seqüência dos marcadores esta mostrada na Tabela 8.

**Tabela 8** – Seqüência de injeção dos marcadores fluorescentes [42-43].

Pós-cirurgia (dias)	Marcador	Injetado (Kg)
14	Tetraciclina	60g + 1ml soro + 2g NaHCO <sub>3</sub>
21	Tetraciclina	60g + 1ml soro + 2g NaHCO <sub>3</sub>
28	Alizarina	30g + 1ml soro + 2g NaHCO <sub>3</sub>
35	Alizarina	30g + 1ml soro + 2g NaHCO <sub>3</sub>
42	Calceína	10g + 1ml soro + 2g NaHCO <sub>3</sub>
49	Calceína	10g + 1ml soro + 2g NaHCO <sub>3</sub>
56	Sacrifício	

A ordem de aplicação dos marcadores foi preconizada aleatoriamente e mantida constante em todos os animais durante o período de cicatrização.

Foram selecionadas dez amostras de cada tipo de enxerto (lâmina) para esta análise. Foram consideradas quatro regiões de cada lâmina para estudo: - região da cortical na interface com o enxerto (lado esquerdo e direito) denominadas região I e II, respectivamente e a região medular na interface com o enxerto (lado esquerdo e direito) denominadas regiões III e IV, respectivamente. A quantificação foi realizada em fotografias digitalizadas obtidas com o auxílio de microscópio de fluorescência (NIKKON ECLIPSE E1000) acoplado a câmera digital (MIDIA CYBERNETICS<sup>7</sup>) e programa de computador (IMAGE PRO PLUS V. 4.5) [44] conectado a um

computador IBM. O programa permite selecionar os três marcadores teciduais utilizados por meio da diferença da intensidade dos “pixels”. O processo é iniciado com a calibração do programa por meio de régua milimetrada para a lente objetiva selecionada (10X). Definiu-se uma classe correspondente para cada marcador: alizarina classe cor amarela, calceína classe cor verde e tetraciclina classe cor vermelha. Em seguida, estas classes foram associadas às colorações relacionadas aos marcadores teciduais obtidas nas fotografias, criando uma graduação de cores (definida como dicionário de cores). A seguir, selecionou-se e delimitou-se a área a ser quantificada e associou-se às classes definidas previamente. O programa classifica automaticamente as áreas, permitindo ajuste manual caso haja necessidade. Desta maneira, a área de cada marcador foi quantificada pelo programa em cada região analisada. A morfometria foi realizada a partir dos dados obtidos para cada marcador e amostra. Os valores foram somados obtendo-se a área total de tecido neoformado em cada enxerto. As médias de deposição foram analisadas por meio da análise de variância utilizando o programa de computador GMC versão 7.7 a fim de testarem-se duas hipóteses:  $H_0$  (todas as médias são iguais) e  $H_1$  (pelo menos uma das médias é diferente das demais). O contraste de significância existente entre mais de duas médias foi estabelecido pelo Teste de Tukey.

### 5.12. MÉTODO DO AZUL DE TOLUIDINA

Para revelar as células dos tecidos na interface com o enxerto, as lâminas foram coradas com azul de toluidina e analisadas em microscópio de luz (NIKKON ECLIPSE E-1000) acoplado a uma câmera digital (MIDIA CYBERNETICS<sup>8</sup>) e com o auxílio de um programa (IMAGE PRO PLUS V. 4.5) instalado em um computador IBM. A metodologia para a coloração é iniciada com a hidratação das lâminas em uma série de álcoois etílicos iniciando em graduação absoluta (100%), passando por graduações 96, 90, 80 e 70% durante 2 min em cada solução; em seguida, as lâminas são coradas na solução de azul de toluidina (0,5g de azul de toluidina diluída em 100ml de água destilada) por 25 min. As lâminas são então lavadas em água corrente durante 2 min para retirar o excesso de corante.

### 5.13. MÉTODO DE LUZ POLARIZADA

As lâminas, isentas de tratamento químico, foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz (ZEISS MC80DX/AXIOSCOP2) com filtro para polarização<sup>9</sup>. Na análise da birrefringência, o colágeno desvia o plano de luz polarizada e permite a visão da orientação dos seus feixes, ou seja, a distribuição lamelar e concêntrica [45-47].

---

<sup>8</sup> Laboratório de Neurociências do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas - USP

<sup>9</sup> Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas – USP



#### **5.14. MÉTODO DE PICO-SÍRIUS**

Para verificar o tipo de colágeno existente nas proximidades do enxerto instalado, as lâminas foram coradas com picro-sírius e analisadas em microscópio de luz (ZEISS MC80DX/AXIOSCOP2) com filtro para polarização. A metodologia para a coloração é iniciada com a hidratação das lâminas em série de álcoois etílicos iniciando em graduação absoluta (100%), passando por graduações 96, 90, 80 e 70% durante 2 min em cada solução; em seguida as lâminas são lavadas em água destilada e coradas na solução de picro-sírius (0,1 g de picro-sírius diluído em 100 ml de água destilada). Após este procedimento, as lâminas são imersas em ácido clorídrico durante 45 min, sendo em seguida lavadas em água destilada. As lâminas são então desidratadas em álcool com graduações 70, 80, 90, 96 e absoluto (100%) [48-50].

#### **5.15. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

A fim de determinar a anatomia do osso formado nas proximidades do enxerto, bem como estudar o nível de integração na interface osso/vidro foi utilizado microscópio eletrônico de varredura Philips modelo XL 30<sup>10</sup> acoplado a equipamento para análise por espectroscopia de energia dispersiva. As amostras foram removidas juntamente com o tecido ósseo circundante, e fixadas em solução Karnovsky. Após a fixação, as amostras foram lavadas em água corrente por 2 h, e em seguida foi realizada a desidratação na seguinte série de álcool etílico com graduações: 70, 80,

---

<sup>10</sup> Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura - IPEN

90, 96 e absoluto (100%). Para evitar o carregamento eletrônico no material, as amostras foram imersas em solução de tetróxido de ósmio 2% por 2 h e depois secas pelo método do ponto crítico (Baltec, CPD 030). A montagem do material foi realizada em base de alumínio e o conjunto foi recoberto com camada de ouro-paládio por meio da técnica de “sputtering” (Balzers Union, SCD)<sup>11</sup>.

### 5.16. ENSAIO DE COMPRESSÃO DIAMETRAL

A simplicidade de execução do ensaio de compressão diametral, a facilidade de obtenção de amostras vítreas com geometria cilíndrica pelo processo de fusão e lingotamento em molde e a relativa simplicidade de polimento das amostras tornam atrativa a avaliação da tensão de fratura por meio deste ensaio. Porém, o formalismo matemático para calcular a tensão máxima de fratura requer certas aproximações devido a complexidade do perfil de tensões que atuam no corpo de prova durante o ensaio [51].

A medida da força de ruptura permite determinar a tensão limite de resistência à tração, ou seja, a tensão de tração de ruptura, de acordo com a Equação 3 [52]

$$\sigma_{M} = \left[ \frac{2P}{\pi DL} \right] \quad [3]$$

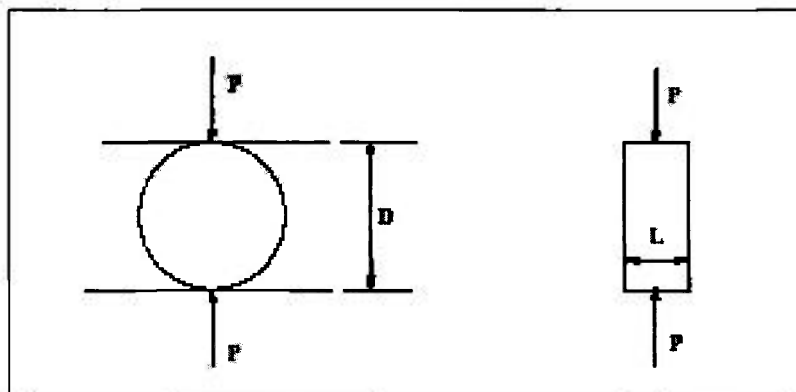
onde:

---

<sup>11</sup> Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas – USP.

$\sigma_M$  é a tensão limite de resistência à tração [MPa],  $P$  é a carga de ruptura [N],  $D$  é o diâmetro [mm] do corpo de prova cilíndrico com espessura  $L$  [mm].

A Figura 4 mostra o esquema do método de ensaio de compressão diametral baseado nas normas ABNT MB-212/58 [53] e NBR-7222/83 [54].

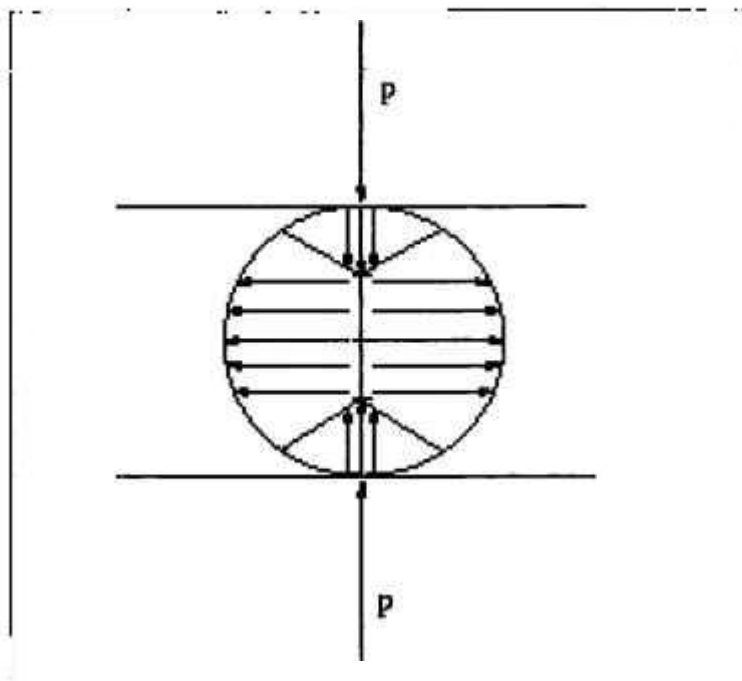


**Figura 4** – Esquema de esforços aplicados em um corpo de prova cilíndrico de dimensões  $D$  e  $L$  [52].

O efeito do diâmetro e da espessura das amostras na determinação da resistência mecânica foi verificado por Price [55]; para razões  $L/D$  na faixa de 0,3 a 1,5, os valores de resistência mecânica não foram influenciados pela geometria das amostras neste intervalo.

A principal dificuldade para realizar o ensaio de compressão diametral é assegurar a perfeita distribuição da carga em toda a linha de aplicação, ou seja, o corpo de prova deve ter uma perfeita geometria cilíndrica e ser isento de qualquer rugosidade superficial [56].

A Figura 5 representa esquematicamente as distribuições de tensões durante a realização do ensaio de compressão diametral.



**Figura 5** – Representação esquemática da distribuição das tensões de compressão e de tração [52].

Para este ensaio, amostras cilíndricas com 8 mm de diâmetro por 20 mm de espessura foram conformadas em molde metálico. Após passar por um processo de recozimento, as amostras foram cortadas com serra de fita nas dimensões adequadas, lixadas e polidas com lixas com granulações 800, 1000, 1200 e 2000 mesh. Durante este processo, para garantir o paralelismo entre as duas faces, as amostras foram fixadas no próprio molde metálico. Os corpos de prova com dimensões 8 mm de diâmetro por 9 mm de espessura foram ensaiados em prensa (KRATOS - 5002)<sup>12</sup> utilizando escala de carregamento de 1 ton e velocidade de ensaio de 20 mm/min. Os corpos de provas foram envoltos por fina folha de papel com o objetivo de melhorar a distribuição da carga aplicada.

<sup>12</sup> Laboratório de biomecânica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia – Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina – USP.

### 5.17. ENSAIO DE FLEXÃO

O ensaio de flexão é geralmente realizado objetivando reproduzir no laboratório as condições funcionais. Desse modo, é possível realizar estes ensaios por diferentes modos, desde que a peça possa ser adaptada diretamente em uma prensa comum. Materiais frágeis, como vidros, ferro fundido cinzento, aços-ferramenta ou carbonetos sinterizados, são freqüentemente submetidos a um tipo de ensaio de dobramento, denominado dobramento transversal, que mede sua resistência e ductilidade (além da possibilidade de se avaliar também a tenacidade e resiliência desses materiais). Entretanto, sempre que possível, o ensaio de tração também deve ser realizado tornando o dobramento transversal um ensaio alternativo. Quanto maior a dureza do material, mais eficaz será esse ensaio, pois a facilidade de execução torna-o mais rápido que a usinagem de um corpo de prova para o ensaio de tração. No entanto, para materiais muito frágeis os resultados obtidos são muito divergentes, com espalhamento de valores em até 25%. Portanto, nesses casos deve-se sempre realizar vários ensaios para a determinação de um valor médio [52].

Significado de flexão:

Flexão é a solicitação mecânica que tende a modificar a direção do eixo geométrico da peça.

A flexão de uma barra pode ser obtida nas seguintes condições:

1. A barra pode ter suas duas extremidades engastadas;
2. Duas extremidades apoiadas;
3. Uma extremidade engastada e outra apoiada;
4. Uma extremidade em balanço;

Por outro lado, a carga defletora pode ser:

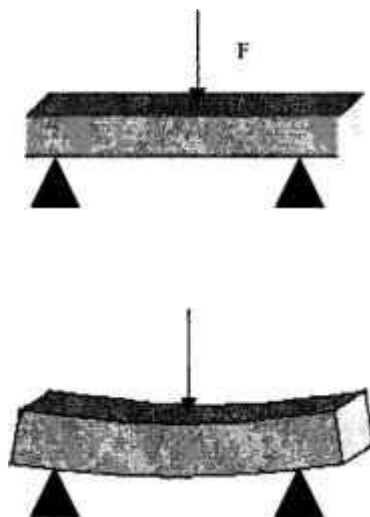
- Concentrada ou distribuída;

- Aplicada numa das extremidades;
- Aplicada no meio ou em um ponto qualquer.

Além disso, a barra pode ser vertical ou horizontal. Os casos mais simples são:

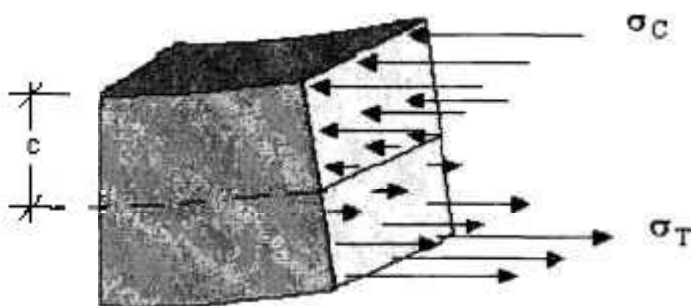
- Flexão plana circular;
- Flexão plana normal.

Quando se tem uma barra de secção retangular de comprimento “L”, comprimento “a”, e largura “b” da secção normal, e uma força cortante “F” é aplicada no centro, os elementos internos da barra estarão sujeitos a tensões de compressão e tração, mas há um plano em que a tensão resultante é nula. Este plano geralmente é denominado de linha neutra. A Figura 6 representa o ensaio de flexão em barra de secção retangular.



**Figura 6** – Representação esquemática do ensaio de flexão de uma barra de secção retangular [52].

A Figura 7 representa esquematicamente os elementos da barra de secção transversal submetidos à flexão.



**Figura 7** - Elemento da barra submetido à flexão [52].  $\sigma_c$  – tensão de compressão e  $\sigma_t$  – tensão de tração.

A tensão fletora é dada pela Equação 4.

$$\sigma = \pm \frac{M_f \cdot c}{I} \quad (4)$$

onde  $\sigma$  a tensão fletora (tensão normal de compressão ou de tração),  $M_f$  é o momento fletor,  $I$  é o momento de inércia da secção transversal e  $c$  é a distância da linha neutra à fibra mais afastada. O sinal positivo e negativo corresponde as tensões de tração e de compressão, respectivamente.

Na "**linha neutra**", vista sob um plano, a tensão resultante é nula.

No caso de flexão pura, como o caso descrito acima, a linha neutra assume a forma de um arco de uma circunferência num plano onde cada secção infinitesimal da barra está em equilíbrio sob a ação de momentos fletores iguais e opostos, de módulo  $M_f$ . A flecha "f" do arco de circunferência (deflexão da barra) é dada pela Equação 5

$$f = \frac{1}{48} \cdot \frac{F \cdot L}{E \cdot I} \quad (5)$$

onde: "f" (deflexão) é medida para cada carga F aplicada, "E" é o módulo de elasticidade longitudinal ou módulo de Young, "I" é o módulo de flexão plana ou momento de inércia próprio de cada perfil de peça. Quanto maior o momento de inércia da secção retangular, menor será a flexão para um dado material e um determinado momento fletor. Isto significa que a posição da viga tem grande influência na resistência a flexão.



Na primeira deformação dentro do campo limitado de deformações, os corpos sólidos reais obedecem à lei de Hooke. As deformações perfeitamente elásticas, em geral, só ocorrem no início do processo. Com o tempo, o esforço e a deformação atingem valores assintóticos, podendo haver a ruptura do material, a fadiga, ou a variação da sua tensão elástica. Após a aplicação sucessiva de esforços de tração ou compressão, permanece uma deformação residual; o efeito de esfoliação ou clivagem ocorre em placas em determinadas direções e em certos materiais cristalinos, como, por exemplo, a calcita e a mica. No dimensionamento das peças que serão submetidas aos ensaios de flexão admitem-se apenas deformações elásticas. A tensão de trabalho é fixada pelo fator de segurança ou pela tensão admissível. A fórmula da tensão é aplicada nas secções onde pode haver ruptura do material, ou seja, nas regiões que se tem momento fletor máximo que produzirá tensões de compressão e de trações máximas, a qual poderá ser superior a tensão de resistência do material. O momento de inércia da secção retangular, segundo um sistema de eixo cartesiano "YZ", é dado pela Equação 6:

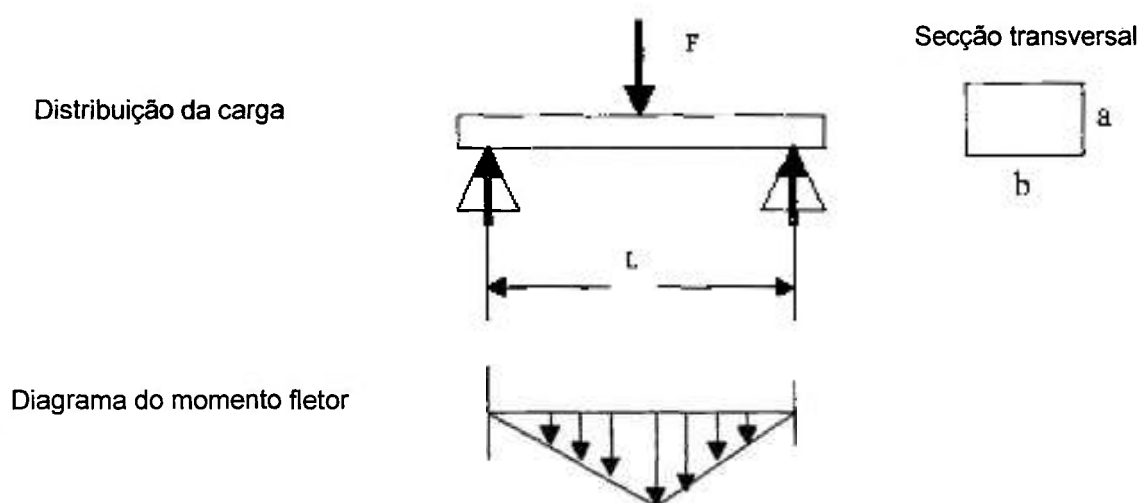
$$I_y = \frac{a.b^3}{12} \quad (6)$$

em relação ao eixo Y e pela Equação 7:

$$I_z = \frac{b.a^3}{12} \quad (7)$$

em relação ao eixo Z.

A resistência à flexão é definida como a tensão máxima de tração na ruptura e é denominado freqüentemente como módulo de ruptura, “MOR”, do acrônimo em inglês “*modulus of rupture*” [57, 58]. A resistência à flexão é determinada por meio das fórmulas anteriormente descritas e envolve cálculos de resistência dos materiais para a determinação do momento fletor máximo. Utiliza-se dois ensaios: o ensaio à três pontos, e o ensaio a quatro pontos. A Figura 8 representa esquematicamente o ensaio a três pontos.



**Figura 8** – Representação esquemática do ensaio de flexão a três pontos [52].

Para uma secção transversal retangular com dimensões a e b, o módulo de ruptura é dado pela Equação 8 [58]:

$$MOR = \frac{3 F.L}{2 b.a^2} \quad (8)$$

O ensaio de flexão é realizado, geralmente, com um corpo de prova constituído por uma barra de secção circular ou retangular para facilitar os cálculos, com comprimento especificado. O ensaio consiste em apoiar o corpo de prova sob dois apoios distanciados entre si por uma distancia “L”, sendo a carga de flexão aplicada no centro do corpo de prova a distância L/2 de cada apoio (ensaio a três pontos). A carga deve ser aumentada lentamente até romper o corpo de prova. A partir deste ensaio, pode-se também inferir outras propriedades do material, como o módulo de ruptura “MOR” ou resistência a flexão, que é o valor máximo da tensão de tração ou compressão nas fibras extremas do corpo de prova durante o ensaio de flexão (ou torção). Se a ruptura ocorrer dentro da zona elástica do material, o MOR representará a tensão máxima na fibra externa; caso ocorra na zona plástica, o valor do MOR é maior que a tensão máxima efetivamente atingida, pois a expressão é determinada pela distribuição linear (elástica) de tensão entre o eixo da barra e as fibras externas. O valor do módulo de ruptura também pode ser relacionado com o limite de resistência do material. O módulo de elasticidade do material também pode ser determinado a partir da Equação 5.

Para este ensaio, amostras com dimensões  $5 \times 3,5 \times 25 \text{mm}^3$  foram conformados em molde metálico pré aquecido a  $200^\circ\text{C}$ . Após recozimento, os vidros foram lixados e polidos com lixas com granulometria 800, 1000, 1200 e 2000 mesh. Os corpos de prova foram ensaiados em prensa (KRATOS - 5002)<sup>13</sup> utilizando escala de carregamento de 1 ton e velocidade de ensaio de 10 mm/min e a distância entre apoios igual a 20mm.

---

<sup>13</sup> Laboratório de biomecânica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia – Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina – USP.

## 5.18. MICRODUREZA

Para determinação da microdureza Vickers, medidas foram efetuadas em microdurometro BULHER MICROMET 2103<sup>14</sup>, com dispositivo de leitura semi-automático; a carga empregada em todas as medidas foi de 10 gf durante 20 s. Esta carga foi determinada experimentalmente após utilizar uma carga de 1 gf que não permitiu a penetração do penetrador no corpo de prova e 50 gf que produziu trincas nos vértices da indentação [59, 60].

Para este ensaio, amostras com secção transversal retangular de 10x10x35mm<sup>3</sup> foram conformados em molde metálico pré-aquecido a 500<sup>0</sup>C. Após recozimento, os vidros foram lixados e polidos com lixas com granulometria 800, 1000, 1200, 2000, 2400 e 4000 mesh.

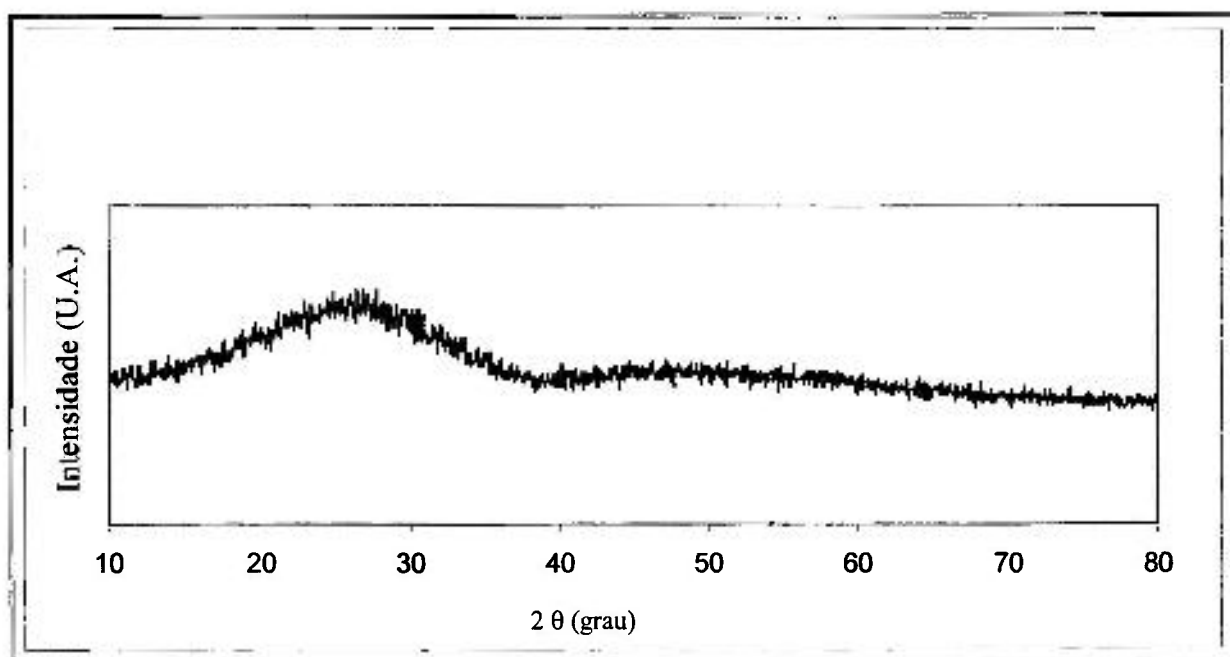
---

<sup>14</sup> Laboratório de Ensaios Mecânicos – Engenharia Mecânica – Escola Politécnica - USP

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

A Figura 9 mostra o difratograma de raios x da amostra BIO1 com 8% em mol de óxido de nióbio. As demais amostras (BIO2, BIO3 e BIO4) apresentam difratogramas semelhantes.



