
OBTENÇÃO DE VIDROS BIOATIVOS UTILIZADOS NA REPARAÇÃO ÓSSEA¹

M. J. Carbonari*

J. R. Martinelli**

F. F. Sene***

B. König Jr.****

S. O. Rogero*****

Resumo

Vidros à base de fosfato, contendo cálcio, sódio e nióbio, foram obtidos e utilizados como enxertos em tíbias de coelhos após esterilização em autoclave. Os enxertos, com superfícies lisas, foram produzidos com quatro teores de nióbio distintos, mantendo constante a razão molar entre os demais constituintes. Os vidros foram caracterizados por meio de difratometria de raios X e espectroscopia na região do infravermelho. Foram realizados ensaios de citotoxicidade segundo a norma ISO 10993-5. Após esses ensaios, 32 enxertos foram instalados em tíbias de coelhos. Para determinar a osteoin-

1 Agradecemos aos técnicos do Laboratório de Histologia do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), em especial a Marta Maria da Silva Righetti, Nilson Silva Souza, Sebastião Aparecido Boleta e Wilson Roberto Campos de Azevedo, e aos técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen), em especial a René, Cebola e Cebolinha.

* Mestre em Engenharia de Materiais pela Universidade Presbiteriana Mackenzie (UPM) e Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen). *E-mail:* mjcarbon@ipen.br

** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen).

*** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen).

**** Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

***** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen).

tegração desses enxertos e os elementos presentes no tecido formado, utilizaram-se microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva. Os resultados indicaram que os materiais são amorfos e o aumento do teor de nióbio contribuiu para reduzir a quantidade de água presente na estrutura do vidro. O vidro é atóxico, apresenta bioatividade e não existe contaminação por nióbio no tecido neoformado.

Palavras-chave: Vidros, vidro bioativo, vidro à base de fosfato.

Abstract

Glasses based on phosphate containing calcium, sodium and niobium were obtained autoclave sterilized and used as rabbit tibia inserts. The smooth surface inserts were produced with four niobium levels, with unchanged the molar ratio between the other constituents. The glasses were characterized by X ray diffraction technique and infrared spectroscopy. cytotoxicity tests were carried out in accordance to ISO 10993-5. After the tests 32 inserts has been fixed in rabbit tibias. Scanning electron Microscope with dispersive energy system has been used to determinate the inserts and bony tissue integration. The results showed that the materials were amorphous and the enhancing in the niobium contends reduces the water contend in the glasses structure. The glass is nontoxic, showing bioactivity and free of niobium contamination in new bony tissue.

Keywords: Glasses, bioactive glass, glass based on phosphate.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de próteses e enxertos vem crescendo substancialmente nos últimos anos. Esses tipos de reparos biomédicos possibilitam um grande impacto na qualidade de vida e na saúde da população (DUCHEYNE; QIU, 1999). Metais e suas ligas, materiais poliméricos, cerâmicas, vidros e vitrocerâmicas estão sendo pesquisados para que possam ser utilizados como materiais de implantes. A vantagem do uso de metais na fabricação de implantes baseia-se principalmente em suas excelentes propriedades mecânicas e no fato de que são biologicamente inertes. Cerâmicas, vidros e vitrocerâmicas são materiais promissores para serem utilizados como enxertos, pois apresentam bioatividade. A composição química desses materiais pode ser ajustada de acordo com as propriedades necessárias nas diversas partes possíveis da reparação óssea. Como exemplo do uso desses materiais, podem-se citar recobrimentos cerâmicos em implantes metálicos e a produção de compósitos bioativos. Essas alternativas podem ser utilizadas para melhorar a baixa resistência mecânica apresentada pelos materiais cerâmicos (VOGEL; WANGE; HARTMANN, 1997).

Algumas características são de fundamental importância para que um material possa ser utilizado como implante ou enxerto. Expectativa de tempo de uso, resistência a tensões mecânicas de tração, compressão e flexocompressão, alta resistência ao desgaste superficial e fadiga são algumas das propriedades necessárias. Além disso, propriedades químicas e biológicas também devem ser investigadas com o propósito de evitar o uso de materiais que possam desenvolver tumores cancerígenos e reações inflamatórias, e produzir radicais livres, entre outros fatores. Para que um implante seja bem-sucedido, o material utilizado deve ter propriedades mecânicas similares às dos ossos humanos, a fim de evitar a ocorrência de desgastes excessivos na interface entre o material implantado e o tecido, bem como inflamações provenientes do uso de materiais que apresentam alta dureza e resistência mecânica.