**Figura 9** – Difratograma de raios X para a amostra contendo 8% em mol de nióbio.

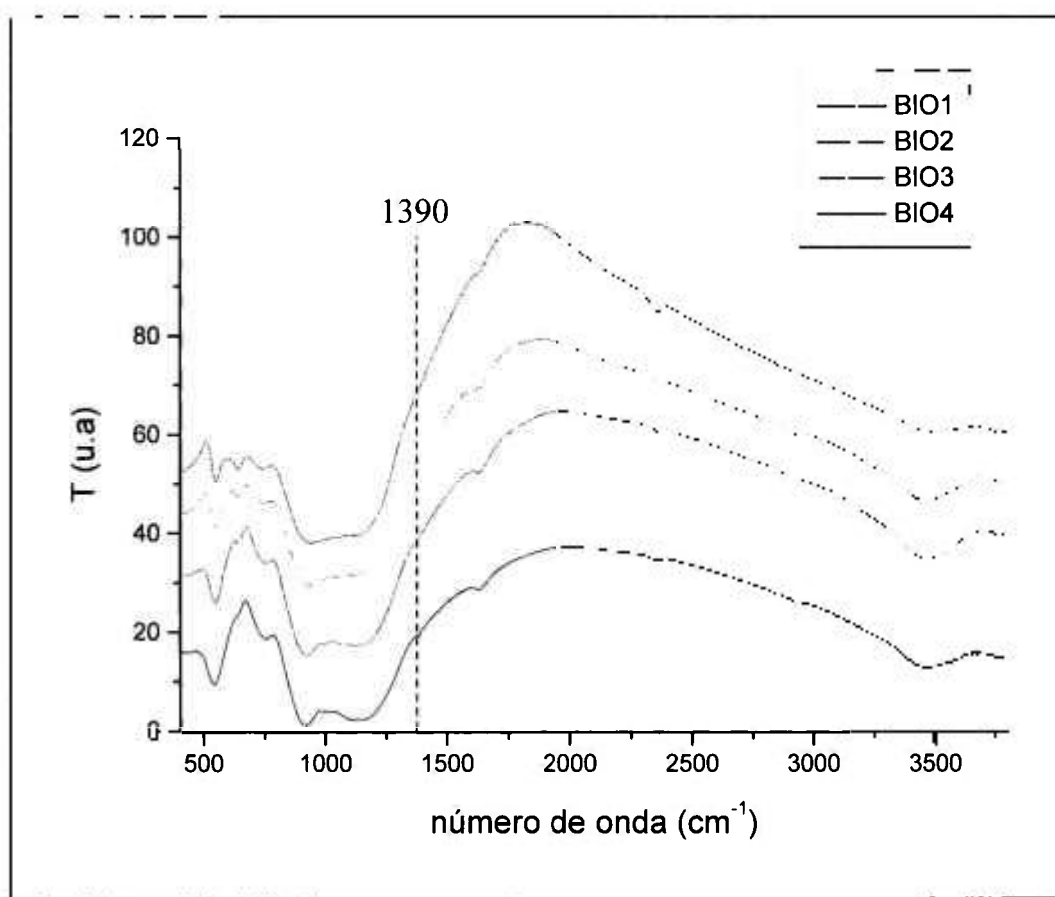
Pode-se observar no difratograma de raios X, halos característicos de materiais que não possuem ordem estrutural atômica à longa distância, ou seja, o difratograma é característico de um material amorfo. Não há indicação da presença de fases cristalinas. Mesmo com o aumento do teor de óxido de nióbio, não há indicação de cristalização destes materiais, mantendo-se as mesmas condições experimentais.

Como decorrência das análises de DRX, propôs-se o estudo da capacidade de osteointegração destes vidros, pois são materiais homogêneos e não apresentam

fases cristalinas dispersas que poderiam influenciar as propriedades mecânicas destes materiais.

## 6.2. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

A Figura 10 apresenta os espectros de transmitância no infravermelho para amostras com teores de óxido de nióbio de 8, 10, 13 e 15% em mol.



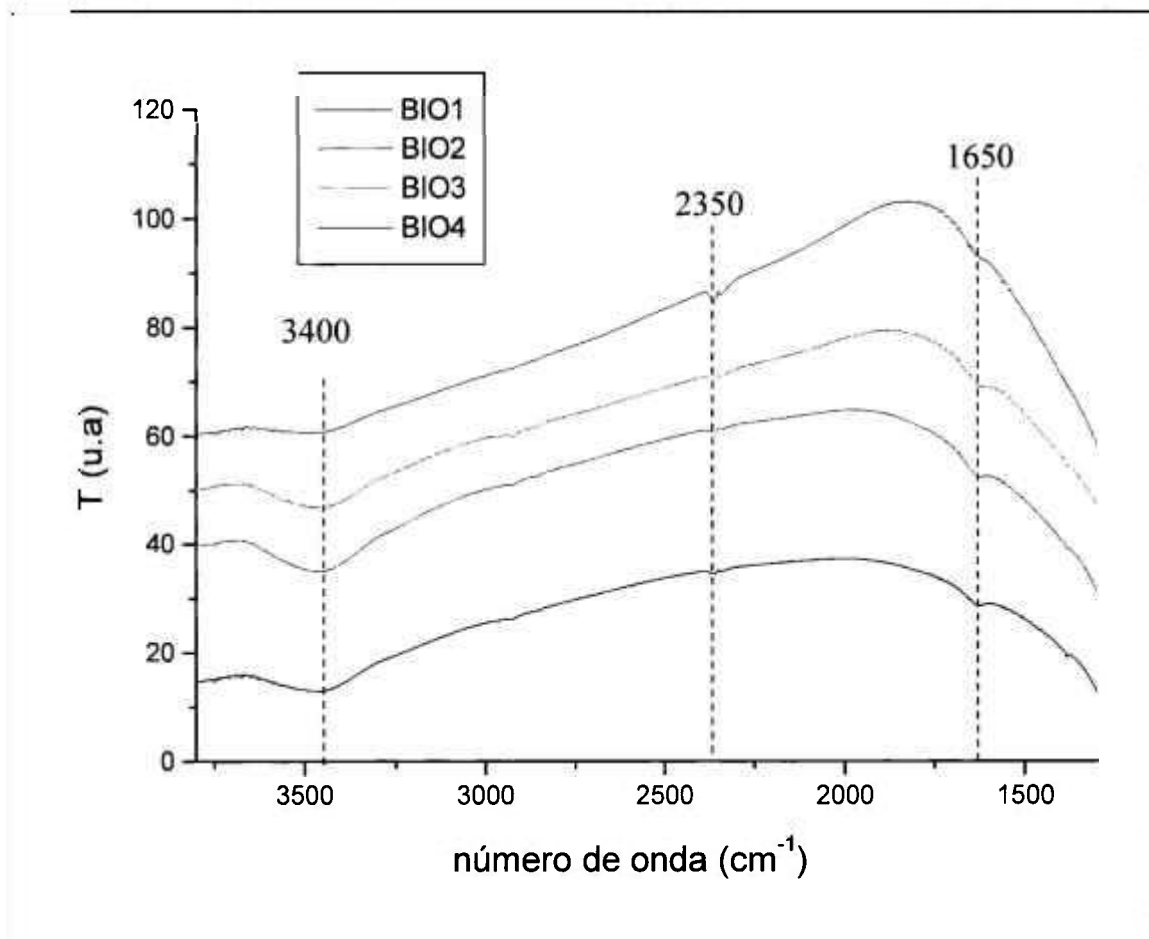
**Figura 10** – Espectros de transmitância no infravermelho para amostras contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.

As bandas relacionadas ao número de onda no intervalo de 500 cm<sup>-1</sup> a 1200 cm<sup>-1</sup> (infravermelho longo) nos fornecem informações a respeito dos grupos atômicos

na estrutura vítrea. As bandas relacionadas ao número de onda no intervalo de 1200  $\text{cm}^{-1}$  a 3500  $\text{cm}^{-1}$  (infravermelho curto) estão relacionadas à presença de  $\text{H}_m\text{O}_n$ .

Os vidros fosfatos apresentam estruturas fundamentais com coordenação tetraédrica e geralmente estes tetraedros apresentam uma ligação (P = O), caracterizada pela absorção centrada na região de 1390 $\text{cm}^{-1}$ . A introdução dos modificadores ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ) em teores relativamente elevados provoca a diminuição do caráter duplo desta ligação [32, 61]. Esta banda de absorção apresenta baixa intensidade e diminui com o aumento do teor de nióbio, evidenciando que a ligação P = O ocorre em pequeno número, mesmo para baixos teores de nióbio.

Os espectros FTIR foram separados de acordo com o número de onda (infravermelho curto ou longo) para melhor análise das bandas. A Figura 11 apresenta os espectros FTIR de transmitância no infravermelho curto para amostras contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.

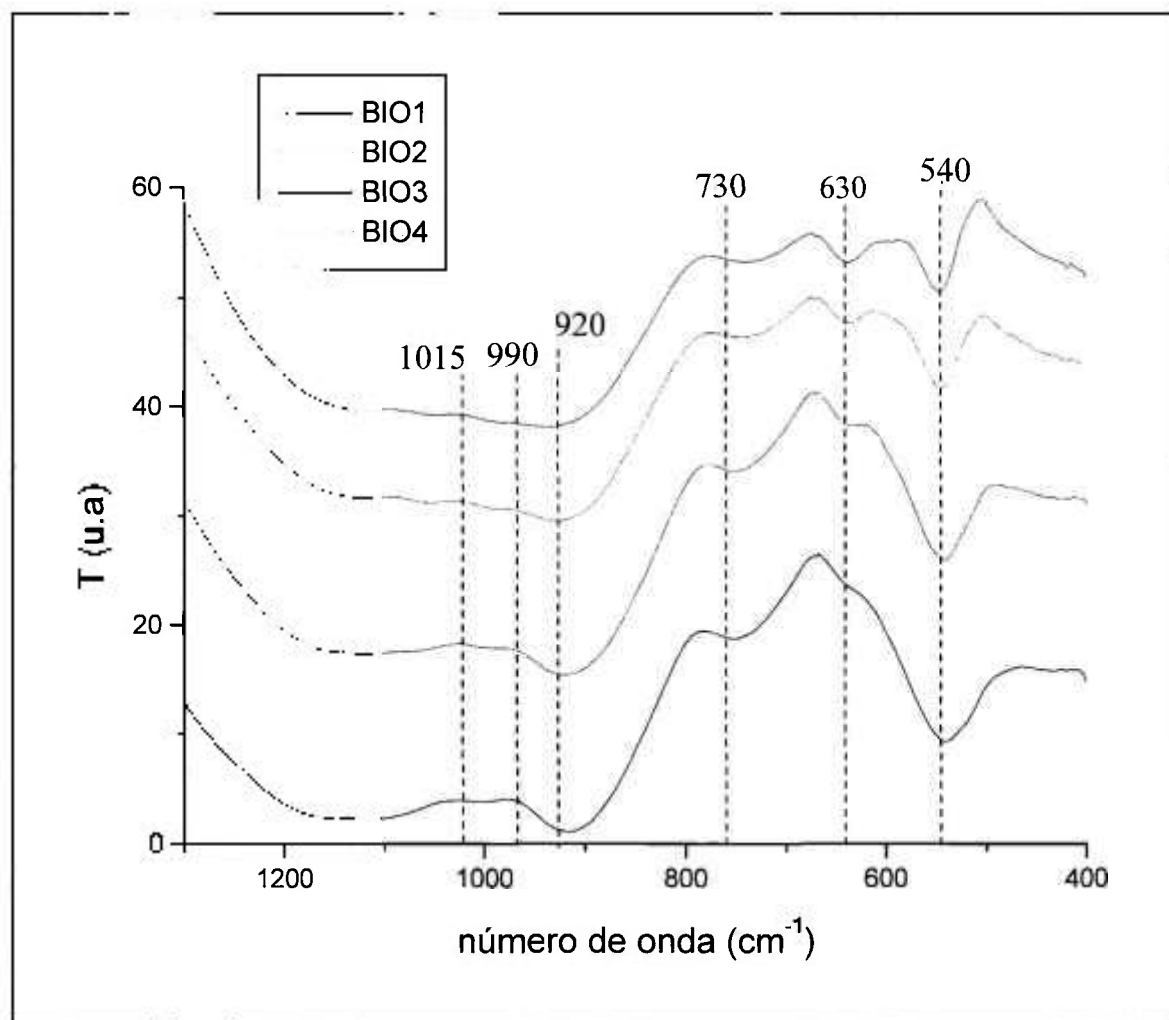


**Figura 11** – Espectros de transmitância no infravermelho curto para amostras contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.

Pode-se observar em  $3400\text{ cm}^{-1}$  uma banda cuja intensidade diminui à medida que o teor de óxido de nióbio é aumentado. Esta absorção é característica do ramo esquerdo e direito das vibrações e rotações da água. Estas moléculas de água encontram-se provavelmente na superfície do vidro absorvidas da atmosfera [32-33]. A banda de pequena intensidade em  $2350\text{ cm}^{-1}$  pode ser observada apenas nas amostras contendo 13 e 15% em mol de óxido de nióbio. Esta banda é atribuída à presença de  $\text{CO}_2$  retido na matriz vítrea [62]. O  $\text{CO}_2$  pode ser proveniente da decomposição do  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  utilizado como material precursor do vidro ou, mais provavelmente da adsorção de  $\text{CO}_2$  presente na atmosfera. A banda em  $1650\text{ cm}^{-1}$ ,



cuja intensidade também diminui à medida que o teor de óxido de nióbio é aumentado, esta associada com a presença de OH e H<sub>2</sub>O, devido às vibrações de deformação de H<sub>2</sub>O [61]. Esta banda indica a presença de água no sistema. As moléculas de água relacionadas a esta banda devem estar na forma de moléculas livres, provavelmente intersticiais, na estrutura vítrea, porém associadas por pontes de hidrogênio [32]. A Figura 12 apresenta os espectros FTIR no infravermelho longo para as amostras contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.



**Figura 12** – Espectros de transmitância no infravermelho longo para amostras contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.

A banda de absorção centrada em  $540\text{ cm}^{-1}$  esta relacionada ao modo acoplado envolvendo ligações O-Nb de média distância, vibração de deformação de ligações O-P-O de grupos  $(\text{PO}_4)^{3+}$  [63] e modo acoplado O-Nb-O-P [64]. Observa-se que a intensidade destas bandas aumenta para as composições contendo 8 e 10% em mol de óxido de nióbio e diminui para as composições contendo 13 e 15% em mol de óxido de nióbio. Este fato indica que os grupos envolvendo fósforo são os principais responsáveis pela intensidade destas bandas.

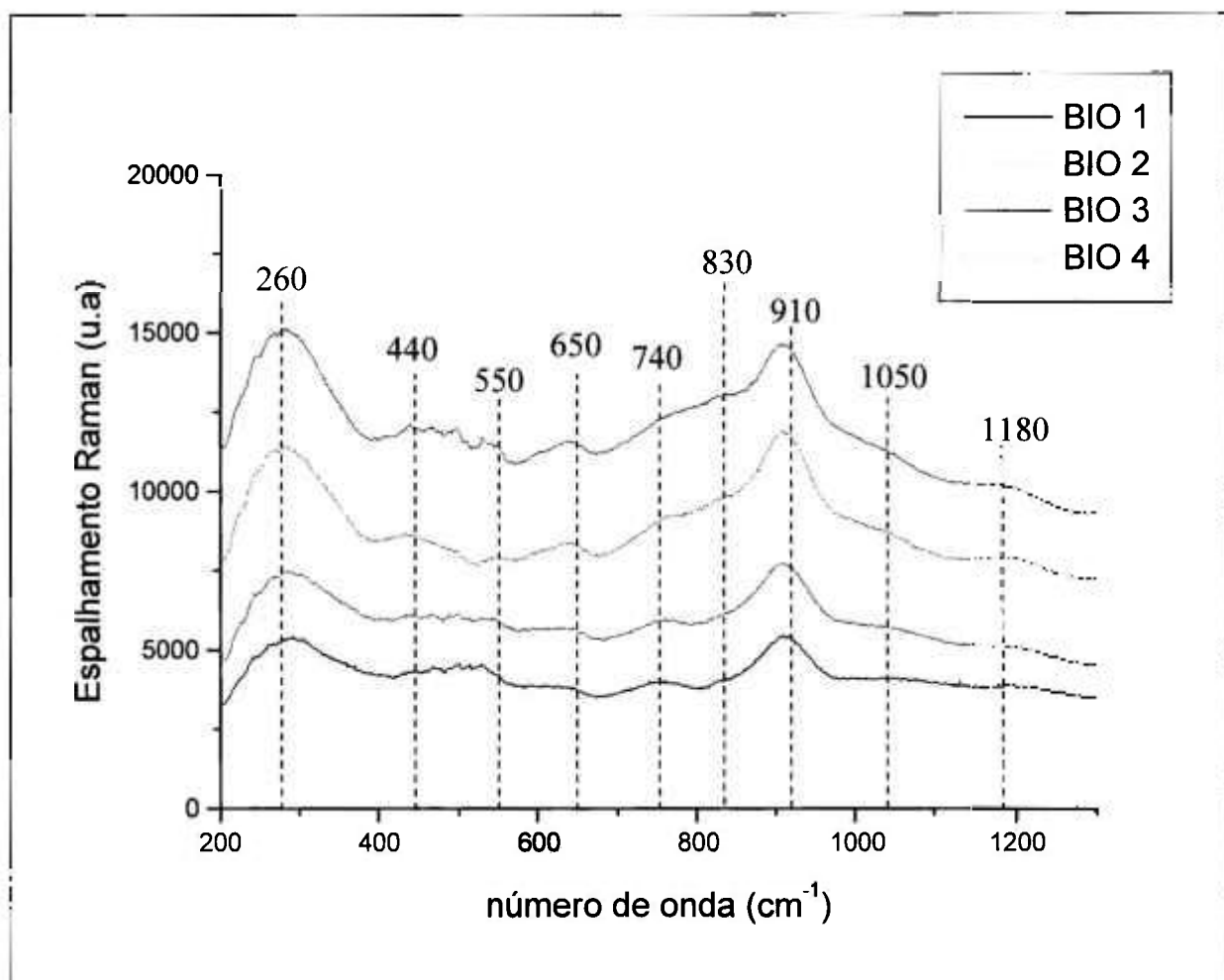
A banda centrada em torno de  $630\text{ cm}^{-1}$  indica a presença de octaedros  $\text{NbO}_6$  no sistema [34]. A intensidade desta banda aumenta em função do teor de óxido de nióbio. A banda centrada em  $730\text{ cm}^{-1}$  esta relacionada com a vibração de estiramento assimétrico e estiramento simétrico de grupos pirofosfatos ( $\text{Q}^1$ ) e sua intensidade aumenta em função do teor de óxido de nióbio [61].

A banda centrada em  $920\text{ cm}^{-1}$  esta relacionada com a vibração de estiramento assimétrico de grupos metafosfato ( $\text{Q}^2$ ) e sua intensidade diminui em função do teor de óxido de nióbio [33]. As bandas centradas em  $990$  e  $1015\text{ cm}^{-1}$  estão relacionadas com o grupo ortofosfato  $\text{Q}^0$  ( $\text{PO}_4$ )<sup>3-</sup> e suas intensidades aumentam em função do teor de óxido de nióbio.

### 6.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN

A Figura 13 apresenta os espectros Raman para vidros com teores de óxido de nióbio de 8, 10, 13 e 15% em mol. Observa-se nestes espectros uma banda localizada em torno de  $260\text{ cm}^{-1}$  que aumenta de intensidade em função do teor de óxido de nióbio. Esta banda está relacionada aos modos de deformação da ligação Nb-O-Nb em grupos octaédricos  $\text{NbO}_6$  [64]. A banda em  $440\text{ cm}^{-1}$  apresenta baixa

intensidade para as amostras contendo 8 e 10% de óxido de nióbio e aumento de intensidade para as amostras contendo 13 e 15% de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ . Esta banda está associada aos modos acoplados O-Nb-O e O-P-O já previamente observados em sistemas similares [64]. A banda localizada em  $550\text{cm}^{-1}$  apresenta baixa intensidade transformando-se em ombro com o aumento do teor de óxido de nióbio. Esta banda está relacionada com os grupos fosfatos.



**Figura 13** – Espectros Raman para vidros contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.

A banda localizada em  $650\text{cm}^{-1}$  apresenta intensidade baixa para a amostra contendo 8% mol de óxido de nióbio. Aumentando-se o teor de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ , esta banda aumenta de intensidade, tornando-se evidente para composições contendo 13 e 15% mol de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ . Esta banda está relacionada com as ligações Nb-O [32].

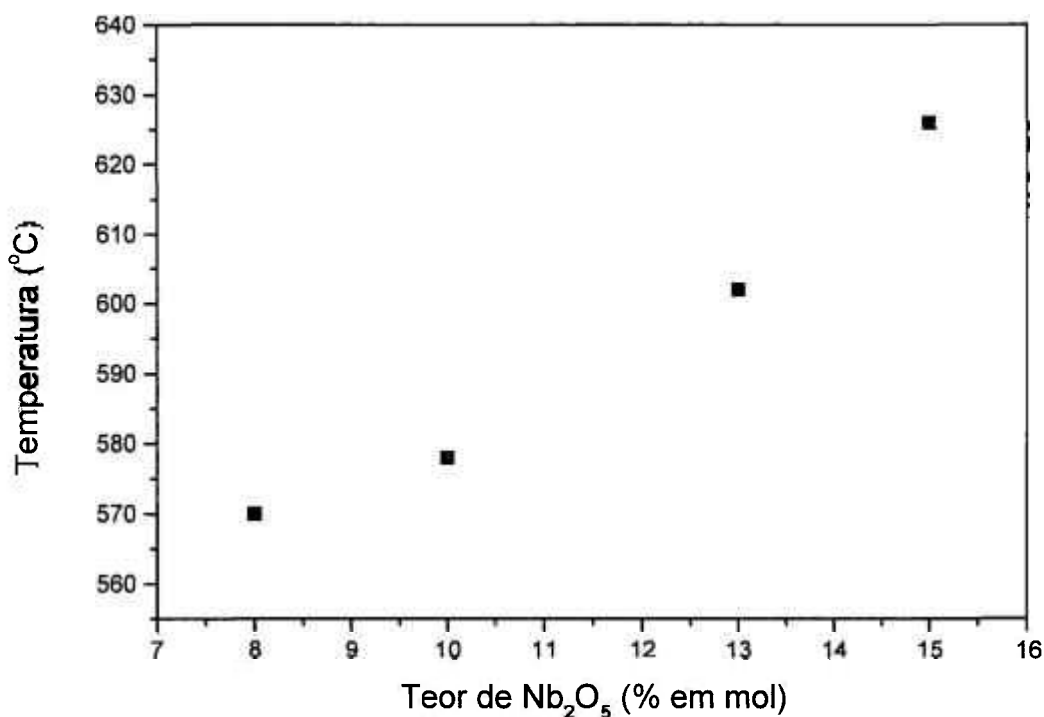
A banda localizada em  $740\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída às vibrações de estiramento simétrico das ligações P-O-P de cadeias metafosfato [33]. Esta banda diminui de intensidade com o aumento de teor de óxido de nióbio e praticamente desaparece para vidros contendo 13 e 15% mol de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ . Em  $830\text{cm}^{-1}$  observa-se a presença de uma banda que se transforma em um ombro à medida que aumenta-se o teor de óxido de nióbio. Esta banda está relacionada com as ligações Nb-O-Nb em estruturas octaédricas de  $\text{NbO}_6$  [32].

As bandas a  $910\text{cm}^{-1}$  e  $1050\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas às vibrações de estiramentos assimétricos de grupos  $Q^0$  ( $\text{PO}_4$ )<sup>3-</sup> e estiramento simétrico de grupos  $Q^1$  ( $\text{PO}_3$ )<sup>-</sup>, que aumentam de intensidade em função do aumento do teor de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ . O ombro localizado em  $1180\text{cm}^{-1}$ , mais intenso nas composições contendo 13 e 15% em mol de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ , pode ser atribuído às vibrações de estiramento simétrico de cadeias do grupo  $Q^2$  ( $\text{PO}_2$ ) [64].

Os resultados obtidos por espectroscopia Raman e FTIR estão de acordo com trabalhos anteriores [32,33] e permitem afirmar que os elementos fósforo e nióbio participam como formadores da estrutura destes vidros. As estruturas tetraédricas dos grupos fosfatos  $Q^n$  são quebradas e substituídas pelo óxido de nióbio na forma de octaedros formando esqueletos -O-P-O-Nb-O-Nb-O-P-O-.

#### 6.4. ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL

As temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ) foram determinadas por meio de análise térmica diferencial (ATD). A Figura 14 apresenta a  $T_g$  em função do teor de óxido de nióbio presente nos vidros fosfato.



**Figura 14** – Temperatura de transição vítrea em função do teor de óxido de nióbio.

Pode-se observar que com o aumento do teor de nióbio, há um aumento da temperatura de transição vítrea. Verifica-se a partir de 10% em mol de óxido de nióbio um incremento mais acentuado na variação da temperatura de transição vítrea quando comparado a teores de nióbio abaixo de 10% em mol. A determinação da  $T_g$  foi importante porque permitiu selecionar adequadamente a temperatura do recozimento realizado para diminuir as tensões residuais características do processo de resfriamento do vidro.

## 6.5. ENSAIO DE LIXIVIAÇÃO

As velocidades de dissolução determinadas durante os ensaios de lixiviação para as amostras contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de nióbio estão mostradas na Tabela 9.

**Tabela 9** – Velocidades de dissolução para vidros contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.

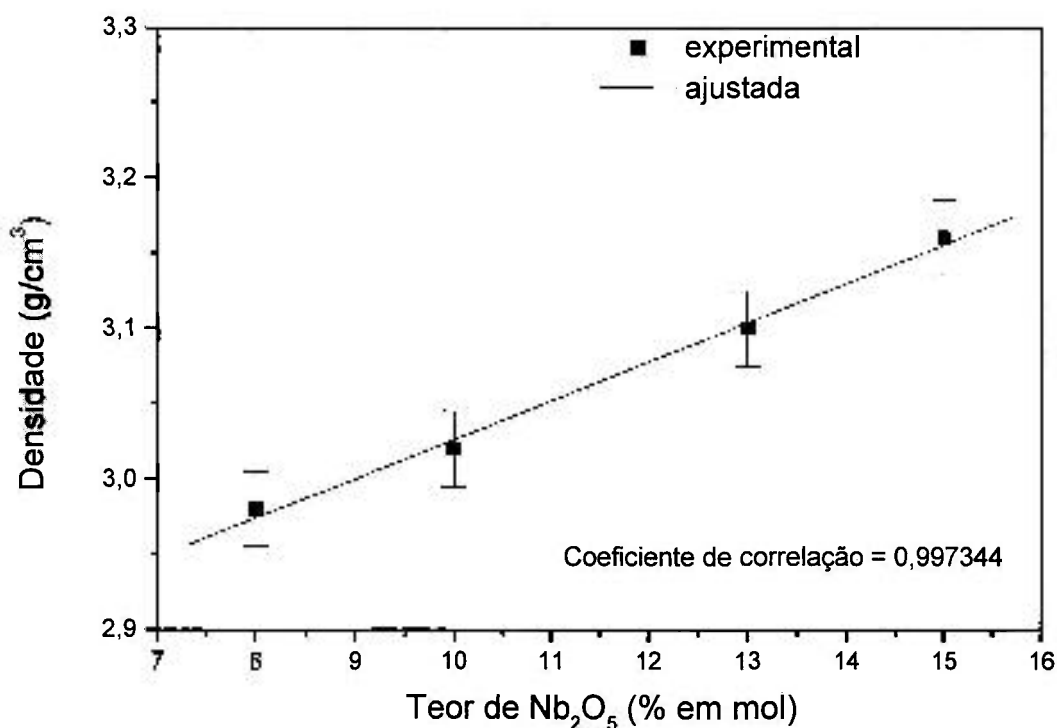
Tempo de imersão (dias)	BIO1 (g.cm <sup>-2</sup> .min <sup>-1</sup> )	BIO2 (g.cm <sup>-2</sup> .min <sup>-1</sup> )	BIO3 (g.cm <sup>-2</sup> .min <sup>-1</sup> )	BIO4 (g.cm <sup>-2</sup> .min <sup>-1</sup> )
1	12,4x10 <sup>-9</sup>	8,46x10 <sup>-9</sup>	5,79x10 <sup>-9</sup>	4,32x10 <sup>-9</sup>
3	42,0x10 <sup>-9</sup>	26,6x10 <sup>-9</sup>	15,7x10 <sup>-9</sup>	10,8x10 <sup>-9</sup>
7	88,6x10 <sup>-9</sup>	57,5x10 <sup>-9</sup>	26,1x10 <sup>-9</sup>	19,9x10 <sup>-9</sup>
14	206,0x10 <sup>-9</sup>	113,0x10 <sup>-9</sup>	61,9x10 <sup>-9</sup>	43,4x10 <sup>-9</sup>

Estes resultados indicam que o aumento do teor de nióbio aumenta a resistência à lixiviação do vidro. Este fato pode ser explicado pelos resultados obtidos a partir dos espectros FTIR e Raman que indicaram a atuação do elemento nióbio como formador da estrutura vítrea. Este elemento fortalece a estrutura vítrea por meio do aumento da força de ligação e do aumento do número de coordenação, conduzindo a uma estrutura mais rígida com maior resistência à lixiviação. Estes valores, quando comparados com a literatura [30, 65], são relativamente baixos mesmo em temperaturas de ensaio mais elevadas. Bunker et al. [65] apresenta como resultados dos testes de dissolução para sistemas vítreos do tipo 40Na<sub>2</sub>O-10CaO-

$50\text{P}_2\text{O}_5$  e  $30\text{Na}_2\text{O}-20\text{CaO}-50\text{P}_2\text{O}_5$  velocidades de dissolução iguais a  $5 \times 10^{-5}$  e  $3 \times 10^{-6}$   $\text{g.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ , respectivamente. Uo et al. [30] verificou que os sistemas vítreos contendo  $10\text{Na}_2\text{O}-20\text{CaO}-70\text{P}_2\text{O}_5$  apresenta como velocidade de dissolução  $6,5 \times 10^{-9}$   $\text{g.cm}^{-2}.\text{min}^{-1}$  a  $37^\circ\text{C}$ , porém este mesmo autor reporta que não foi possível obter vidros com teores de  $\text{P}_2\text{O}_5$  abaixo de 40% em mol com adição de  $\text{CaO}$ .

## 6.6. DENSIDADE

A Figura 15 apresenta a densidade dos vidros determinadas pelo método de Arquimedes em função do teor de óxido de nióbio. A reta desta figura foi ajustada pelo método dos mínimos quadrados.



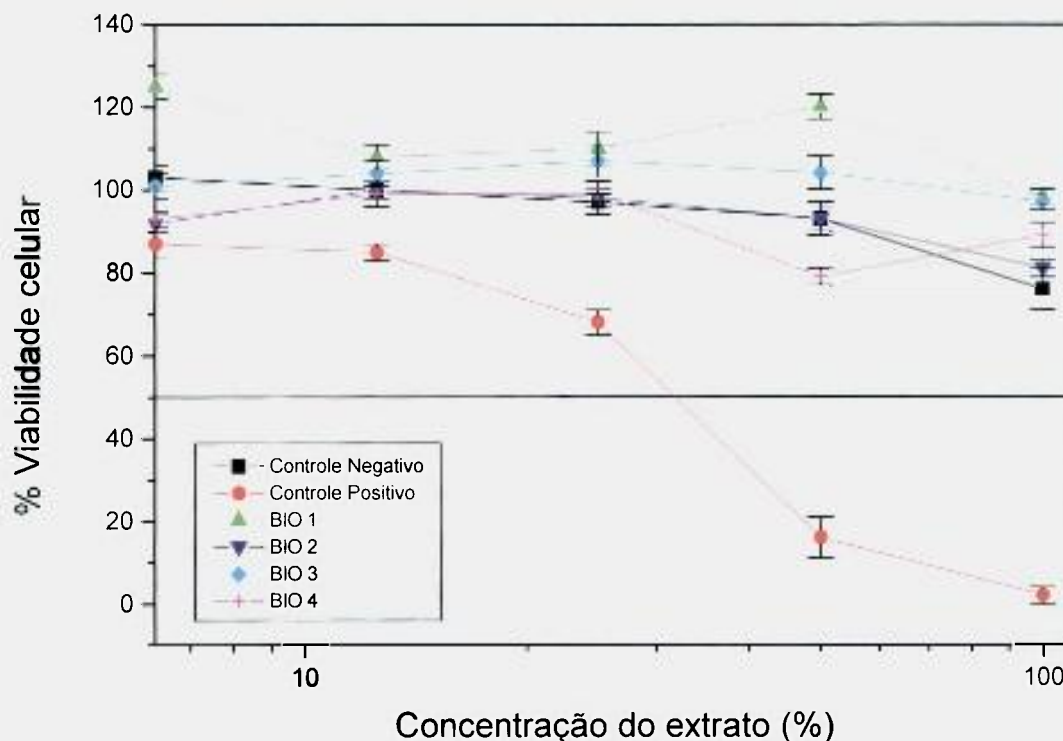
**Figura 15** – Densidade dos vidros em função do teor de óxido de nióbio.

Como pode ser observada nos resultados apresentados na Figura 15, a densidade dos vidros aumenta em função do aumento do teor de nióbio. Estes resultados confirmam os difratogramas de raios X indicando que a estrutura formada não apresenta modificações bruscas (cristalização) em função do aumento do teor de óxido de nióbio [33].

## 6.7. TESTE DE CITOTOXICIDADE

A Figura 16 mostra o resultado da avaliação da citotoxicidade dos vidros contendo 8, 10, 13 e 15% mol de nióbio segundo a norma ISO 10993-5 [37].





**Figura 16** – Resultados obtidos por meio dos testes de citotoxicidade dos vidros contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio segundo a norma ISO 10993-5.

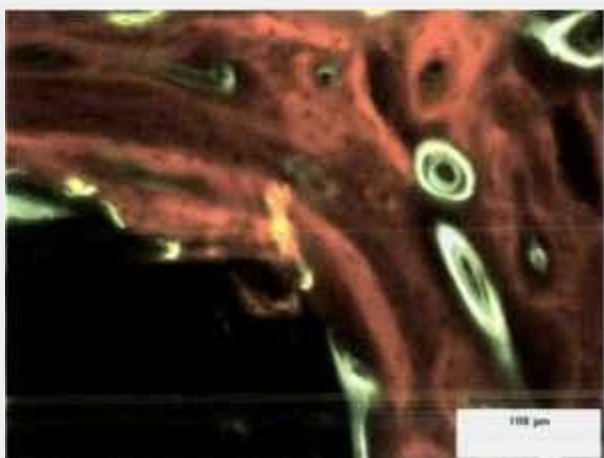
O potencial citotóxico pode ser quantificado por meio do índice de citotoxicidade, expressado como  $IC_{50(\%)}$ . Este índice é facilmente determinado por meio do gráfico do percentual da viabilidade celular em relação aos controles e a concentração do extrato.  $IC_{50(\%)}$  é a concentração do extrato necessária para exterminar metade da população celular. Pode ser observado, por meio dos resultados da Figura 16, que o controle negativo (titânio comercialmente puro) não apresenta efeitos tóxicos ( $IC_{50(\%)} > 100$ ), o controle positivo (solução fenol) apresenta toxicidade ( $IC_{50(\%)} = 33$ ) e todos os extratos das quatro composições dos vidros ensaiados não apresentam citotoxicidade [38-39].

## 6.8. ANÁLISE DA OSTEOINTEGRAÇÃO

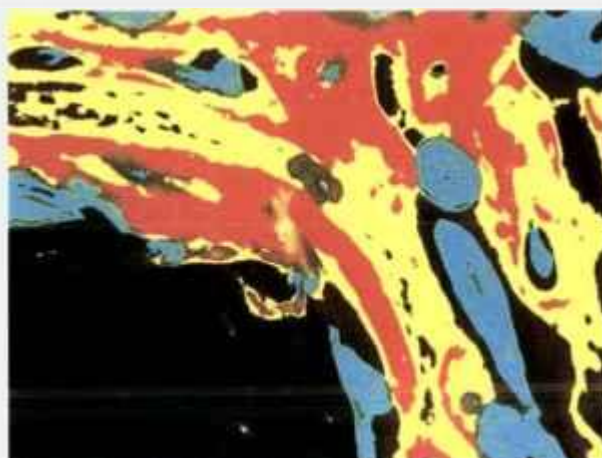
A análise da osteointegração do vidro em tíbias de coelhos foi realizada por meio de microscopia de fluorescência, microscopia de luz de lâminas coradas com o método de azul de toluidina, microscopia de luz polarizada de lâminas isentas de tratamento químico e coradas com o método de picro-sírius e microscopia eletrônica de varredura.

### 6.8.1. ANÁLISE PELO MÉTODO MORFOMÉTRICO

Os marcadores da remodelação óssea aplicados em diferentes períodos de tempo foram identificados na microscopia de fluorescência de acordo com as quatro regiões especificadas (Figuras 17 a 20). As Figuras 17 e 18 mostram a região I utilizada para contagem e esta mesma região associada ao dicionário de cores, respectivamente.



**Figura 17** – Imagem da região I (cortical) utilizada para contagem.



**Figura 18** – Imagem da região I associada ao dicionário de cores.

A Região II esta localizada na mesma posição da região I mostrada na Figura 17, porém do lado esquerdo do enxerto.

As Figuras 19 e 20 mostram a região III utilizada para contagem e esta mesma região associada ao dicionário de cores, respectivamente.



**Figura 19** – Imagem da região III (medula) utilizada para contagem.



**Figura 20** – Imagem da região III associada ao dicionário de cores.

A Região IV esta localizada na mesma posição da região III mostrada na Figura 19, porém do lado esquerdo do enxerto.

O método utilizado para estimar a deposição óssea permitiu quantificar, por meio dos marcadores fluorocromáticos, a quantidade de tecido ósseo em área ( $\mu\text{m}^2$ ) depositado nas quatro regiões definidas. Estes valores foram totalizados e foi calculada a média de deposição por lâmina estudada.

Os valores da deposição óssea estão mostrados na Tabela 10 agrupados por animal, região, composição do enxerto e marcador.

Como os marcadores teciduais incorporam apenas à apatita em deposição, durante as análises morfométricas o osso antigo e a medula óssea não foram contabilizados já que estes comprovadamente não são marcados [66-68].

Tabela 10 – Área de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) totalizada por animal.

Enxerto	Região	Marcador	Animal		
			1	2	3
BIO1	I	Tetraciclina	5437	5843	7841
		Alizarina	26721	13868	23842
		Calceína	23920	25048	24801
	II	Tetraciclina	6841	7458	2958
		Alizarina	21245	18517	20095
		Calceína	21845	27354	23820
	III	Tetraciclina	2384	1985	3450
		Alizarina	11386	9887	10783
		Calceína	13842	13354	1489
	IV	Tetraciclina	2455	3842	1851
		Alizarina	1252	10810	11001
		Calceína	11821	12498	13174
BIO2	I	Tetraciclina	4874	4474	6581
		Alizarina	22457	20145	19458
		Calceína	28541	22645	22507
	II	Tetraciclina	2932	7135	5654
		Alizarina	20440	22187	19100
		Calceína	22396	21845	21158
	III	Tetraciclina	2274	1682	1850
		Alizarina	11831	15755	10945
		Calceína	15436	12228	1388
	IV	Tetraciclina	1330	1410	1605
		Alizarina	11195	9255	879
		Calceína	11844	11334	11305
BIO3	I	Tetraciclina	9845	5844	6258
		Alizarina	21803	13887	17889
		Calceína	17592	18889	15250
	II	Tetraciclina	8621	7032	7849
		Alizarina	18856	17848	16700
		Calceína	21894	19484	20902
	III	Tetraciclina	2855	5138	3844
		Alizarina	13008	11576	12455
		Calceína	15885	14402	14548
	IV	Tetraciclina	1716	2283	1488
		Alizarina	8547	9058	10857
		Calceína	11284	9884	8854
BIO4	I	Tetraciclina	9589	6823	5841
		Alizarina	21254	17800	18814
		Calceína	21536	22348	25819
	II	Tetraciclina	8213	7487	4641
		Alizarina	14882	15888	15888
		Calceína	20685	21283	24955
	III	Tetraciclina	1989	2248	1652
		Alizarina	9284	11443	10168
		Calceína	10534	9818	10774
	IV	Tetraciclina	4963	2231	2242
		Alizarina	11845	8854	9742
			Calceína	15684	11225

Com os dados apresentados na Tabela 10 foi realizado o teste estatístico da análise de variância das áreas de deposição óssea agrupadas pelos diferentes tipos de enxertos, diferentes áreas de avaliação e por marcador tecidual.

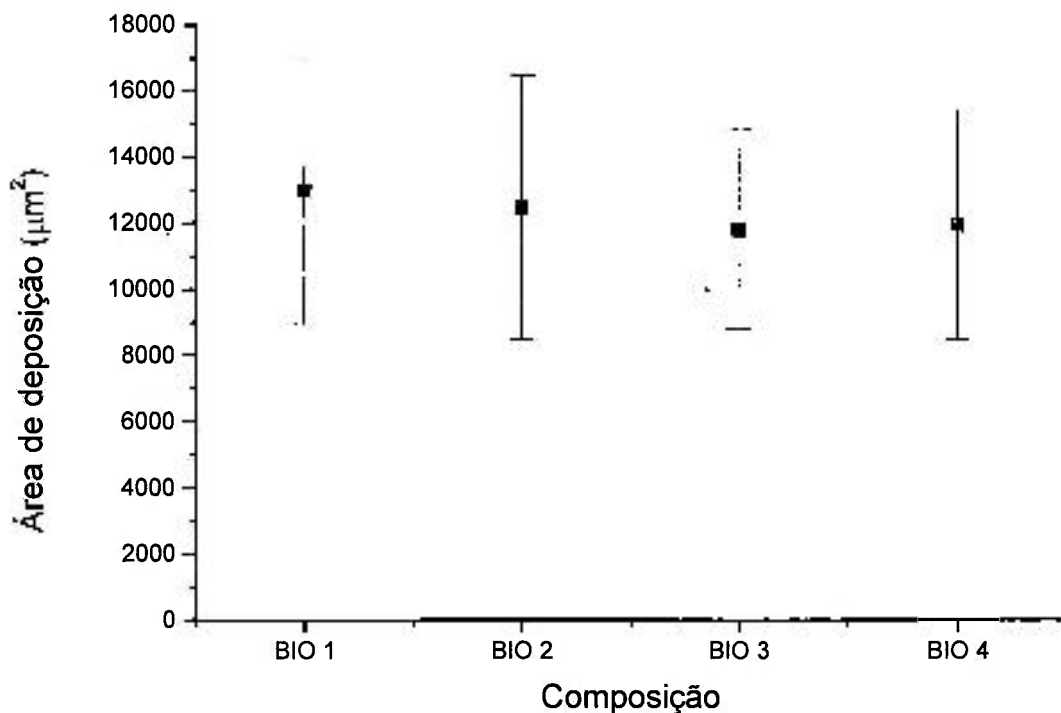
Os resultados da análise de variância indicaram que não existe diferença significativa ao nível de 5% para os valores de deposição óssea quando o fator analisado refere-se as diferentes composições do enxerto ( $F_{\text{calculado}} = 2,82 < F_{\text{tabelado}} = 3,472$ ). Os valores das médias deste fator estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11** – Médias das áreas de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) agrupadas por composição do enxerto.

Composição	Média ( $\mu\text{m}^2$ )
BIO1	12966
BIO2	12475
BIO3	11795
BIO4	11940

Pode-se admitir que o aumento do teor de nióbio não alterou a capacidade de osteointegração do material de enxertia. A quantidade de tecido depositado para o enxerto contendo 8% em mol de óxido de nióbio é estatisticamente igual à quantidade de deposição óssea para a composição contendo 15% em mol de óxido de nióbio.

A Figura 21 apresenta as médias de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) agrupadas por composição do enxerto e o desvio padrão para melhor visão dos resultados.



**Figura 21** – Médias das áreas de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) agrupadas por composição do enxerto.

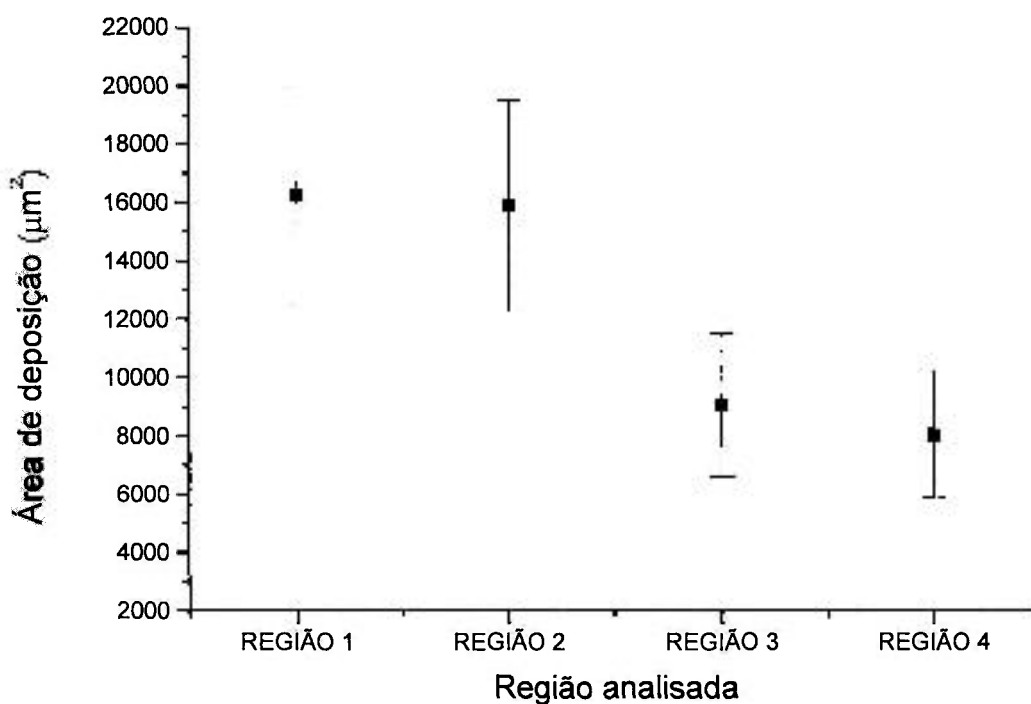
Para os fatores de análise referente às regiões e os marcadores teciduais os resultados da análise de variância indicaram diferenças significativas ao nível de 5%. A análise de variância indica que existe diferença apenas entre os extremos dos dados analisados. Para verificar se existe diferença estatística entre os valores intermediários foi calculado o valor crítico de Tukey ao nível de significância de 5%.

A Tabela 12 apresenta os valores das médias de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) e o valor crítico para contraste, agrupadas por região de contagem.

A Figura 22 apresenta as médias de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) agrupadas por região de contagem e desvio padrão para melhor visão dos resultados.

**Tabela 12** – Médias das áreas de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) e valor crítico para contraste agrupadas pelas regiões de contagem.

Região	Média ( $\mu\text{m}^2$ )	Tukey (5%)
I	16253	
II	15862	1221
III	9042	
IV	8020	



**Figura 22** – Médias das áreas de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) agrupadas pelas regiões de contagem.

Analisando os dados apresentados na Tabela 12 verifica-se que não existe diferença significativa ao nível de 5% na deposição óssea entre as áreas I e II, bem

como entre as áreas III e IV. Existe, porém, uma diferença significativa entre as duas primeiras regiões quando comparadas com as duas últimas.

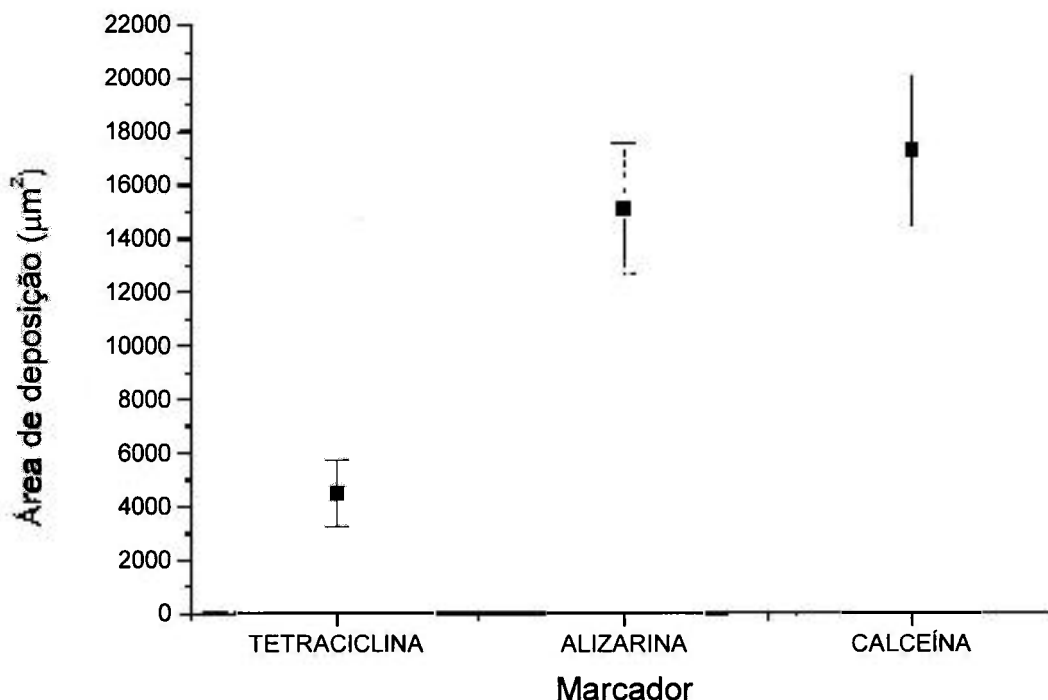
A Tabela 13 apresenta os valores das médias de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) e o valor crítico para contraste, agrupadas por marcador tecidual.

A Figura 23 apresenta as médias de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) agrupadas por marcador tecidual e desvio padrão para melhor visão dos resultados.

**Tabela 13** – Médias das áreas de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) e valor crítico para contraste agrupadas por marcador.

Marcador	Média ( $\mu\text{m}^2$ )	Tukey (5%)
Tetraciclina	4481	935
Alizarina	15119	
Calceína	17282	





**Figura 23** – Médias das áreas de deposição óssea ( $\mu\text{m}^2$ ) agrupadas por marcador.

Os dados apresentados na Tabela 13 mostram que existem diferenças significativas ao nível de 5% entre os marcadores teciduais, sendo que a calceína apresentou maior área de deposição óssea (46,85%), seguida da alizarina (40,99%) e tetraciclina (12,15%).

Os mecanismos que atuam no processo de remodelamento ósseo nas proximidades ao enxerto são iguais aos que ocorrem quando há um implante de titânio instalado. A maior capacidade de osteointegração do vidro enxertado em relação às superfícies de titânio se deve à presença da camada rica em cálcio e fósforo (principais constituintes do vidro) que contribui para a melhor adesão da rede de fibrina do coágulo durante a migração de células osteogênicas [69-72].

Para explicar o mecanismo que integra o implante ou enxerto ao osso, três fenômenos são descritos e resultam na osteogênese de contato: (1) osteocondução, que consiste na migração de células osteogênicas diferenciadas para a superfície do material, (2) formação óssea, que é o produto da mineralização da matriz da interface, (3) remodelação óssea, caracterizada pelo dinamismo do tecido ósseo remodelando as osteonas constantemente por meio da formação óssea [6].

A hemorragia que acontece na loja que irá receber o implante resulta na formação de coágulo sangüíneo que dura apenas poucos dias, mas que pode persistir, se prolongado, por até duas semanas. Em adição à formação do coágulo sangüíneo, dois outros mecanismos contribuem para a hemostásia. Primeiro, a vasoconstrição faz diminuir o sangramento, a retração do coágulo condensa o tampão hemostático e reduz o tamanho do sítio da ferida. A retração é causada pelas forças tracionais e plaquetas ativadas resultando em condensação de fibrina.