Os vidros bioativos previamente desenvolvidos contêm em sua composição silício, sódio, cálcio e pequenas quantidades de fósforo. Esses vidros foram patenteados e chamados de biovidros. Atualmente, eles são utilizados, por exemplo, em preenchimento de cavidades ósseas, enxertia em cirurgias para correção de defeitos periodontais e tratamento de dentina hipersensível (HENCH, 1991, 1998).

Vidros fosfatos estão sendo pesquisados para também serem utilizados como materiais bioativos, pois suas composições químicas são naturalmente mais próximas dos tecidos ósseos (DAY, 1995; HÖLAND, 1997; KASUGA; ABE, 1999; VOGEL et al., 1997).

No presente trabalho, desenvolveram-se vidros fosfatos contendo sódio (para fragmentar as cadeias fosfáticas), cálcio (para promover a formação de ortofosfato de cálcio) e nióbio (para elevar a durabilidade química e as propriedades mecânicas desses vidros, além de ser um elemento reconhecidamente bioinerte).

2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Preparação das amostras

Vidros fosfatos foram obtidos da fusão de misturas de hidróxido de amônia dibásico, óxido de nióbio, óxido de cálcio e óxido de sódio em fornos elétricos em cadinho de alumina. As misturas foram aquecidas a 450 °C por 30 minutos para decompor o hidróxido de amônia dibásico e então aquecidas a 1400 °C para completa fusão dos precursores, permanecendo nessa temperatura por uma hora para homogeneização e afinagem. O líquido é vertido em molde de aço inoxidável preaquecido a 440 °C, e esse conjunto é colocado em um forno elétrico na mesma temperatura, permanecendo por 10 minutos. Após esse período, o vidro é sacado do molde e aquecido a uma temperatura na faixa de 570 °C-620 °C, permanecendo nessa temperatura por 2 horas. 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 durante o processo de fabricação.

2.2 Espectroscopia no infravermelho

Espectroscopia no infravermelho (FTIR, do acrônimo inglês *fourier transformation infrared spectroscopy*) 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.

Para essa análise, pastilhas com diâmetro de 12 mm e espessura de 0,5 mm foram preparadas através da prensagem uniaxial de partículas de vidro de tamanho médio de 10 µm e concentração de 2% em peso, dispersas em pó de KBr (desidratado). Essas 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 (SENE, 2002).

2.3 Teste de avaliação da toxicidade

Foram avaliados os efeitos tóxicos dos vidros em células por meio de ensaios *in vitro* de citotoxicidade, utilizando um extrato diluído do material em contato com culturas de células de ovário de *hamster* chinês (CHO), da American Type Culture Collection (ATCC) (BIOLOGICAL EVALUATION..., 1992; ROGERO et al., 2000). Solução fenol (0,02%) e alumina foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Os extratos foram preparados com a adição de 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 (NAKAMURA et al., 1989). Para a preparação das placas de cultura de células, 2 mL de 1×10^2 células/mL de CHO foram adicionados para cada 60 mm de diâmetro da placa de cultura ensaiada e incubada por aproximadamente 5 horas a 37 °C e umidade de 5% em uma incubadora com atmosfera de CO₂, 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% de rodamina B em 4% de formaldeído depois de sete dias de incubação. O número de colônias visíveis em cada placa foi contado por meio um contador de cultura digital e comparado com o número de colônias de CHO das placas-controle.

2.4 Ensaios *in vivo*

Para verificar a osteointegração, enxertos com diâmetro de $3,20 \pm 0,10$ mm e comprimento de $7,00 \pm 1,00$ mm foram instalados em tíbias de coelhos Nova Zelândia, onde permaneceram durante oito semanas em cicatrização. Este estudo seguiu os procedimentos da Comissão de Ética de Pesquisas com Animais, de acordo com o protocolo cirúrgico (Protocolo nº 97/2002). Após um período de quarentena, oito coelhos com peso aproximado de 3 kg receberam 32 enxertos (oito por grupo). De acordo com o plano cirúrgico, dois enxertos foram instalados na região proximal de cada tíbia sob anestesia geral e proteção de antibiótico. O protocolo cirúrgico foi o mesmo para todos os animais. Os coelhos receberam inicialmente as seguintes medicações: ketamina 20 mg/kg (sedativo), rompum 0,2 mL/kg (anestésico geral e relaxante muscular) e aceplan 0,08 mL/kg (anestésico geral). Tricotomizou-se o pelo de ambas as pernas, realizou-se antiseptia, e o local foi anestesiado com xilocaína (anestesia local). Uma incisão foi feita próximo ao leito cirúrgico, e colocaram-se os enxertos instalados na região proximal da epífise sob irrigação salina. Após a instalação, os tecidos foram cuidadosamente suturados com fio de seda (Ethicon – Johnson's & Johnson's 4.0) (KÖNIG JR.; LOPES, 2002).