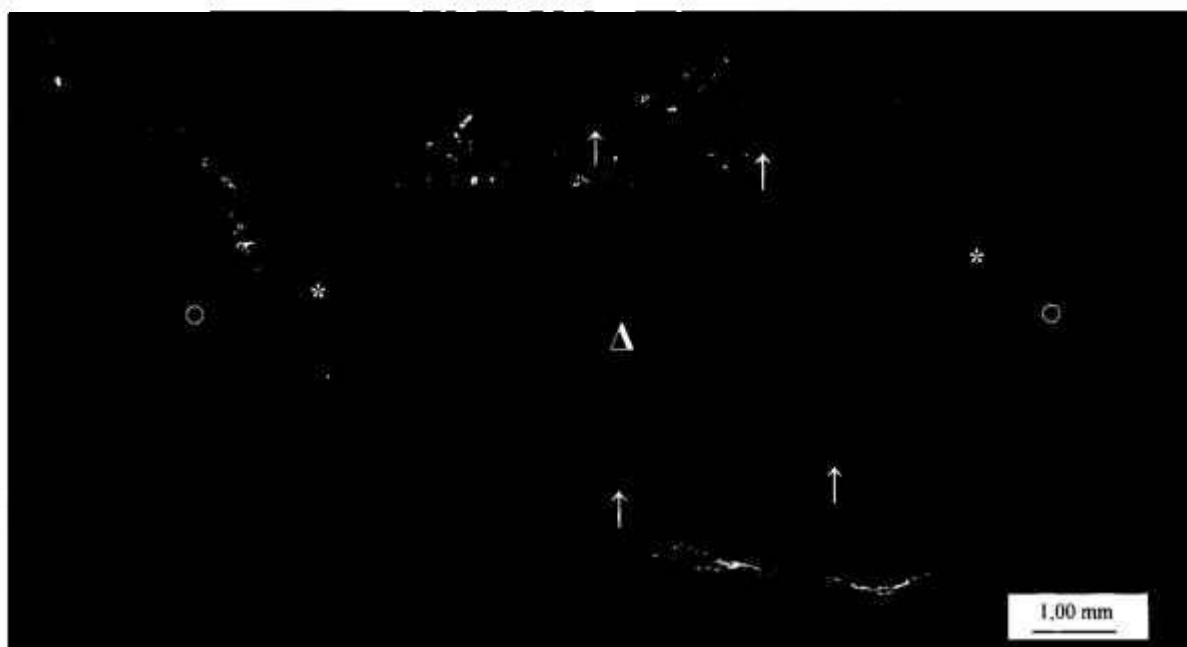
A baixa quantidade de tecido depositado (12,15%) durante a aplicação do marcador tetraciclina (2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> semanas pós-operatória) pode ser explicada considerando-se que neste período o organismo passa pelo processo de reparação do trauma causado pelo procedimento cirúrgico. É neste período que o material instalado entra em contato com componentes biológicos, principalmente proteínas e outras macromoléculas que serão aderidas à superfície do material. Estas proteínas irão permitir a interação das células formadoras do tecido ósseo. Outro fator que pode contribuir para a baixa deposição de tecido nas primeiras semanas pós-cirurgia é o trauma térmico local, causado durante a fresagem óssea para instalação do enxerto, mesmo sendo utilizada refrigeração com água. Neste caso, o organismo leva algum tempo para reabsorver o osso inviável permitindo a proliferação dos osteoblastos.

Nos períodos de aplicação da alizarina (40,99%) e da calceína (46,85%), verificou-se que a deposição óssea ocorreu de forma mais intensa. Uma vez iniciada a remodelação, houve avanço sem interrupção. A formação óssea é regulada por mecanismo realimentador, capaz de estimular as células osteoblásticas a um alto estado de atividade individual. Este processo segue até ser iniciado o estágio homeostático, que regula a formação lamelar [40].

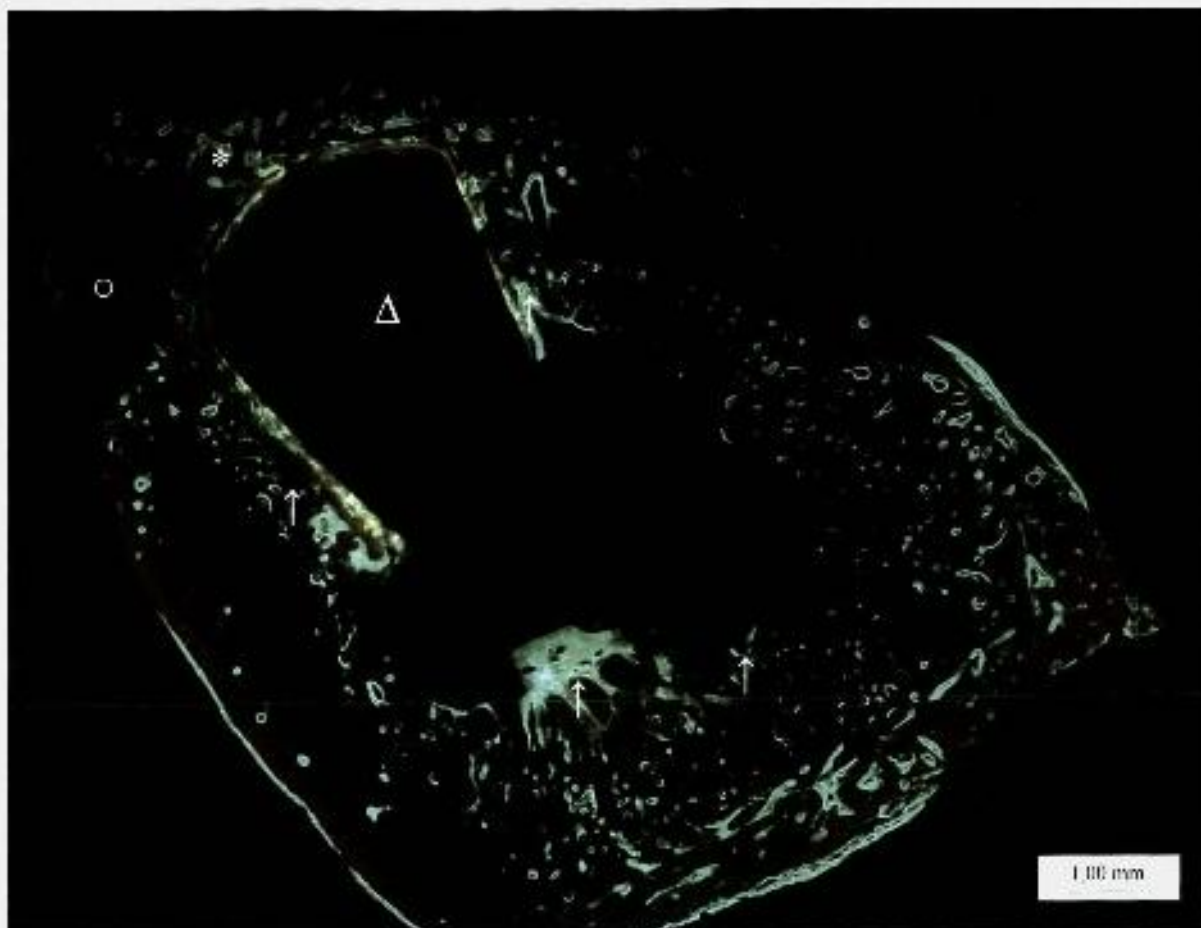
### **6.8.2. MARCADORES FLUOROCROMÁTICOS**

A calcificação ativa pode ser avaliada por intermédio dos marcadores fluorocromáticos de união com a apatita indicando os diferentes períodos de tempo e o mecanismo de deposição óssea nas áreas próximas ao enxerto por meio de faixas difusas com colorações distintas. A aplicação semanal e em duplicata dos marcadores eliminou a necessidade da especificação do início e término da ação semanal de cada substância.

As Figuras 24 e 25 mostram, em corte longitudinal do enxerto em relação à tibia do coelho, a região de instalação e o enxerto instalado após o período de cicatrização de oito semanas.



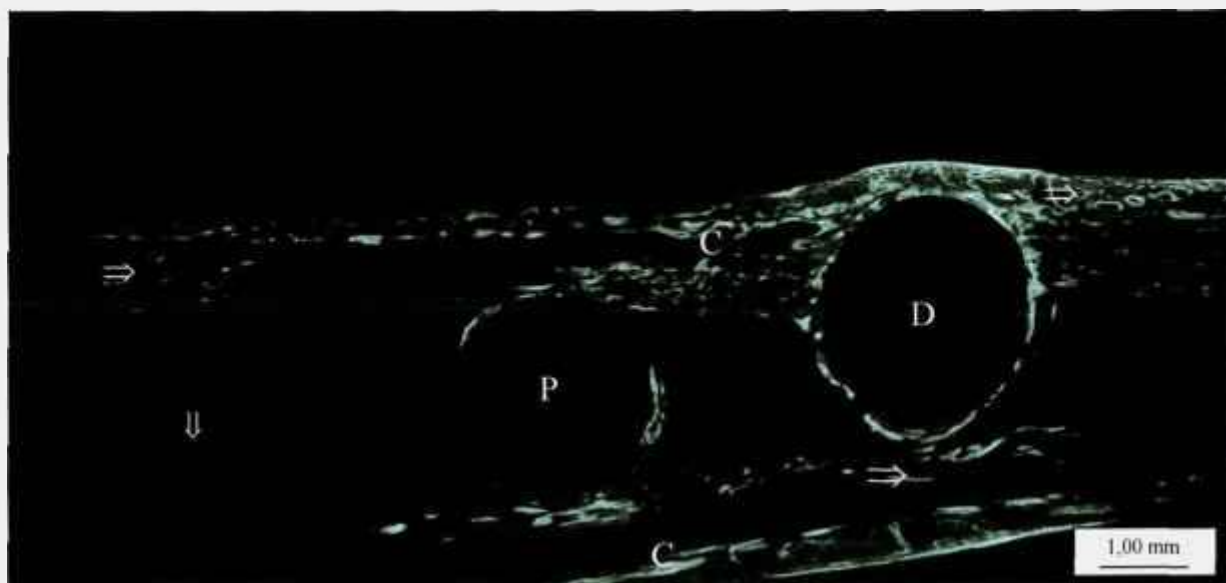
**Figura 24** – Micrografia de fluorescência mostrando a região de instalação do enxerto (Δ) (BIO1) em corte longitudinal em relação ao enxerto e as diversas regiões de remodelamento (\*) na tábua óssea e osteocondução na medula (↑). Observa-se também a presença do perióstio (○) preservado durante a cirurgia.



**Figura 25** – Micrografia de fluorescência mostrando a região de instalação do enxerto (Δ) (BIO4) em corte longitudinal em relação ao enxerto e as diversas regiões de remodelamento (\*) na tábua óssea e osteocondução na medula (↑). Observa-se também a presença do periósteo (○) preservado durante a cirurgia.

A Figura 26 mostra, em corte transversal em relação ao enxerto, a região de instalação junto à tábua óssea remodelada e o processo de osteocondução na região da medula caracterizado principalmente pela presença do marcador calcéina. Devido à baixa magnitude da fotografia (ampliação de 2X em relação à imagem original) combinada com o tempo de exposição (10s), pode-se observar apenas a presença do marcador de maior intensidade sob a ação da luz fluorescente. Nota-se que o tecido ósseo remodelado representado pela cor verde circunda o enxerto na região distal e

em grande parte na região proximal indicando que existe remodelamento do tecido conduzido pela presença do enxerto. Na posição distal pode-se observar maior remodelamento e condução óssea devido à menor distância do enxerto em relação à tábua óssea. Observa-se também a ausência de tecido ósseo na região medular mais afastada do enxerto.

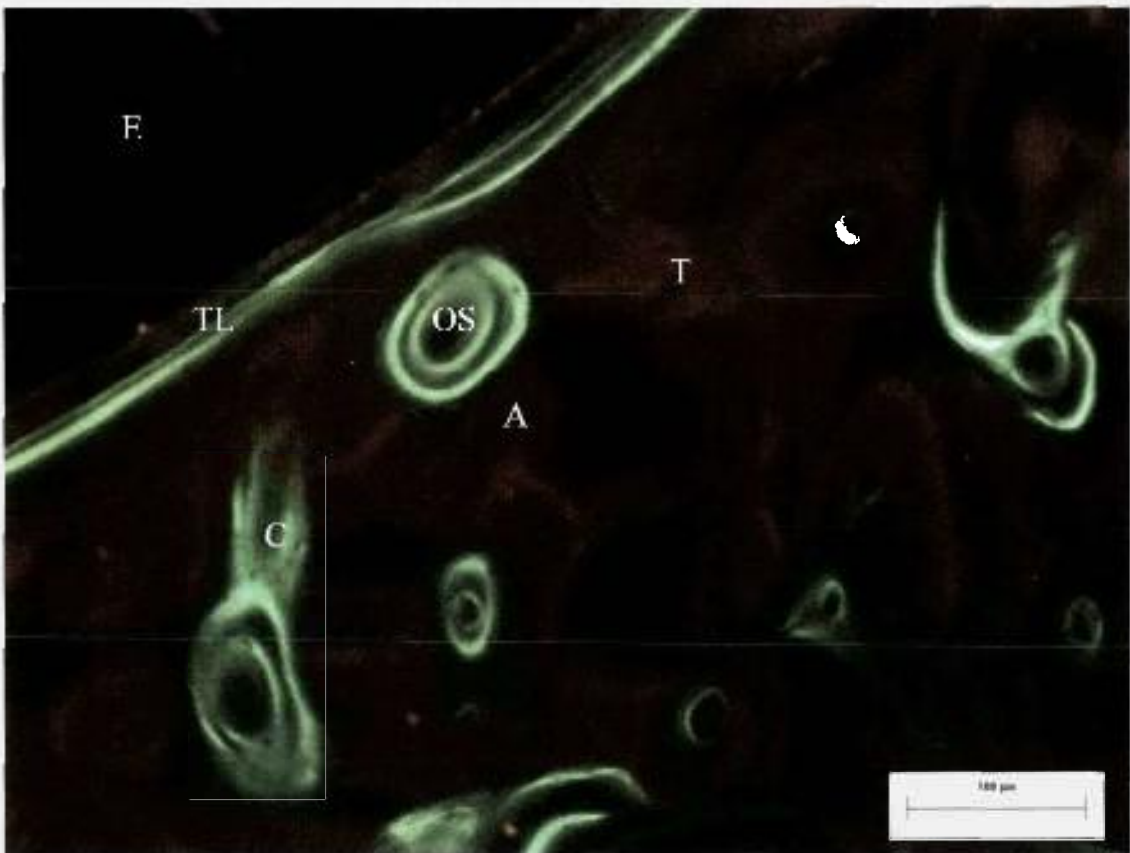


**Figura 26** – Micrografia de fluorescência mostrando em corte transverso do enxerto, a instalação do enxerto nas regiões proximal (P – BIO2) e distal (D – BIO3). Na região medular (⇓) pode-se observar a falta de tecido ósseo diferente da região cortical (⇨). A coloração verde representa o tecido marcado com calceína (C).

Como pode ser observado nas Figuras 24, 25 e 26, há grande quantidade de tecido ósseo formado na região da medula por osteocondução, bem como a remodelação da região de incisão no ápice do enxerto. O periósteo favorece o processo de remodelamento ósseo nas regiões superior e inferior externa da tábua óssea (região de ancoragem), como pode ser evidenciado nas Figuras 24 e 25. Também pode ser observado grande metabolismo nas regiões periféricas da tíbia

mostrando que existe cicatrização e acomodação da estrutura óssea ao ato cirúrgico. A Figura 26 mostra a localização dos enxertos instalados nas posições distal e proximal da tíbia.

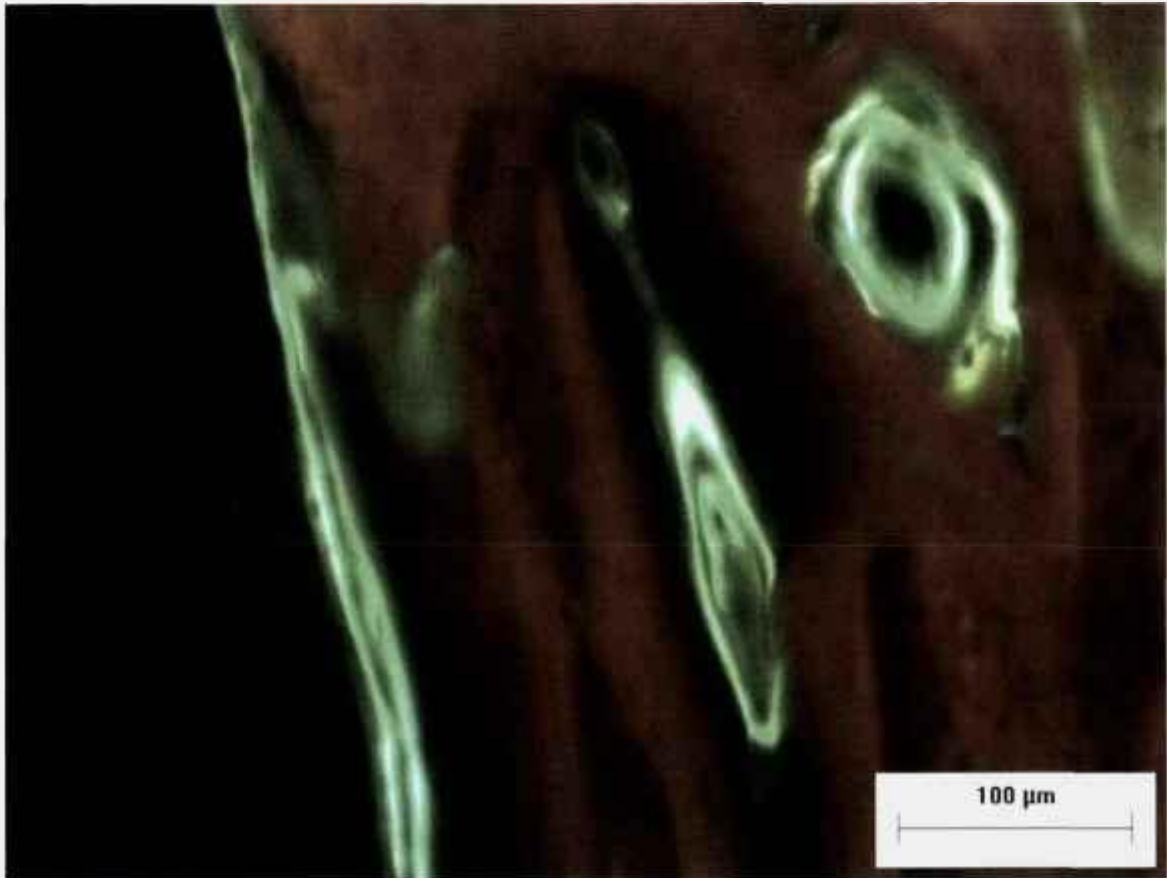
A Figura 27 mostra a interface do enxerto com o tecido ósseo remodelado na região de ancoragem da cortical oposta.



**Figura 27** – Micrografia de fluorescência mostrando processo de remodelamento ósseo na região de ancoragem na tábua oposta à instalação do enxerto (BIO1). Observa-se a presença dos três marcadores – tetraciclina (T), alizarina (A) e calceína (C). Nota-se também a presença de osteonas (OS) e tecido lamelar (TL). Enxerto (E).

Na Figura 27 pode-se observar a presença de osteonas. Interessante notar que estas osteonas estão sendo formadas em períodos diferentes marcados pela calceína e tetraciclina.

A Figura 28 mostra a interface entre o enxerto e o tecido na região medular.



**Figura 28** – Micrografia de fluorescência mostrando o processo de remodelamento ósseo por osteocondução na região medular. (BIO2)

Na Figura 28 observa-se a formação de osteonas marcadas pela tetraciclina, alizarina e calceína. A formação das osteonas não ocorre de forma organizada, ou seja, não há uma seqüência cronológica para formação dos anéis. Pode-se observar que a formação dos anéis é aleatória e pode ocorrer à formação de anéis intermediários em períodos mais longos. Novamente observa-se a presença de tecido lamelar na interface com o enxerto.

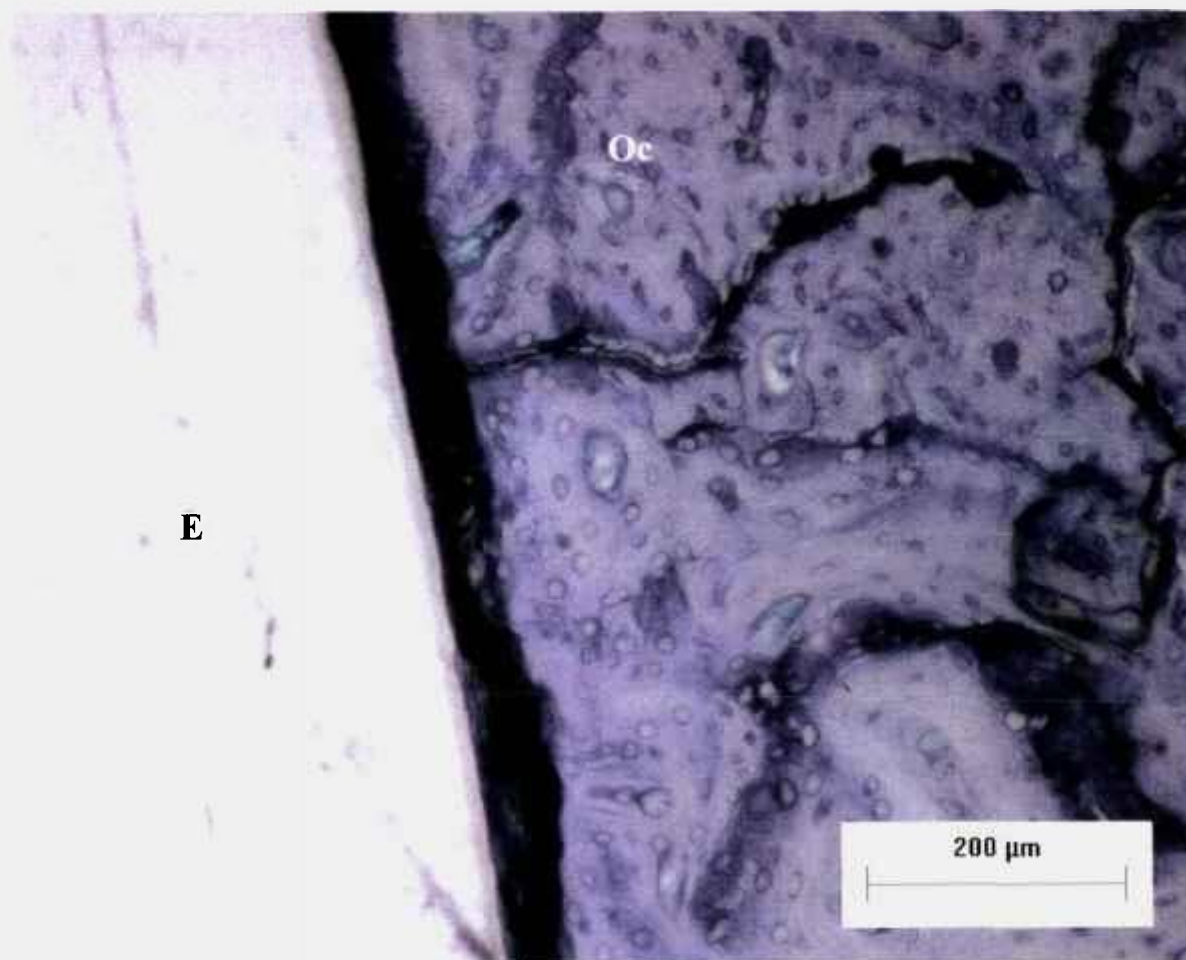


### **6.8.3. MÉTODO DE AZUL DE TOLUIDINA**

As lâminas coradas com azul de toluidina mostraram os diferentes tecidos e evidenciaram o tipo de célula pela coloração dos núcleos. A intensidade da coloração indica o teor orgânico do tecido ósseo remodelado e com vasos sanguíneos de diversos calibres..

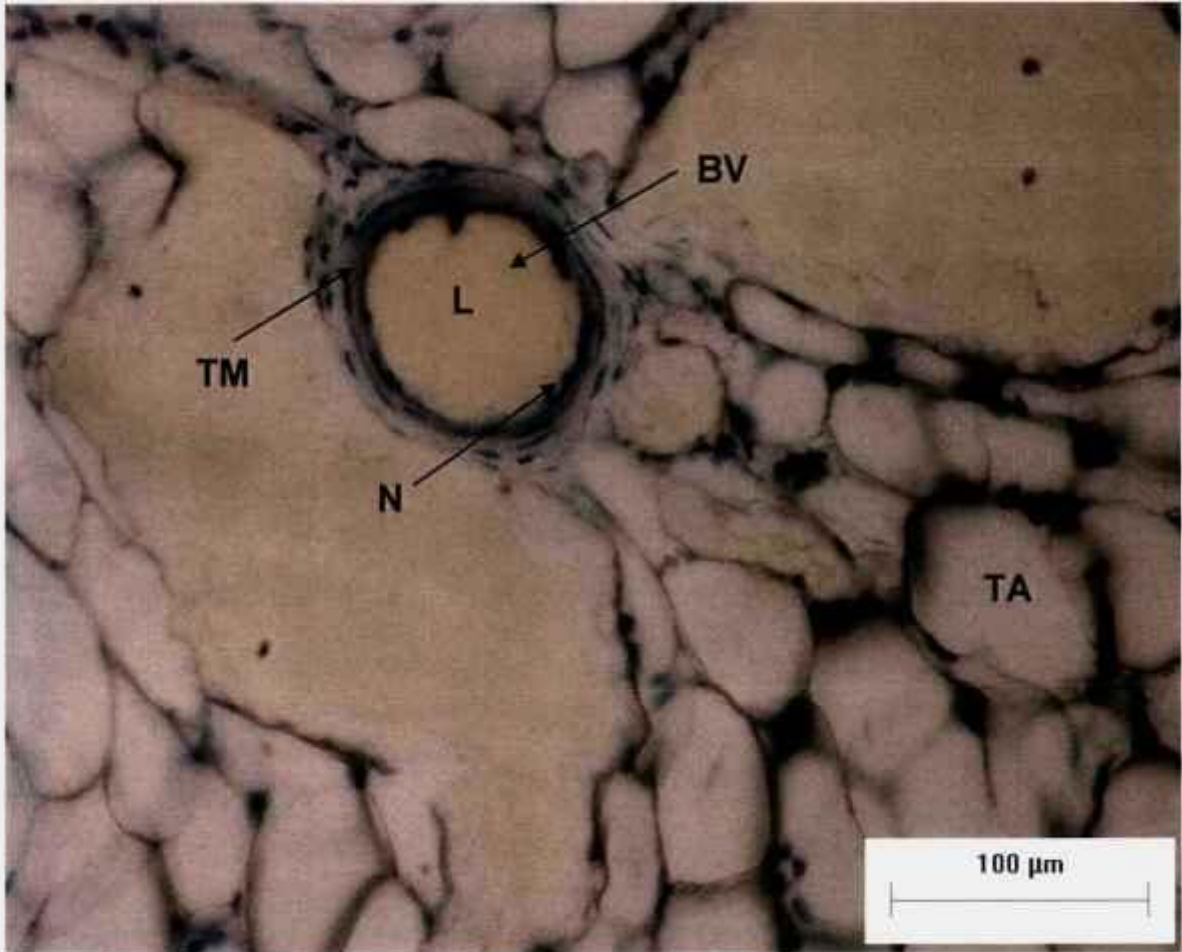
Por este método foi possível observar o contato direto entre o tecido remodelado (colágeno ou tecido ósseo) e a superfície do enxerto.

A Figura 29 mostra a interface entre o enxerto e o tecido ósseo.



**Figura 29** – Micrografia mostrando a remodelação óssea da região medular na interface entre a superfície do enxerto (E) e o tecido ósseo corado com azul de toluidina. Observa-se a presença de osteócitos (Oc) dispersos pela matriz de colágeno. (BIO4)

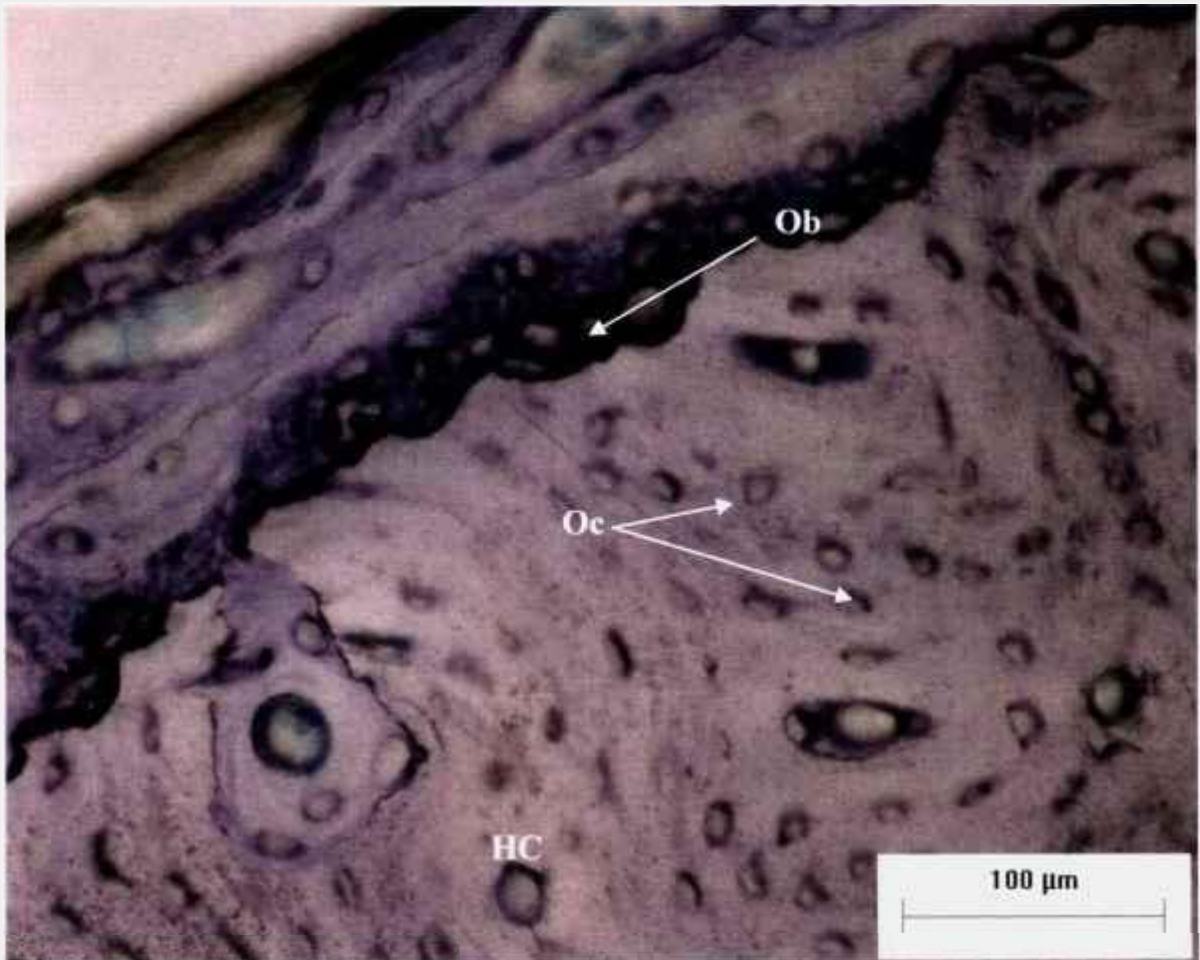
A Figura 30 mostra um vaso sanguíneo na região medular e a presença de tecido adiposo característico da região medular do osso.



**Figura 30** – Micrografia mostrando a medula óssea corada com azul de toluidina onde pode-se observar a presença de tecido adiposo (TA) e um vaso sanguíneo (BV). (L) Luz do vaso, (TM) túnica média e (N) núcleos do endotélio.

Na Figura 30 observa-se o diâmetro da luz (L) bem evidenciado e a espessura da parede do vaso. Como a túnica média (TM) é rica em células musculares, os núcleos de suas células endoteliais projetam-se para a luz do vaso. Estas características indicam que este vaso deve ser uma arteríola [73-75].

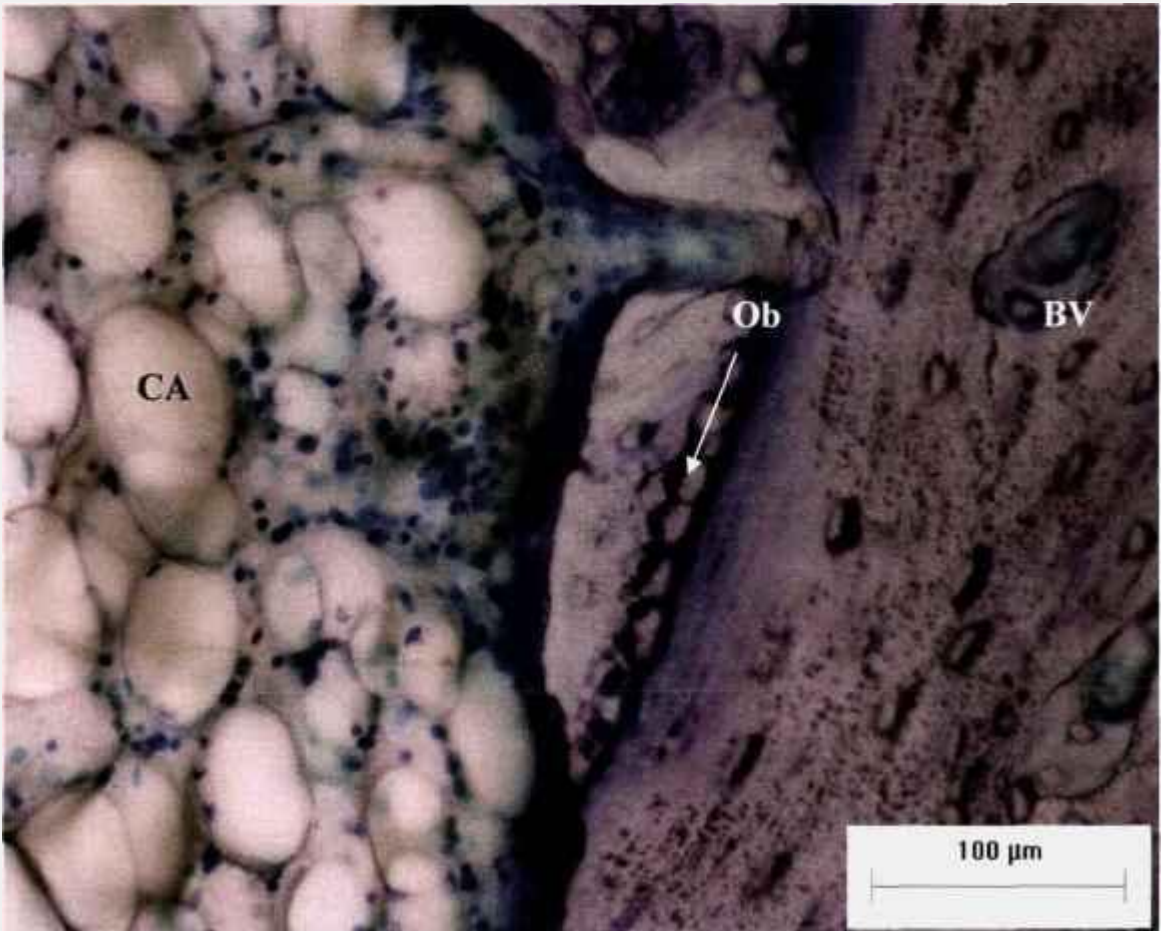
A Figura 31 mostra o tecido remodelado corado com azul de toluidina, o colar de osteoblastos, osteócitos dispersos na matriz de colágeno, a presença de osteonas e uma linha de cementação ou cicatrização no limite entre o osso antigo e o remodelado servindo de ancoragem do tecido mais recente.



**Figura 31** – Tecido remodelado corado com azul de toluidina, canal de Havers (HC), colar de osteoblastos (Ob) e osteócitos (Oc). Verifica-se regiões de contato entre a superfície do enxerto e o tecido remodelado. (BIO1)

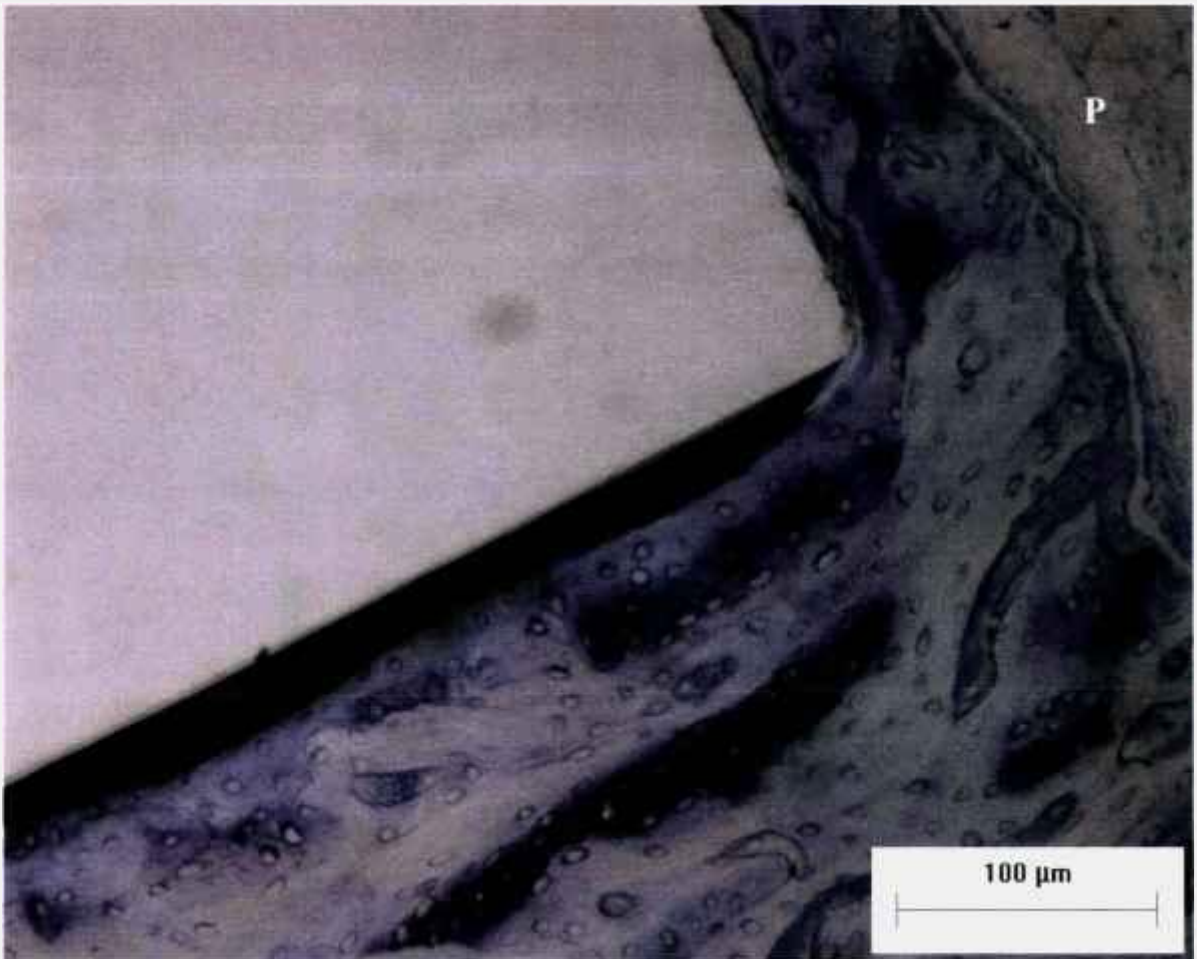
Na Figura 31 observa-se o contato do tecido ósseo diretamente sobre a superfície do enxerto. É evidente nesta figura a existência da interface entre o tecido velho pré-existente com características de tecido com formação concêntrica e o tecido remodelado de característica lamelar.

A Figura 32 mostra a região de interface entre a tábua óssea e a medula, o colar de osteoblastos, células adiposas e vasos sanguíneos.



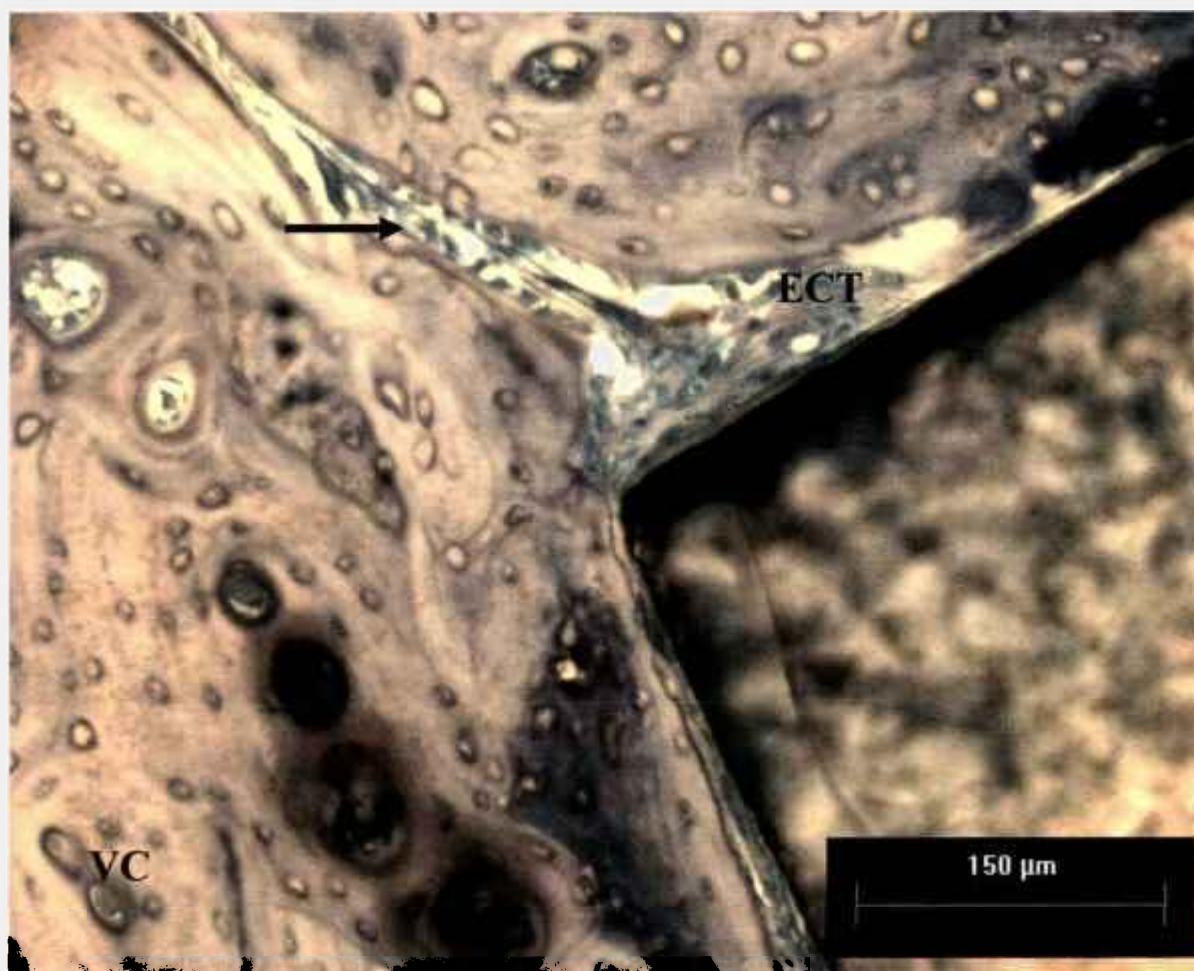
**Figura 32** – Região de interface entre a tábua óssea e a medula. Verifica-se a presença do colar de osteoblastos (Ob) junto ao endósteo, células adiposas (CA) da medula e alguns vasos (BV).

A Figura 33 mostra a região da cortical cirúrgica remodelada e a presença do periósteo preservado durante a cirurgia.



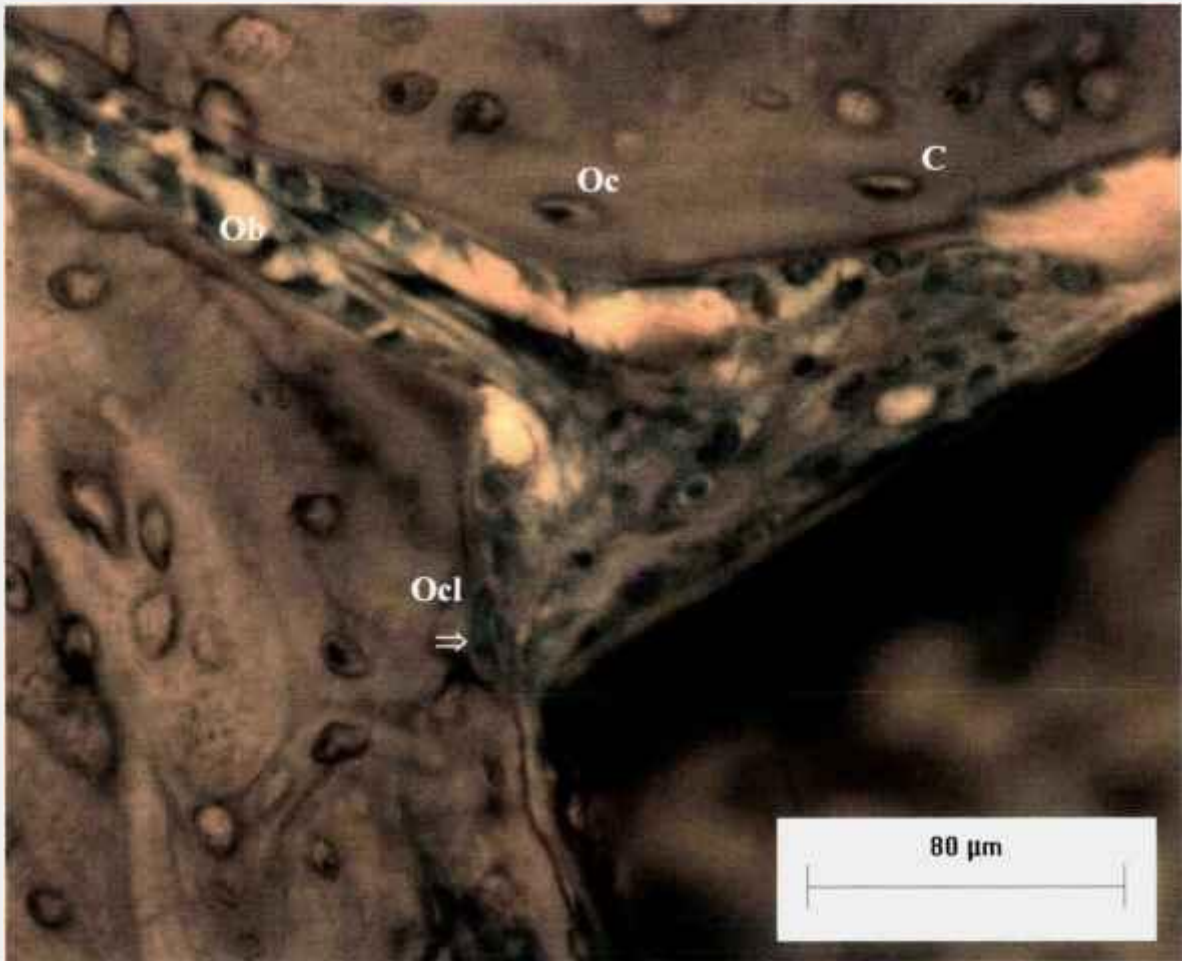
**Figura 33** – Região da cortical cirúrgica e periósteo (P). (BIO 3)

As Figuras 34 e 35 mostram a região da cortical onde foi realizada a instalação do enxerto. Esta região é caracterizada pelo processo de remodelação óssea conduzida pela presença do periósteo preservado durante a cirurgia.



**Figura 34** – Micrografia mostrando a região de instalação corada com azul de toluidina onde pode-se observar a presença de tecido conjuntivo de transição (ECT) e osteoblastos (→) na interface com o enxerto. (BIO4)

Verifica-se na Figura 34 a ligação entre duas osteonas denominada canal de Volkmann (VC) e a presença de tecido conjuntivo em contato com a superfície do enxerto na região de incisão. A Figura 35 mostra a região da Figura 34 marcada com a seta ampliada para melhor visão das células presentes nesta região. Observar-se então o colar de osteoblastos, fibras de colágeno, grandes células e células com dois núcleos [74-75].



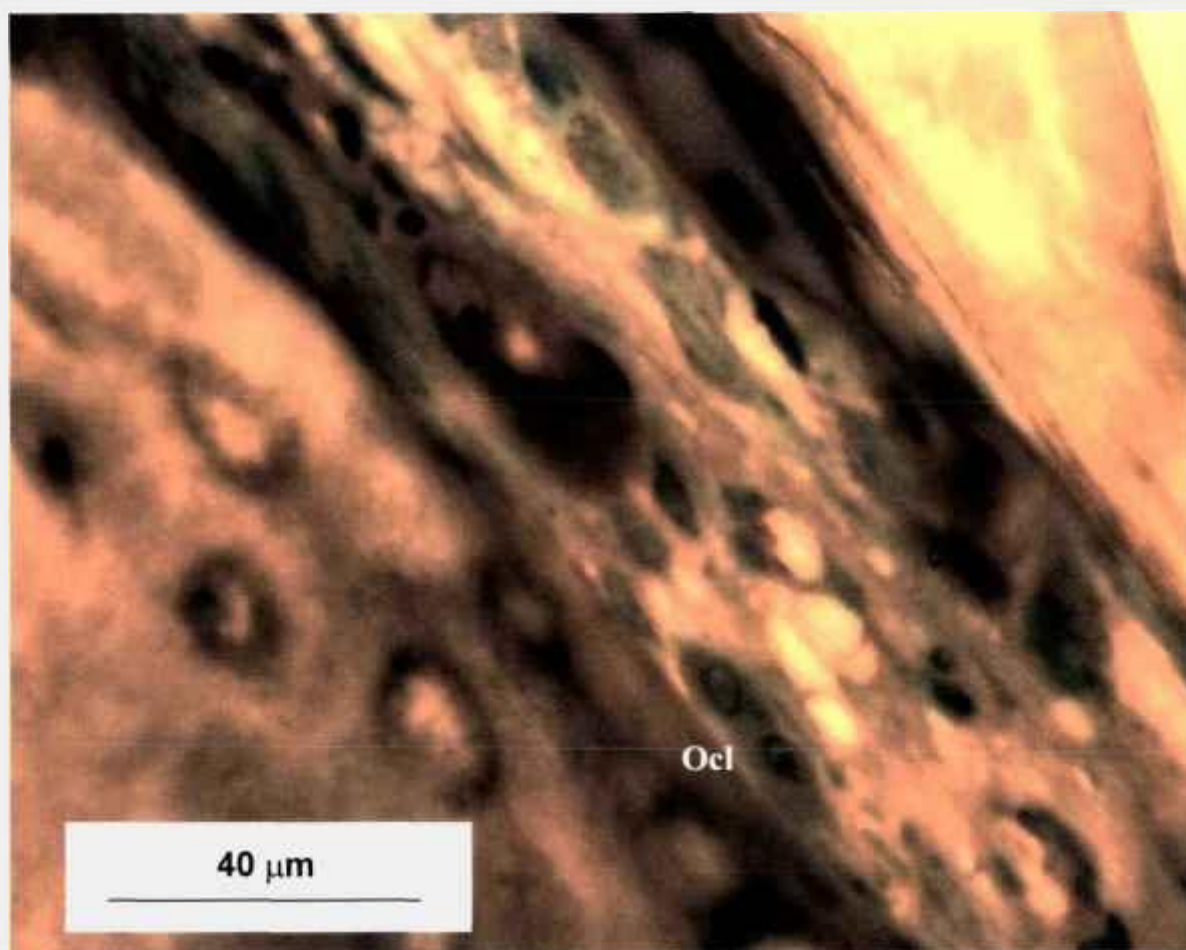
**Figura 35** – Micrografia mostrando a região de incisão corada com azul de toluidina com maior resolução onde observa-se a presença de tecido conjuntivo na interface com o enxerto. Nota-se a presença de colágeno (C), osteócitos (Oc), osteoblastos enfileirados (Ob) e osteoclastos (Ocl). Lacunas de Howship com osteoclasto (=>) são também observadas. (BIO4)

O colar de osteoblasto age como frente de ossificação dando origem ao osteóide e em seguida ao tecido ósseo neoformado.