2.5 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 um microscópio eletrônico de varredura Philips modelo XL 30 acoplado a um 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 duas horas, e, em seguida, realizou-se a desidratação na seguinte série de álcool etílico com graduações: 70%, 80%, 90%, 95% e absoluto (100%). Para melhorar a condutividade elétrica do material, as amostras foram imersas em solução de tetróxido de ósmio 2% por duas horas e depois secadas pelo método do ponto crítico (Baltec, CPD 030). Realizou-se a montagem do material em uma base de alumínio, e o conjunto foi recoberto com uma camada de ouro-paládio através da técnica de *sputtering* (Balzers Union, SCD).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste da citotoxicidade

A Gráfico 1 mostra o resultado da avaliação da citotoxicidade das amostras contendo 8%, 10%, 13% e 15% em mol de óxido de nióbio, segundo a norma ISO 10993-5.

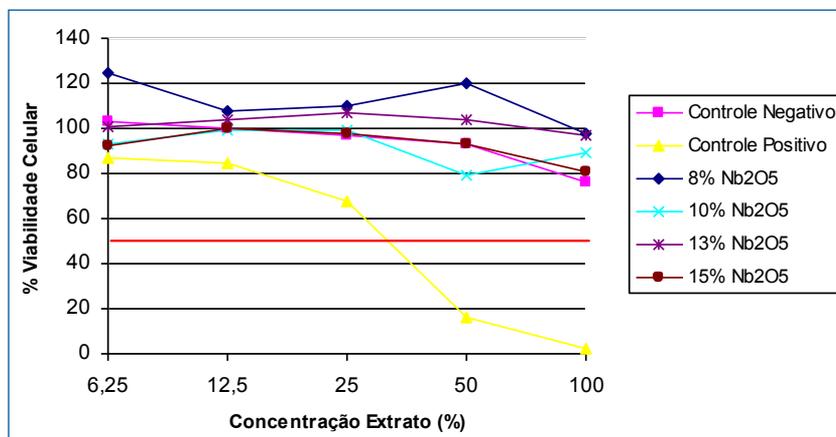


Gráfico 1 Resultados obtidos por meio dos testes de citotoxicidade das amostras contendo 8%, 10%, 13% e 15% em mol de óxido de nióbio segundo a norma ISO 10993-5.

Fonte: Elaborado pelos autores.

O potencial citotóxico pode ser quantificado através do índice de citotoxicidade, expresso como IC50(%). Esse índice é facilmente determinado por meio do gráfico do percentual da viabilidade celular em relação aos controles e à concentração do extrato. O IC50(%) é a concentração do extrato necessária para exterminar metade da população celular. Pode ser observado pelos resultados do Gráfico 1 que o controle negativo (alumina) não apresenta efeitos tóxicos (IC50(%) > 100), o controle positivo (solução fenol) apresenta toxicidade (IC50(%) = 33), e todos os extratos que representam as quatro composições diferentes dos vidros não apresentam citotoxicidade.

3.2 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

A Gráfico 2 apresenta os espectros FTIR de transmitância no infravermelho para amostras com teores de óxido de nióbio de 8%, 10%, 13% e 15% em mol.