Existem evidências de processo de erosão ativo no tecido ósseo junto à superfície do implante, caracterizado pela presença de osteoclastos em contato próximo com a superfície óssea em depressões denominadas lacunas de reabsorção ou lacunas de Howship [73-75]. Este processo é responsável pela remoção do osso



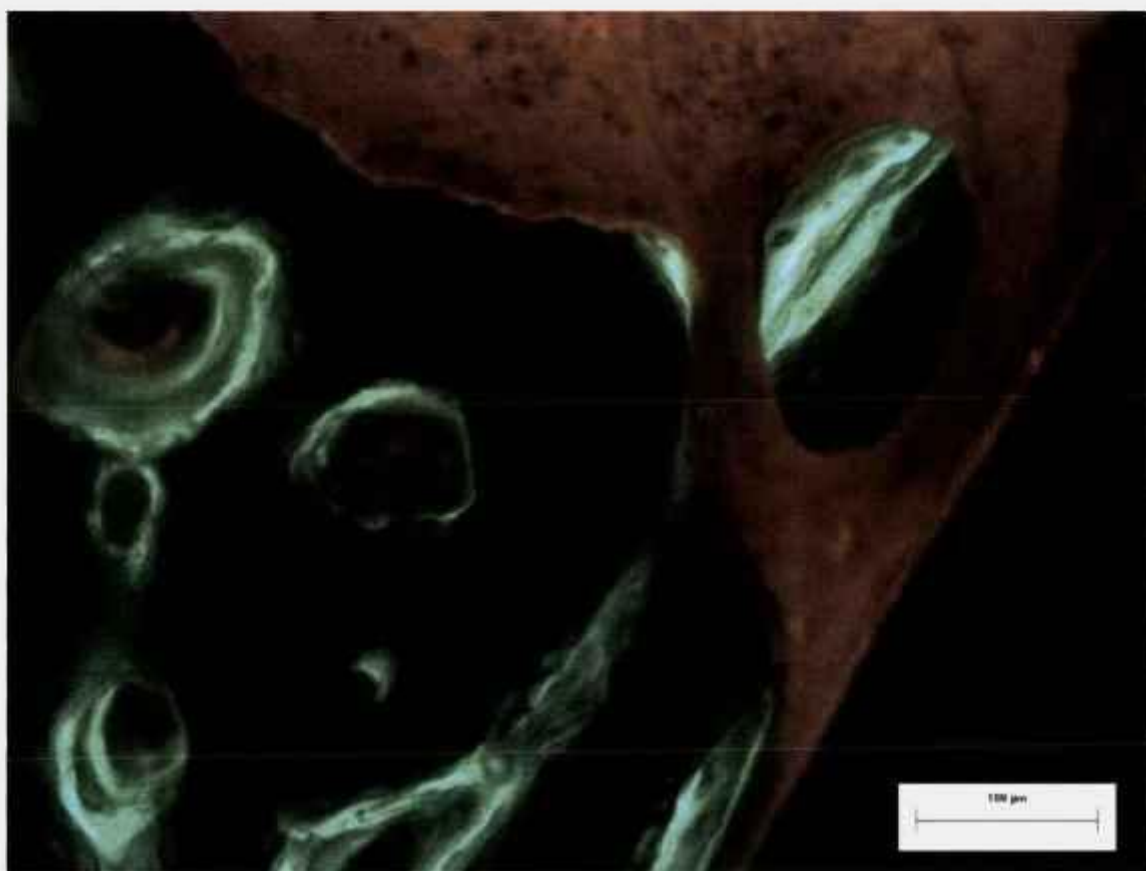
antigo, e quando este processo é finalizado, provavelmente essas células se dissociem em células mononucleadas que podem novamente se fundir para formar osteoclastos ativos (Figura 36) quando estimuladas apropriadamente [73].



**Figura 36** – Grandes células multinucleadas osteoclastos (Ocl) que participam do processo de reabsorção óssea. (BIO4)

A utilização das técnicas combinadas de fluorescência em lâminas coradas com azul de toluidina permitiu avaliar alguns mecanismos atuantes durante o processo de remodelamento ósseo, principalmente nas regiões onde co-existe tecido ósseo e tecido conjuntivo, bem como avaliar os períodos de formação de anéis concêntricos formadores das osteonas.

A Figura 37 mostra a região próxima à cortical oposta onde existe a formação de trave óssea marcada com calceína rodeada por tecido conjuntivo em contato com o enxerto. A Figura 38 apresenta o mesmo material da Figura 37 corado com azul de toluidina.



**Figura 37** – Micrografia de fluorescência onde observa-se a formação da trave óssea circundada por tecido conjuntivo. (BIO2)



**Figura 38** – Lâmina corada com azul de toluidina mostrando a formação da trave óssea circundada por tecido conjuntivo e os canaliculos (C). (BIO2)

Observa-se nas Figuras 37 e 38 que o processo de remodelamento do tecido ósseo na região de formação da trave óssea está ocorrendo no período de aplicação da calceína. Este fato indica que nesta região seria necessário maior período de cicatrização para completar o processo de remodelamento ósseo.

#### 6.8.4. MÉTODO DE LUZ POLARIZADA

Por meio da luz polarizada é possível observar a formação e a distribuição de colágeno em organização lamelar ou de anéis concêntricos nos diversos períodos de remodelamento do tecido ósseo [46-48].

As Figuras 39 e 40 mostram duas regiões distintas junto à interface da superfície do enxerto e do tecido ósseo remodelado mostrando o padrão das fibras de colágeno.



**Figura 39** – Micrografia de luz polarizada mostrando o padrão das fibras de colágeno formadas nas proximidades com o enxerto e as osteonas (OS). (BIO1)



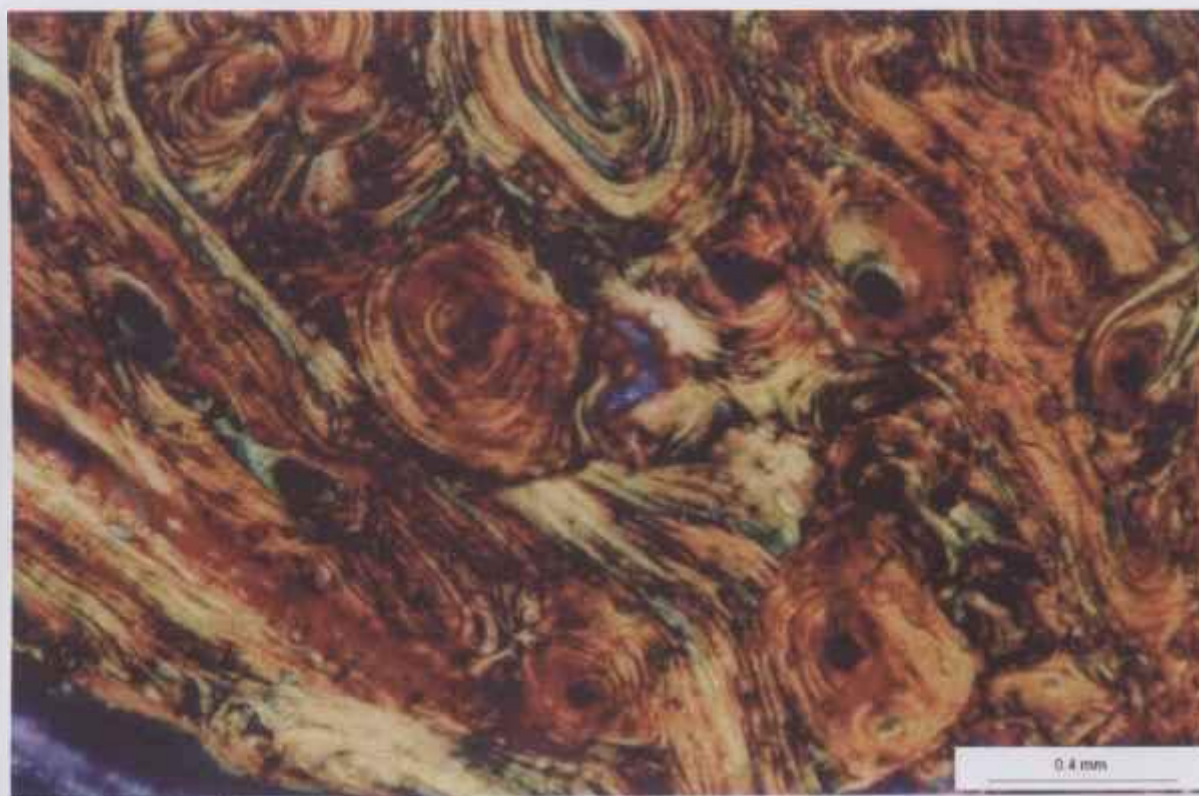
**Figura 40** – Precipitação de tecido remodelado junto à superfície do enxerto (E) de aspecto lamelar desorganizado (L). (BIO1)

Devido à alta birrefringência do colágeno tipo I, gerada pela espessura e subestrutura fibrilar altamente orientada, observa-se em algumas regiões da Figura 39 a rede de fibras exibindo estrutura entrelaçada aleatória e densa. As osteonas apresentam-se com efeito tri-dimensional das fibras por meio do uso da técnica de luz polarizada. A distribuição irregular e entrelaçada das fibras colágenas do tipo I caracteriza o osso primário, o tecido mais imaturo do osso em remodelamento [49]. O osso primário, com seus osteócitos largos e bem esféricos, cresce rapidamente pela formação de arcabouço de hastes e placas [50] e se adere à superfície do enxerto [76-79].

### 6.8.5. MÉTODO DE PICRO-SÍRIUS

A análise das lâminas coradas com picro-sírius mostrou que a birrefringência do colágeno é mais evidenciada quando comparada com a lâmina não corada. Por meio desta coloração pode-se distinguir entre o colágeno maduro (corado em vermelho, amarelo ou mesmo laranja) e o colágeno imaturo (corado em verde) [48-50].

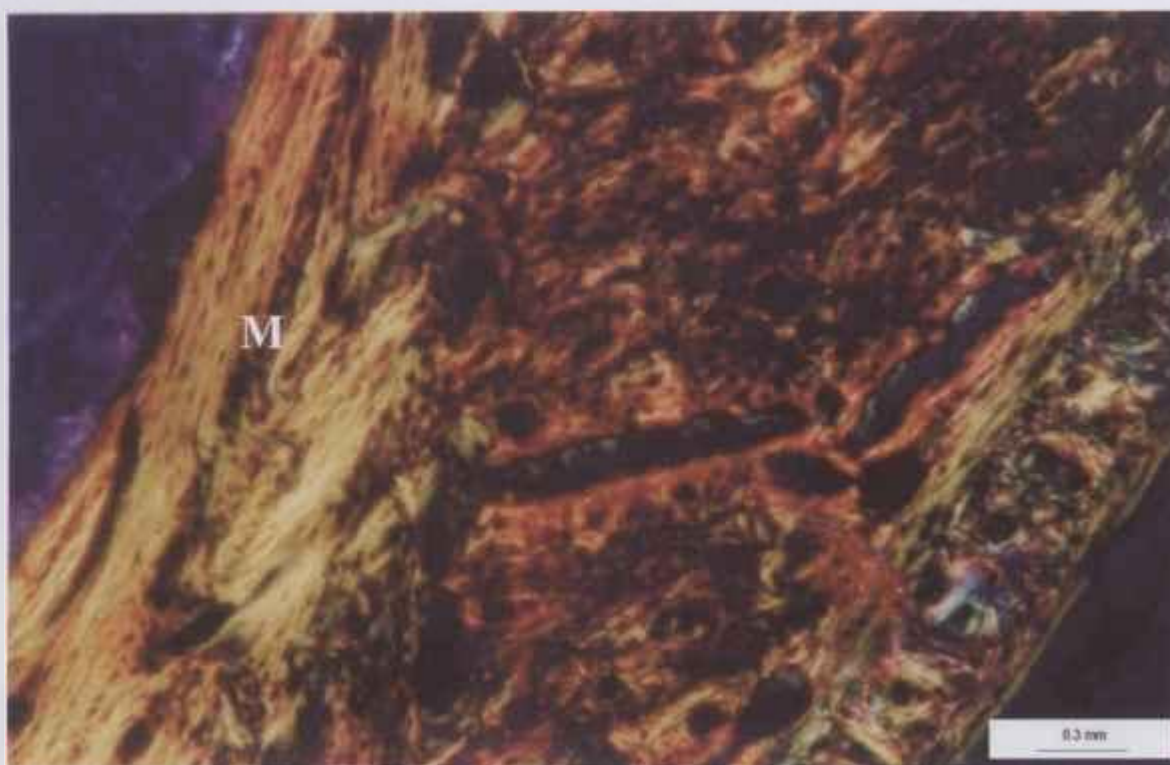
A Figura 41 apresenta lâmina corada com o método de picro-sírius na região onde está ocorrendo o processo de remodelamento ósseo.



**Figura 41** – Micrografia de luz polarizada de lâmina corada com picro-sírius. Observa-se a presença de colágeno Tipo I (vermelho e amarelo) e Tipo III (verde) em pequena quantidade. (BIO2)

Fica evidenciada por esta técnica a presença de colágeno maduro disposto de forma ordenada em lamelas paralelamente orientadas ou de forma concêntrica ao redor de canais vasculares formando osteonas. Este fato indica a existência do processo de remodelamento ósseo ativo. Pode-se observar também a presença de tecido imaturo distribuído de forma não organizada e corado com a cor verde. Entretanto, a existência de colágeno imaturo não é predominante na região analisada ficando limitado a pequenas regiões principalmente no interior das osteonas.

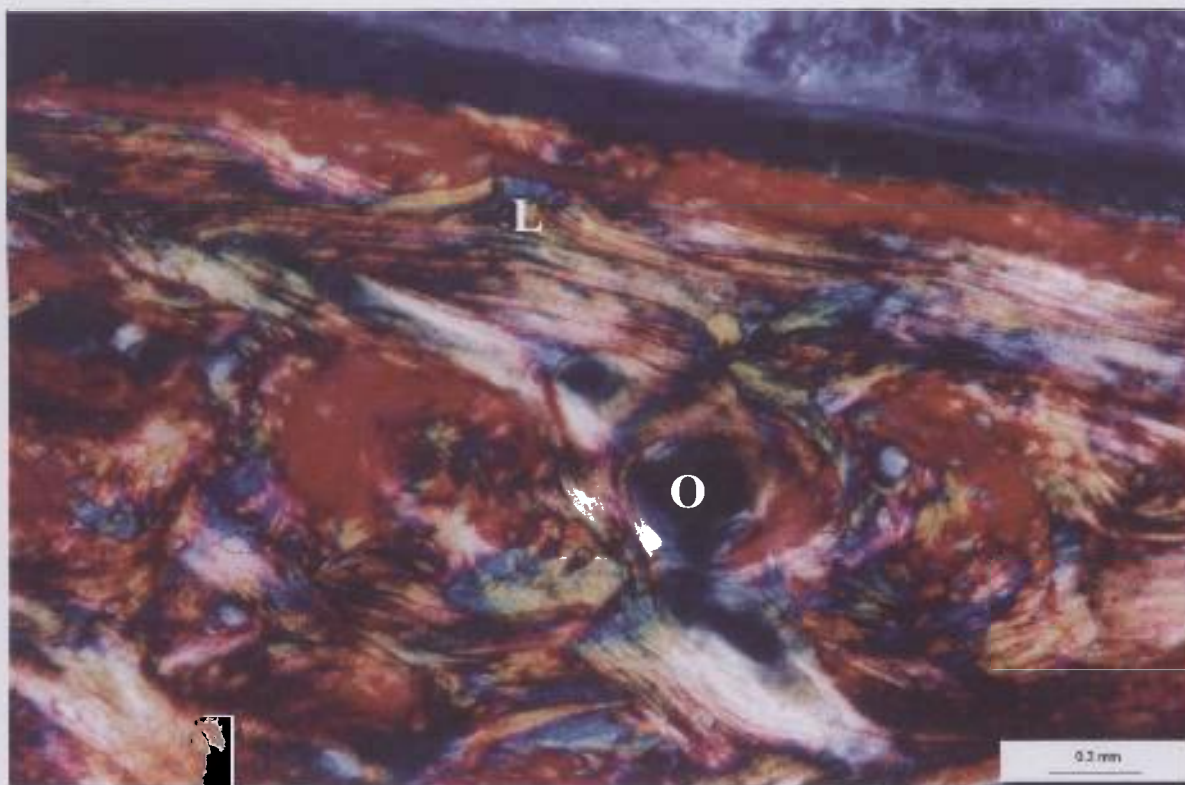
A Figura 42 apresenta a região de ancoragem na tábua oposta. Pode-se observar o direto contato entre o colágeno maduro e a superfície do enxerto distribuído de forma lamelar seguindo um padrão ordenado.



**Figura 42** – Região de ancoragem na tábua oposta. Presença de colágeno maduro em contato com a superfície do enxerto (M). (BIO3)

A Figura 43 apresenta a região medular onde verifica-se o processo de osteocondução e a coexistência de colágeno maduro disposto paralelamente em forma de lamelas e concêntrico formando osteonas.

Fica evidenciada na Figura 43 a eficácia do uso da técnica de luz polarizada associada ao corante picro-sírius na identificação das redes de colágeno e dos dois tipos de colágeno (maduro e imaturo) presentes no processo de remodelamento ósseo.



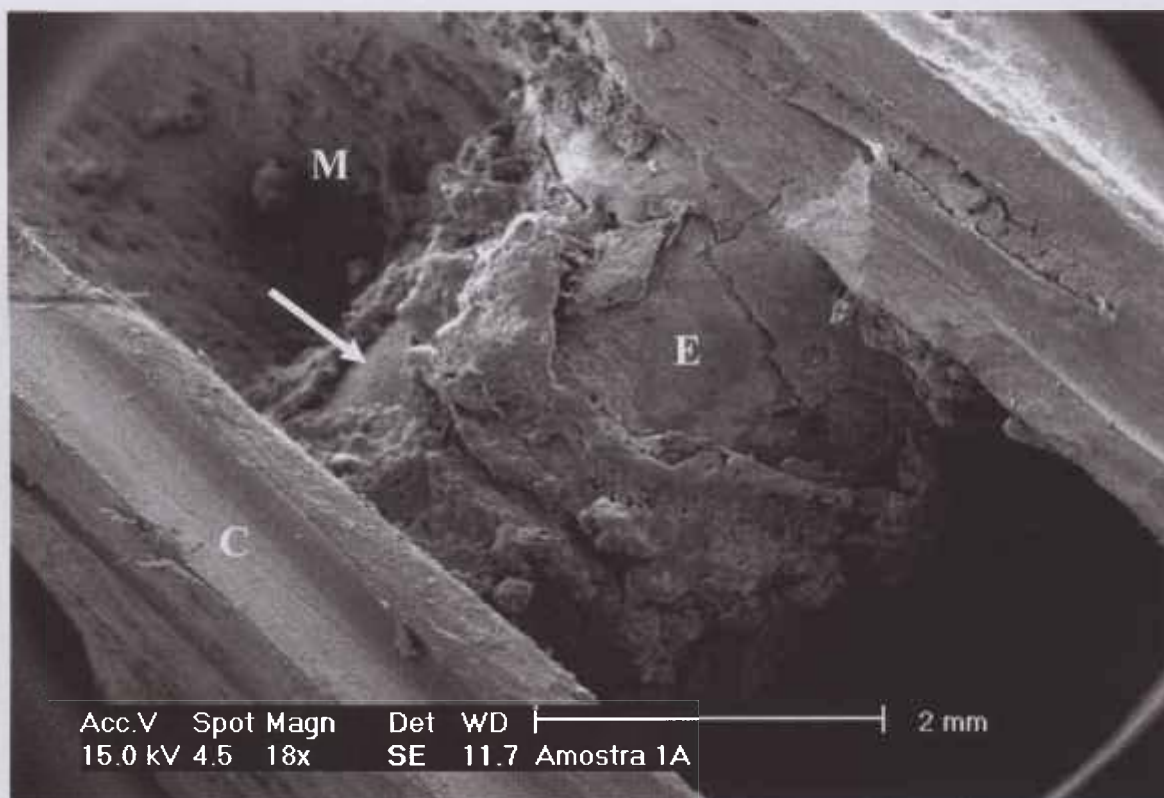
**Figura 43** - Lâmina corada com picro-sírius e analisada em microscópio de luz polarizada na região medular junto à superfície do enxerto. Aderência de colágeno de distribuição lamelar na superfície do enxerto (L). Remodelamento de osteonas (o). (BIO2)



### 6.8.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Por meio da microscopia eletrônica de varredura verificou-se o remodelamento ósseo no interior da região medular aderido à superfície do enxerto, bem como na região próxima à cortical onde houve a formação da bainha óssea.

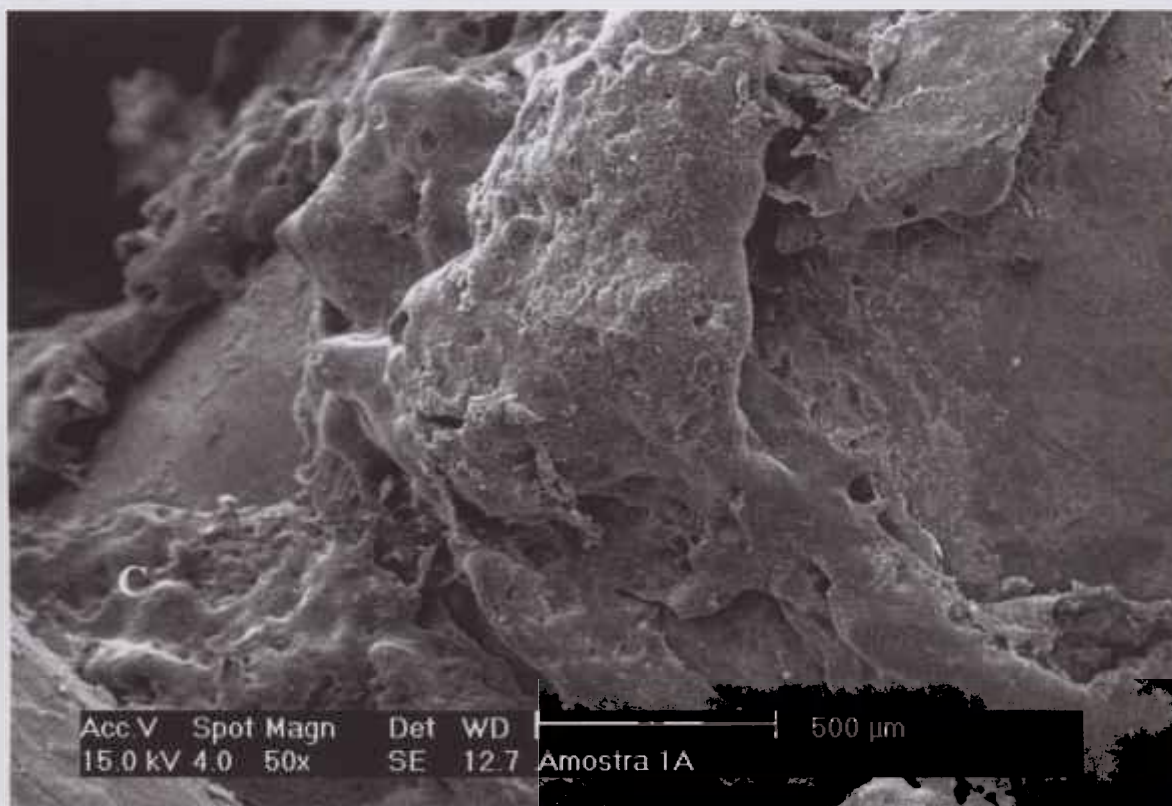
A Figura 44 mostra a cortical, a região medular e o enxerto instalado.



**Figura 44** – Micrografia eletrônica de varredura. Observa-se a cortical óssea (C), região medular (M) e o enxerto instalado (E). (BIO1)

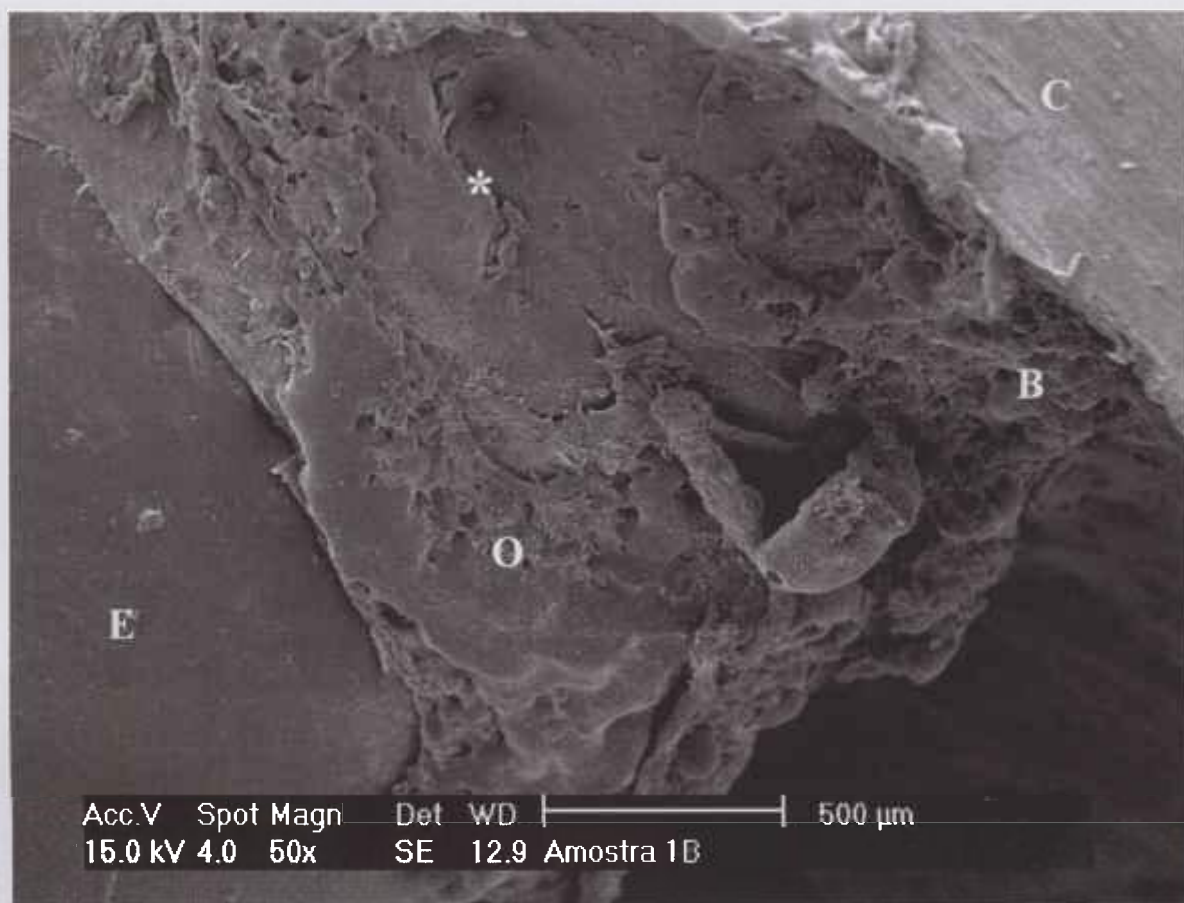
Na Figura 44 observa-se a grande quantidade de tecido depositado na região medular sobre a superfície do enxerto identificando a osteocondução como processo ativo. Observar-se também a formação de calo ósseo na região cirúrgica da tábua óssea.

A Figura 45 mostra a região indicada pela seta na Figura 44 ampliada para que possa ser avaliada a interação entre o tecido e a superfície do implante. Verifica-se que o tecido ósseo deposita diretamente sobre a superfície do enxerto, inclusive em regiões afastadas da cortical.



**Figura 45** – Micrografia eletrônica de varredura da superfície do enxerto. Observa-se o contato do tecido ósseo na superfície do vidro. Cortical (C). (BIO1)

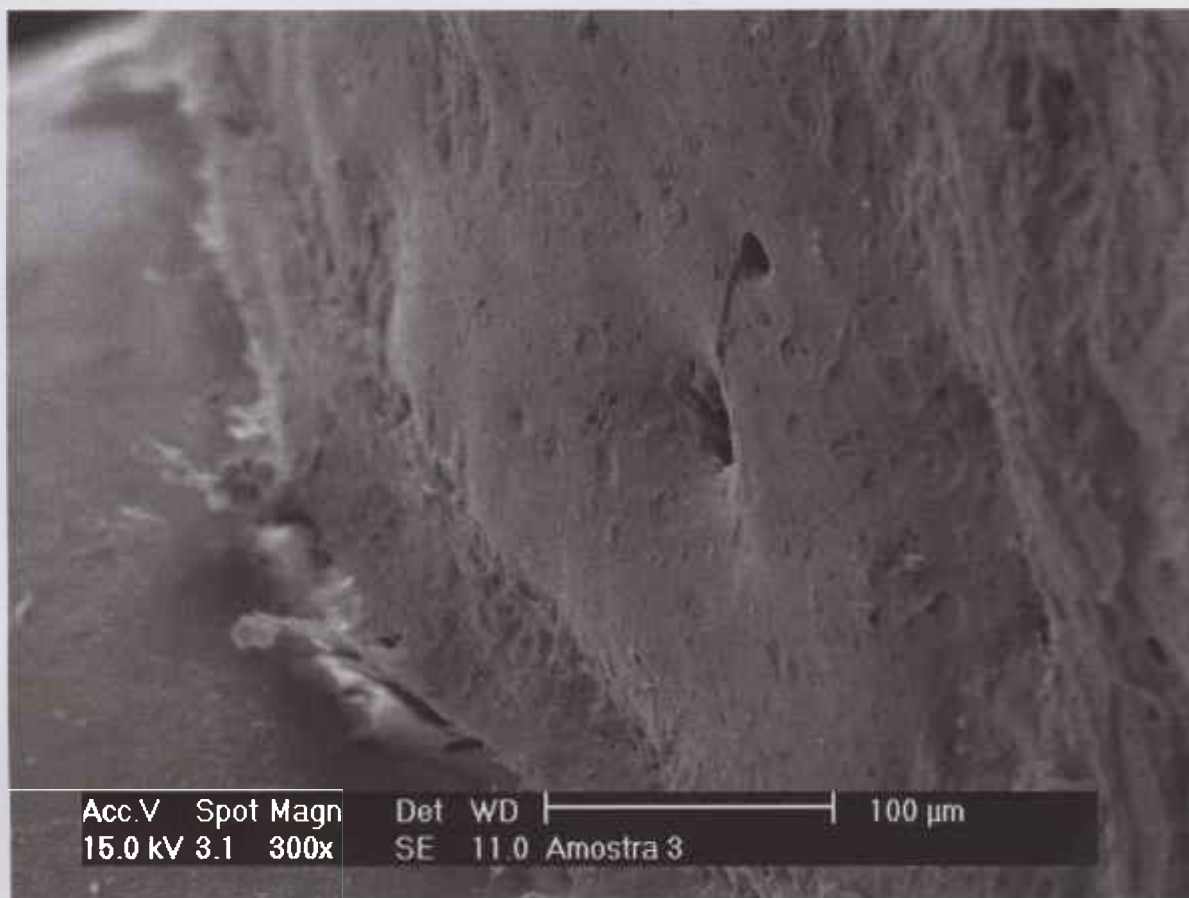
A Figura 46 apresenta a formação da bainha e o processo de osteocondução a partir da cortical sobre a superfície do enxerto.



**Figura 46** – Microscopia eletrônica de varredura. Formação da bainha (B) e processo de osteocondução (O) próxima à região da cortical (C). Enxerto (E). (BIO2)

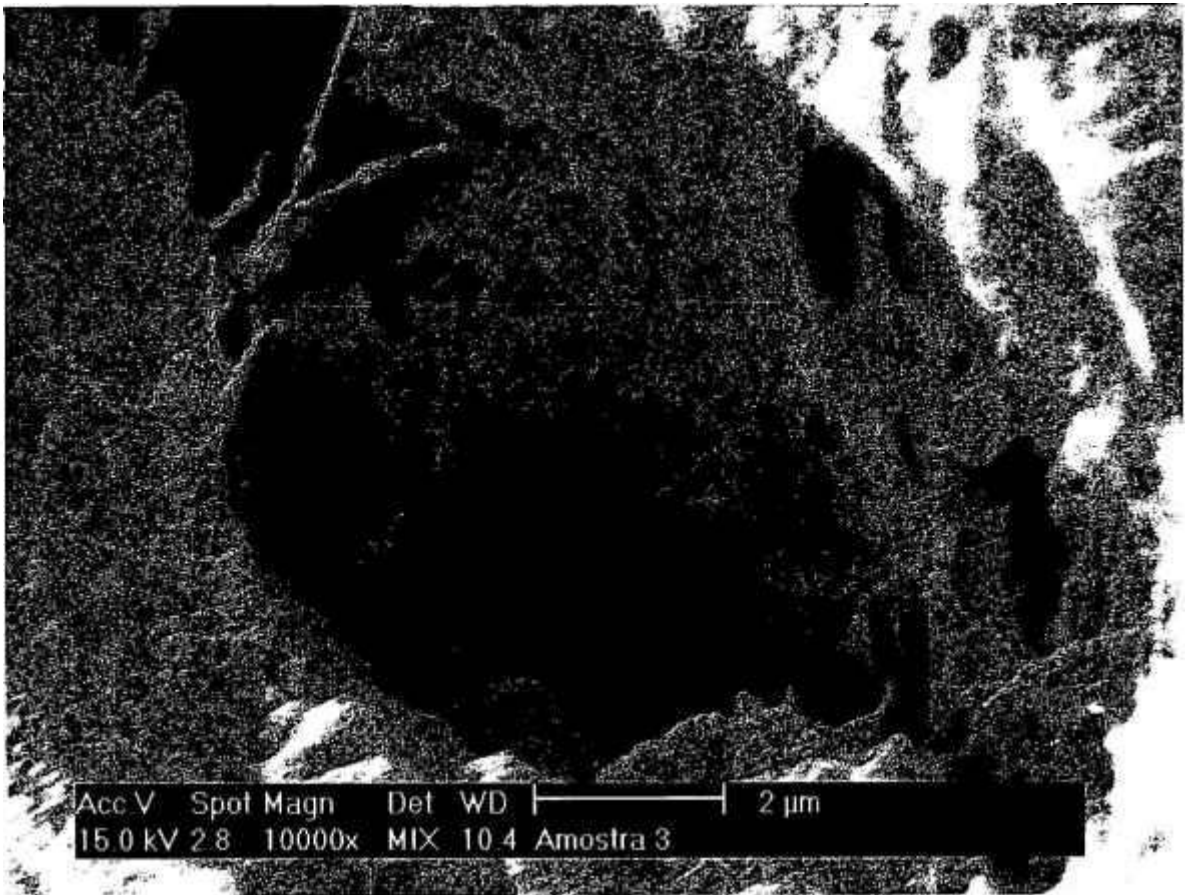
Para identificar possíveis contaminações dos elementos presentes no material de enxertia, análises por espectroscopia de energia dispersiva foram realizadas no tecido remodelado na região marcada com o símbolo (\*) da Figura 46. Não detectou-se a presença do elemento nióbio no tecido neoformado por esta técnica. Foram detectados cálcio e fósforo, principais constituintes da parte mineral do osso.

A Figura 47 mostra a existência de forames nutritivos [73] na cortical da tíbia do coelho.



**Figura 47** – Microscopia eletrônica de varredura da superfície periosteal. Observa-se a existência de forames. (BIO3)

A Figura 48 mostra o interior do forame nutrício.

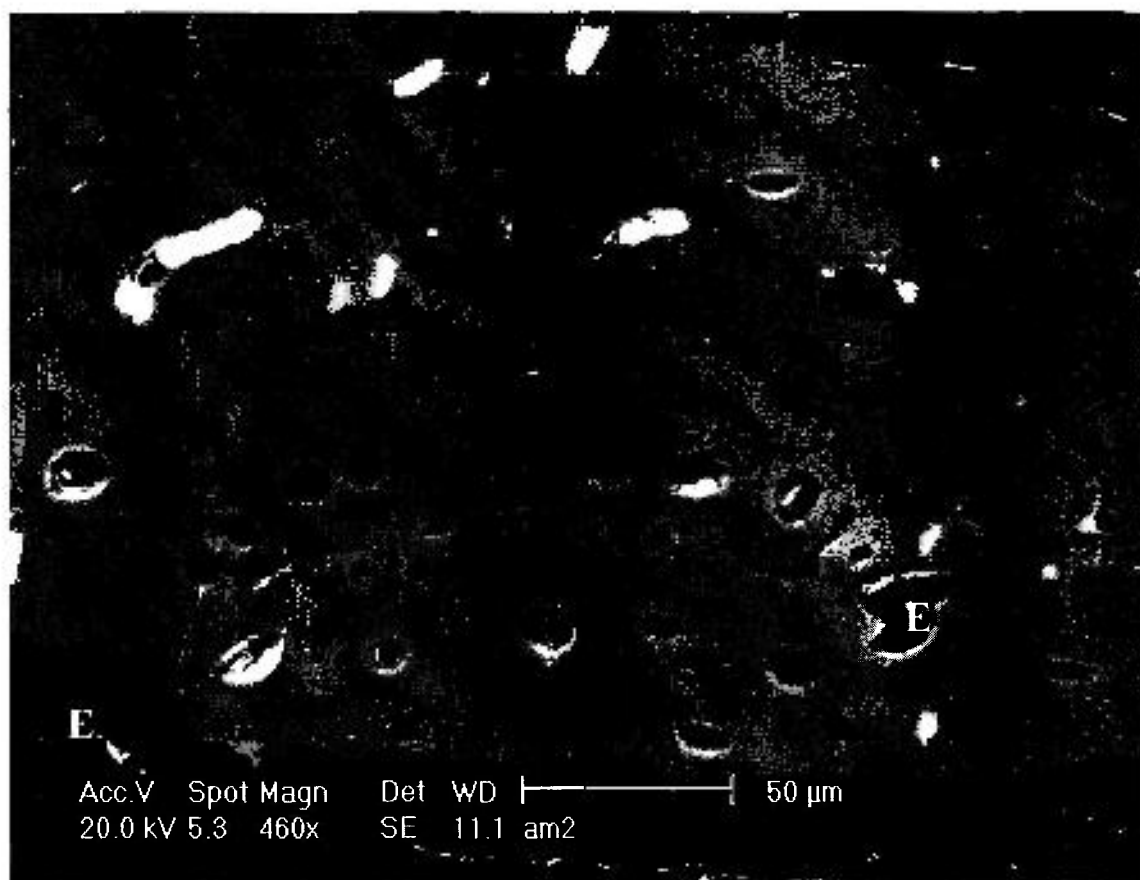


**Figura 48** – Microscopia eletrônica de varredura da superfície periosteal. Observa-se o interior do forame nutrício. (BIO3)

Os forames nutrícios conduzem as artérias nutrícias ao interior de canais nutrícios.

Lâminas histológicas também foram observadas por microscopia eletrônica de varredura para melhor avaliar o contato entre a superfície do enxerto e o tecido remodelado.

A Figura 49 mostra a região de remodelamento ósseo junto à superfície do enxerto.



**Figura 49** – Microscopia eletrônica de varredura mostrando o tecido remodelado (TR) junto à superfície do enxerto (E). Presença de osteócitos (Oc) e canais de Havers (HC). (BIO3)

Análises por espectroscopia de energia dispersiva foram realizadas nas lâminas na região do enxerto e no tecido remodelado para verificar os elementos presentes nessas regiões [80]. O resultado desta técnica revelou a existência de fósforo, cálcio, sódio e nióbio no enxerto, porém, apenas fósforo e cálcio foram detectados no tecido remodelado confirmando os resultados anteriores. Não detectou-se a presença de nióbio no tecido remodelado.

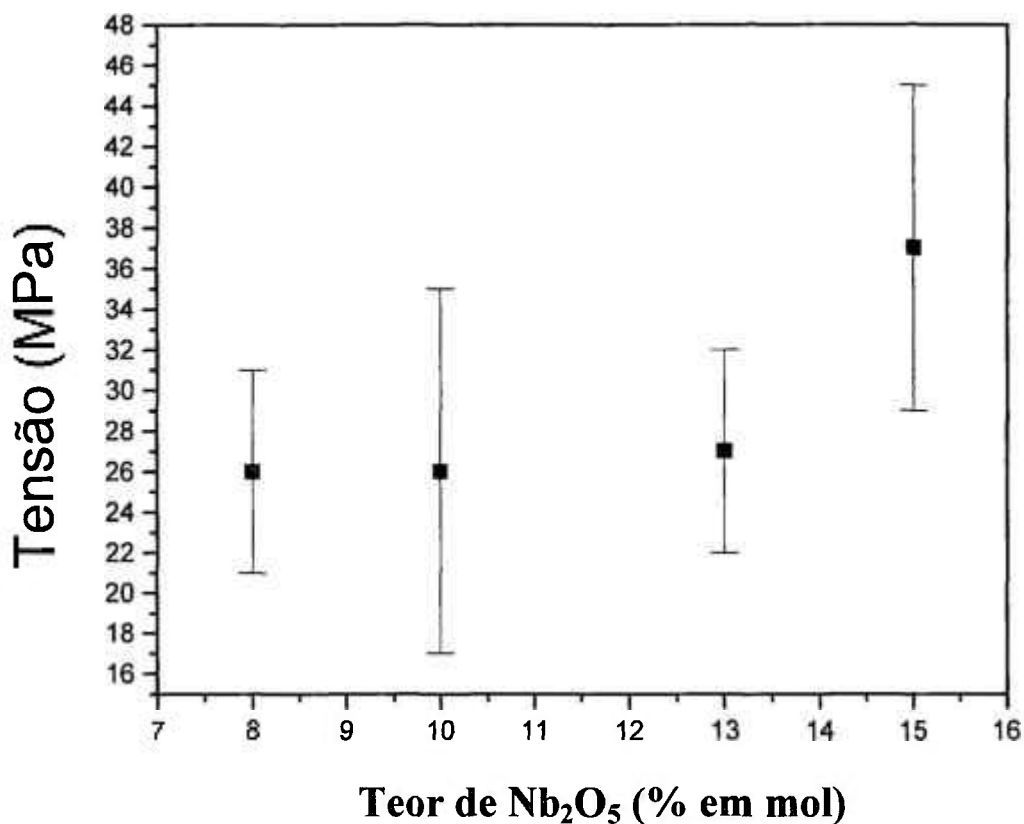
## 6.9. ENSAIOS MECÂNICOS

### 6.9.1. COMPRESSÃO DIAMETRAL

Os valores de tensão máxima de fratura em função do teor de óxido de nióbio dos vidros estudados estão apresentados na Figura 50, onde cada medida representa a média de seis corpos de prova.

Verifica-se que a resistência mecânica é semelhante para os vidros estudados. O valor médio da tensão de fratura para a amostra contendo 15% em mol de óxido de nióbio sugere que este vidro apresenta maior resistência a fratura, alcançando o valor máximo de 44 MPa para este ensaio.

A tensão de fratura dos vidros deste trabalho são semelhantes aos resultados reportados na literatura [51] para outros vidros bioativos, tendo sido encontrado as mesmas dificuldades para a realização deste ensaio. Observa-se excessiva variação da tensão de fratura como, por exemplo, na composição contendo 10% em mol de óxido de nióbio que variou entre 17 e 35 MPa. Esta variação, representada pelo desvio padrão, atingiu até 35% do valor médio e pode ser observada pelas barras de erro da Figura 50.

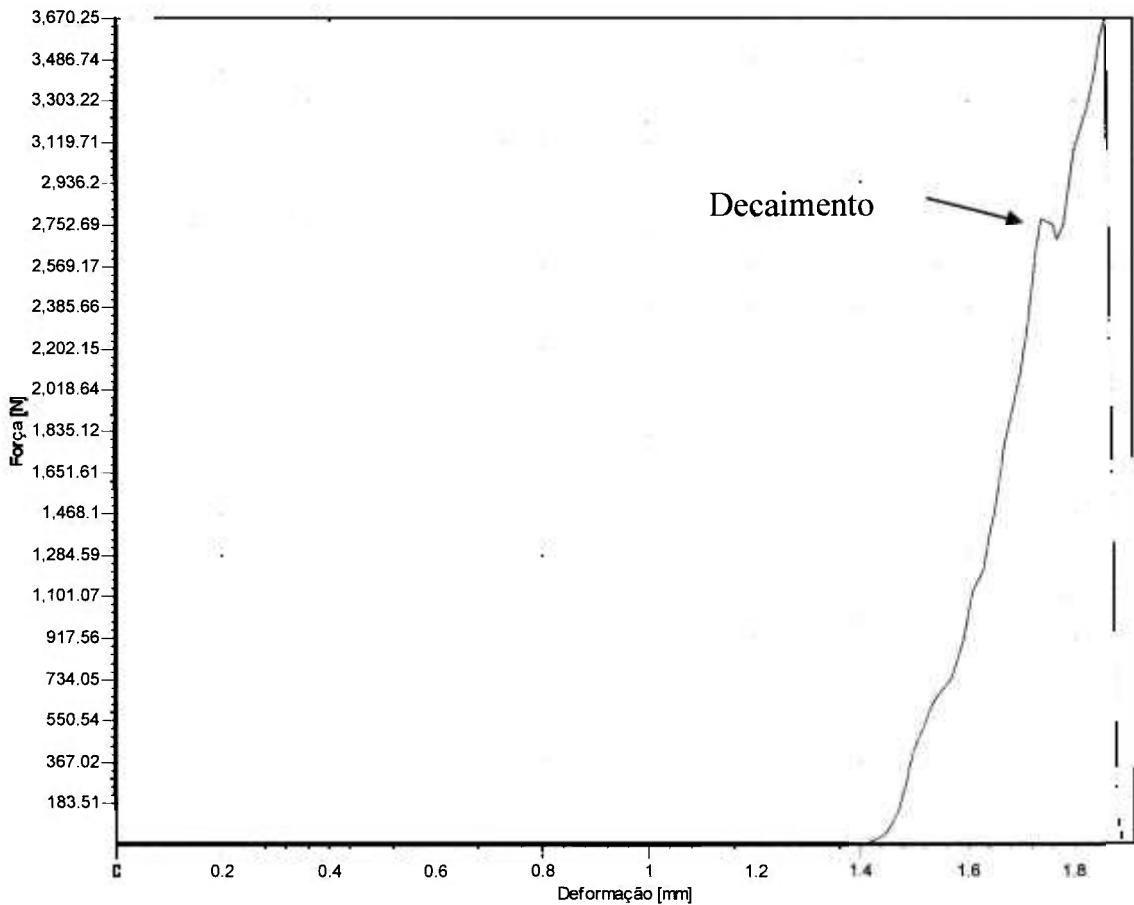


**Figura 50** – Tensão de fratura dos vidros medida por compressão diametral em função do teor de óxido de nióbio.

Como previamente exposto por PEITL FILHO [51], a principal fonte de erro do ensaio de compressão diametral foi determinada por meio da observação das folhas de papel colocadas para melhorar a adaptação do dispositivo aplicador de carga a superfície dos corpos de prova, e das curvas de tensão em função da deformação fornecidas pela máquina de ensaio de compressão. A evidência da má distribuição de carga foi fornecida pela análise da folha de papel. Em princípio, em um ensaio bem sucedido de compressão diametral a folha de papel deveria apresentar uma linha contínua em toda extensão de aplicação da carga. Entretanto, a folha de papel empregada nos ensaios, em sua maioria, revelou uma linha descontínua.



Algumas curvas apresentaram decaimento da carga durante o carregamento após o qual retornava a crescer, como mostrado na Figura 51.



**Figura 51** – Curva de carregamento por compressão diametral do vidro fosfato contendo cálcio, sódio e nióbio. (BIO 1)

Novamente tomando como referencia o trabalho de PEITL FILHO [51], o alívio da carga durante o ensaio de compressão diametral, foi aqui também associado à propagação de trincas, que ocorreu com o carregamento abaixo da tensão de propagação catastrófica. A propagação de trincas abaixo da tensão de fratura ocorreu devido a concentração de tensão em pontos específicos do corpo de prova, causada

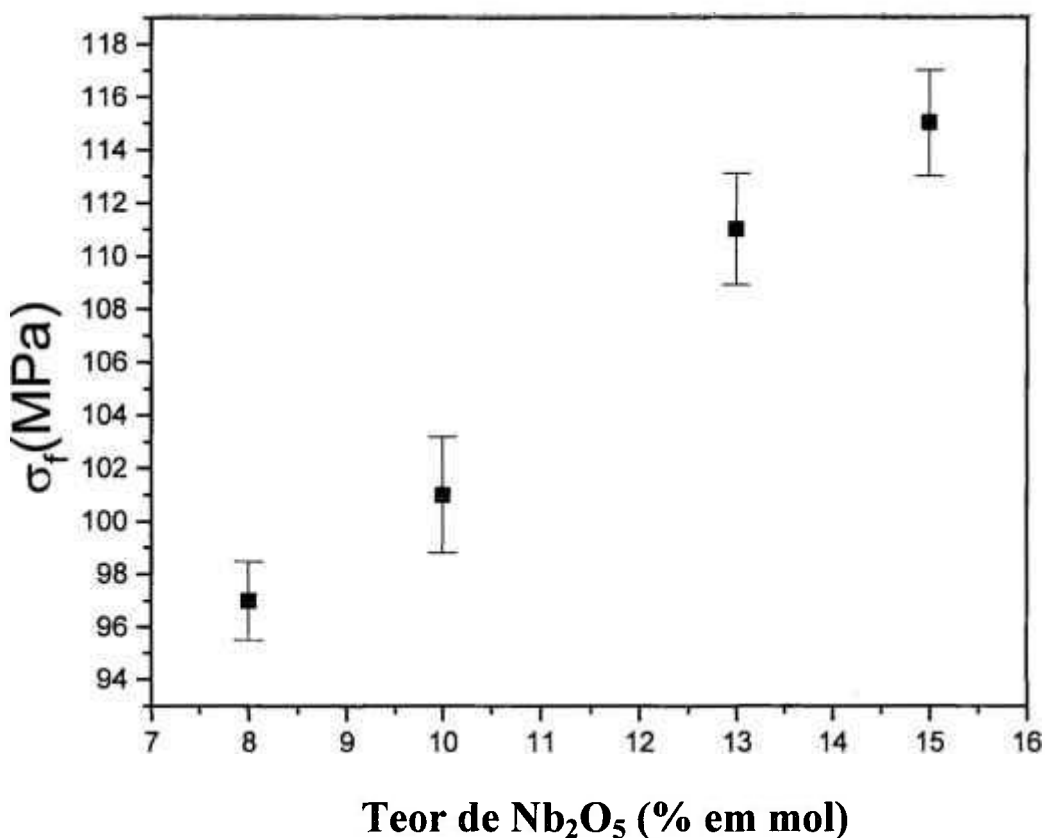
pela rugosidade superficial dos cilindros, originada do processo de moldagem. Esta rugosidade provocou uma distribuição heterogênea da carga ao longo da linha de contato entre a amostra e o dispositivo de aplicação de carga e resultou no carregamento excessivo nos pontos de contato.

A impossibilidade de se produzir cilindros com superfícies isentas de rugosidade inviabilizou a utilização dos resultados do ensaio de compressão diametral para as medidas de tensão de fratura e este ensaio foi substituído pelo ensaio de flexão de três pontos.

### **6.9.2. FLEXÃO A TRÊS PONTOS**

A Figura 52 apresenta os resultados do módulo de ruptura dos vidros contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.