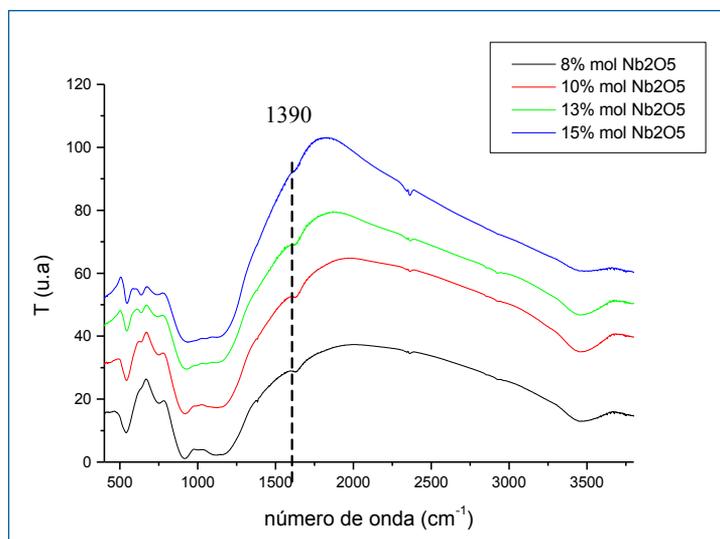


Gráfico 2 Espectros FTIR para amostras contendo 8%, 10%, 13% e 15% em mol de óxido de nióbio.

Fonte: Elaborado pelos autores.

As bandas relacionadas ao número de onda no intervalo de 500 cm^{-1} até 1.200 cm^{-1} (infravermelho longo) nos fornecem informações a respeito dos grupos estruturais presentes no vidro. As bandas relacionadas ao número de onda no intervalo de 1.200 cm^{-1} até 3.500 cm^{-1} (infravermelho curto) nos fornecem informações sobre grupos relacionados à água presente no vidro.

Para uma melhor análise das bandas, os espectros FTIR foram separados de acordo com o número de onda (infravermelho curto ou longo) e são apresentados nas figuras 3 e 4, respectivamente. Geralmente, os tetraedros apresentam uma ligação (P = O) cuja banda característica situa-se na região de 1.390 cm^{-1} . A introdução dos modificadores (Na^+ e Ca^{2+}) em grandes quantidades, em vidros fosfatos, provoca a diminuição dessa dupla ligação (ARANHA, 1994). Essa banda, apesar de não ser observada claramente, diminui com o aumento do teor de nióbio. Podemos admitir que a ligação P = O ocorre em pequena quantidade mesmo para baixos teores de nióbio.

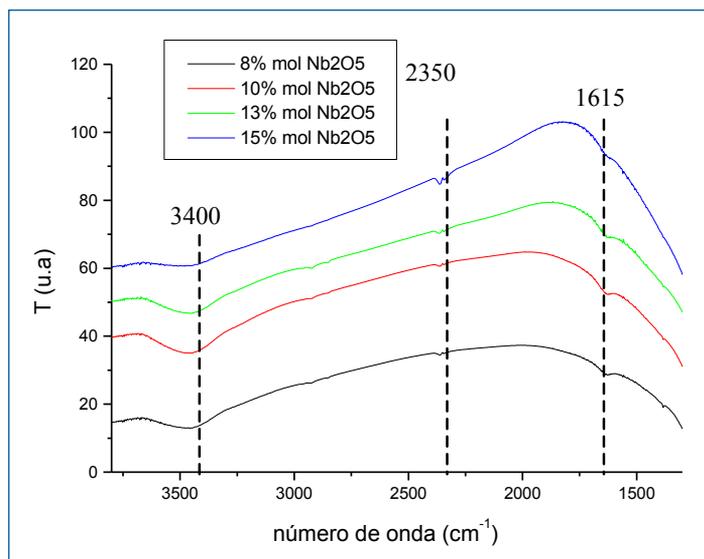


Gráfico 3 Espectros FTIR no infravermelho curto para amostras contendo 8%, 10%, 13% e 15% em mol de óxido de nióbio.

Fonte: Elaborado pelos autores.

Pode-se observar, em 3.400 cm^{-1} , uma banda que diminui de intensidade à medida que o teor de óxido de nióbio é aumentado. Essa absorção é característica dos ramos esquerdo e direito das vibrações e rotações da água. Essas moléculas de água encontram-se provavelmente na superfície do vidro absorvida da atmosfera (SENE, 2002; BIOLOGICAL EVALUATION..., 1992; ROGERO et al., 2000; NAKAMURA et al., 1989; KÖNIG JR.; LOPES, 2002; ARANHA, 1994). Uma banda de pequena intensidade em 2.350 cm^{-1} pode ser observada apenas nas amostras contendo 13% e 15% em mol de óxido de nióbio. Essa banda é atribuída à presença de CO_2 retido na matriz vítrea. O CO_2 pode ser proveniente da decomposição do Na_2CO_3 utilizado com material precursor do vidro ou, mais provavelmente, da presença do

CO_2 na atmosfera. Uma banda em 1.650 cm^{-1} que também diminui de intensidade à medida que o teor de óxido de nióbio é aumentado igualmente está associada com a presença de OH e H_2O , por causa das vibrações de deformação de H_2O . Essa banda indica a presença de água no sistema. As moléculas de água relacionadas a essa banda devem estar na forma de moléculas livres, provavelmente intersticiais, na rede vítrea, porém associadas por pontes de hidrogênio (ARANHA, 1994). A Gráfico 4 apresenta os espectros FTIR no infravermelho longo para as amostras contendo 8%, 10%, 13% e 15% em mol de óxido de nióbio.

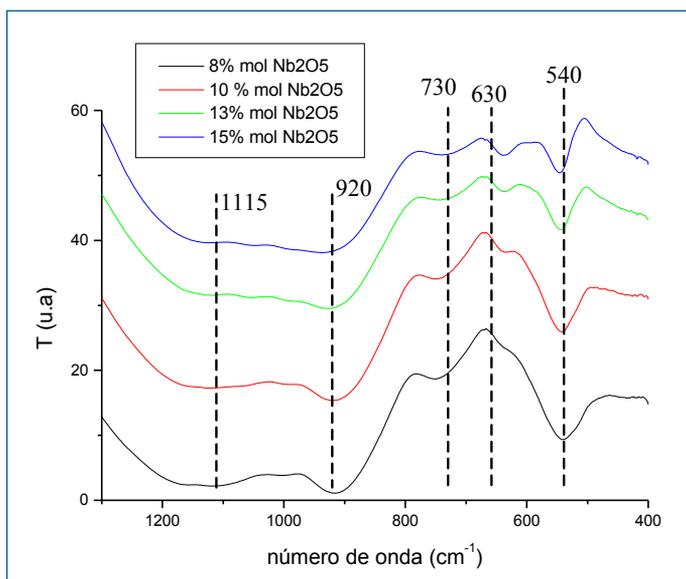


Gráfico 4 Espectros FTIR no infravermelho longo para amostras contendo 8%, 10%, 13% e 15% em mol de óxido de nióbio.

Fonte: Elaborado pelos autores.

A banda de absorção centrada em 540 cm^{-1} está relacionada ao modo acoplado, envolvendo ligações O-Nb de média distância, vibração de deformação de ligações O-P-O de grupos $(\text{PO}_4)^{3-}$ e modo acoplado O-Nb-O-P. Observa-se que a intensidade dessas 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. Esse fato indica que os grupos envolvendo fósforo são os principais responsáveis pela intensidade dessas bandas.

A banda centrada em torno de 630 cm^{-1} indica a presença de octaedros NbO_6 no sistema. Essa banda aumenta de intensidade com o aumento do teor de óxido de nióbio.

3.3 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 1 mostra a topografia do osso neoformado na região medular.

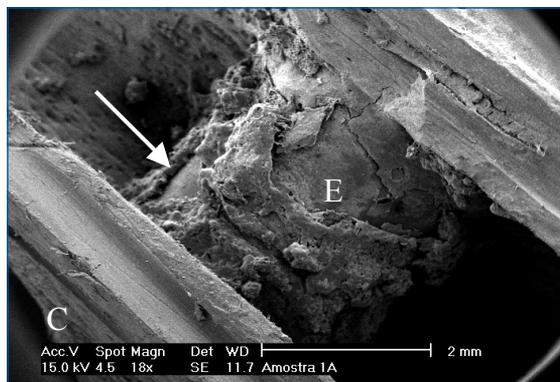


Figura 1 Micrografia eletrônica de varredura do enxerto instalado na tíbia do coelho. Observa-se a deposição óssea por toda extensão do enxerto. Cortical (C), enxerto (E). Elétrons secundários.

Fonte: Acervo dos autores.

Na Figura 1, pode ser observado que ocorreu deposição de tecido ósseo por toda a superfície do enxerto, inclusive na região medular. A Figura 2 mostra a região indicada pela seta na Figura 1, em escala ampliada.

A deposição do tecido ósseo ocorreu diretamente sobre a superfície do enxerto, inclusive em regiões afastadas da cortical, como pode ser observado na Figura 2.

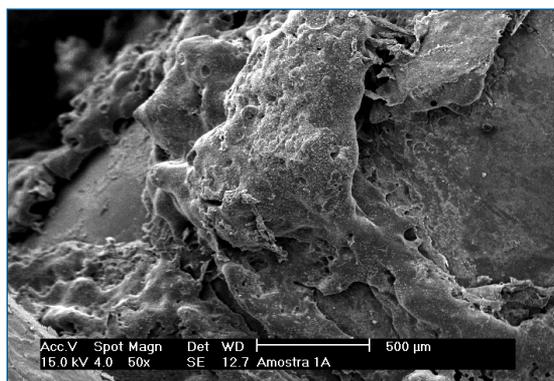


Figura 2 Micrografia eletrônica de varredura da superfície do enxerto. Observa-se o contato do tecido ósseo na superfície do vidro.

Fonte: Acervo dos autores.

Para identificar possíveis contaminações dos elementos presentes no material de enxertia, foi utilizada espectroscopia de energia dispersiva sobre a superfície do enxerto e no tecido depositado. A Figura 3 mostra o resultado da espectroscopia de energia dispersiva realizada na interface do tecido neoformado sobre a superfície do enxerto.

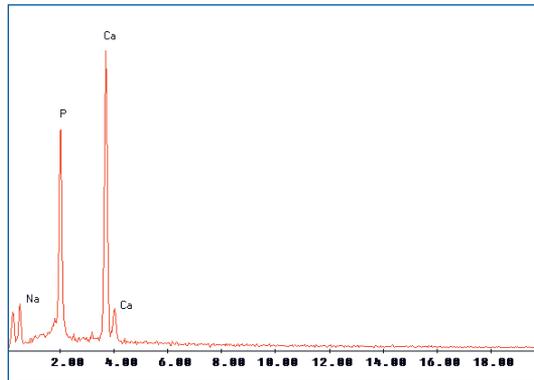


Figura 3 Espectro de energia dispersiva do tecido neoformado sobre a superfície do implante.

Fonte: Elaborado pelos autores.

Na Figura 3, pode-se observar a ausência de nióbio no tecido neoformado. Os elementos detectados através dessa análise são cálcio e fósforo, principais constituintes da parte mineral do osso.

4 CONCLUSÕES

Os resultados do teste de citotoxicidade mostraram que os vidros não apresentaram toxicidade.

O aumento do teor de óxido de nióbio contribui para a diminuição da quantidade de moléculas de água presente na estrutura do vidro e também favorece a formação de octaedros do tipo NbO_6 no sistema.

A deposição do tecido neoformado ocorre diretamente sobre a superfície do vidro. Os principais elementos presentes nesse tecido são cálcio e fósforo.

REFERÊNCIAS

- ARANHA, N. *Vidros niobofosfatos: preparação, caracterização e propriedades*. 1994. Tese (Doutorado em Ciências)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.
- BIOLOGICAL evaluation of medical devices. Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO document 10993-5, Part 5, 1992.
- DAY, D. Using glass in the body. *The American Ceramic Society Bulletin*, v. 74, p. 64-68, 1995.
- 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.
- HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. *Journal American Ceramic Society*, v. 74, p. 1486-1510, 1991.
- _____. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, v. 19, p. 1419-1423, 1998.
- 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.
- KASUGA, T.; ABE, Y. Calcium phosphate invert glasses with soda and titania. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 243, p. 70-74, 1999.
- KÖNIG JR., B.; LOPES, C. C. Bone remodeling analysis after placement of dental implants using polyfluorochrome sequential labeling. *Annals of Anatomy*, v. 184, p. 241-244, 2002.
- NAKAMURA, A. et al. Radiation vulcanized natural rubber latex is not cytotoxic. *Proceedings of Japan Atomic Research Institute Jaeri-M*, v. 89, n. 228, p. 79-87, 1989.
- ROGERO, S. O. et al. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. *Toxicology in Vitro*, v. 14, p. 497-504, 2000.
- 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 em Tecnologia Nuclear)–Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- VOGEL, J. et al. Resorbable porous phosphate invert glasses – first in vitro and in vivo results. *Bioceramics*, v. 10, p. 57-60, 1997.
- VOGEL, J.; WANGE, P.; HARTMANN, P. Phosphate glasses and glass-ceramics for medical applications. *Glastechnische Berichte-Glass Science and Technology*, v. 70, p. 220-223, 1997.