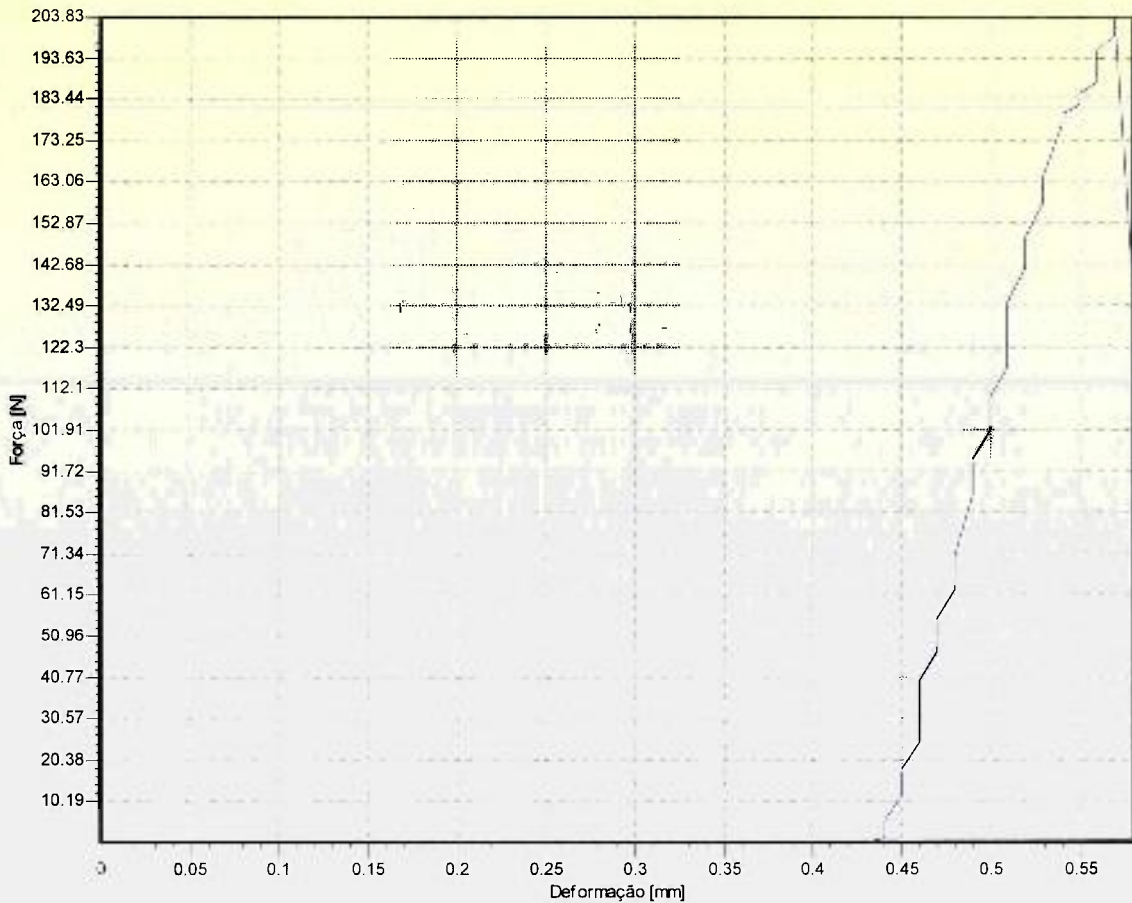
Esta figura mostra que a resistência mecânica dos vidros aumenta em função do teor de nióbio. Quando comparados com a literatura, os valores aqui encontrados são superiores aos encontrados por Hench [9] para o vidro bioativo 45S5 que apresentou tensão de fratura entre 40 e 60 MPa no ensaio de flexão. Quando comparados com os resultados encontrados por PEITL FILHO [51] para o vidro SSP4 isento de fração cristalizada ( $76 \pm 16$  MPa), os resultados são próximos dos valores encontrados para o vidro contendo 8% em mol de óxido de nióbio.



**Figura 52** - Tensão de fratura dos vidros contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio por flexão a três pontos.

A Figura 53 mostra a curva de carregamento por flexão a três pontos do vidro fosfato contendo cálcio, sódio e nióbio.

Para determinar o módulo de elasticidade foi utilizado o valor da deformação obtido por meio da Figura 53. Este valor, apesar de não ser preciso devido a ausência de equipamentos para determinar a deformação com maior precisão, forneceu informações do comportamento do módulo de elasticidade em função do aumento do teor de nióbio nos vidros.



**Figura 53** – Curva de carregamento por flexão em três pontos do vidro fosfato contendo cálcio, sódio e nióbio. (BIO 1)

Os valores do módulo de elasticidade para amostras contendo 8, 10, 13 e 15% mol de óxido de nióbio determinados por meio dos valores da flecha obtida durante o ensaio de flexão a três pontos estão mostrados na Tabela 14.

Os resultados dos ensaios de flexão a três pontos mostram que com o aumento do teor de óxido de nióbio, a tensão de fratura do vidro aumenta e a tendência indicada pelos ensaios de compressão diametral foi a mesma porém, os valores obtidos com o ensaio de flexão a 3 pontos foram até 5 vezes superiores e a dispersão dos resultados não ultrapassou 2%. O módulo de elasticidade calculado

com o valor da flecha resultante do ensaio de flexão mostrou que os resultados são próximos ao do osso cortical e que este valor pode ser ajustado variando-se a composição dos vidros de acordo com a região de instalação do enxerto.

**Tabela 14** – Valores do módulo de elasticidade para os vidros contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.

Vidro	Módulo de Elasticidade (GPa)
BIO1	33
BIO2	35
BIO3	40
BIO4	41

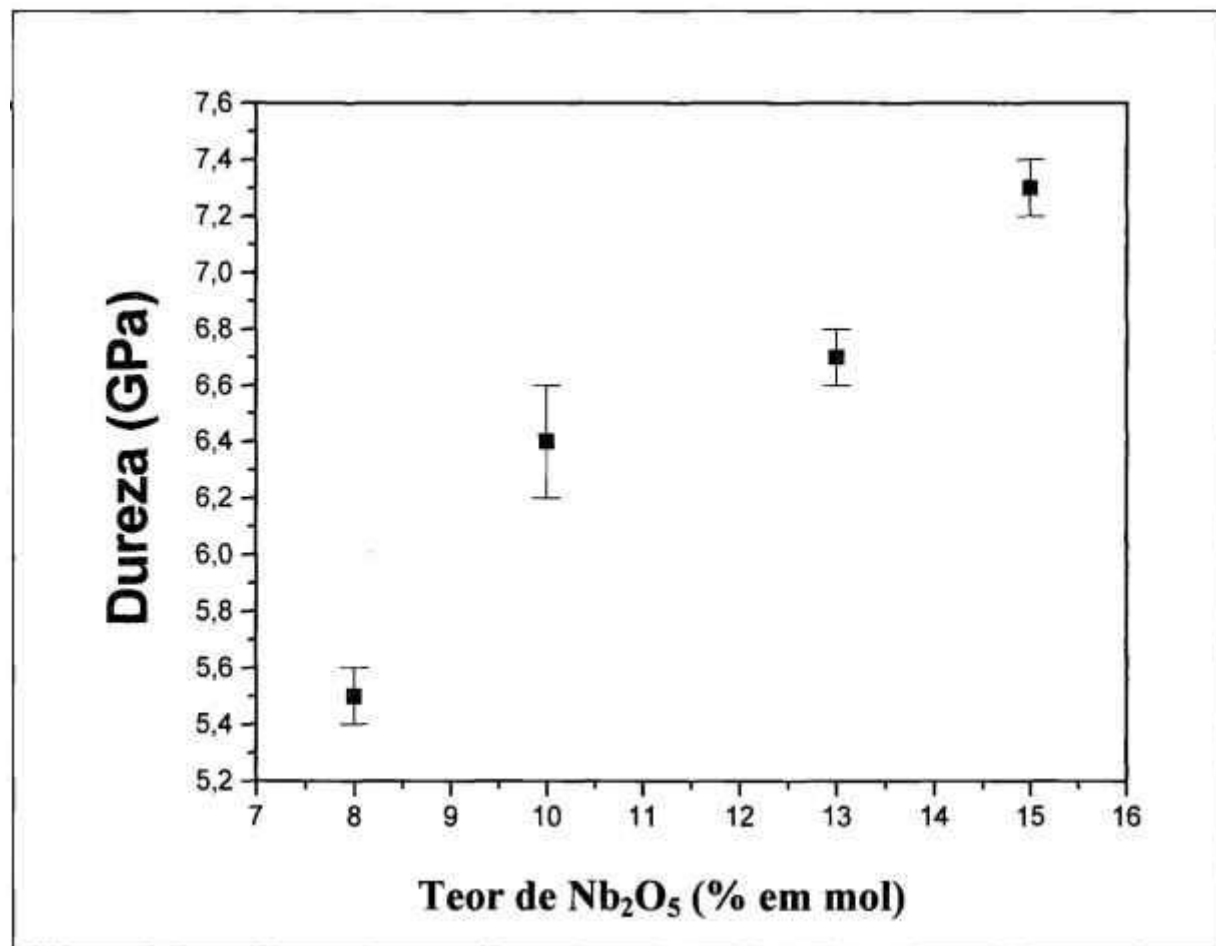
Novamente, os valores do módulo de elasticidade determinados por meio de ensaios de flexão em quatro pontos [51] para o vidro bioativo SSP4 isento de fração cristalizada ( $33 \pm 1,3$  GPa), são semelhantes aos valores determinados para os vidros do presente trabalho contendo 8% em mol de óxido de nióbio.

### 6.9.3. MICRODUREZA

A Figura 54 apresenta os resultados de dureza Vickers dos vidros contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.

Os resultados de dureza do material estão de acordo com os resultados obtidos nos ensaios de compressão diametral e flexão a três pontos; a dureza aumenta em função do teor de nióbio. Sendo a dureza o índice de coesão reticular, esta grandeza está relacionada com a força de ligação entre os átomos que formam sua estrutura e o número de ligações presentes nas unidades básicas formadoras do

vidro. Por este motivo, com o aumento do teor de nióbio a estrutura dos vidros fosfato é constituída por grupos atômicos com maior coordenação e maior força de ligação, conseqüentemente o material terá maior dureza [33].



**Figura 54** – Valores de dureza para os vidros contendo 8, 10, 13 e 15% em mol de óxido de nióbio.

Estes valores são superiores aos determinados por PEITL FILHO [51] para o vidro bioativo SSP4 isento de fração cristalizada ( $4,5 \pm 0,1$  GPa) e para o vidro bioativo SSP6 ( $4,4 \pm 0,2$  GPa).

## 7. CONCLUSÕES

Determinou-se que o nióbio participa como formador de estruturas vítreas em cadeias que apresentam ligações do tipo O-P-Nb-O-P-O e Nb-O-Nb, substituindo grupos fosfatos em coordenação tetraédricas.

O aumento da concentração de óxido de nióbio aumenta a durabilidade química, a densidade e a resistência mecânica destes vidros. O módulo de elasticidade pode ser facilmente adequado em função do teor de óxido de nióbio.

Todas as composições estudadas são atóxicas.

O processo de remodelamento ósseo apresenta menor intensidade de deposição nos períodos logo após os procedimentos cirúrgicos e continuam com grande intensidade e sem interrupções nos períodos subseqüentes.

A adição de nióbio não interferiu nos resultados de área de deposição de tecido remodelado sendo que as regiões mais próximas da tábua óssea apresentam maior área de deposição em relação às áreas da medula óssea.

A presença predominante de colágeno tipo I é propício para a deposição de minerais. A direção das fibras de colágeno apresenta em algumas regiões, rede entrelaçada aleatória pronta para deposição da parte mineral.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BRANEMARK, P.J.; HANSSON, B. O.; ADELL, R.; BREINE, U.; LINDSTRON, J.; HALLEN, O.; ÖMANN, A. Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J. Plast Reconstruction Surg.* 3:81, 1969.
02. DUCHEYNE; P., QIU, Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*, v. 20, p. 2287-2303, 1999.
03. VOGEL, J.; WANGE, P; HARTMANN, P. Phosphate glasses and glass-ceramics for medical applications. *Glastech. Ber. Glass Sci. Technol.*, v. 70, p. 220-223, 1997.
04. DAY, D. Using glass in the body, *The American Ceramic Society Bulletin*, v. 74, p. 64-68, 1995.
05. HENCH, L.L. Biomaterials: a forecast for the future, *Biomaterials*, v. 19; p. 1419-1423, 1998.
06. GOMES, L.A. ***Implantes osseointegrados, técnica e arte***, 1a. ed., Santos Livraria e Editora, São Paulo, SP, 2002.
07. BONFIELD, W.; BEST, S.; KRAJEWSKI, A.; RAVAGLIOLI, A. Prospects for ceramics in clinical applications, *Bioceramics, Fourth Euro Ceramics*, v. 8, p.3-6, 1995.
08. GASSER, B. About composites materials and their use in bone surgery, *Injury, Int. J. Care Injure*, v. 31, p.48-53, 2000.
09. HENCH, L.; WILSON, J. ***An Introduction to Bioceramics***, Advanced Series in Ceramics, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993.
10. HULBERT, S. The use of alumina and zirconia in surgical implants, *Advanced Series in Ceramics*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993.



11. DUCHEYNE, P.; HEALY, K.E. Surface spectroscopy of calcium phosphate ceramic and titanium implant materials, In: KATNER, B.(ED). Surface characterization of biomaterials, Amsterdam, p. 175-192, 1998.
12. DUBOIS, J.C.; SOUCHIER, C.; COUBLE, M.L.; EXBRAYAT, P.; LISSAC, M. An image analysis method for the study of cell adhesion to biomaterials, *Biomaterials*, v. 20, p. 1841-1849, 1999.
13. DAVIES, J. E. ***Bone engineering***. Toronto: Squared Incorporated, 2000.
14. COVEY, D.C. Clinical induction of bone repair with demineralized bone matrix or a bone morphogenetics protein, *Orthopedic Review*, v. 18, p. 857-863, 1986.
15. KOKUBO, T.; HENCH, L.L.; WILSON, J. *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific, Singapore, p. 75, 1993.
16. HENCH, L.L.; SPLINTER, R.J.; ALLEN, W.C.; GREENLEC, T.K. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, *J. Biomedical Research Symposia No. 2*, Interscience, New York, p. 117, 1972.
17. ZACHARIASEN, W.H. *J. Am. Soc.* v. 54, p. 3841, 1938.
18. PENG, Y.B., DAY, D.E. High thermal expansion phosphate glass; *Glass Technology*, v. 32; p. 166; 1991.
19. MILANKOVIC, A.M.; DAY, D.E. Thermally stimulated polarization and DC conduction in iron phosphate glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 162, p. 275-286, 1993.
20. YUNFEI, L; WEIWEI, H. Structural study of iron phosphate glasses, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 112, p. 136-141, 1989.
21. SALES, B.C.; ABRAHAM, M.M. Structural properties of lead-iron phosphate glasses, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 71, p. 103-112, 1985.

22. SALES, B.C.; BOATNER, L.A. Lead phosphate glasses as a stable medium for the immobilization and disposal of high-level nuclear waste, *Materials Letters*, v. 2, p. 221, 1984.
23. DAYANAND, C.; GRAW, M.S. Structural investigations of phosphate glasses, *Journal of Materials Science*, v. 31, p. 1945-1967, 1996.
24. KAWACHI, E.Y.; BERTRAN, C.A.; REIS, R.R.; ALVES, O.L. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar, *Química Nova*, v. 23, p. 518-522, 2000.
25. VOGEL, J.; SCHULZE, K.J.; REIF, D.; HARTMANN, P.; PLATZBECKER, U.; LEUNER, B. Resorbable porous phosphate invert glasses – First in vitro and in vivo results, *Bioceramics*, v.10, p. 5760, 1997.
26. KASUGA, T.; ABE, Y. Calcium phosphate invert glasses with soda and titania, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 243, p. 70-74, 1999.
27. KASUGA, T.; MIZUNO, T.; WATANABE, M.; NOGAMI, M.; NIINOMI, M. Calcium phosphate invert glass-ceramic coatings joined by self-development of compositionally gradient layers on a titanium alloy, *Biomaterials*, v. 22, p. 577-582, 2001.
28. KNOWLES, J.C.; FRANKS, K.; ABRAHAM, I. Investigation of the solubility and ion release in the glass system  $K_2O - Na_2O - CaO - P_2O_5$ , *Biomaterials*, v. 22, p. 3091-3096, 2001.
29. KURKJIAN, C.R. Mechanical properties of phosphate glasses, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 263&264, p. 207-212, 2000.
30. UO, M.; MIZUNO, M.; KUBOKI, Y.; MAKISHIMA, A.; WATARI, F. Properties and cytotoxicity of water soluble  $Na_2O - CaO - P_2O_5$  glasses, *Biomaterials*, v. 19, p. 2277-2284, 1998.

31. ZHANG, Y.; SANTOS, J.D. Microstructural characterization and in vitro apatite formation in CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-TiO<sub>2</sub>-MgO-Na<sub>2</sub>O glass ceramic, Journal of the European Ceramic Society, v. 21, p.169-175, 2001.
32. ARANHA, N. **Vidros Niobofosfatos: Preparação, Caracterização e Propriedades**. 1994. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
33. SENE, F.F. **Síntese e Caracterização de Vidros Niobofosfato de Bário e Potássio para Aplicações como Matriz Hospedeira de Íons de Terras Raras**. 2002. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
34. MAZALI, I.O.; ABREU FILHO, P.P.; ALVES, O.L. Propriedades Estruturais e Comportamento da Cristalização de Vidros Niobofosfatos: Precusores de Vitrocerâmicas Porosa, Anais 13<sup>o</sup> CBECIMAT, 1998.
35. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. M.J. Carbonari; J.R. Martinelli; B. König Jr.; L.J. Faria Jr. Vidro Bioativo Aperfeiçoado com Adição de Nióbio e aplicações Osteointegradas, BR PI Pat. 411, 20 set 2002.
36. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. M.J. Carbonari; J.R. Martinelli; B. König Jr.; L.J. Faria Jr. Bioactive Niobium Phosphate Glasses for Osteointegrated Applications, PCT-Patent Cooperation Treaty, N 082, 09 set 2003.
37. ISO document 10993-5. **Biological evaluation of medical devices**, Part 5, Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods, 1992.
38. ROGERO, S.O.; MALMONGE, S.M.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; MIYAMARU, L.L.; CRUZ, A.S. Biocompatibility study of polymeric biomaterials, Proceedings do II COLAOB – Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Belo Horizonte, Dezembro 2001.

39. LOPÉRGOLO, L.C.; BARROS, J.A.G.; ROGERO, S.O.; CRUZ, A.S.; IKEDA, T.I.; MIYAMARU, L.L.; LUGÃO, A.B.; CATALANI, L.H. Estudo da biocompatibilidade de membranas à base de poli(n-vinil-2-pirrolidona) produzidas por radiação ultravioleta. Anais do 6o. Congresso Brasileiro de Polímeros/IX International Macromolecular Colloquium, Gramado, Novembro 2001.
40. ADAMI JR., N. ***O Efeito do Volume na Revitalização e Osteointegração do Enxerto Ósseo Autógeno Endocondral.*** 2003. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo.
41. DONATH, K.; BREUNER, G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues, J. Oral Pathol., v. 11, p. 318:326, 1982.
42. RAHN, B. A. Die polychrome sequenzmarkierung, Freiburg i. Br., Habilitations-Schrift, 1976.
43. KÖNIG JR, B.; AND LOPES, C. C. Bone remodeling analysis after placement of dental implants using polyfluorochrome sequential labeling. Annals of Anatomy v. 184, p. 241-244, 2002.
44. DUBOIS, J.C.; SOUCHIER, C.; COUBLE, M.L.; EXBRAYAT, P.; LISSAC, M. An image analysis method for the study of cell adhesion to biomaterials, Biomaterials, v. 20, p. 1841-1849, 1999.
45. WOLMAN, M. Polarized Light Microscopy as a Tool of Diagnostic Pathology – A Review, The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, v. 23, p. 21-50, 1975.
46. KIRÁLY, K. Specimen Preparation and Quantification of Collagen Birefringence in Unstained Sections of Articular Cartilage Using Image Analysis and Polarizing Light Microscopy, Histochemical Journal, v. 29, p. 317-327, 1997.

47. PIDAPARTI, R.M.V.; CHANDRAN, A.; TAKANO, Y.; TURNEY, C.H. Bone Mineral Lies Mainly Outside Collagen Fibrils: Predictions of a Composite Model for Osteonal Bone, *J. Biomechanics*, v. 29, p. 909-916, 1996.
48. JUNQUEIRA, L.C.U.; MONTES, G.S.; SANCHEZ, E.M.; The influence of Thickness on the Study of Collagen by the Picrosirius-Polarization Method, *Histochemistry*, v. 74, p. 153-156, 1982.
49. MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C.U. The use of the Picrosirius-Polarization Method for the Study of the Biopathology of collagen, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 1-11, 1991.
50. VIDAL, B.C.; MELLO, M.L.; PIMENTEL, E.R. Polarization Microscopy and Microspectrophotometry of Sirius Red, Picrosirius and Chlorantine Fast Red Aggregates and of their complexes with Collagen, *Histochemical Journal*, v. 14, p. 857-878, 1982.
51. PEITL FILHO, O. ***Vitro-cerâmica bioativa de alto desempenho mecânico***. 1995. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.
52. LOSEKANN, C.R. Processos de Fabricação I - Apostila do Curso de Engenharia Industrial Mecânica, Universidade do Vale do Itajaí, p. 27-34, 2001.
53. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ***Resistência a Tração Simples de Argamassa e Concreto por Compressão Diametral de Corpos de Prova Cilíndricos***. MB-212. 1958.
54. Associação Brasileira de Normas Técnicas. ***Determinação da Resistência à Tração por Compressão Diametral de Corpos de Prova Cilíndricos***. NBR-7222. 1983.
55. PRICE, W.M. Green Strength of Ceramics: Techniques for Measuring the Tensile Strength of Unfired Clays and Ceramic Bodies, *Interceram*, v. 3, p. 197-200, 1974.

56. MARION, R.H.; JOHNSTONE, J.K. A Parametric Study of the Diametral Compression Test for Ceramics, *Ceramic Bulletin*, v. 56, p. 998-1002, 1977.
57. SOUZA, S.A. ***Ensaio Mecânicos de Materiais Metálicos***. 5<sup>a</sup> ed. Ed. Edgard Blücher Ltda. São Paulo, 1982.
58. American Standard for Testing and Materials (ASTM). ***Standard Test Methods for Strength of Glass by Flexure (Determination of Modulus of Rupture)***, ASTM C-158-84.
59. ANSTIS, G.R.; CHANTIKUL, P.; LAWN, B.R.; MARSHALL, D.B. A Critical Evaluation of Indentation Techniques for Measuring Fracture Toughness: I, Direct Crack Measurements, *Journal of the American Ceramic Society*, v. 64, p. 533-538, 1981.
60. CHANTIKUL, P.; ANSTIS, G.R.; LAWN, B.R.; MARSHALL, D.B. A Critical Evaluation of Indentation Techniques for Measuring Fracture Toughness: II, Strength Method, *Journal of the American Ceramic Society*, v. 64, p. 539-543, 1981.
61. HIGAZY, A.A.; BRIDGE, B. Infrared Spectra of the Vitreous System  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-P}_2\text{O}_5$  and their interpretation, *Journal of Materials Science*, v. 20, p. 2345-2358, 1985.
62. PONTUSCHKA, W.M.; SEM, M.; ROUSE, C.G. Técnicas de preparação de vidros especiais. Apostila do curso de pós-graduação. Instituto de Física da Universidade de São Paulo. São Paulo. 1992.
63. DAYNAND, C.; GRAW, M.S. Structural Investigations of Phosphate Glasses, *Journal of Materials Science*, v. 31, p.1945-1953, 1996.
64. JAZOULI, A.E.L.; VIALA, J.C.; PARENT, C.; FLEM, G.L.E.; HAGENMULLER, P. Structural Investigation of Glasses Belonging to the  $\text{Na}_2\text{O} - \text{Nb}_2\text{O}_5 - \text{P}_2\text{O}_5$  System, *Journal of Solid State Chemistry*, v. 73, p.433-439, 1988.

65. BUNKER, B.C.; ARNOLD G.W.; WILDER, J.A. Phosphate glass dissolution in aqueous solution, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 64, p. 291-316, 1984.
66. SUN, T.C.; MORI, S.; ROPER, J., BROW, C., HOOSER T., BURR, DB. Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information?, *Bone*, v. 13, p.443-446, 1992.
67. STUART, A.J.; SMITH DA. Use of the fluorochrome xylenol orange, calcein green, and tetracycline to document bone deposition and remodeling in healing fractures in chickens, *Avian Dis.*, v. 36, p.447-449, 1992.
68. RAHN, B.A.; PERREN, S.M. Alizarin complexon-fluorochrome for bone and dentine labeling, *Experientia*, v. 15, p. 180, 1972.
69. TURNEY, C.H. Functional determinants of bone structure:beyond wolff's law of bone transformation, *Bone*, v. 13, p. 403-409, 1992.
70. DUCHEYNE, P.; QIU, Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function, *Biomaterials*, v. 20, p.2287-2302, 1999.
71. HÖLAND, W. Biocompatible and bioactive glass-ceramics – state of the art and new directions, *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 219, p. 192-197, 1997.
72. HENCH, L.L. Bioceramics: From Concept to Clinic, *Journal of American Ceramic Society*, v. 74, p. 1487-1515, 1991.
73. WILLIAMS, P.L.; WARWICK, R.; DYSON, M.; BANNISTER, L.H. **Gray Anatomia**, 37<sup>a</sup> ed, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1995.
74. GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Atlas de Histologia**; Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1990.
75. GEORGE, L.L.; ALVES, C.E.R.; CASTRO, R.R.L. **Histologia Comparada**, Editora Roca Ltda, São Paulo, 1998.

76. SCHENK, R.K.; BUSER, D.; HARDWICK, W.R.; DAHLIN, C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible, *Int J Oral Maxillofac Impl*, v. 9, p.13-29, 1994.
77. ALBREKTSSON, T.; BRANEMARK, P-I; HANSSON, H.A.; LINDSTROM, J. Osseointegrated titanium implants. Requeriments for ensuring a long-lasting direct bone anchorage in man, *Acta Orthop Scand*, v. 52, p.155-170, 1981.
78. ROBERTS, W.E.; TURLEY, P.K.; BREZNEAK, N. Bone physiology and metabolism, *J. Calif. Dent. Assoc.*, v. 15, p. 54-61, 1987.
79. SENNERBY, L.; THOMSEN, P.; ERICSON, L.E. Early tissue response to titanium implants insert in rabbit cortical bone, *J Mater Sci Mater Med*, v. 4, p. 240-250, 1993.
80. FARIA JR., L. J. ***Diferentes métodos para análise crítica da osteointegração dos implantes de titânio em tíbias de coelhos.*** 1999. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo.